

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**DOUGLAS FERREIRA**

**PRODUÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE**  
**METABÓLITO COM ATIVIDADE CITOTÓXICA DE CULTURA DE**  
*Streptomyces carpaticus*

**SÃO CARLOS - SP**

**2011**

**PRODUÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE  
METABÓLITO COM ATIVIDADE CITOTÓXICA DE CULTURA DE**  
*Streptomyces carpaticus*

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**DOUGLAS FERREIRA**

**PRODUÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE**  
**METABÓLITO COM ATIVIDADE CITOTÓXICA DE CULTURA DE**

*Streptomyces carpaticus*

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Engenharia  
Química da Universidade Federal de São Carlos  
como parte dos requisitos necessários à obtenção  
do título de Doutor em Engenharia Química, área  
de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de  
Processos Químicos.

**Orientadores:**

**Prof. Dr. Alberto Colli Badino Júnior**

**Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho**

**SÃO CARLOS - SP**

**2011**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar

F383pi

Ferreira, Douglas.

Produção, isolamento e identificação de metabólito com atividade citotóxica de cultura de *Streptomyces carpaticus* / Douglas Ferreira. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
142 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Engenharia bioquímica. 2. *Streptomyces*. 3. Valinomicina. 4. Atividade citotóxica. I. Título.

CDD: 660.63 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE  
**DOUGLAS FERREIRA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM  
21 DE SETEMBRO DE 2011.

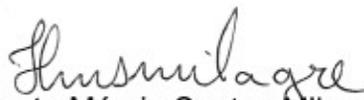
BANCA EXAMINADORA:



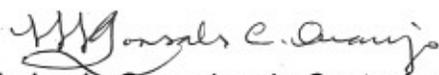
Alberto Colli Badino Júnior  
**Orientador / PPGEQ-UFSCar**



Edson Rodrigues Filho  
**Co-orientador / PPGQ-UFSCar**



Humberto Márcio Santos Milagre  
**UNESP**



Maria Lucia Gonsales da Costa Araújo  
**UNESP**



Quezia Bezerra Cass  
**PPGQ-UFSCar**



Antonio José Gonçalves da Cruz  
**PPGEQ-UFSCar**

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **DOUGLAS FERREIRA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 21 DE SETEMBRO DE 2011.

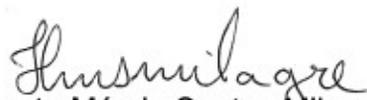
BANCA EXAMINADORA:



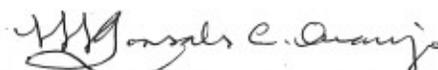
Alberto Colli Badino Júnior  
**Orientador / PPGEQ-UFSCar**



Edson Rodrigues Filho  
**Co-orientador / PPGQ-UFSCar**



Humberto Márcio Santos Milagre  
**UNESP**



Maria Lucia Gonsales da Costa Araújo  
**UNESP**



Quezia Bezerra Cass  
**PPGQ-UFSCar**



Antonio José Gonçalves da Cruz  
**PPGEQ-UFSCar**

Dedico este trabalho aos meus amados pais, pelo exemplo de coragem e persistência em suas metas, aos meus irmãos e sobrinhos pela compreensão, carinho e motivação em todas as circunstâncias desta fase da minha vida.

“Never walk the beaten track, because it will only take you where others have already been.”

Alexander Graham Bell

## AGRADECIMENTOS

A Deus;

Ao Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior, pela oportunidade, confiança, orientação, dedicação e constantes incentivos durante todo o desenvolvimento da pesquisa;

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filhos, pela oportunidade, confiança, dedicação, orientação e preciosos ensinamentos durante o desenvolvimento da pesquisa;

A Prof. Dr<sup>a</sup>. Raquel Carvalho Montenegro e ao doutorando Felipe Rocha Rodrigues pela dedicação e preciosa colaboração na realização dos bioensaios;

A Prof. Dr<sup>a</sup>. Quezia Bezerra Cass pela dedicação, paciência e contribuição neste trabalho;

Aos demais professores do Departamento de Engenharia Química da UFSCar;

Aos demais professores do Departamento de Química da UFSCar;

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSCar;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar;

Ao corpo técnico do Departamento de Engenharia Química – UFSCar: Amadeus Gomes de Azevedo, Oscar, Tiago, Tais e Edilson por estar sempre a disposição em ajudar;

Ao corpo técnico do Departamento de Química – UFSCar: Luciana Vizotto, Valdir Vaz, Paulo, Roberta pela disposição em ajudar em todos os momentos;

Aos pesquisadores, alunos e técnicos do Laboratório de Oncologia Experimental da UFC pela colaboração e dedicação na realização dos ensaios biológicos;

Aos amigos do LaBioMMi pelo companheirismo, dedicação, incentivo, inúmeros momentos de descontração e por terem sido minha família durante todos estes anos;

Ao amigo Gezimar Donizeti de Souza pelo grande incentivo, conselhos e pela imensa contribuição nas frutíferas discussões científicas;

Aos amigos Marília Trap, Taícia Fill, Henrique Finochio, Thiago André, Rodrigo Kitamura, Jame´s Almada e Tiago Lourenço pela amizade, conselhos, constante apoio e incentivos;

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar pelo companheirismo e incentivos;

Aos amigos do Grupo de Síntese Orgânica e CLAE pela amizade e disposição em ajudar sempre;

Aos amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica pela convivência, imensa dedicação na realização de cultivos e convivência durante todos estes anos;

A Dr.<sup>a</sup> Luciana Bueno dos Reis Fernandes pela dedicação e obtenção das imagens de microscopia eletrônica;

A Suelem por estar sempre ao meu lado, somando, incentivando e fazendo de todos os momentos especiais;

A Senhora Elza Spina Fabri por todas as alegrias, amizade e ensinamentos compartilhados;

A minha família por todo incentivo e apoio;

A todos que contribuíram direta e indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

## RESUMO

“PRODUÇÃO, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITO COM ATIVIDADE CITOTÓXICA DE CULTURA DE *Streptomyces carpaticus*” – A presente tese teve como objetivo principal produzir, isolar e identificar substância presente em caldo de cultivo de *Streptomyces carpaticus* que apresentou alta atividade biológica contra as linhagens de células tumorais HL-60 (Leucemia promielocítica humana), MDA-MB 435 (Carcinoma de mama humano), HCT-8 (Carcinoma de cólon humano), SF-295 (Glioblastoma humano). Inicialmente foram realizados cultivos de *Streptomyces carpaticus* em mesa incubadora rotativa em meio de cultura DSMZ 65. Ensaio iniciais de extratos do caldo de cultivo apresentaram atividade antiproliferativa próximas de 100% de inibição frente às linhagens de células tumorais. Com o propósito de se obter maior volume de caldo de cultivo para isolamento do composto de interesse, foram realizados cultivos em biorreator de bancada com 12 L de volume útil. Ao final do cultivo o caldo foi microfiltrado e ultrafiltrado em membranas de 0,22 µm e 3 kDa, o retido foi submetido a partições utilizando diferentes solventes orgânicos (acetato de etila e n-butanol). Os fracionamentos dos extratos foram bioguiados com base nos resultados dos bioensaios e de análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-DAD-MS). Os fracionamentos conduziram ao isolamento e identificação do ciclododecadepsipeptídeo Valinomicina como responsável pela atividade citotóxica, além de evidenciar a linhagem como produtora de ácido isopalmítico. Valores de concentração de inibição (IC<sub>50</sub>) obtidos para o composto isolado do caldo, frente às diferentes linhagens de células tumorais apresentaram baixas concentrações entre 2 e 10 ng.mL<sup>-1</sup>. O uso de biorreatores de bancada, o fracionamento bioguiado e o uso da técnica de espectrometria de massas se revelaram de fundamental importância para o desenvolvimento da pesquisa uma vez que, após descoberto o correspondente composto responsável pela atividade antiproliferativa relatada, foi evidenciado que este é produzido em concentrações muito baixas pela linhagem estudada. A utilização de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas por monitoramento seletivo de íons permitiu a obtenção de uma metodologia de estimativa de produção em quatro diferentes meios de cultura testados, resultado de grande importância para estudos futuros no que se refere ao desenvolvimento do processo de produção e purificação do composto Valinomicina por *S. carpaticus*.

## ABSTRACT

PRODUCTION, ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CITOTOXIC ACTIVITY METABOLITE OF *Streptomyces carpaticus* CULTURE – This study addresses the production, isolation and identification of the substance present in culture broth of *Streptomyces carpaticus* which showed high biological activity against human tumor cell lines HL-60 (promyelocytic leukemia), MDA-MB 435 (breast carcinoma), HCT-8 (colon carcinoma), SF-295 (glioblastoma). Cultures of *Streptomyces carpaticus* in culture medium DSMZ 65 were performed in shake flasks. Initial bioassays of the culture broth extracts showed antiproliferative activity close to 100% inhibition against the tumor cell lines. In order to obtain greater volume of culture medium to isolate the compound of interest, bioreactor cultivations were performed in bioreactor with 12 L working volume. After microfiltration and ultrafiltration of the culture broth through a 0.22-micron and 3 kDa membrane filter, the retentate was then subjected to partitioning using different organic solvents (ethyl acetate and n-butanol). The fractionation of the extracts was bioguided based on the bioassay results and on HPLC-DAD-MS analysis. The fractionations led to the isolation and identification of the cyclodepsipeptide Valinomycin as responsible for cytotoxic activity. In addition, the results showed the strain as isopalmitic acid producer. Values of inhibition concentration ( $IC_{50}$ ) obtained for the compound isolated from the broth, against various tumor cell lines, presented low values ranging between 2 and 10  $ng \cdot mL^{-1}$ . The use of bench scale bioreactor, bioguided fractionation and mass spectrometry proved to be fundamental to the development of this study, because it was evidenced that the discovered compound responsible for the antiproliferative activity is produced at very low concentrations. The use of HPLC-DAD-MS/MS by selective ion monitoring was able to propose a methodology to estimate Valinomycin production in four different culture media tested, an important result for future studies regarding the development of the production and purification process of Valinomycin by *S. carpaticus*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Penicilina G e ácido micofenólico, primeiros produtos naturais isolados de espécies do gênero <i>Penicillium</i> . ....	9
Figura 2.	Estrutura molecular dos compostos Taxol e Captopril. ....	10
Figura 3.	Primeiros metabólitos secundários isolados de fonte marinha. ....	11
Figura 4.	Metabólitos secundários isolados de fonte marinha com atividade citotóxica em linhagens de células tumorais. ....	13
Figura 5.	Estruturas moleculares de alguns antibióticos. ....	18
Figura 6.	Estruturas moleculares de alguns antibióticos. ....	19
Figura 7.	Estruturas moleculares de alguns aminoglicosídeos com atividade antibiótica. ....	20
Figura 8.	Estruturas moleculares de alguns polipeptídios com atividade antibiótica. ....	25
Figura 9.	Layout de um espectrômetro de massas acoplado com CLAE. ....	26
Figura 10.	Eventos que ocorrem na fonte de ionização por ESI de um espectrômetro de massas. ....	28
Figura 11.	Diferentes experimentos que podem ser selecionados pelo analista de acordo com a necessidade de levantamento de informações em um espectrômetro de massas com analisador triplo quadrupolo. Adaptado de Hoffmann (1996). ....	30
Figura 12.	Ilustração esquemática do sistema de filtração. Para ambas as membranas temos em 1 a entrada do caldo, em 2 a saída de caldo não filtrado e em 3 temos a coleta do caldo filtrado. ....	33
Figura 13.	Corte transversal do módulo de microfiltração utilizado no processo de filtração do caldo de cultivo. ....	33

Figura 14.	Ilustração do preenchimento interno da membrana de filtração. ....	34
Figura 15.	Sistema de filtração em operação. ....	34
Figura 16.	Ilustração do equipamento de espectrometria de massas (esquerda) e da fonte de ionização por ESI (direita) utilizados neste trabalho. ....	37
Figura 17.	Conversão do sal MTT em azul de formazan. ....	46
Figura 18.	Experimento de teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> com células tumorais MDA-MB 435 de frações obtidas do caldo de cultivo do <i>Streptomyces carpaticus</i> . ....	47
Figura 19.	Esquema ilustrativo representado as três distintas etapas de preparo do inóculo que antecedem a coleta de amostras durante os experimentos em mesa incubadora com o microrganismo <i>Streptomyces carpaticus</i> . ....	54
Figura 20.	Fluxograma das etapas de fracionamento realizadas com o caldo de cultivo obtido no Experimento S1. ....	57
Figura 21.	Fluxograma das etapas de fracionamento realizadas com o caldo de cultivo obtido no Experimento S2. ....	58
Figura 22.	Fluxograma ilustrativo das etapas realizadas com o caldo de cultivo obtidos dos Experimentos RSc2 e RSc3. ....	59
Figura 23.	Fluxograma das etapas de fracionamento da fração FPD. ....	60
Figura 24 –	Etapas de pré-tratamento de amostras realizadas com caldo de cultivo a serem analisadas por CLAE-ESI-MS/MS via SRM. ....	61
Figura 25.	Ilustração de sistema para preparo de diazometano. ....	61
Figura 26.	Em A, ilustração do procedimento para o preparado do diazometano. Em B temos a metilação da amostra. ....	62
Figura 27.	Detalhamento da rampa de temperatura utilizada na análise em CG-EM. ....	63

Figura 28.	Fotografia da cultura de <i>Streptomyces carpaticus</i> BA-3 realizado em placas de petri em três diferentes meios sólidos após 14 dias de incubação a temperatura de 30 °C. Meio 4, meio DSMZ 65 e meio 5 da esquerda para direita. ....	65
Figura 29.	Produção de pigmentos hidrossolúveis verde oliva em meio sólido DSMZ 65.	65
Figura 30.	Fotografias obtidas por microscopia óptica com aumento de 40x, 100x e 200x, respectivamente. ....	65
Figura 31.	Crescimento do micélio celular com morfologia da cadeia de esporos em espiral estendido obtida por microscopia eletrônica de varredura com aquisição de imagem em condições ambiente em equipamento da FEI modelo Quanta 250.	66
Figura 32.	Fotografia de ampolas contendo a linhagem de <i>Streptomyces carpaticus</i> liofilizada na forma de esporos e células vegetativas. ....	66
Figura 33.	Evolução do crescimento celular, pH, consumo de glicose, maltose e frutose durante o Experimento S1 realizado com <i>S. carpaticus</i> em incubador rotativo com meio DSMZ 65 modificado. ....	68
Figura 34.	Evolução do crescimento celular, consumo de açúcares redutores totais e oxigênio dissolvido durante o Experimento RSc1. ....	74
Figura 35.	Cultivo do <i>S. carpaticus</i> em biorreator - Experimento RSc3 com volume de trabalho de 12 L. ....	75
Figura 36.	Evolução do crescimento celular, consumo de açúcares redutores totais e concentração de oxigênio dissolvido durante o Experimento RSc2. ....	76
Figura 37.	Evolução do crescimento celular, consumo de açúcares redutores totais e concentração de oxigênio dissolvido durante o Experimento RSc3. ....	77
Figura 38.	Cromatogramas das frações EBR23A (A) e EBR23B (B). ....	79
Figura 39.	Resultados dos experimentos de CLAE-EM das frações FPHS13, FPHS14 e FPHS15 no modo ESI- em A, B e C e no modo ESI+ em D, E e F. ....	81

Figura 40.	Em A, B e C os cromatogramas CLAE-DAD (210-400 nm) das frações FPHS13, FPHS14, FPHS15 respectivamente. ....	82
Figura 41.	Espectros de massa da fração FPHS15 (A e B) após processados os TIC ESI- e ESI+ que estão apresentados em C e E. Os cromatogramas de íon selecionado para $m/z$ 1110 (D) e 1134 (F), respectivamente. ....	83
Figura 42.	FPHS15 analisada por inserção direta no modo ESI- do íon selecionado. A) íon produto de $m/z$ 1110 (25 eV); B) íon produto de $m/z$ 957 (35 eV); C) íon produto de $m/z$ 929 (30 eV); D) íon precursor de $m/z$ 957 (25 eV); E) perda neutra de $m/z$ 153 (25 eV); F) perda neutra de $m/z$ 181 (25 eV). ....	84
Figura 43.	Cromatogramas de íon selecionado $m/z$ 1110 (ESI-) e $m/z$ 1134 (ESI+) das frações FPHS13 (A e B), FPHS14 (C e D) e FPHS15 (E e F). ....	85
Figura 44.	Cromatogramas de íon selecionado $m/z$ 1134 das frações S7 (A), S8 (B), S9 (C), S10 (D), S11 (E), S12 (F) e S13 (G). ....	87
Figura 45.	Espectros de íons totais gerados para as frações S10 e S11 respectivamente pelo processamento da banda cromatográfica em 42 min – (A) e (B): ESI- e (C) e (D): ESI+. ....	87
Figura 46.	Estrutura molecular do composto Valinomicina. ....	88
Figura 47.	Perfil cromatográfico CLAE-UV em diferentes comprimentos de onda de Valinomicina comercial. ....	90
Figura 48.	<i>Full scan</i> no modo ESI+ do composto Valinomicina (Sigma-Aldrich, V0627), solução 100 $\mu\text{g/mL}$ em MeOH, volume de injeção 20 $\mu\text{L}$ . ....	90
Figura 49.	Perfil de íons produto de $m/z$ 1112 (ESI+) gerados em diferentes potencias aplicados na cela de colisão do espectrômetro de massas para o padrão Valinomicina. Em A, B, C, D, E e F foram utilizados 30, 35, 38, 40, 45 e 50 eV respectivamente. ....	91
Figura 50.	Esquema geral de fragmentos gerados na ionização de polipeptídios por ESI+ proposto por Roepstorff e Folhlman (1984) e Johnson et al. (1988). ....	92

Figura 51.	Perfil cromatográfico CLAE-UV de Valinomicina comercial e da fração FPHS15. ....	93
Figura 52.	Comparação do perfil de íons produto de $m/z$ 1112 (ESI+) gerados em diferentes potenciais aplicados na cela de colisão do espectrômetro de massas utilizados para a fração FPep. Em A, B, C, D e E foram utilizados 20, 30, 35, 40 e 45 eV respectivamente. ....	93
Figura 53.	Comparação do padrão de fragmentação do íon $m/z$ 1112.0 para o padrão comercial Valinomicina em (A) e para o composto com atividade antiproliferativa isolado do caldo de fermentação do <i>S. carpathicus</i> (B) obtidos por CID (40 eV) ESI+-EM/EM.....	95
Figura 54.	Em A tem-se o TIC obtido por análise em GS-EIMS. Em B tem-se o espectro de fragmentação após processamento da banda com tempo de retenção em 19,92 em A. ....	98
Figura 55.	Fragmentos característicos de ésteres de ácidos graxos. Em <b>A</b> tem-se a ionização por impacto eletrônico seguida pela migração de hidrogênio. Em <b>B</b> tem-se a fragmentação na ligação $\alpha$ - $\beta$ (rearranjo de McLafferty) gerando o íon $m/z$ 74. Em <b>C</b> e <b>D</b> tem-se uma migração de hidrogênio seguida da fragmentação no $C_3$ - $C_4$ gerando o íon $m/z$ 87. Em <b>E</b> e <b>F</b> tem-se uma migração de hidrogênio seguida da fragmentação no $C_7$ - $C_8$ gerando o íon $m/z$ 143. ....	99
Figura 56.	Fórmula estrutura do ácido 14-metilpentadecanóico. ....	99
Figura 57.	Espectro de íons produto para diferentes íons formados para o padrão Valinomicina. A - $[M+H]^+$ $m/z$ 1112 $m/z$ (CID 40 eV), B - $[M+NH_4]^+$ $m/z$ 1129 (CID 40 eV), C - $[M+Na]^+$ $m/z$ 1134 (CID 75 eV), D - $[M+K]^+$ $m/z$ 1150 (CID 90 eV).....	101
Figura 58.	Cromatograma SRM para o composto Valinomicina. Solução 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ MeOH. Em A monitoramento da transição 1129 $\rightarrow$ 1084. Em B monitoramento das transições 1112 $\rightarrow$ 1084, 1129 $\rightarrow$ 1084, 1134 $\rightarrow$ 592, 1150 $\rightarrow$ 607. ....	101
Figura 59.	Curva de calibração para o padrão Valinomicina no intervalo de concentrações de 3 a 3000 $\text{ng.mL}^{-1}$ . ....	102

Figura 60.	Cromatogramas SRM para o composto Valinomicina. A transição monitorada foi 1129→1084. Em A e B maior concentração da curva de calibração. Em C e D menor concentração da curva de calibração. ....	103
Figura 61.	Cromatogramas com detecção por SRM para o composto Valinomicina (transição monitorada 1129→1084). Em A amostra de meio DSMZ 65 sem adição inóculo fortificada com padrão na concentração de 500 ng.mL <sup>-1</sup> . Em B, C, D e E temos os cromatogramas para os meios DSMZ 65, NBIMCC 185, DSMZ 246 e DSMZ 545 respectivamente sem fortificação (brancos). ....	104
Figura 62.	Evolução do crescimento celular, consumo de açúcares redutores totais, pH e produção de Valinomicina em meio DSMZ 65. ....	107
Figura 63.	Evolução do crescimento celular, consumo de açúcares redutores totais, pH e produção de Valinomicina em meio NBIMCC 185. ....	107
Figura 64.	Evolução do crescimento celular, consumo de açúcares redutores totais, pH e produção de Valinomicina em meio DSMZ 246. ....	108
Figura 65.	Evolução do crescimento celular, consumo de açúcares redutores totais, pH e produção de Valinomicina em meio DSMZ 545. ....	108
Figura 66.	Crescimento celular obtido no cultivo do <i>S. carpaticus</i> nos meios DSMZ 65, 246, 545 e NBIMCC185. ....	109
Figura 67.	Perfil de produção de Valinomicina dos diferentes meios avaliados. ....	109
Figura 68.	Espectros de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, RMN 200 MHz) do extrato EBS2A. ....	126
Figura 69.	Espectros de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, RMN 200 MHz) do extrato EBS2B. ....	127
Figura 70.	Espectros de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, RMN 200 MHz) do extrato <b>EBS2C</b> . ....	128
Figura 71.	Espectros de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, RMN 400 MHz) da fração <b>FPHS15</b> . ....	129
Figura 72.	Espectros de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , RMN 400 MHz) da fração <b>FPHS18</b> . ....	130

Figura 73.	Espectros de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , RMN 400 MHz) da fração S10 (A). B e C são ampliações de algumas regiões do espectro. ....	131
Figura 74.	Espectros de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , RMN 400 MHz) da fração <b>S12</b> . ....	132
Figura 75.	Espectros de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , RMN 400 MHz) da substância D3F9. ....	133
Figura 76.	Espectros de COSY ( $\text{CDCl}_3$ , RMN 400 MHz) da substância D3F9. ....	134
Figura 77.	Mapas de contorno de HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , RMN 400 MHz) da substância D3F9. ....	135
Figura 78.	Mapas de contorno de HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , RMN 400 MHz) da substância D3F9. ....	136
Figura 79.	Espectros de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , RMN 400 MHz) da banda selecionada na Figura 47 que foi coletada por injeção do padrão Valinomicina por CLAE-UV (210 nm) (A). B, C, D, E, F e G ampliações de algumas regiões do espectro. ....	137
Figura 80.	Espectros de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , RMN 400 MHz) da fração PHex. ....	138

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Novos metabólitos isolados de actinomicetos marinhos durante o período de 2003 – 2005 (LAM, 2006). .....	14
Tabela 2.	Produtos naturais de interesse isolados do gênero <i>Streptomyces</i> . .....	16
Tabela 3.	Produtos Naturais de origem microbiana em desenvolvimento clínico como agentes anticancerígenos (LAM, 2007). .....	22
Tabela 4.	Meio de cultura 4 (INORGANIC SALTS-STARACH AGAR, Küster, 1959a) (SHIRLING, GOTTLIEB, 1966). .....	40
Tabela 5.	Meio de cultura 5 (GLYCEROL-ASPARAGINE ÁGAR, Pridham and Lyons 1961) (SHIRLING, GOTTLIEB, 1966). .....	40
Tabela 6.	Meio de cultura DSMZ 65 (GYM <i>Streptomyces</i> Medium) (GERMAN COLLECTION OF MICROORGANISMS AND CELL CULTURES, 2011). .....	41
Tabela 7.	Meio de cultura DSMZ 65 com adição de sal marinho. ....	41
Tabela 8.	Preparo da solução de traço de sais (SHIRLING, GOTTLIEB, 1966). .....	41
Tabela 9.	Meio de cultura NBIMCC 185 (Glucose Medium for <i>Streptomyces</i> ) (NATIONAL BANK FOR INDUSTRIAL MICROORGANISMS AND CELL CULTURES, 2011). .....	42
Tabela 10.	Meio de cultura DSMZ 246 (Sea Water Agar) (GERMAN COLLECTION OF MICROORGANISMS AND CELL CULTURES, 2011). .....	42
Tabela 11.	Meio de cultura DSMZ 545 (Tryptone Soya Broth - TSB) (GERMAN COLLECTION OF MICROORGANISMS AND CELL CULTURES, 2011). .....	42
Tabela 12.	Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> através do método do MTT. ....	48

Tabela 13.	Características de morfologia e de cultura do microrganismo marinho <i>Streptomyces carpaticus</i> .....	64
Tabela 14.	Massas obtidas dos extratos no Experimento S1. ....	69
Tabela 15.	Grau de inibição do crescimento celular (GI em %) das amostras em três linhagens tumorais testadas em diferentes concentrações. Valores correspondem à média (GI) ± Desvio Padrão (DP).....	69
Tabela 16.	Grau de inibição do crescimento celular (GI em %) das amostras em quatro linhagens tumorais testadas na dose única de 50µg/mL. Valores correspondem à média (GI) ± Desvio Padrão (DP).....	71
Tabela 17.	Grau de inibição do crescimento celular (GI em %) das amostras em quatro linhagens tumorais testadas na dose única de 50µg/mL. Valores correspondem à média (GI) ± Desvio Padrão (DP).....	71
Tabela 18.	Grau de inibição do crescimento celular (GI em %) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 25µg/mL. Valores correspondem à média ± Desvio Padrão (DP).....	72
Tabela 19.	Valores das variáveis de cultivo obtidos nos experimentos realizados em reatores convencionais para o microrganismo em estudo.....	77
Tabela 20.	Grau de inibição do crescimento celular (GI em %) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50µg/mL. Valores correspondem à média (GI) ± Desvio Padrão (DP).....	78
Tabela 21.	Grau de inibição do crescimento celular (GI em %) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 25µg/mL para a fração FPH 14 e 50 µg/mL para as demais frações. Valores correspondem à média (GI) ± Desvio Padrão (DP).....	80
Tabela 22.	Grau de inibição do crescimento celular (IC <sub>50</sub> em µg.mL <sup>-1</sup> ) das amostras FPH, PPD, FPHS14 e FPHS15 em linhagem tumoral SF-295. Em parênteses encontram-se os intervalos de confiança.....	80

Tabela 23.	Grau de inibição do crescimento celular ( $IC_{50}$ em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) das amostras S789, S10 e S12 em linhagens tumorais. Em parênteses encontram-se os intervalos de confiança. ....	86
Tabela 24.	Diferentes espécies de <i>Streptomyces</i> produtoras de Valinomicina. ....	89
Tabela 25.	Diferentes fragmentos obtidos do espectro EM/EM de $m/z$ 1112. ....	94
Tabela 26.	Grau de inibição do crescimento celular ( $IC_{50}$ em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) das amostras FPHS 15 e FPep em quatro diferentes linhagens tumorais. Em parênteses encontram-se os intervalos de confiança. ....	96
Tabela 27.	Deslocamentos químicos atribuídos aos sinais de hidrogênios e carbonos via mapa de contorno do HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , RMN 400 MHz) da substância D3F9. ...	97
Tabela 28.	Valores obtidos para a recuperação (em %) do composto Valinomicina produzida pelo <i>S. carpaticus</i> em quatro diferentes meios de cultivo. Valores são média $\pm$ desvio padrão. ....	105
Tabela 29.	Valores das concentrações de açúcares obtidos no cultivo <i>S. carpaticus</i> em meio DSMZ 65. ....	139
Tabela 30.	Valores da concentração celular, pH e Valinomicina obtidos no cultivo <i>S. carpaticus</i> em meio DSMZ 65. ....	139
Tabela 31.	Valores das concentrações de açúcares obtidos no cultivo <i>S. carpaticus</i> em meio NBIMCC 185. ....	140
Tabela 32.	Valores da concentração celular, pH e Valinomicina obtidos no cultivo <i>S. carpaticus</i> em meio NBIMCC 185. ....	140
Tabela 33.	Valores das concentrações de açúcares obtidos no cultivo <i>S. carpaticus</i> em meio DSMZ 246. ....	141
Tabela 34.	Valores da concentração celular, pH e Valinomicina obtidos no cultivo <i>S. carpaticus</i> em meio DSMZ 246. ....	141

Tabela 35.	Valores das concentrações de açúcares obtidos no cultivo <i>S. carpaticus</i> em meio DSMZ 545.....	142
Tabela 36.	Valores da concentração celular, pH e Valinomicina obtidos no cultivo <i>S. carpaticus</i> em meio DSMZ 545.....	142

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

### ENTIDADES

FDA	Food and Drug Administration
LaBioMMi	Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos
LEB	Laboratório de Engenharia Bioquímica
LOE	Laboratório de Oncologia Experimental
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos

### SOLVENTES, FASES ESTACIONÁRIAS, REAGENTES E MEIOS DE CULTURA

Acet	Acetona
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio Deuterado
CD <sub>3</sub> OD	Metanol Deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
C <sub>18</sub>	Octadecilsilano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
Hex	Hexano
MeOH	Metanol
n-But	n-Butanol

### TÉCNICAS ANALÍTICAS

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CID-MS/MS	Collision-Induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD	Detector de Arranjo de Diodo
EM	Espectrômetro de Massas
EI	Electron Impact
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
ESI	Electrospray Ionization
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	Índice de Refração
LC	Liquid Chromatography
LC-MS	Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry
LC-MS/MS	Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
SPE	Solid-Phase Extraction
SRM	Selected Reaction Monitoring
TIC	Total Ion Chromatogram
UV	Ultravioleta

### PARÂMETROS E GENERALIDADES

COSY	Correlation Spectroscopy
$C_x$	Concentração celular total em gramas por litro
Da	Dalton
MHz	Megahertz
MM	Massa Molecular
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
$m/z$	Mass-to-charge ratio
ppm	Parts per Million
rpm	Rotações por minuto
$\sigma$	Desvio Padrão
$\bar{X}$	Média
$\delta$	Chemical Shift

## SUMÁRIO

1	Introdução .....	1
2	Objetivo.....	7
3	Revisão Bibliográfica.....	8
3.1	Produtos naturais .....	8
3.1.1	Produtos naturais marinhos .....	11
3.2	Estreptomicetos.....	14
3.3	O câncer .....	20
3.4	Biossíntese dos peptídeos .....	22
3.5	Espectrometria de massas: uma técnica espectroscópica .....	26
3.6	Comentários finais sobre a revisão bibliográfica.....	30
4	Materiais e métodos .....	32
4.1	Materiais .....	32
4.1.1	Microrganismo .....	32
4.1.2	Meios de cultura .....	32
4.1.3	Equipamentos utilizados.....	32
4.1.4	Materiais e equipamentos diversos.....	38
4.2	Métodos .....	39
4.2.1	Métodos analíticos.....	39
4.2.2	Preparo de meio de cultura.....	40
4.2.3	Preparo de solução lioprotetora .....	43
4.2.4	Determinação da concentração celular pelo método gravimétrico (massa seca) .....	43
4.2.5	Velocidade específica máxima de crescimento celular .....	44
4.2.6	Tempo de geração, $t_G$ .....	44
4.2.7	Determinação do coeficiente de rendimento celular ( $Y_{X/S}$ ).....	45
4.2.8	Bioensaios.....	45
4.2.9	Avaliação do potencial citotóxico de substâncias presentes no caldo da linhagem em estudo frente a diferentes linhagens de células tumorais .....	46
4.2.10	Metodologia de preservação da linhagem <i>Streptomyces carpaticus</i> .....	48

4.3	Cultivos em meio líquido .....	52
4.3.1	Protocolos de cultivos em incubador rotativo e em biorreator .....	53
4.4	Empacotamento de coluna analítica .....	54
4.5	Condições cromatográficas aplicadas nas análises por HPLC-UV e HPLC-IR.....	55
4.6	Condições cromatográficas aplicadas nas análises por HPLC-ESI-MS para frações ativas	55
4.7	Condições instrumentais aplicadas nas análises por HPLC-ESI-MS/MS via SRM...	56
4.8	Fracionamento das amostras obtidas do caldo de cultivo do <i>S. carpaticus</i> .....	56
4.9	Tratamento de amostras aplicado nas análises por CLAE-ESI-EM/EM.....	60
4.10	Preparo de diazometano para metilação de ácidos carboxílicos.....	61
4.11	Análises por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas	62
5	Resultados e discussão .....	64
5.1	Levantamento da cinética de crescimento celular e avaliação da atividade citotóxica em diferentes linhagens de células tumorais presente no caldo de cultivo do <i>Streptomyces carpaticus</i> .....	64
5.2	Levantamento da cinética de crescimento celular do <i>Streptomyces carpaticus</i> em biorreator e isolamento de composto bioativo. ....	72
5.3	Isolamento de ácido 14-metilpentadecanóico.....	96
5.4	Desenvolvimento de estimativa de produção de Valinomicina no caldo de cultivo do <i>Streptomyces carpaticus</i> .....	100
6	Conclusões .....	110
7	Bibliografia .....	112
8	APÊNDICE A .....	126
9	APÊNDICE B .....	139

## 1 Introdução

Nas últimas décadas, a procura por novos compostos bioativos tem aumentado significativamente com a melhoria dos procedimentos de triagem, isolamento e testes de novas substâncias para detectar propriedades de natureza antimicrobiana, antitumoral, anti-HIV e anti-beta-lactamásica dentre outras. A grande diversidade de compostos químicos sintetizados por espécies de plantas, animais, microrganismos e fungos é resultado da evolução na seleção e conservação de importantes mecanismos de defesa utilizados para repelir, paralisar ou matar predadores ou parasitas (CRAGG, NEWMAN, SNADER, 1997; FAULKNER, 2000).

O uso dos microrganismos como fontes de novos fármacos teve como marco a descoberta da penicilina produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum* que foi utilizada no tratamento de infecções provocadas por bactérias e sua produção industrial foi impulsionada pela Segunda Guerra Mundial, pelo aumento da disseminação de doenças na população mundial e pelo avanço na qualidade de diagnósticos das doenças. Contudo a administração prolongada deste e de outros antibióticos e outros fármacos ocasionou a seleção e o aparecimento de microrganismos resistentes aos mesmos tornando sua prescrição limitada, fazendo-se necessário o estudo de compostos com amplo espectro de ação aos microrganismos. Atualmente, o número de novos fármacos oriundos de microrganismos é praticamente ilimitado e leva à procura de compostos bioativos potencialmente úteis para aplicações terapêuticas, possibilitando sua aplicação no tratamento de inúmeras doenças como câncer, infecções bacterianas e inflamações (CRAGG, NEWMAN, SNADER, 1997; RACHEV et al., 2003; CHIN et al., 2006).

Os microrganismos, bem como as plantas e animais, possuem a capacidade de produzirem inúmeras classes de moléculas sendo estas de natureza micro ou macromolecular que desempenham cada qual, um papel importante para a manutenção da vida do indivíduo. Sabe-se que as moléculas de natureza peptídica ou polipeptídica são responsáveis por inúmeros papéis importantes nos processos de defesa, garantindo assim a manutenção da vida dos organismos. Assim falando, os microrganismos são sofisticadas fábricas de moléculas das mais variadas classes de compostos. São verdadeiros laboratórios especializados em sintetizarem moléculas muitas vezes extremamente difíceis de serem reproduzidas pelos químicos sintéticos. Os microrganismos sintetizam estes compostos com inúmeras finalidades, porém todas voltadas a trazerem algum benefício e a perpetuação de suas espécies. Inúmeras teorias, cada qual com sua

proposta, tentam entender porque unidades tão primitivas possuem habilidades tão espetaculares. As publicações científicas deixam cada vez mais evidente a existência de um processo de evolução em andamento e que microrganismos, plantas e animais fazem com que a relação entre esses organismos sempre traga benefícios e habilidades antes inexistentes.

Os produtos naturais podem pertencer às mais diferentes classes de substâncias orgânicas e serem derivados do metabolismo primário que são todas substâncias com distribuição não restrita envolvidas diretamente no crescimento dos microrganismos ou ainda derivados do metabolismo secundário que são aquelas substâncias produzidas após a fase de crescimento micelial, não essenciais para o crescimento e reprodução e que podem desempenhar papel de defesa como é o caso dos antibióticos (DEMAIN, 1998; HAAVIK, 1979; PRICE-WHELAN, DIETRICH, NEWMAN, 2006). Segundo Rachev et al. (2003), aproximadamente 70% das substâncias bioativas conhecidas são sintetizadas por Actinomicetos. O gênero *Streptomyces* se caracteriza como excelente fonte de metabólitos secundários em que intermediários comuns na célula (aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos, etc.) são condensados a estruturas complexas por meio de passos bioquímicos definidos (OMURA et al., 2001). *Streptomyces* produzem metabólitos secundários com uma ampla diversidade estrutural incluindo não só substâncias antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antitumorais, como também moléculas com propriedades imunossupressoras, anti-hipertensivas e anti-hipercolesterolêmicas (HOPWOOD, 2007). Como exemplo da grande diversidade de compostos bioativos produzidos por *Streptomyces* pode-se citar antibióticos (estreptomicina, retamicina, eritromicinas, tetraciclinas, compostos beta-lactâmicos como cefamicina C e ácido clavulânico), antitumorais (mitomicina, daunomicina, doxorubicina), e imunossupressores (rapamicina e FK506), dentre outros.

Processos fermentativos que utilizam microrganismos são conhecidos e usados pela sociedade há séculos com finalidades de produção de bebidas, queijos, pães e fármacos, porém, o surgimento da indústria teve como marco a necessidade de consumo e padronização destes produtos motivados pelas guerras mundiais. Nos dias atuais, é essa modernização do processo que garante a disponibilidade rápida e em grandes quantidades destes produtos em casos de epidemias e grandes catástrofes. Considerada a complexidade e muitas das vezes a instabilidade de alguns compostos, o processo de produção precisa ser projetado, modelado e otimizado de forma integrada, considerados os setores de cultivo, extração e purificação etapas as quais irão garantir a eficiência e o sucesso do processo como um todo. A indústria biotecnológica

conta com modernos equipamentos capazes de controlar inúmeras etapas do processo garantindo assim sua maior eficiência.

Nestas descobertas está a figura do pesquisador que, movido pela curiosidade e motivado pela busca incessante do conhecimento, consegue muitas das vezes, grandes descobertas devido a sua capacidade de observar fatores que ocorrem ao largo do planejamento e da lógica traçada para o projeto de pesquisa, sendo desta forma a capacidade de observação um requisito essencial de um bom profissional.

Inúmeros trabalhos científicos abrangendo produtos naturais marinhos têm sido publicados nas últimas três décadas. Os oceanos cobrem mais de 71% da superfície da Terra e da mesma forma que o ecossistema terrestre, o ecossistema marinho é extremamente diversificado em formas de vida. O papel dos microrganismos na ecologia marinha é basicamente o mesmo dos microrganismos na ecologia terrestre e esta é uma das explicações para a potente atividade biológica e o ascendente interesse dos pesquisadores em explorar esse ambiente e seus organismos como fontes de compostos que conduzam a descoberta de novos fármacos. Os interesses dos pesquisadores estão relacionados com a prospecção de compostos com atividade antitumoral, atividade citotóxica, atividade anti-HIV, atividade anti-hipertensiva e atividade anti-infecciosa sendo que inúmeros compostos já estão sendo usados em ensaios clínicos (HARVEY, 2008; HILL, 2004; WIJESEKARA, KIM, 2010).

O meio ambiente marinho é uma ampla fonte desta variedade ainda pouco explorada. Os microrganismos marinhos ocupam ambientes de pressão, salinidade e temperatura extremas. Alguns desenvolveram capacidades fisiológicas e metabólicas únicas que lhes permitem sobreviver sob esta grande variedade de habitat extremo além de lhes conferir potencial para a produção de metabólitos não produzidos pelos microrganismos terrestres (CARVALHO, FERENANDES, 2010; LAM, 2006). Bactérias marinhas são fontes abundantes de peptídeos e depsipeptídeos cíclicos bioativos. A oportunidade de descobrir novas espécies e então, novos compostos químicos com potencial de desenvolvimento industrial de novos fármacos, produtos cosméticos, suplementos nutricionais, agroquímicos e outros têm aumentado através da aplicação de novos recursos para explorar o meio marinho. Isto, combinado com os atuais conhecimentos dos mecanismos de ação das doenças aumenta a capacidade de descoberta de novos compostos com finalidade terapêutica (BUTLER, 2004; FAULKNER, 2000; GULLO et al., 2006; HERNÁNDEZ et al., 2004; JENSEN et al., 2005; ZOTCHEV, 2011).

O desenvolvimento do presente trabalho baseou-se na investigação de uma linhagem de *Streptomyces* disponível no laboratório do grupo de pesquisa em Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química e que foi isolada de sedimentos marinhos coletados no município de São Sebastião, litoral sul do Estado de São Paulo, sendo que após a caracterização microbiológica e identificação por sequenciamento de rDNA 16S, a linhagem mostrou 100% de similitude com a linhagem de referência *Streptomyces carpaticus* DSM 41468 (BERLINCK et al. 2004; HERNÁNDEZ, 2002). A descoberta da linhagem foi descrita em 1983 por Gauze et al. (1986). Existe apenas um único relato na literatura que revelou um produto com características terapêuticas obtidas de *S. carpaticus*. A patente japonesa da empresa SEKISUI CHEM. IND. CO., LTD (1993) (JP5279262-A) descreve os extratos obtidos do caldo fermentativo de diferentes linhagens de microrganismos, dentre eles o *S. carpaticus*, com atividade capaz de inibir inflamações alérgicas. Entretanto, não há menção de que o princípio ativo foi isolado ou identificado. Como o projeto estava atrelado à avaliação da atividade citotóxica frente a linhagens tumorais das frações (fracionamento bio-guiado) obtidas do caldo de cultivo do microrganismo sob investigação e uma vez que o grupo de Pesquisa da UFSCar envolvido no projeto Temático “Produção e purificação de ácido clavulânico, cefamicina C e outros metabólitos bioativos de *Streptomyces*”, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2005/55079-4) tinha como parceria o grupo de pesquisa do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, foi então firmada colaboração com as pesquisadoras deste grupo (Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia do Ó Pessoa e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Carvalho Montenegro) para que os ensaios biológicos fossem realizados no LOE.

O LOE faz parte do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará. Criado no ano de 1989 pelo Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes que, desde então, vem se dedicando à pesquisa em modelos experimentais para determinação do mecanismo de ação de moléculas de origem natural e sintética com potencial atividade anticâncer, bem como, ao estudo dos mecanismos responsáveis pela gênese das neoplasias primárias e suas metástases dentro de um programa nacional de prospecção envolvendo diversas instituições de pesquisa com vistas à criação da Rede Nacional para Prospecção de Fármacos Anticâncer.

O LOE dispõe de modernos equipamentos e infra-estrutura adequada para o emprego de técnicas de biologia molecular, imunohistoquímica, citogenética, citotoxicidade, avaliação de moléculas em tumores experimentais, microscopia confocal, citometria de fluxo, análise de imagens, e outros, na tentativa de desenvolver novos métodos precisos de diagnóstico e tratamento do câncer. O laboratório conta ainda com um termo de cooperação com o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI-NIH) que contribuiu de forma decisiva para a introdução de técnicas avançadas de bioprospecção, além de disponibilizar as 64 linhagens de células tumorais humanas usadas por essa instituição e que vem contribuindo para aprimorar o padrão de qualidade dos trabalhos e da prestação de serviços realizados pelos seus pesquisadores e desde sua implantação vários trabalhos científicos têm sido publicados (disponível em: [http://www.unifac.med.br/loe/conteudo.asp?ref=loe\\_publicacoes](http://www.unifac.med.br/loe/conteudo.asp?ref=loe_publicacoes)).

Em 2007, o LOE foi selecionado através do edital MCT-CNPq/CT-SAÚDE-Nº 23/2007, para se estabelecer como Laboratório Nacional de Referência na prestação de serviços na área de prospecção de moléculas com potencial atividade antineoplásica e, assim, poder atender as necessidades da indústria farmacêutica nacional dentro dos padrões requeridos internacionalmente pelos órgãos regulamentadores do registro de medicamentos. Ressalte-se também que o LOE encontra-se vinculado ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos (INOFARMED).

Outra parceria importante foi firmada com o Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos que co-orienta a presente tese de doutorado. O Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho é o coordenador do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos (LaBioMMi) e tem vasta experiência na área de Química Orgânica, com ênfase em Química dos Produtos Naturais de Microorganismos investigando a biossíntese de produtos naturais microbianos; biotransformação; fungos endofíticos, produção de antibióticos e inseticidas a partir de fungos filamentosos e Actinomicetos; Espectrometria de Massas, Cromatografia e Ressonância Magnética Nuclear.

Assim, o presente trabalho possui destacada importância para o grupo de pesquisa de Engenharia de Processos Biológicos, dentro da linha de pesquisa de Produção de Metabólitos Bioativos de *Streptomicetos* do Departamento de Engenharia Química da UFSCar. Os resultados deste trabalho podem dar origem ao surgimento de novas linhas de estudo como o: de otimização da produção do metabólito de interesse, estudo de condições de cultivo do

microrganismo em reatores convencionais e não convencionais, levantamento de informações cinéticas que subsidiem o aumento da escala laboratorial para escala piloto de produção do metabólito de interesse, expressão do metabólito com uso de biologia molecular em outros microrganismos (leveduras ou bactérias) que possuam processo industrial totalmente elucidado, além do estudo das etapas de separação e purificação do metabólito de interesse em escala industrial (“downstream”).

## 2 Objetivo

Visto que a descoberta de novas substâncias bioativas depende de constantes buscas, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- 1- a avaliação da capacidade produtora de novos compostos bioativos através da realização de ensaios citotóxicos frente a células tumorais dos extratos do cultivo do microrganismo *Streptomyces carpaticus*;
- 2- isolamento, identificação e caracterização deste(s) composto(s);
- 3- desenvolvimento de uma metodologia de estimativa da concentração do composto em caldo de cultivo.

Os resultados que serão obtidos permitirão definir um protocolo de produção em escala de bancada de compostos bioativos, o que inclui metodologia de preparo e preservação do microrganismo produtor, padronização do preparo de inóculo, desenvolvimento de estudos básicos para produção de novos compostos bioativos de estreptomicetos, incluindo composição de meio de cultura e condições de cultivo como temperatura, pH, agitação, aeração e modo de operação do biorreator.

### 3 Revisão Bibliográfica

#### 3.1 Produtos naturais

Para sobreviver no meio ambiente natural, poder competir por nutrientes com outros microrganismos e garantir a perpetuação da espécie, muitos microrganismos produzem compostos antimicrobianos para inibir ou mesmo matar outras linhagens (HOPWOOD, 2007). O uso de medicamentos e compostos extraídos da natureza na tentativa de curar moléstias humanas remonta de séculos atrás, contudo desde o surgimento da “alquimia” no final da Idade Média e após o médico suíço Paracelsus afirmar a necessidade do uso de medicamentos para combater as enfermidades, estes compostos vêm sendo estudados pela comunidade científica e sendo empregados no combate de moléstias, bem como na indústria de bebidas e cosméticos.

A época de ouro dos antibióticos, também conhecida como a era dos antibióticos, teve início no final da década de 1940 com a descoberta das resistências bacterianas de linhagens de estreptococos, pneumococos as sulfonamidas (compostos sintéticos utilizados na época para o tratamento de infecções). Foi um momento de grande avanço da Química de Produtos Naturais onde inúmeras classes de compostos como tetraciclinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, macrolídeos e inúmeras outras foram descobertas (BUSH, 2010; BÉRDY, 2005; CLARDY, FISCHBACH, WALSH, 2006).

Uma definição usual e no sentido mais amplo é que a Química de Produtos Naturais é a ciência que trata dos compostos químicos isolados e ou derivados de organismos vivos naturais tais como plantas, animais e microrganismos. Estes compostos podem ser provenientes do metabolismo primário ou secundário de organismos (BÉRDY, 2005). Neste contexto a Química de Produtos Naturais está relacionada com o isolamento, elucidação estrutural e o estudo da biossíntese de novos compostos que podem ser utilizados em diversos campos de aplicação pela sociedade.

O ácido micofenólico (1) (Figura 1) isolado do fungo *Penicillium glaucoma* (posteriormente classificado como *P. brevicompactum*) por Bartolomeo Gosio (BENTLY, 2000; BÉRDY, 2005) entre o final do século XIX e início do século XX e a Penicilina G (2) (Figura 1), descoberta do fungo *Penicillium notatum* por Alexander Fleming em 1928 e posteriormente

isolada e desenvolvida como antibiótico pelos cientistas Howard Florey, Ernst Chain e Norman Heatley, são considerados os primeiros produtos naturais isolados de microrganismos.

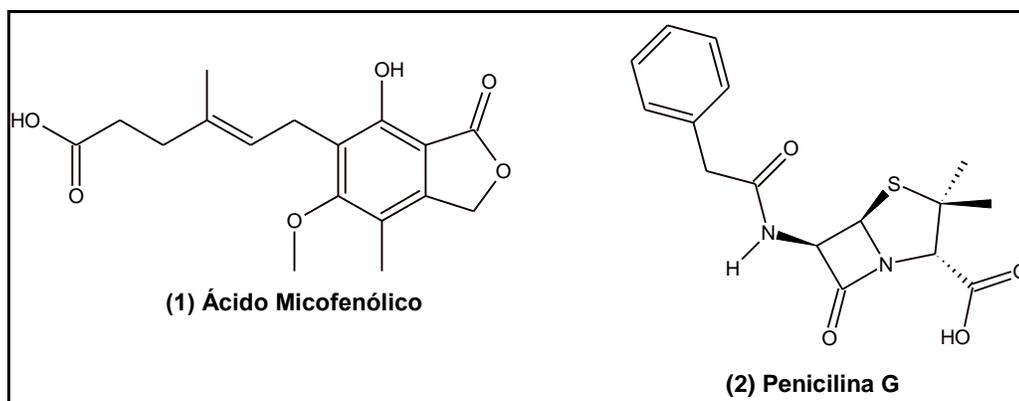


Figura 1. Penicilina G e ácido micofenólico, primeiros produtos naturais isolados de espécies do gênero *Penicillium*.

As décadas de 40 e 50 são consideradas a “Era de Ouro dos Antibióticos”, pois foram isolados inúmeros grupos de importantes antibióticos como tetraciclina, cefalosporinas, aminoglicosídeos e macrolídeos. Estima-se que entre 70 e 80 % dos antibióticos isolados entre 1950 e 1960 eram oriundos de diferentes espécies do gênero *Streptomyces*. Neste período a descoberta de atividades biológicas como inibidores de enzimas, antiviral e antitumoral estavam apenas sendo iniciadas (BÉRDY, 2005) sendo que, atualmente, existem inúmeras outras aplicações em diversas áreas do conhecimento como na produção de biopolímeros de menor impacto ambiental e na biorremediação para tratamento de efluentes dentre outras.

Nos dias atuais os compostos com atividade bactericida de maior uso são aqueles que apresentam um anel beta-lactâmico devido a sua alta eficácia contra várias infecções bacterianas e poucos efeitos colaterais (BAGGALEY, BROWN, SCHOFIELD, 1997). Dentre os compostos beta-lactâmicos largamente utilizados pode-se citar a Cefamicina C inicialmente isolada de *Streptomyces clavuligerus*, e alguns antibióticos semi-sintéticos derivados da Cefamicina C como a Cefoxitina e a Cefotetan. Já o ácido clavulânico, apesar de possuir fraca atividade antibiótica, é um potente inibidor de enzimas beta-lactamases produzidas por alguns microrganismos e que confere a esses, resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. As vendas de antibióticos beta-lactâmicos alcançaram já superaram valores de US\$15 bilhões, representando cerca de 65% do mercado mundial de antibióticos (ELANDER, 2003).

De forma geral, os produtos naturais podem ser utilizados em três diferentes segmentos pela sociedade: com objetivo de produção em larga escala de substâncias de interesse para uso na medicina, agricultura, indústrias de cosméticos, combustíveis, têxtil, energética, agropecuária e outros inúmeros campos; como reagentes de partida para modificação estrutural em laboratórios especializados em síntese orgânica ou em processos fermentativos que envolvam biotransformação; modelo estrutural para síntese química total destes compostos e ou análogos destes com rendimentos superiores aos obtidos em processos fermentativos. Como exemplo dos dois últimos segmentos pode-se citar os compostos Taxol (3) (Paclitaxel) e Captopril (4) ilustrados na Figura 2. O Taxol é um antitumoral isolado de *Taxus brevifolia* que pode ser obtido por isolamento, semi-síntese ou síntese total (HOLTON et al., 1994). A semi-síntese é obtida a partir do composto desacetil-10-baccatina III (CORREA, 1995; DENIS, CORREA, GREENE, 1990; DENIS et al., 1988) obtido em quantidades significativas de agulhas do pinheiro *Taxus baccata*. O Captopril é um composto análogo a uma toxina (peptídeo), componente do veneno da serpente *Bothrops jararaca* e tem sido largamente utilizado no tratamento de hipertensão arterial devido a sua propriedade de inibir o sistema enzimático responsável pela conversão da angiotensina I em angiotensina II que é um evento extremamente importante para a regulação da pressão arterial (CRAIK, SCANLON, 2000; WIJESKARA, KIM, 2010).

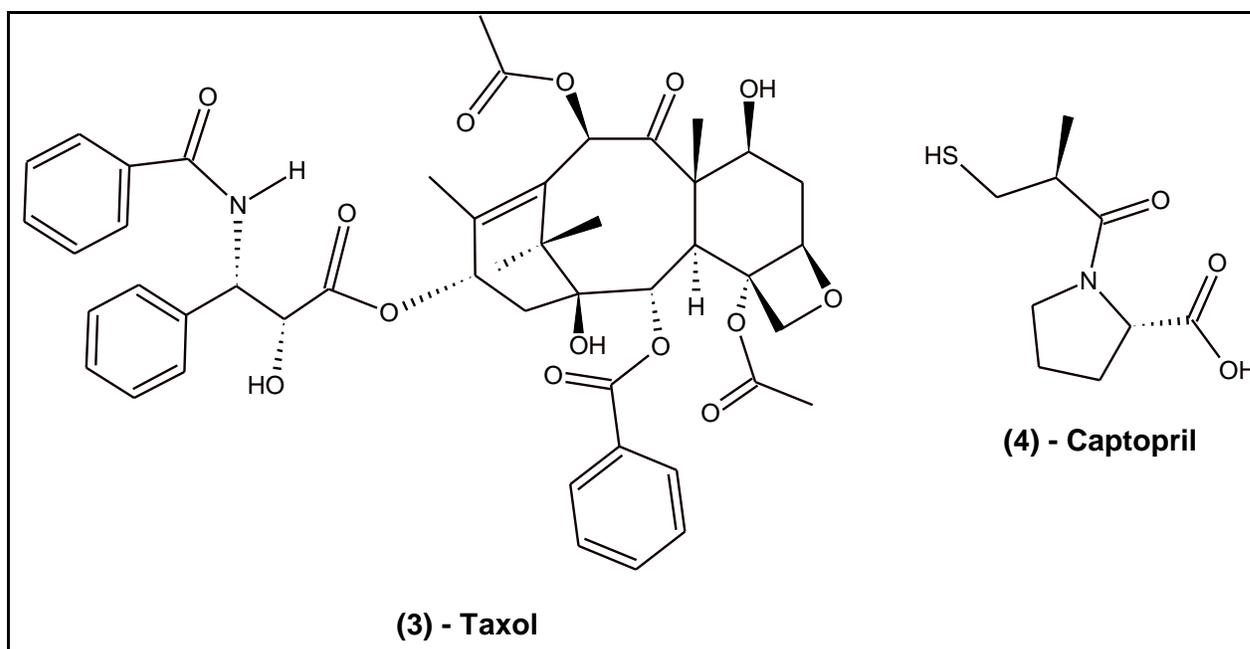


Figura 2. Estrutura molecular dos compostos Taxol e Captopril.

### 3.1.1 Produtos naturais marinhos

A química de produtos naturais extraídos do mar é uma área recente em todo o planeta e no Brasil o tema ganhou destaque na 62ª Reunião Anual da SPBC – Ciências do Mar: Herança para o futuro. O interesse por estes produtos começa a ser enfatizado com a abertura de investimentos na área como o Programa de Pesquisa em Caracterização, Conservação, Restauração e Uso Sustentável da Biodiversidade do Estado de São Paulo (BIOTA/FAPESP), lançado em novembro de 2009 que aprovou nove propostas de trabalhos (BIOTA-FAPESP, 04/08/2010) no sentido de estimular e articular atividades de pesquisa a fim de suprir a demanda de pesquisadores na área devido à grande biodiversidade a ser explorada em suas águas oceânicas (62ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 04/08/2010).

A Química de Produtos Naturais Marinhos tem como pioneirismo os trabalhos de Takao Okazaki e colaboradores com bactérias da ordem dos Actinomicetos (OKAZAKI, KITAHARA, OKAMI, 1975). Em seus trabalhos iniciais os autores relataram o isolamento de uma hidroxiquinona do actinomiceto *Chainia purpurogena* em 1975 e as istamicinas A e B de *Streptomyces tenjimariensis* em 1979 (OKAMI, 1979). Porém, é atribuído ao italiano Giuseppe Brotzu o isolamento do primeiro metabólito secundário de um fungo, a Cefalosporina C (5) de *Cephalosporium acremonium* de origem marinha no ano de 1948 (Figura 3) (ABRAHAM, 1987). Já o composto pentabromopseudilina (6) (Figura 3) é conhecido como o primeiro metabólito de origem bacteriana, isolado em 1966 da bactéria de origem marinha *Pseudomonas bromoutilis* (BURKHOLDER, PFISTER, LEITZ, 1966; PESCHKE, HANEFELD, LAATSCH, 2005).

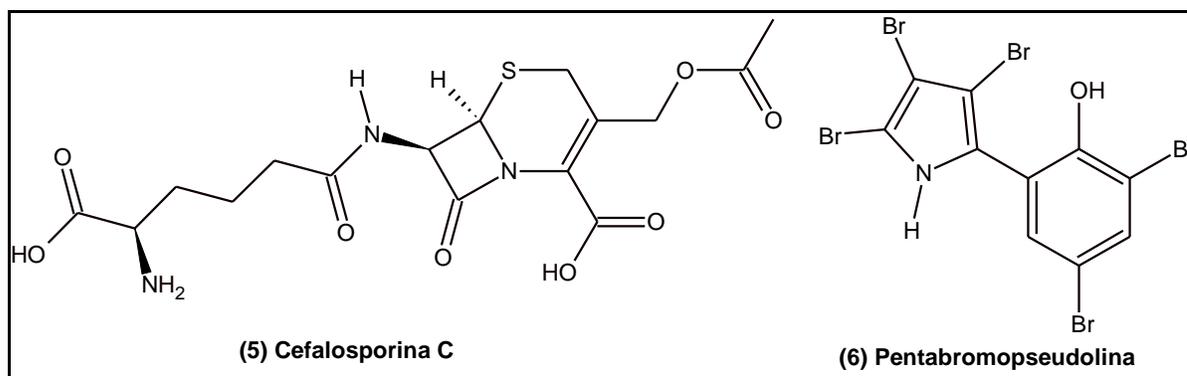


Figura 3. Primeiros metabólitos secundários isolados de fonte marinha.

Os organismos marinhos representam uma fonte muito promissora de descoberta de novos produtos naturais a ser explorada devido à incrível diversidade de compostos químicos já identificados. Além de cobrir quase 70% da superfície da terra os oceanos contêm uma variedade de espécies ainda pouco estudadas e muitas das quais não são encontradas no ambiente terrestre (FENICAL, JENSEN, 2006).

Inúmeros compostos surgiram como promissores agente tumorais como a briostatina 1 (7) (Figura 4), um metabólito macrocíclico (lactona cíclica ou macrolídeo) isolado de *Bugula neritina* (PETTIT et al., 1982; KECK et al., 2011) e o depsipeptídeo didemnina B (8) (Figura 4) isolado de *Trididemnum solidum* (RINEHART et al., 1981), capaz de inibir as sínteses de DNA, RNA e de proteínas em várias linhagens de células tumorais (MARCO et al., 2004). Estes compostos apresentaram excelente atividade antiviral e imunossupressora e alta eficiência no tratamento de leucemia e melanoma, porém devido a sua toxicidade foram retidos na fase II dos ensaios clínicos (AMADOR et al., 2003). Dolastatina 10 (9) (Figura 4) um peptídeo linear isolado de *Dolabella auricularia* (PETTIT et al., 1987) capaz de inibir a proliferação celular e induzir a apoptose em numerosas linhagens de células malignas através de ações que são mediadas por interações com a tubulina resultando na alteração das funções dos microtúbulos, estruturas protéicas que fazem parte do citoesqueleto nas células (AMADOR et al., 2003; PETTIT, R., PETTIT, G., HAZEN, 1998.). Tiocoralina (10) (Figura 4), um depsipeptídeo isolado do extrato micelial da bactéria *Micromonospora marina* apresentou atividade antimicrobiana, além de atividade citotóxica em concentrações de 1,73 nM, contra várias linhagens de células tumorais (ROMERO et al., 1997).

O microrganismo *Salinospora tropica* que produz a Salisnosporamida A (NPI-0052) também produz dois macrolídeos: as Esporolidas A e B que são formadas a partir de dois policetídeos diferentes, contendo um grande número de carbonos oxidados, o que contribui para a estrutura não usual destas Esporolidas. Embora estas Esporolidas não terem apresentado atividade biológica antimicrobiana e anticancerígena nos testes realizados, estas estruturas indicam o enorme potencial dos actinomicetos marinhos na produção de novos metabólitos secundários (LAM, 2006). A Tabela 1 ilustra a grande variedade de compostos com atividade biológica isolados de actinomicetos marinhos durante o período de 2003 a 2005 (LAM, 2006).

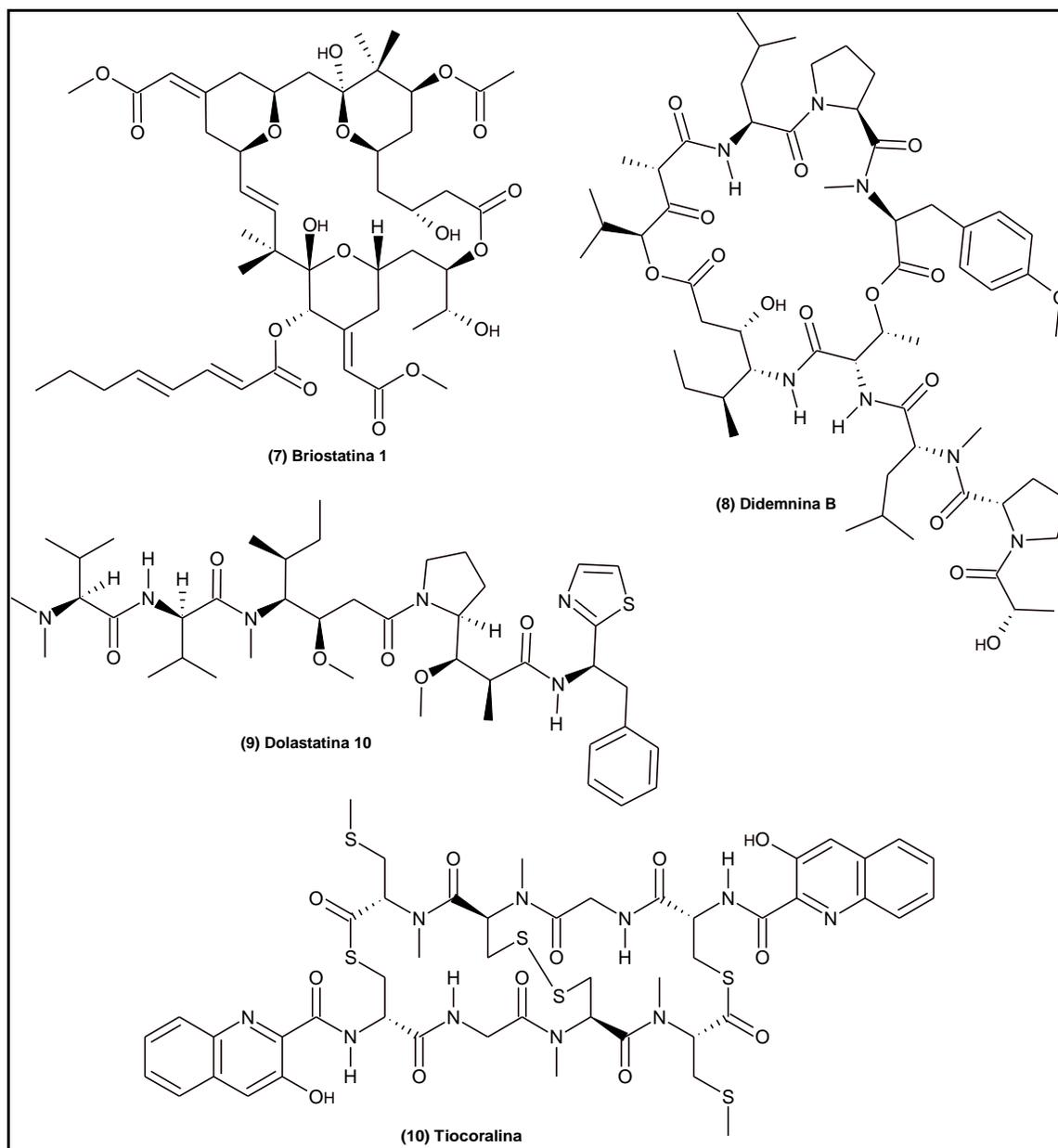


Figura 4. Metabólitos secundários isolados de fonte marinha com atividade citotóxica em linhagens de células tumorais.

É importante salientar que a grande maioria dos trabalhos científicos relata o problema de que quantidades muito pequenas em massa destes compostos são produzidas pelos respectivos organismos, contudo estes compostos têm apresentado grande potencial para uso clínico e sabe-se que mais de 10.000 metabólitos já foram isolados de organismos marinhos apresentando variadas atividades biológicas como: atividade antibiótica, antifúngica, citotóxica, neurotóxica, antiviral, antineoplásica dentre outras (KELECOM, 2002).

Tabela 1. Novos metabólitos isolados de actinomicetos marinhos durante o período de 2003 – 2005 (LAM, 2006).

Composto	Microrganismo	Atividade
Abissomicina	<i>Verrucosispora</i> sp.	Antibacteriana
Aureoverticilactama	<i>Streptomyces aureoverticillatus</i>	Anticâncer
Bonactina	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana e antifúngica
Caprolactonas	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticâncer
Chandrananimicinas	<i>Actinomadura</i> sp.	Antibacteriana, anticâncer, antifúngica
Chinikomicinas	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticâncer
Cloro-dihydroquinonas	Novo actinomiceto	Antibacteriana, anticâncer
Diazepinomicina (ECO-4601)	<i>Micromonospora</i> sp.	Antibacteriana, anticâncer, antiinflamatória
Indóis 3,6-disubstituídos	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticâncer
Frigociclinona	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacteriana
Glaciapirróis	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana
Gutingimicina	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana
Helquinolina	<i>Janibacter limosus</i>	Antibacteriana
Himalomicinas	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana
IB-00208	<i>Actinomadura</i> sp.	Anticâncer
Komodoquinona A	<i>Streptomyces</i> sp.	Atividade Neurotrogênica
Lajolamicina	<i>Streptomyces nodosus</i>	Antibacteriana
Marinomicinas	' <i>Marinispora</i> '	Antibacteriana, anticâncer
Mechercharmicinas	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anticâncer
MKN-349A	<i>Nocardiosis</i> sp.	Desconhecida
Salinosporamida A (NPI-0052)	<i>Salinispora tropica</i>	Anticâncer
Esporolidas	<i>Salinispora tropica</i>	Desconhecida
Trioxacarcinas	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacteriana, anticâncer, antimalária

### 3.2 Estreptomicetos

As Actinobactérias são um grupo de bactérias gram-positivas encontradas colonizando o solo, água doce e inclusive o habitat marinho. Actinobactérias possuem um importante papel na decomposição de matéria orgânica e uma característica importante deste filo é o fato de possuírem um conteúdo de bases nitrogenadas (Guanina e Citosina) nos nucleotídeos de aproximadamente 69–78% (KORN-WENDISCH, 1992).

Os gêneros *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium* e *Mycobacterium* vêm despertando crescente interesse dos setores biotecnológicos, em especial aqueles relacionados às indústrias, por apresentarem potenciais para a síntese de metabólitos secundários de importância médica e industrial como a produção de aminoácidos por fermentação e processos de bioconversão. Neste contexto, *Streptomyces* correspondem a um interessante gênero dentro do

Filo das Actinobactérias devido à diversidade de compostos com as mais variadas aplicações e pela imensa variedade de espécies do gênero sendo mais de 500 citadas na literatura.

*Streptomyces* apresentam uma diversidade metabólica única e um grande potencial em produzir novos compostos, sendo responsáveis por aproximadamente dois terços de todos os antibióticos de origem microbiana conhecidos e ainda são apontados como uma excelente fonte de novos compostos a ser explorada (HOPWOOD, 2007). Dentre as inúmeras classes de antibióticos produzidos pelos *Streptomyces* estão os polipeptídeos, glicopeptídeos, depsipeptídeos, aminoglicosídeos, cefalosporinas, nitrofuranos, macrolídeos, monobactamas, penicilinas, quinolonas, tetraciclina, sulfonamidas e outras. Algumas características fenotípicas dos *Streptomyces* são colônias de crescimento lento, grande parte das espécies que representam o gênero é aeróbica, além de odor característico de “terra molhada” por produzirem substâncias chamadas geosminas em seu metabolismo. Por possuírem filamentos aéreos abundantes e ramificados que se tornam uma rede de fios chamados micélio, o gênero foi erroneamente classificado no passado dentro do Reino Fungi, porém suas células são procariotas ao contrário dos fungos que são microrganismos que possuem células eucariotas. A Tabela 2 aponta a grande diversidade de compostos das mais variadas classes químicas produzidas por bactérias do gênero *Streptomyces* e as Figuras 5 e 6 ilustram algumas estruturas moleculares destes antibióticos.

Entre as inúmeras descobertas de compostos isolados de microrganismos do gênero *Streptomyces*, pode-se citar o isolamento de três antibióticos polienos macrolídeos do caldo de fermentação de *Streptomyces sp.* M90025: Elizabetina, M90025A e M90025B. Os compostos exibiram atividade antifúngica e citotoxicidade contra células de leucemia humana (YOUNGWAN et al., 2000).

Migrastatina, uma substância inibidora da migração de células tumorais ou antimetastásica foi isolada de caldos de fermentação de *Streptomyces sp.* MK929-43F1. A migração celular de células tumorais é essencial para a invasão de novos tecidos e assim para a disseminação de células doentes (NAKAE et al., 2000).

Um novo composto denominado MK800-62F1 foi isolado do caldo de fermentação de *Streptomyces diastatochromogenes* MK800-62F1. Após análises das propriedades físico-químicas e atividades biológicas, a substância foi caracterizada como um novo inibidor de morte celular por apoptose (YOSHIMOTO, et al., 2000).

Tabela 2. Produtos naturais de interesse isolados do gênero *Streptomyces*.

Substâncias	Microrganismo	Classe	Referências
Estreptomicina	<i>Streptomyces griseus</i>	Aminoglicosídeos	Vanderlinde, Yegian (1948)
Cloranfenicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Anfenicóis	Bewick, Williams, Veltkamp (1976)
Framicetina	<i>Streptomyces lavendulae</i>	Aminoglicosídeos	Decaris (1953)
Clortetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Policetídeos	Biffi et al. (1954)
Neomicina	<i>Streptomyces fradiae</i>	Aminoglicosídeos	Dulmage (1953)
Oxitetraciclina	<i>Streptomyces rimosus</i>	Polocetídeos	Zygmunt (1961)
Nistatina	<i>Streptomyces noursei</i>	Polienos	Jonsbu, Ellingsen, Nielsen (2000)
Eritromicina	<i>Streptomyces erithreus</i>	Macrolídeos	Weber (1985)
Espiramicina	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Macrolídeos	Jin, Cen (2004)
Vancomicina	<i>Streptomyces orientalis</i>	Glicopeptídeos	McIntyre, Bull, Bunch (1996)
Kanamicina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Aminoglicosídeos	Basak, Majundar (1975)
Lincomicina	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Lincosamidas	Young, Kempe, Bader (1985)
Tobramicina	<i>Streptomyces tenebraeus</i>	Aminoglicosídeos	Kiss et al. (1988)
Cosmomicina D	<i>Streptomyces olindensis</i>	Antraciclina	Carvalho et al. (2010)
Amfotericina B	<i>Streptomyces nodosus</i>	Polienos	Caffrey et al. (2001)
Natamicina	<i>Streptomyces natalensis</i>	Polieno Macrolídeo	Farid et al. (2000)
Fosfomicina	<i>Streptomyces fradiae</i>	Derivado ácido fosfônico	Rogers, Birnbaum (1974)
Puromicina	<i>Streptomyces alboniger</i>	Aminonucleosídeos	Sankaran; Pogell (1975)
Ácido Clavulânico	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Beta-lactâmicos	Neto et al. (2005)
Avermectina	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Macrolídeos	Gao et al. (2009)
Paromomicina	<i>Streptomyces krestomuceticus</i>	Aminoglicosídeos	Davidson; Boer; Ritmeijer (2009)
Espectinomicina	<i>Streptomyces spectabilis</i>	Aminoglicosídeos	You-Young et al. (2003)
Daunorubicina	<i>Streptomyces peucetius</i>	Antraciclina	Takashima et al. (1987)
Tetraciclina	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Policetídeos	Darken et al. (1960)
Pristinamicina	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	Depsipeptídeos	Jia, Jin, Mei (2008)
Tiostreptona	<i>Streptomyces azureus</i> , <i>S. laurentii</i>	Oligopeptídeo	Mocek et al. (1993)
Tirandamicinas	<i>Streptomyces</i> sp.	Ácidos tetrâmicos	Carlson et al. (2009)
Salinamidas	<i>Streptomyces</i> sp. CNB-091	Depsipeptídeos	Trischman et al. (1994), Moore et al. (1999)
Tunicamicina	<i>Streptomyces lysosuperficus</i> , <i>S. LA-507</i> e <i>S. chartreusis</i> NRRL 3882	Nucleosídes	Hamill, Hoehn, Boeck (1982)
Fujimicina (FK-506)	<i>Streptomyces tsukubaensis</i>	Lactona macrolítica	Kino et al. (1987)
Ascomicina (FK-520)	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Macrolactama	Paul, Graeber, Stuetz (2000)
Rapamicina	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Macrolídeo	Cheng, Fang, Demain (1995)

PIB, uma proteína inibidora de beta-lactamases foi isolada do caldo de fermentação de *Streptomyces exfoliatus*. O gene codificador da proteína foi identificado e a mesma pôde ser expressa em *Escherichia coli* (KANG et al., 2000).

As butirolactonas Cedarmicinas A e B obtidas em culturas de *Streptomyces sp.* TP-A0456 mostraram atividade antibiótica contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e contra leveduras (SASAKI et al., 2001).

O isolamento e elucidação da estrutura de um novo composto, o 2-metil-heptil-isonicotinato (Figura 6) produzido por *Streptomyces sp.* 201 tem sido relatado na literatura. Tal composto apresenta atividade antifúngica contra *Fusarium moniliforme*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium oxysporum*, *Escherichia solani* e *Rhizoctonia solani* além de atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Shigella sp.*, *Klebsiella sp.*, *E. coli* e *Proteus mirabilis* (BORDOLOI et al., 2001).

Os novos antibióticos denominados watasemicinas A e B (Figura 6) foram obtidos de caldo de cultivo de uma nova linhagem *Streptomyces sp.* TP-A0597 isolada da água do mar da Baía de Toyama (Japão). Tais compostos apresentaram atividades antibióticas contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e contra leveduras (SASAKI et al., 2002).

Uma outra classe importante de antibióticos é a dos aminoglicosídeos. São antibióticos bactericidas que possuem em sua estrutura molecular açúcares modificados com grupos aminas. São inibidores da síntese protéica por se ligarem irreversivelmente a ribossomos específicos e impedindo a continuidade da síntese protéica. A Figura 7 ilustra alguns aminoglicosídeos empregados como fármacos, sendo a Estreptomicina o primeiro composto isolado da classe no ano de 1943, conhecida como o primeiro antibiótico utilizado no tratamento da tuberculose (WAKSMAN, 1953).

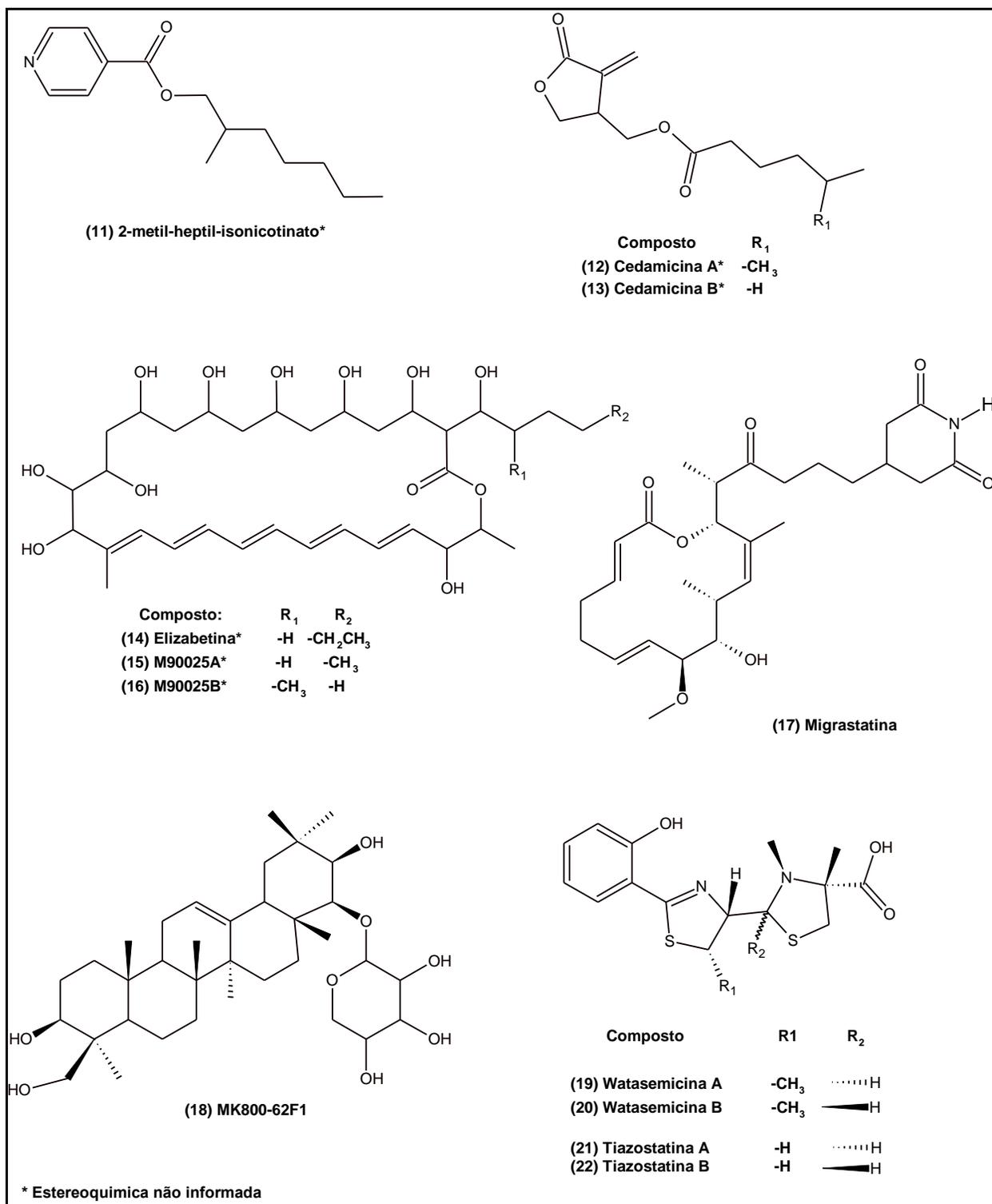


Figura 5. Estruturas moleculares de alguns antibióticos.

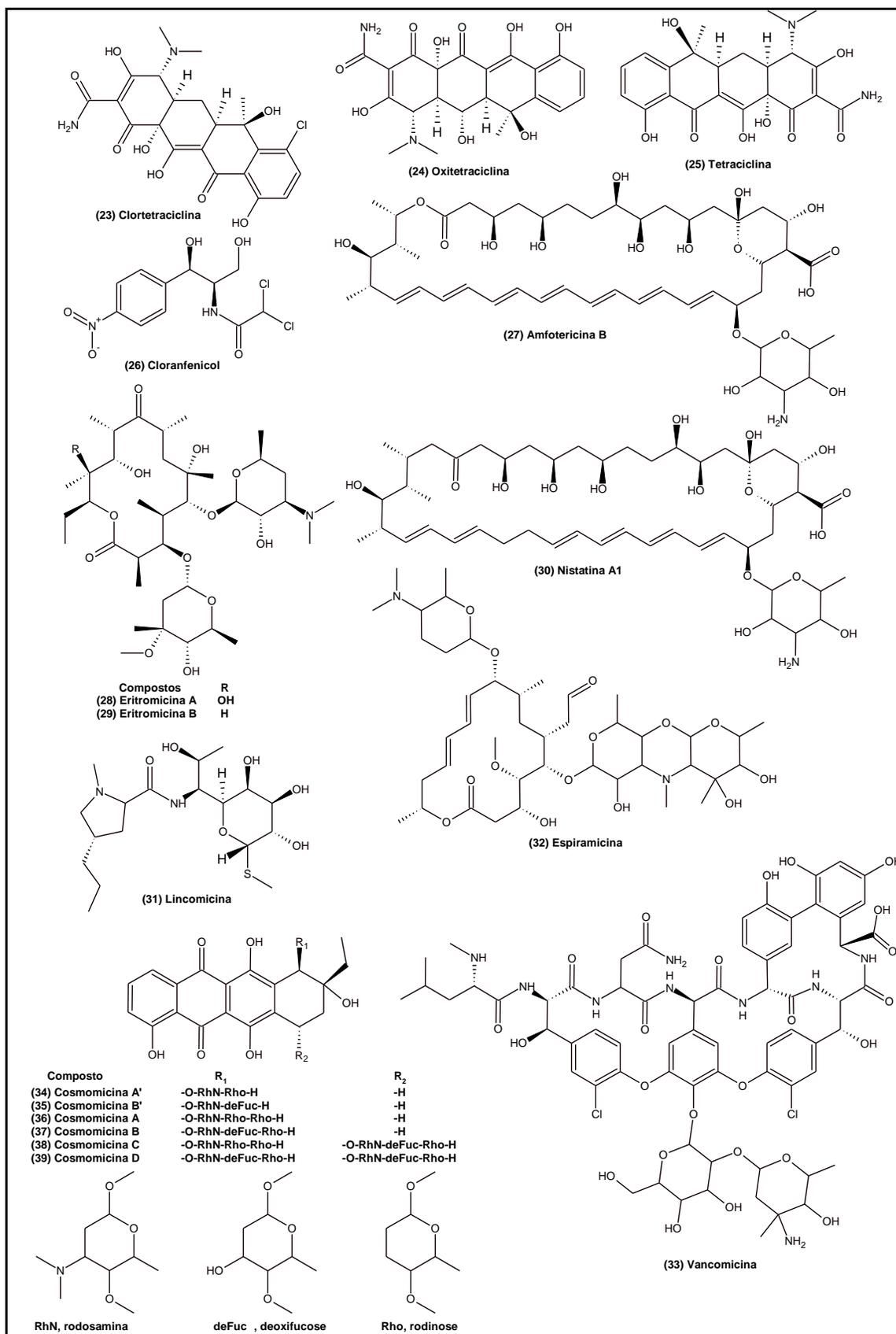


Figura 6. Estruturas moleculares de alguns antibióticos.

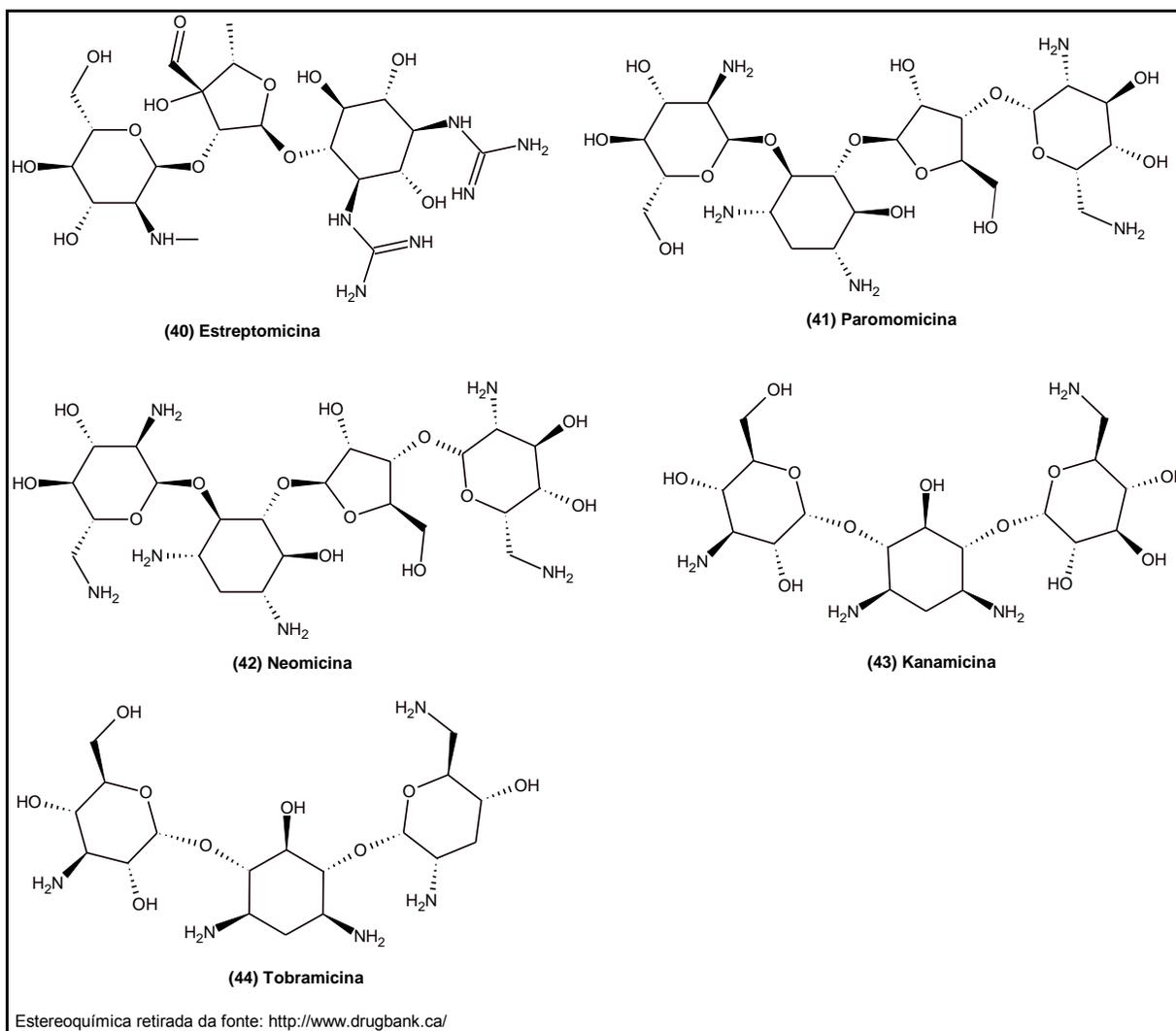


Figura 7. Estruturas moleculares de alguns aminoglicosídeos com atividade antibiótica.

### 3.3 O câncer

Das inúmeras doenças relacionadas à saúde pública, o câncer é uma das que se destacam sendo estimado acima de 6 milhões de novos casos por ano em todo mundo, o que a torna a segunda causa morte de pacientes. Em todo mundo são imensos os recursos destinados à triagem de compostos e métodos para conseguir êxito no tratamento desta enfermidade. Desta forma é de grande importância o estudo de novos compostos que permitam tratar esta enfermidade. Os produtos naturais têm contribuído de forma incalculável como agentes para controle de ciclo celular conduzindo de forma promissora as pesquisas com antitumorais (SHU, 1998).

O termo câncer foi primeiramente utilizado por Aulus Cornelius Celsus um enciclopedista romano conhecido pelo seu extenso trabalho na medicina. Hipócrates, conhecido como o pai da medicina ocidental, descreveu inúmeros tipos de cânceres. Ele classificava oncos os tumores benignos e carcinos os tumores malignos. Nos dias atuais tumores chamados de sarcomas são aqueles que têm início em tecidos conjuntivos como os ossos, músculos ou cartilagem e aqueles designados de carcinomas tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas. Como a dissecação de cadáveres não era prática no passado, somente protuberâncias no corpo das pessoas eram vistas como cânceres tendo este cenário mudado a partir do século 17 quando a dissecação passou a ser uma prática um pouco mais aceita pela sociedade.

Atualmente, câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo. As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando inter-relacionadas. As causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. O acelerado crescimento populacional bem como o aumento da taxa média de vida contribui para o aparecimento de inúmeras doenças das quais se destaca o câncer como a mais grave delas. Isto afeta de forma significativa o impacto do câncer no mundo e este recai principalmente sobre os países de médio e baixo desenvolvimento. Importante causa de doença e morte no Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade. Para 2010 estimou-se que aproximadamente 489.270 novos casos da doença entre homens e mulheres fossem surgir sendo 27,8% deste valor concentrado no estado de São Paulo o que o torna o mais afetado dos estados brasileiros (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2010).

A cirurgia e a radioterapia são as modalidades mais antigas e de atuação localizada no tratamento de cânceres. Já a quimioterapia, outra modalidade no tratamento da doença, faz uso de compostos químicos, sejam estes isolados ou em combinação, que tem como objetivo principal conter ou mesmo eliminar a proliferação de células neoplásicas. Em alguns casos, é

comum o uso das diferentes modalidades de tratamento dependendo da gravidade do caso clínico do paciente (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER, 2010).

O ataque indiscriminado promovido pelas drogas antineoplásicas às células de rápida proliferação, cancerosas ou normais, produz os indesejáveis efeitos colaterais ou tóxicos, conhecidos e extremamente temidos pelos indivíduos que necessitam submeter-se ao tratamento. Antitumoral, anticâncer e antineoplásico são sinônimos dos termos usados para toda droga aplicada no tratamento de cânceres.

Tabela 3. Produtos Naturais de origem microbiana em desenvolvimento clínico como agentes anticancerígenos (LAM, 2007).

Compostos	Fonte	Etapa Clínica
Becatecarina	Rebecamicina de <i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>	Fase III
CKD-732	Fumagilina de <i>Aspergillus fumigatus</i>	Fase II
ECO-4601	<i>Micromonospora sp.</i>	Fase I
Elsamitrucina	Actinomiceto não identificado	Fase II
Irofulvena	Iludina S de <i>Clitocybe illudens</i>	Fase II
Ixabepilona	Epotilona B de <i>Sorangium cellulosum</i>	Fase III
KOS-953	Geldanamicina de <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Fase II
NPI-0052	<i>Salinospora tropica</i>	Fase I
NPI-2358	Halimida de <i>Aspergillus sp.</i>	Fase I
Romidepsina	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Fase II
Vorinostat	Tricostatina de <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Fase II
Temsirolimus	Sirolimus de <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Fase III

### 3.4 Biossíntese dos peptídeos

A indústria farmacêutica tem, cada vez mais, grande interesse em usar peptídeos e proteínas como agentes terapêuticos devido ao fato desses apresentarem alta atividade biológica específica associada com baixa toxidez, porém em contra partida fármacos de origem peptídica fazem parte de pequena fatia do mercado mundial. Atualmente, a grande maioria de fármacos disponível comercialmente é de moléculas de baixo peso molecular, “moléculas pequenas” que tem origem por isolamento de produtos naturais ou por completa ou parcial síntese em laboratórios especializados em síntese química.

Os aminoácidos são moléculas pequenas que se caracterizam por terem um grupo funcional amina e outro carboxílico embora algumas moléculas que não têm esta característica são também designadas como aminoácidos como é o caso da taurina que é de fato o ácido

aminoetilsulfônico. Os aminoácidos são muito importantes nos seres vivos, podendo ocorrer neles na forma livre, mas sobretudo, como constituintes de peptídeos, enzimas e proteínas que são polímeros resultantes de reações de condensação que podem incluir outros componentes, e ainda associados a outras moléculas biológicas, como é o caso da vitamina B5 (ácido pantotênico) (SILVA, J. J., SILVA, J. A., 2009).

A ligação química entre moléculas de aminoácidos quando o grupo carboxílico de uma molécula reage com o grupo amina de outra molécula é conhecida como ligação peptídica. É uma reação de desidratação liberando uma molécula de H<sub>2</sub>O no final da reação. Os peptídeos são classificados de acordo com o número de aminoácidos que possuem em sua estrutura. Aqueles com dois aminoácidos são classificados como dipeptídeos, três aminoácidos são classificados como tripeptídeos, entre quatro e dez aminoácidos são classificados como oligopeptídeos e entre dez e cem aminoácidos são classificados como polipeptídios

Os peptídeos podem ser divididos em duas categorias baseadas na rota biossintética pela qual eles são gerados. Um grupo consiste nos peptídeos codificados por genes ou peptídeos sintetizados pelos ribossomos e possuem entre 30 a 60 resíduos de aminoácidos (MARAHIEL, 1992). Os peptídeos da segunda categoria não são de origem ribossômica e são sintetizados por uma série de condensações catalisadas por sintetases peptídicas não ribossomais usando um mecanismo multi-enzimático (DOEKEL, MARAHIEL, 2001; KLEINKAUF, VON DÖHREN, 1996; MARTIM et al., 2003). Estas sintetases são enormes proteínas multifuncionais compostas por diferentes módulos com diferentes domínios capazes de realizar etapas específicas na condensação de um aminoácido na cadeia peptídica em crescimento (DU, SHEN, 1999; MARAHIEL, 1992). Os compostos peptídicos resultantes freqüentemente contêm aminoácidos não protéicos incluindo os aminoácidos D e outros componentes (KLEINKAUF, VON DÖHREN, 1990, 1996). Exemplos de D-aminoácidos produzidos por *Streptomyces* sp. são a Valinomicina (D-valina), Actinomicinas (D-valina ou D-alo-isoleucina) e o (R)-4-amino-3-isoxazolidinona (D-ciclo-serina) (SILVA, J. J., SILVA, J. A., 2009). A porção peptídica dos compostos produzidos desta forma é geralmente menor do que aqueles produzidos pelos ribossomos e, na maioria das vezes, possuem menos de 20 aminoácidos em sua constituição (MARTIN, 2003).

Peptídeos não ribossomais representam uma grande família de metabólitos secundários bioativos produzidos por bactérias e fungos. Muitos destes peptídeos são importantes

---

drogas farmacológicas como os imunossupressores Ciclosporina A (45) (Figura 8) e os antibióticos Vancomicina (33) (Figura 6), Colistina A e B (48 e 49) (Figura 8), Polimixina B1 e B2 (46 e 47) (Figura 8) e Bacitracina (50) (Figura 8). Outros peptídeos não ribossomais sintetizados como os sideróforos estão associados com a patogenicidade dos microrganismos. A extraordinária variedade de propriedades biológicas destas moléculas é resultado da enorme diversidade estrutural desta classe de produtos naturais (DU, SHEN, 1999; EPPELMANN, DOEKEL, MARAHIEL, 2001).

Durante a síntese de uma cadeia polipeptídica, mais de um ribossomo pode-se ligar ao mRNA e fazer a tradução da fita. Acredita-se que imediatamente após um ribossomo liberar o códon de iniciação, outro ribossomo já estará se ligando a esse códon e iniciando a síntese de mais uma cadeia polipeptídica. A tradução de um mRNA por vários ribossomos dá origem aos polissomos ou polirribossomos, que são conjuntos de ribossomos associados ao longo do mRNA, separados por uma distância de 80 nucleotídeos. A formação dos polissomos permite que um número muito maior de polipeptídeos seja sintetizados durante a permanência do mRNA no citoplasma (eucariotos). As bactérias sintetizam os polipeptídeos de forma mais rápida porque além de formarem polissomos como os organismos eucariontes, não precisam fazer processamento do mRNA. Nos procariotos (bactérias), o mRNA é traduzido desde o instante que se inicia a transcrição e como os processos ocorrerem no citoplasma, ambos acontecem ao mesmo tempo. Antes que a transcrição tenha terminado, a síntese de proteínas já se inicia, pois no que surge a extremidade 5'da fita de mRNA, os ribossomos reconhecem as seqüências específicas e começam a tradução.

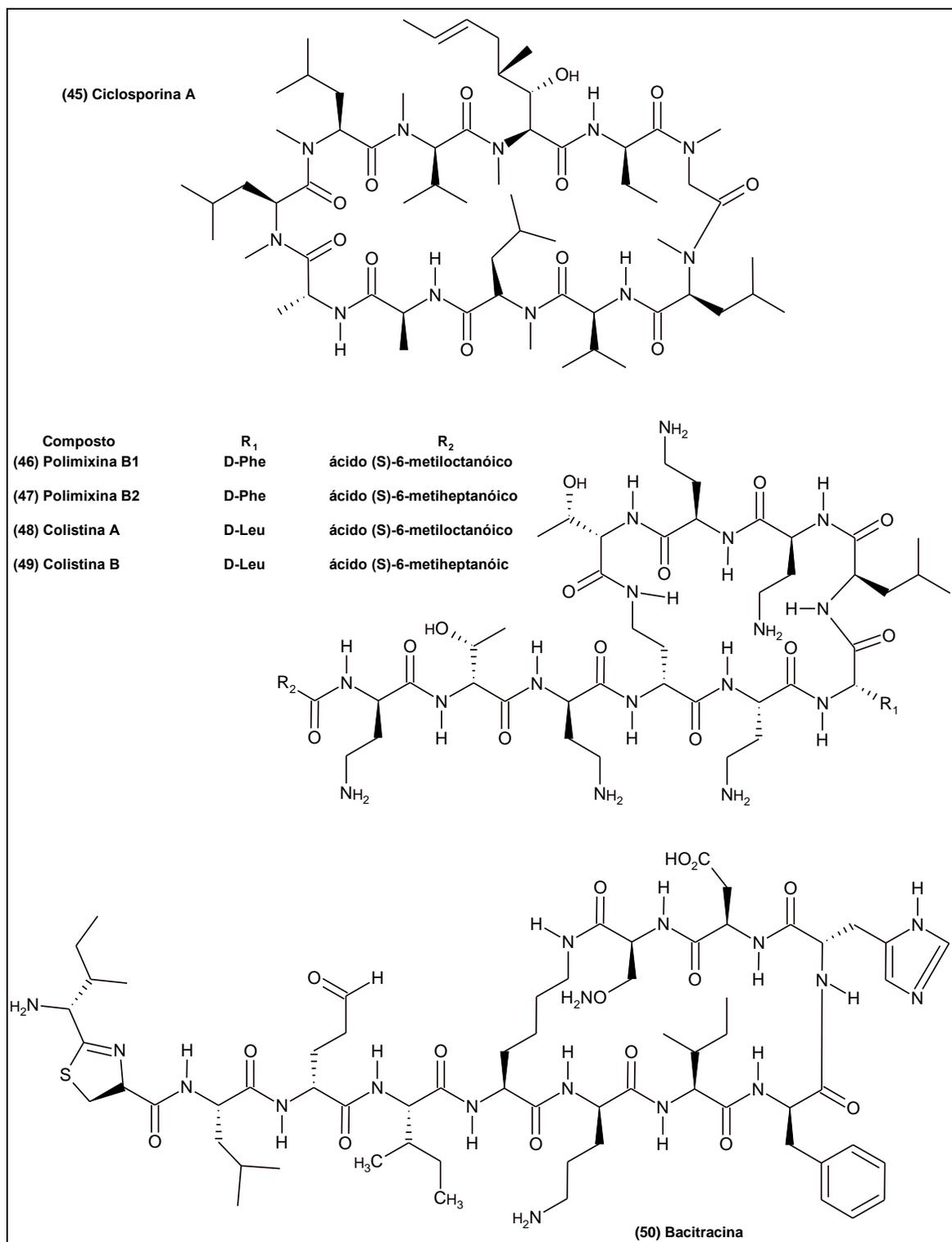


Figura 8. Estruturas moleculares de alguns polipeptídios com atividade antibiótica.

### 3.5 Espectrometria de massas: uma técnica espectroscópica

A espectrometria de massas tem se destacado como importante ferramenta analítica para o levantamento de informações que permitem a elucidação estrutural de moléculas com massa molecular alta principalmente após a implementação, nestes equipamentos, de técnicas de ionização mais branda. Nos dias atuais, sua utilização não se limita aos laboratórios de química sendo uma ferramenta muito difundida nos diversos segmentos de mercado com aplicabilidade no controle de qualidade em empresas de tabaco, cosméticos, bebidas, petrolíferas bem como em laboratórios de física, biologia, bioquímica, engenharia de controle de processos e outros (GREER; MORRIS, 2008; TRAUGER; WEBB; SIUZDAK, 2002).

O espectrômetro de massas é um equipamento constituído de três unidades básicas: a fonte de ionização, ou seja, unidade onde moléculas (analíto) sofrem ionização que, de acordo com cada diferente tipo de ionização, gera íons em fase gasosa que serão analisados; o analisador, onde os íons são analisados por uma combinação de campos elétricos e magnéticos de acordo com sua relação massa/carga ( $m/z$ ) e o detector, onde os íons separados no analisador são detectados pelo sinal eletrônico gerado e estes sinais são transformados em um espectro que permite a interpretação de um profissional com conhecimento da técnica. A Figura 9 ilustra o layout de um espectrômetro de massas com suas respectivas unidades básicas.

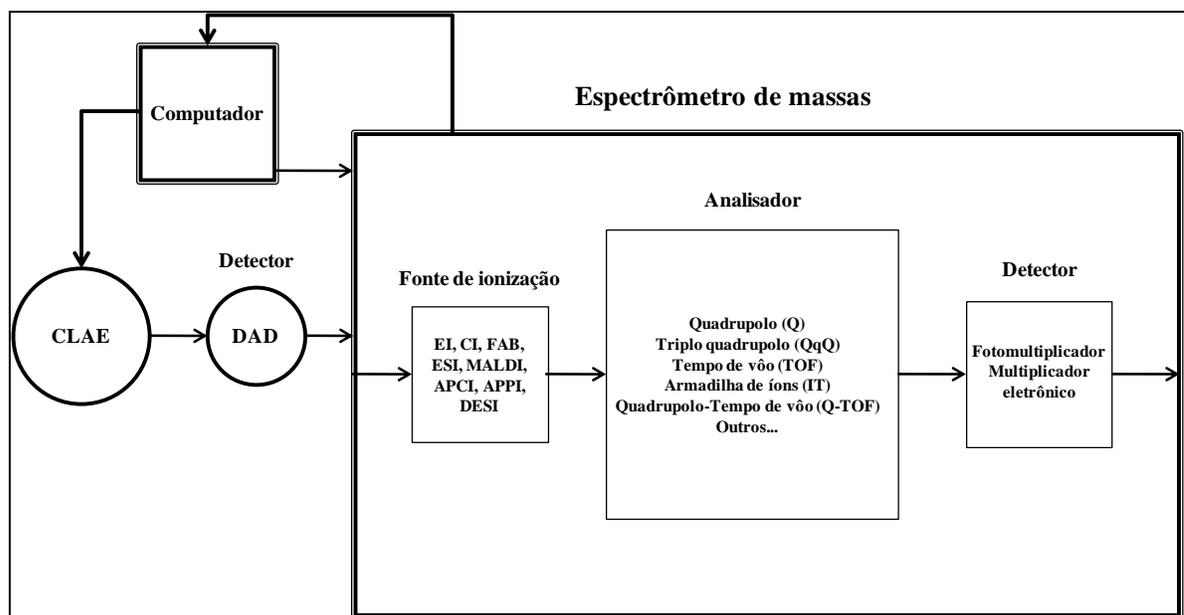


Figura 9. Layout de um espectrômetro de massas acoplado com CLAE.

Experimentos de um único estágio de análise (*full scan*) (MS) e experimentos com dois ou mais estágios de análise (*tandem*) (MS<sup>n</sup>) contribuem imensamente para o estudo de biomoléculas. Arranjos com mais de um analisador em equipamentos modernos permitem experimentos valiosos para estas situações. A determinação da seqüência de aminoácidos tem sido usada para a elucidação da estrutura primária de peptídeos incluindo situações envolvendo misturas complexas (DANIEL, FILHO, 2007, GRIFFITHS et al., 2001, HOFFMANN, 1996).

Muitas biomoléculas não podem ser ionizadas pela técnica clássica de ionização por impacto eletrônico (EI), técnica muito utilizada para moléculas voláteis porque os compostos são volatilizados em um estado inicial e em seguida ionizados, tornando desta forma o método limitado para compostos termicamente estáveis com baixo peso molecular ((DANIEL; FILHO, 2007, GRIFFITHS et al., 2001).

Uma das técnicas de ionização mais utilizadas atualmente é por “*electrospray*” (ESI) (YAMASHITA; FENN, 1984). A ionização por “*electrospray*” é uma técnica suave e pode gerar íons multiplamente carregados, com número de cargas elevado, o que possibilita a análise de compostos com elevada massa molecular como peptídeos, proteínas, nucleotídeos, polímeros sintéticos em inúmeros detectores por reduzir a razão *m/z*. Como o analíto a ser analisado deve estar em solução, isso permite com que a técnica seja utilizada acoplada com inúmeras outras técnicas de separação e ou elucidação estrutural (CLAE, RMN) (GREER; MORRIS, 2008).

A Figura 10 ilustra uma fonte de ionização por ESI. A amostra em solução é introduzida na fonte de ionização através de uma sonda (*probe*) que possui em sua extremidade um capilar de aço inoxidável de 100 µm de diâmetro interno, a uma vazão de fase móvel que pode variar entre 1 e 1000 µL/min e sob temperatura que pode variar de 200 a 550°C. A aplicação de um potencial de voltagem que pode variar de 2 a 5 kV no capilar provoca a ionização das moléculas em solução gerando íons ânions [M-H]<sup>-</sup> (molécula deprotonada), no caso de operar no modo *electrospray* negativo (ESI-) e íons cátions [M+H]<sup>+</sup> (molécula protonada) no caso de operar no modo *electrospray* positivo (ESI+). No modo ESI+ é freqüente notar a presença de íons [M+Na]<sup>+</sup>, [M+K]<sup>+</sup> e [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> que são designados íons aduto. No caso [M+Na]<sup>+</sup> é o aduto de sódio, [M+K]<sup>+</sup> o aduto de potássio e [M+ NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> o aduto de amônio. No modo ESI- é possível notar a presença do aduto com cloro [M+Cl]<sup>-</sup>. Os íons saem do capilar e são acelerados com a ajuda de um gás nebulizador (geralmente N<sub>2</sub>) na direção de um anteparo. A aplicação de um potencial no cone do equipamento com carga contrária aos dos íons gerados após a explosão

Coulombica (Figura 10) faz com que íons de cargas opostas sejam atraídos para dentro de sistema em alto vácuo e os íons de mesma carga sejam repelidos (SOUZA, 2010).

Estes e outros parâmetros que devem ser cuidadosamente escolhidos a fim de garantir a eficiência do processo de ionização e, desta forma, permitir que o espectro de massas gerado contenha informações de interesse do analista são conhecidos como os ajustes finos (*tuning*), que devem ser realizados por um operador que possua experiência na técnica.

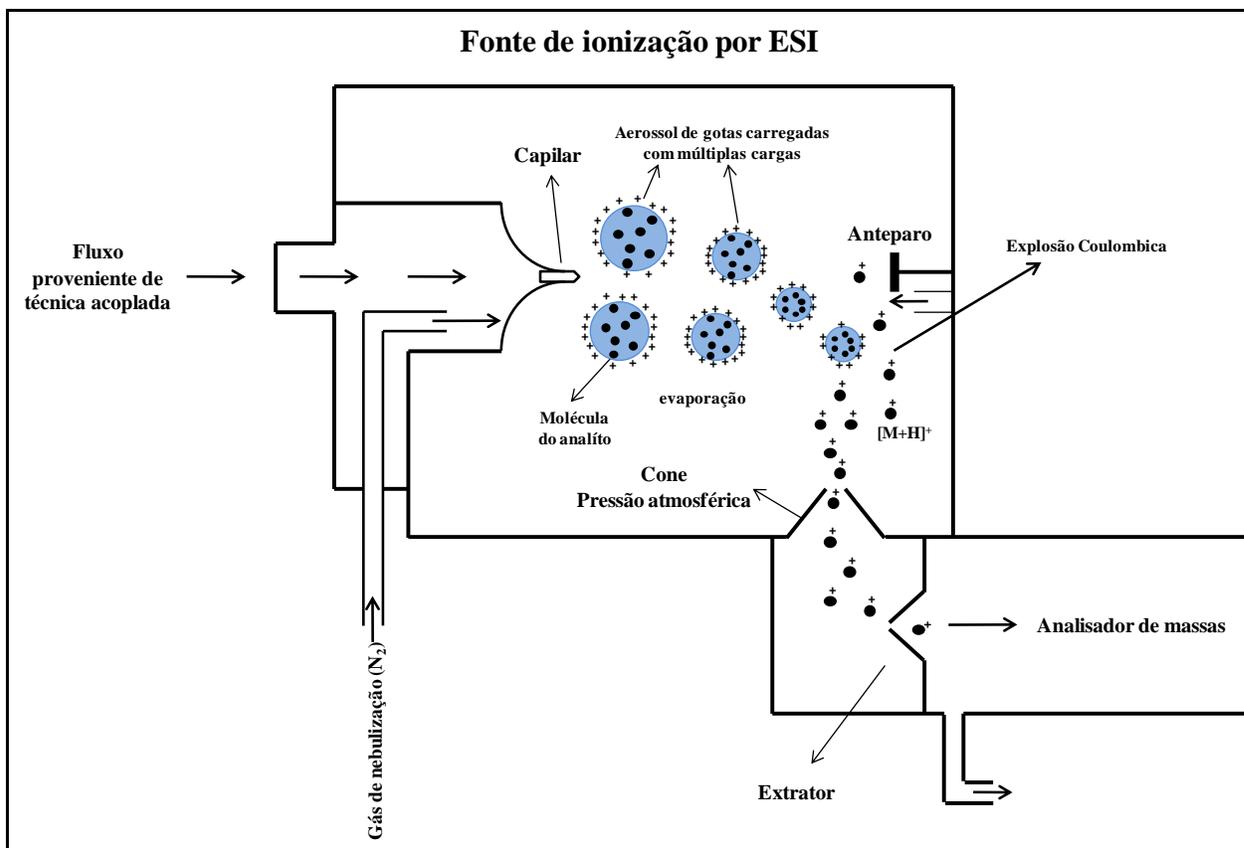


Figura 10. Eventos que ocorrem na fonte de ionização por ESI de um espectrômetro de massas.

Inúmeros experimentos podem ser selecionados em equipamentos com diferentes analisadores, a fim de obter dados que permitam elucidar a estrutura de uma molécula. Estes experimentos, para arranjos em triplo quadrupolo, que estão ilustrados na Figura 11 são:

*Full scan*: o primeiro analisador permite a transmissão (separando pela razão  $m/z$ ) de todos os íons gerados na fonte de ionização. A célula de colisão e o segundo quadrupolo estão inativos funcionando apenas como lentes para focarem e acelerar os íons até o detector.

Íon precursor (*parent ion scanning*): o primeiro analisador permite a transmissão (separando pela razão  $m/z$ ) de todos os íons gerados na fonte de ionização com razão  $m/z$  acima

do íon o qual está sob investigação. Estes íons são fragmentados na célula de colisão com gás inerte (geralmente argônio) e os fragmentos são analisados no segundo analisador do equipamento. Este experimento é útil para verificar se um dado fragmento foi gerado por um ou mais íons específicos.

Íon produto (*product or daughter ion scanning*): o primeiro quadrupolo é programado para selecionar apenas os íons de razão  $m/z$  que estão sob investigação gerados na fonte de ionização. Estes íons específicos são encaminhados até a célula de colisão (hexapolo) onde são fragmentados e analisados pelo segundo quadrupolo. Todos os fragmentos decorrentes dos íons previamente selecionados no primeiro quadrupolo geram um padrão específico de fragmentação (impressão digital) de cada íon em análise.

Perda neutra (*constant neutral loss scanning*): neste tipo de experimento é selecionada um ou mais valores que correspondem a perda neutra previamente identificada pelo analista ao analisar os dados gerados no experimento de *full scan*. O segundo analisador opera de forma que somente íons que possuam a diferença em unidades de massa previamente selecionada pelo analista, daqueles que passaram pelo primeiro analisador sejam detectados. Este experimento é muito útil para confirmar a origem de fragmentos em amostras com pouca pureza ou identificar classes de compostos em extratos brutos.

Monitoramento seletivo de íons (*selected reaction monitoring – SRM*): o primeiro analisador permite a passagem de apenas íons de razão  $m/z$  selecionadas e estes são fragmentados na célula de colisão. O segundo analisador opera de forma igual ao primeiro permitindo a passagem de somente íons de razão  $m/z$  selecionados. Esta metodologia é muito empregada para confirmar a presença de um composto característico em uma matriz complexa como presença de anabolizantes ou drogas em amostras de sangue ou urina de atletas em testes antidoping.

Assim, a escolha da ionização por ESI para análises de peptídeos e proteínas, dentre outras classes de compostos, se destaca dos outros modos de ionização existentes pela compatibilidade de acoplamento com cromatografia líquida, compatibilidade de realização de experimentos em um ou mais estágios ( $MS^n$ ), sensibilidade de detectar amostras em concentrações baixas, formação de íons multiplamente carregados que permite com que estes sejam analisados em analisadores com baixo limite de detecção além de possibilitarem a aquisição de informações mais completas sobre a fragmentação dos íons em experimentos em mais de um estágio (TRAUGER, 2002).

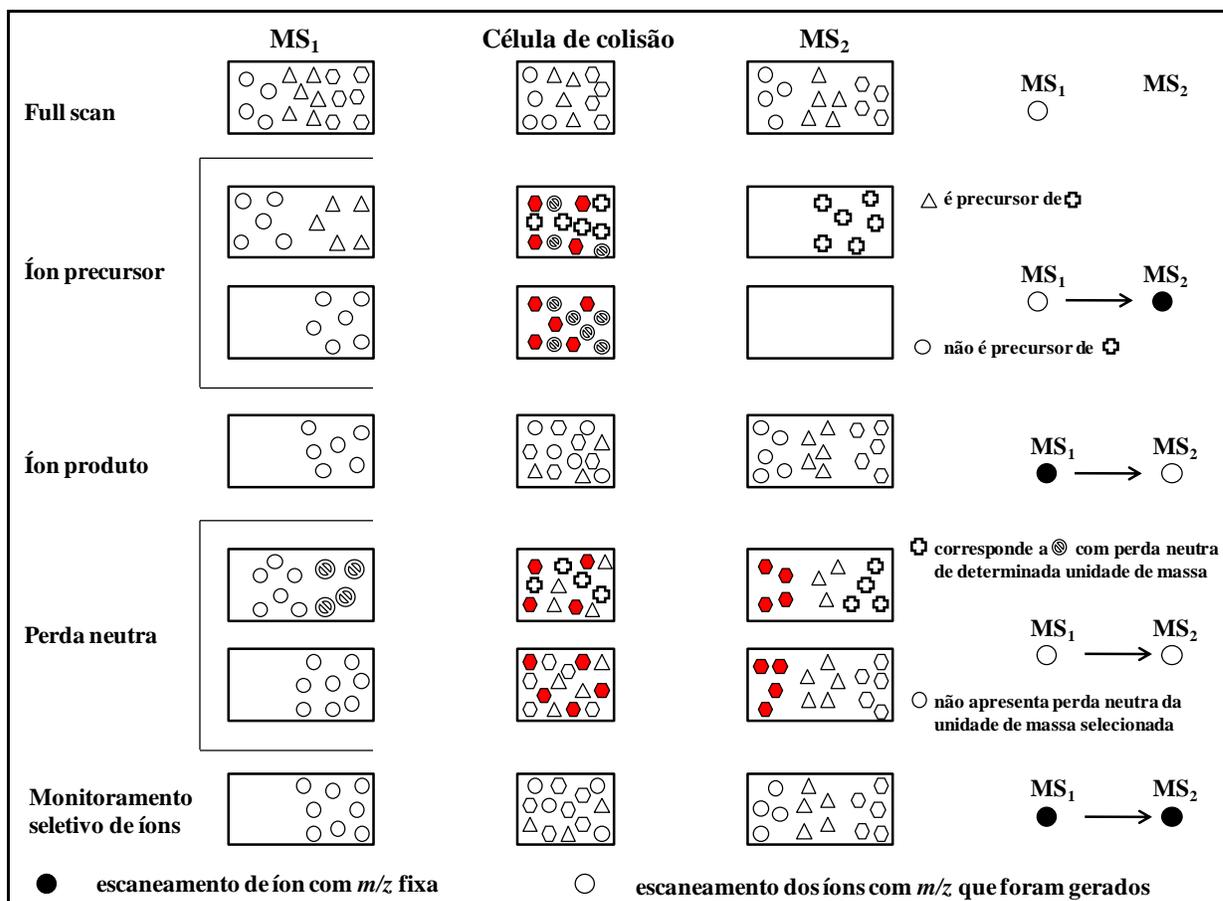


Figura 11. Diferentes experimentos que podem ser selecionados pelo analista de acordo com a necessidade de levantamento de informações em um espectrômetro de massas com analisador triplo quadrupolo. Adaptado de Hoffmann (1996).

### 3.6 Comentários finais sobre a revisão bibliográfica

A análise da literatura mostra que a busca por compostos naturais hábeis a serem utilizados em terapia com pacientes é um campo que vem crescendo desde a descoberta da Penicilina, apresentando um grande desenvolvimento nos últimos 20 anos. Também, evidencia-se que a geração de conhecimento para a otimização de bioprocessos de cultivo em larga escala de novas linhagens de *Streptomyces* produtoras de metabólitos com bioatividade demanda estudos bem elucidativos sobre as características fisiológicas e de crescimento celular das linhagens sob investigação, características essas que podem estar associadas á produção de compostos bioativos de interesse, bem como em relação ao desenvolvimento de metodologia de quantificação desses compostos, que se fazem necessárias na análise do bioprocessos.

Fazendo-se uma abordagem geral deste trabalho pode-se dizer que se trata de uma pesquisa em laboratório eminentemente experimental na qual será avaliada a produção de

metabólitos bioativos por linhagem do gênero *Streptomyces* isolado de sedimento marinho que fortuitamente possam ser utilizados em algum segmento do setor industrial. Também se espera obter informações fisiológicas do microrganismo e cinéticas do processo necessárias para subsidiar posteriores estudos de aumento de produção na translação do processo de cultivo em escala de laboratório para escala piloto.

## **4 Materiais e métodos**

Os materiais e métodos a serem utilizados nesta pesquisa estão detalhados nos itens seguintes.

### **4.1 Materiais**

#### **4.1.1 Microrganismo**

Foi utilizada a linhagem *Streptomyces carpaticus* isolada por Hernández (2002) de sedimentos marinhos no canal de São Sebastião, litoral sul do estado de São Paulo (Brasil) em profundidades que variaram de 12 a 15 metros. A linhagem apresentou 100 % de similitude com a linhagem de referência *S. carpaticus* DSM 41468 segundo sequência de rDNA.

#### **4.1.2 Meios de cultura**

Nas etapas de reativação do microrganismo, preparação de inóculo e de produção nos cultivos investigativos visando à triagem de compostos bioativos, foram empregados meios de cultura utilizando glicose, glicerol e amido como fontes de carbono e energia e extrato de levedura, peptona e farinha de soja como fontes de nitrogênio, além de água do mar, no intuito de reproduzir as condições do habitat natural do microrganismo e o uso de sais contendo micronutrientes necessários ao seu desenvolvimento.

#### **4.1.3 Equipamentos utilizados**

##### **4.1.3.1 Módulo de microfiltração**

O módulo de filtração utilizado nos experimentos foi do tipo fibra oca (hollow-fiber) da Amersham Biosciences Corp. A membrana de 0,20  $\mu\text{m}$  apresenta uma área de 0,36  $\text{m}^2$  e é composta de 450 membranas cilíndricas de 1,0 mm de diâmetro e 30 cm de comprimento de

polissulfona. Conforme ilustrado na Figura 12, as dimensões da membrana de 0,20  $\mu\text{m}$  são: A=350 mm, B=12,72 mm e C=50 mm. Já a membrana de 3,0 kDa apresenta uma área de 2,1  $\text{m}^2$  e é composta de membranas cilíndricas de 1,0 mm de diâmetro e 60 cm de comprimento também de polissulfona. As dimensões da membrana de 3,0 kDa são: A=607 mm, B=15,0 mm e C=50 mm. A Figura 13 ilustra um corte transversal do módulo de filtração e a Figura 14 ilustra o preenchimento interno das membranas de filtração. A Figura 15 mostra uma foto do módulo de microfiltração em operação filtrando caldo de cultivo do microrganismo em estudo.

Um fator importante na escolha do módulo de microfiltração é a sua resistência à esterilização. Optou-se por esterilizar o módulo através de autoclavagem e por isso a sua resistência a uma temperatura de 120°C foi considerada.

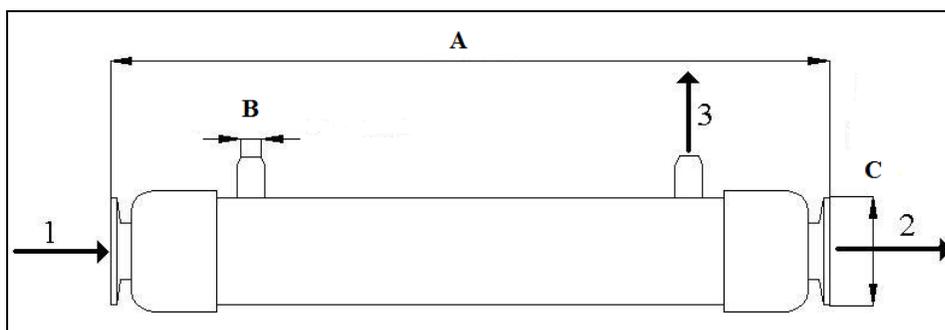


Figura 12. Ilustração esquemática do sistema de filtração. Para ambas as membranas temos em 1 a entrada do caldo, em 2 a saída de caldo não filtrado e em 3 temos a coleta do caldo filtrado.

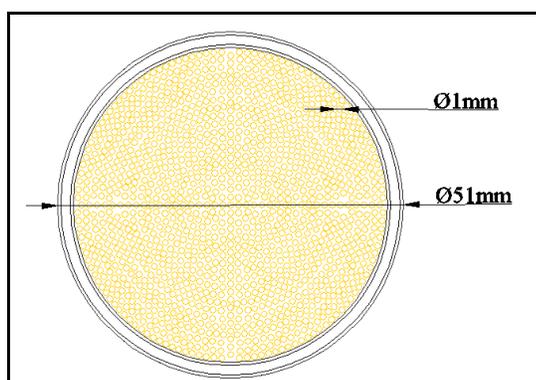


Figura 13. Corte transversal do módulo de microfiltração utilizado no processo de filtração do caldo de cultivo.



Figura 14. Ilustração do preenchimento interno da membrana de filtração.



Figura 15. Sistema de filtração em operação.

#### 4.1.3.2 Manômetro de Bourdon

Para o controle da pressão do módulo de microfiltração, foram utilizados manômetros de Bourdon preenchidos por glicerina para evitar pulsos no ponteiro do manômetro ocasionado pela bomba peristáltica utilizada o que impossibilitaria uma medida precisa da pressão do sistema. O controle da pressão do sistema é fundamental para evitar que haja desprendimento de alguma conexão e interrupção no processo de filtração.

#### 4.1.3.3 Câmara asséptica

Para garantir uma manipulação asséptica em todas as etapas de manipulação do microrganismo que se fizeram necessárias, foi utilizado uma câmara asséptica de fluxo laminar

da marca VECO, contendo um bico de Bunsen e lâmpada germicida UV. A lâmpada UV era ligada, com o fluxo laminar desligado, por um período de 15 minutos e depois de decorrido este período era imediatamente desligada com acionamento, em seguida, do fluxo laminar. Antes de iniciar as atividades no ambiente o mesmo era deixado em repouso por 15 minutos para completo estabelecimento de fluxo laminar de ar. A câmara minimiza a possibilidade de contaminação e a presença de poeira, pela passagem constante de um fluxo laminar permitindo que haja uma maior segurança na manipulação da linhagem.

#### **4.1.3.4 Ultrafreezer**

As amostras do caldo de cultivo retiradas em diferentes intervalos de crescimento durante os experimentos, bem como os criotubos contendo a linhagem em estudo foram armazenadas em um Bio-Freezer Forma Scientific à temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.1.3.5 Autoclaves**

Materiais envolvidos diretamente na realização dos cultivos, tais como meio de cultura, soluções e suspensões diversas, vidrarias, reator e outros foram esterilizados em autoclaves da marca FABBE, à temperatura de  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

#### **4.1.3.6 Mesa incubadora rotativa (shaker)**

As etapas de incubação do microrganismo objetivando a reativação e crescimento, bem como alguns experimentos preliminares, foram realizadas em incubadora rotativa da New Brunswick Scientific, Inc., modelo G-25 equipada com controle de temperatura e de agitação.

#### **4.1.3.7 Centrífuga**

Nos passos em que se fizeram necessários, amostras foram centrifugadas em centrífuga refrigerada 5810 R EPPENDORF, com capacidade de centrifugar frascos com

volumes que podem variar de 2,0 a 500,0 mL sendo necessária apenas a troca dos cabeçotes de apoio da amostra.

#### **4.1.3.8 Fluxometro de massa**

As vazões de alimentação de ar foram medidas com um fluxômetro de massa da Cole Parmer modelo EW33116-10. O fluxômetro de massa foi utilizado nos cultivos em biorreator a fim de manter constante a vazão de alimentação de ar.

#### **4.1.3.9 Medidor de pH**

O valor de pH foi medido utilizando um pHmetro de bancada da marca Orion modelo 710A.

#### **4.1.3.10 Biorreator de bancada**

Os experimentos foram realizados em biorreator de bancada da New Brunswick modelos Bioflo IIC e 310 utilizando dornas com 14,0 L de volume total. O fermentador é munido de sistema de controle de temperatura, pH, oxigênio dissolvido e agitação, bem como rotâmetro para aeração e bombas para a adição de antiespumante e soluções de ácido e de base quando se fizer necessário.

#### **4.1.3.11 Espectrômetros**

Espectrômetro de RMN da marca BRUKER ARX 200 e BRUKER DPX 400 foram utilizados para a obtenção dos espectros de RMN.

O equipamento de espectrometria de massas QuattroLC-MICROMASS, triplo-quadrupolo (QqQ) marca WATERS (Figura 16) foi utilizado no levantamento de informações necessárias para compreender a classe e estrutura do composto isolado da cepa do microrganismo em estudo. Foram realizados experimentos de inserção direta e experimento LC-MS/MS nos modos de ionização positivo e negativo, utilizando-se ESI-MS/MS.

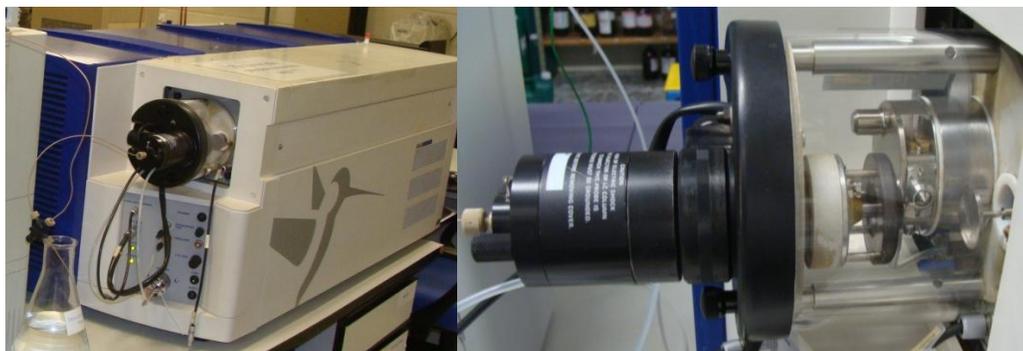


Figura 16. Ilustração do equipamento de espectrometria de massas (esquerda) e da fonte de ionização por ESI (direita) utilizados neste trabalho.

#### 4.1.3.12 Cromatógrafos

Equipamento de cromatografia em fase líquida da marca Waters – Alliance 2695 equipado com módulo de detector de arranjo de diodo (DAD) Waters 996, módulo de controle de temperatura, módulo degaseificador in-line degasser, módulo de injeção automática Waters 717 plus autosampler, duas bombas Waters 510 HPLC pump. Os cromatogramas foram registrados pelo software Millennium 3.1.

Equipamento de cromatografia em fase líquida da marca Waters equipado com módulo Waters 996 de detecção de arranjo de diodo (DAD) com aquisição de espectro de varredura de 210 – 400 nm, duas bombas Waters 510, módulo de injeção automática Waters 717 plus. Os cromatogramas foram registrados pelo software Millennium 3.1.

Equipamento de cromatografia em fase líquida da marca Waters equipado com módulo Waters 486 de detecção de UV, módulo Waters 410 de detecção de IR, duas bombas Waters 515, injetor automático Waters 717 plus.

Equipamento de cromatografia em fase líquida da marca Shimadzu composto por duas bombas LC-20AT, degaseificador de membrana DGU-20A<sub>5</sub>, auto-injetor SIL-10A, detector ELSD 2000ES Alltech e detector espectrofotométrico UV-vis SPD-20A ligados a uma interface CBM 20A. Os cromatogramas foram adquiridos pelo software LC solution.

Equipamento de cromatografia em fase gasosa CARLO ERBA GC 8000 series utilizando coluna J&W Scientific DB1 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) acoplado a um espectrômetro de massas MICROMASS Platform II com software MICROMASS MassLynx 2.1 e biblioteca de dados MICROMASS MassLynx Library NIST.

#### 4.1.4 Materiais e equipamentos diversos

- Sílica gel 230-400 mesh (Sílica Flash), para cromatografia em coluna;
- Sílica gel 70-230 mesh (Sílica comum), para cromatografia em coluna;
- Sephadex LH20, para cromatografia em coluna;
- Solventes orgânicos comerciais destilados no DQ-UFSCar
- Solventes orgânicos grau PA das marcas Merck e Aldrich;
- Solventes orgânicos grau CLAE JT Baker;
- Solventes orgânicos deuterados da marca Merck e Aldrich 98-99,9%;
- Frascos Erlenmeyers de 250, 500, 1000, 2000 mL;
- Placas de Petri;
- Ampolas de vidro boro silicato;
- Rodilhões confeccionados com gase e algodão hidrofóbico;
- Álcool etílico 70%;
- Evaporador rotativo TECNAL;
- Sal marinho da marca Red Sea Coral Pro Salt;
- Extrato de Malte;
- Extrato de Levedura;
- Glicose;
- Glutamato monossódico;
- Leite desnatado Difco;
- Agar-agar;
- Equipamento Milli-Q marca Milipore;
- Sistema a vácuo para a extração em fase sólida Supelco Visiprep<sup>TM</sup>;
- Microscópio óptico marca Olympus BX50;
- coluna Superdex Peptide 10/300 GL da marca GE Healthcare;
- polarímetro da marca Perkin-Elmer modelo 241 Polarimeter.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Métodos analíticos

Foram realizados cultivos em mesa incubadora rotativa em Erlenmeyers de 500 mL com 50 mL de meio de cultura à temperatura de 28°C e agitação de 200 rpm durante todo o período de cultivo. Os cultivos tiveram duração de tempo que variava entre 96 a 120 horas. A concentração celular nos meios de cultura contendo insolúveis foi avaliada por massa seca ou indiretamente a partir da reologia do caldo (índice de consistência, K), utilizando o reômetro comercial Brookfield, modelo LV-DVIII+. As concentrações de glicerol e de açúcares foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando coluna Shodex Sugar KS 802 (Lonpak-Waters).

Uma vez retirados os Erlenmeyers da mesa incubadora, seus conteúdos foram centrifugados a 5°C para separar as células do caldo de cultivo. O sobrenadante foi submetido à partição líquido-líquido com diferentes solventes orgânicos (n-butanol, acetato de etila) com variação do pH. A seguir, foram realizados procedimentos com o intuito de avaliar características bioativas do(s) composto(s) presentes no caldo. As atividades antiproliferativas dos extratos foram testadas através de bioensaios contra linhagens de células tumorais humanas HL-60, HCT-8, MDAMB-435 e SF-295 usando o método MTT de análise que foram desenvolvidas através de colaboração com as pesquisadoras Universidade Federal do Ceará.

Os extratos brutos foram fracionados até resultarem no isolamento dos metabólitos de interesse, utilizando-se para isto diferentes técnicas cromatográficas (cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida preparativa em bancada, cromatografia líquida de alta eficiência). Os compostos que apresentaram bioatividade, depois de isolados, foram submetidos às técnicas de espectrometria de UV-vis, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a caracterização e elucidação estrutural.

#### 4.2.2 Preparo de meio de cultura

As composições dos meios de culturas estão apresentadas nas Tabelas 4 a 12 e os protocolos de preparação utilizados para investigação e triagem do crescimento da espécie de *Streptomyces carpaticus* isolada de sedimentos marinhos estão descritos na sequência.

Tabela 4. Meio de cultura 4 (INORGANIC SALTS-STARCH AGAR, Küster, 1959a) (SHIRLING, GOTTLIEB, 1966).

Composto	Quantidade
Amido	10,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (base anidra)	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1,0 g
NaCl	1,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0 g
CaCO <sub>3</sub>	2,0 g
Água destilada	1000,0 mL
Solução de traço de sais*	1,0 mL
Agar	20,0 g

(\*) Descrito na Tabela 8.

Solução 1 – Diluir 10,0 g de amido solúvel em 500 mL de água fria.

Solução 2 – Dissolução dos sais em 500 mL de água fria.

Misturar as soluções 1 e 2 e em seguida ajustar o pH entre os valores 7,0 à 7,4.

Adicionar o ágar e homogeneizar a solução. Vedar o frasco e autoclavar durante 15 minutos a 121°C.

**Obs:** Para o preparo do meio líquido não foram utilizados os reagentes: ágar e CaCO<sub>3</sub>.

Tabela 5. Meio de cultura 5 (GLYCEROL-ASPARAGINE ÁGAR, Pridham and Lyons 1961) (SHIRLING, GOTTLIEB, 1966).

Composto	Quantidade
L-asparagine (base anidra)	1,0 g
Glicerol	10,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (base anidra)	1,0 g
Água destilada	1000,0 mL
Solução de traço de sais*	1,0 mL
Agar	20,0 g

(\*) Descrito na Tabela 8.

Diluir os reagentes em 1000 mL de água fria e em seguida ajustar o pH entre os valores 7,0 à 7,4.

Adicionar o ágar e homogeneizar a solução. Vedar o frasco e autoclavar durante 15 minutos a 121°C.

**Obs:** Para o preparo do meio líquido não foi utilizado ágar.

Tabela 6. Meio de cultura DSMZ 65 (GYM *Streptomyces* Medium) (GERMAN COLLECTION OF MICROORGANISMS AND CELL CULTURES, 2011).

Composto	Quantidade
Glicose	4,0 g
Extrato de levedura	4,0 g
Extrato de malte	10,0 g
CaCO <sub>3</sub>	2,0 g
Água destilada	1000,0 mL
Agar	12,0 g

Diluir os reagentes em 1000 mL de água fria e em seguida ajustar o pH para 7,2.

Adicionar o ágar e homogeneizar a solução. Vedar o frasco e autoclavar durante 15 minutos a 121°C.

**Obs:** Para o preparo do meio líquido não foram utilizados os reagentes: ágar e CaCO<sub>3</sub>.

Tabela 7. Meio de cultura DSMZ 65 com adição de sal marinho.

Composto	Quantidade
Glicose	4,0 g
Extrato de levedura	4,0 g
Extrato de malte	10,0 g
Sal marinho	33,33 g
Água destilada	1000,0 mL

Diluir os reagentes em 1000 mL de água fria e em seguida ajustar o pH para 7,2.

Homogeneizar a solução, vedar o frasco e autoclavar durante 15 minutos a 121°C.

Tabela 8. Preparo da solução de traço de sais (SHIRLING, GOTTLIEB, 1966).

Composto	Quantidade
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
Água destilada	100,0 mL

Diluir os reagentes em 100 mL de água destilada e em seguida armazenar em frasco previamente limpo sob o abrigo da luz e sob refrigeração.

Tabela 9. Meio de cultura NBIMCC 185 (Glucose Medium for *Streptomyces*) (NATIONAL BANK FOR INDUSTRIAL MICROORGANISMS AND CELL CULTURES, 2011).

Composto	Quantidade
glicose	10,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
Extrato de carne	4,0 g
Peptona	4,0 g
NaCl	2,5 g
Água destilada	1000,0 mL
Agar	20,0 g

Diluir os reagentes em 1000 mL de água fria e em seguida ajustar o pH para 7,2. Homogeneizar a solução, vedar o frasco e autoclavar durante 15 minutos a 121°C.

**Obs:** Para o preparo do meio líquido não foi adicionado ágar.

Tabela 10. Meio de cultura DSMZ 246 (Sea Water Agar) (GERMAN COLLECTION OF MICROORGANISMS AND CELL CULTURES, 2011).

Composto	Quantidade
Extrato de carne bovina	10,0 g
Peptona	10,0 g
Água de torneira	250,0 mL
Água do mar	750,0 mL
Ágar	20, g

Diluir os reagentes em 1000 mL de água fria e em seguida ajustar o pH para 7,3. Homogeneizar a solução, vedar o frasco e autoclavar durante 15 minutos a 121°C.

**Obs:** Para o preparo do meio líquido não foi adicionado ágar.

Tabela 11. Meio de cultura DSMZ 545 (Tryptone Soya Broth - TSB) (GERMAN COLLECTION OF MICROORGANISMS AND CELL CULTURES, 2011).

Reagente	Quantidade
Peptona de caseína	17,0 g
Peptona de farelo de soja	3,0 g
Glicose	2,5 g
NaCl	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g
Água destilada	1000,0 mL

Diluir os reagentes em 1000 mL de água fria e em seguida ajustar o pH para 7,3.

Homogeneizar a solução, vedar o frasco e autoclavar durante 15 minutos a 121°C.

### 4.2.3 Preparo de solução lioprotetora

A solução lioprotetora foi preparada utilizando leite desnatado e glutamato monossódico. Esterilizou-se a solução de leite desnatado separada da solução de glutamato. Para preparar o leite desnatado foram diluídos 10 g de leite em 90 mL de água, o procedimento foi realizado em agitador magnético para garantir a completa dissolução do leite. O leite foi esterilizado em autoclave por 10 minutos a 121°C.

No caso do glutamato monossódico preparou-se uma solução 50% m/v que foi esterilizada em autoclave por 15 minutos.

Após a esterilização destes componentes foi realizado o preparo da solução lioprotetora em ambiente asséptico utilizando pra isso uma capela de fluxo laminar. Um volume de 10 mL da solução de glutamato monossódico foi adicionado aos 90 mL de leite desnatado, obtendo após a mistura a solução lioprotetora (leite desnatado 10% e glutamato monossódico 5% m/v).

### 4.2.4 Determinação da concentração celular pelo método gravimétrico (massa seca)

O acompanhamento da concentração celular durante os cultivos foi realizado através do tradicional método de determinação da massa seca micelial onde uma alíquota de volume fixo do caldo de cultivo em diferentes tempos durante o cultivo foi coletada e centrifugada a 11000 rpm por 15 minutos. Em seguida o sobrenadante era armazenado em frascos rotulados e devidamente acondicionado para realização de determinação de substratos e produtos durante o cultivo e o pellet formado era novamente ressuspensionado em água Milli-Q e após ser agitado em vórtex era novamente submetido à centrifugação a 11000 rpm por 15 minutos. Após a segunda centrifugação o sobrenadante era descartado e o pellet formado era disposto em frascos previamente pesados e dispostos em estufa por período de 24 horas a temperatura de 60°C. O cálculo para obtenção da concentração celular é dado pela equação 1.

$$(m_{Pf} - m_{Pi}) \times 10^3 \div V_T = Cx \text{ (g x L}^{-1}\text{)} \quad \text{Equação 1}$$

onde:

$m_{pi}$ : massa do frasco antes da adição do pellet micelial (g)

$m_{pf}$ : massa do frasco depois do acondicionamento em estufa por 24 h (g)

$V_T$ : volume de amostra (mL)

$C_x$ : concentração celular ( $\text{g.L}^{-1}$ )

#### 4.2.5 Velocidade específica máxima de crescimento celular

A partir dos resultados obtidos nos cultivos do microrganismo em estudo, que estão representados em gráficos de concentração celular ( $C_x$  em  $\text{g.L}^{-1}$ ) em função do tempo (h) para melhor compreensão dos dados, foi possível determinar a velocidade específica de crescimento celular ( $\mu$ ), considerando-se a equação:

$$\mu = \frac{1}{C_x} \frac{dC_x}{dt} \quad (\text{Equação 2})$$

onde,  $\mu$  é a velocidade específica de crescimento celular,  $C_x$  é a concentração celular (em  $\text{g.L}^{-1}$ ) e  $t$  (em horas) é o tempo de cultivo. Na fase de cultivo onde o crescimento celular ocorre de forma exponencial tem-se que:

$$\frac{1}{C_x} \frac{dC_x}{dt} = cte = \mu_{\max} \quad (\text{Equação 3})$$

Integrando a equação 3 obtém-se a equação 4:

$$\ln C_x = \ln C_{x_0} + \mu_{\max} \times (t - t_0) \quad (\text{Equação 4})$$

onde,  $C_{x_0}$  é a concentração celular no início da fase exponencial de crescimento celular e  $\mu_{\max}$  é a velocidade específica máxima de crescimento celular, obtida como sendo o coeficiente angular do gráfico  $\ln C_x$  versus  $t$ .

#### 4.2.6 Tempo de geração, $t_G$

A determinação do tempo de geração, que é o tempo necessário para uma unidade celular se duplicar,  $t_G$  (em horas), foi obtida pela Equação 5:

$$t_G = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (\text{Equação 5})$$

#### 4.2.7 Determinação do coeficiente de rendimento celular ( $Y_{X/S}$ )

Para melhor descrever o desempenho dos cultivos, alguns parâmetros são definidos como o coeficiente global de rendimento de substrato (S) a células (X),  $Y_{X/S}$ , ou coeficiente global de rendimento celular, da forma que segue:

$$Y_{X/S} = -\frac{\Delta C_x}{\Delta C_S} \quad (\text{Equação 6})$$

Sendo  $C_S$  igual à concentração de açúcares redutores totais ( $C_{ART}$ ), tem-se que :

$$Y_{X/ART} = -\frac{\Delta C_x}{\Delta C_{ART}} \quad (\text{Equação 7})$$

$C_{ART}$  (em  $\text{g.L}^{-1}$ ) é calculado pela Equação 8, onde  $C_{GLU}$  (em  $\text{g.L}^{-1}$ ) é a concentração de glicose e a  $C_{Mal}$  (em  $\text{g.L}^{-1}$ ) é a concentração de maltose presente no caldo.

$$C_{ART} = C_{Glu} + \left(\frac{360}{342}\right) \times C_{Mal} \quad (\text{Equação 8})$$

#### 4.2.8 Bioensaios

Os bioensaios foram realizados utilizando extratos obtidos da extração líquido-líquido com diferentes solventes orgânicos do caldo de cultivo.

A identificação de compostos bioativos através de bioensaios de atividade antiproliferativas contra linhagens de células tumorais humanas HL-60 (leucemia), HCT-8 (câncer de cólon), MDAMB-435 (melanoma) e SF-295 (sistema nervoso central) usando o método MTT de análise foram desenvolvidas através de colaboração com as pesquisadoras Dr<sup>a</sup>. Claudia do Ó Pessoa e Dr<sup>a</sup>. Raquel Carvalho Montenegro do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, utilizando extratos dos cultivos deste estreptomiceto isolado de sedimento marinho.

#### 4.2.9 Avaliação do potencial citotóxico de substâncias presentes no caldo da linhagem em estudo frente a diferentes linhagens de células tumorais

A avaliação do potencial citotóxico de moléculas presentes no caldo de cultivo do estreptomiceto em investigação tem como objetivo verificar a citotoxicidade *in vitro* de extratos e frações em diferentes linhagens de células tumorais. Essa análise faz parte de um *screening* inicial para determinação do potencial antiproliferativo destas amostras e foi avaliada através do método de MTT proposto por Mosmann (1983), o qual vem sendo utilizado no programa de *screening* do National Cancer Institute – NCI dos Estados Unidos (SKEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e de baixo custo. Foi descrito primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT) (51) em azul de formazan (52), a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (Figura 17). A solução amarela do MTT é reduzida pela atividade mitocondrial nas células metabolicamente ativas em um cristal roxo. Na placa ilustrada na Figura 18, pode-se observar que somente os poços referentes às colunas 3 e 4 nas linhas G e H apresentaram atividade pelo método MTT. As colunas 3 e 4 correspondem à duplicata da mesma fração e as colunas 1 e 2 são os controles positivo (presença de Doxorrubicina) e negativo (ausência de Doxorrubicina), respectivamente. É importante ressaltar que o estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIGE, 1996).

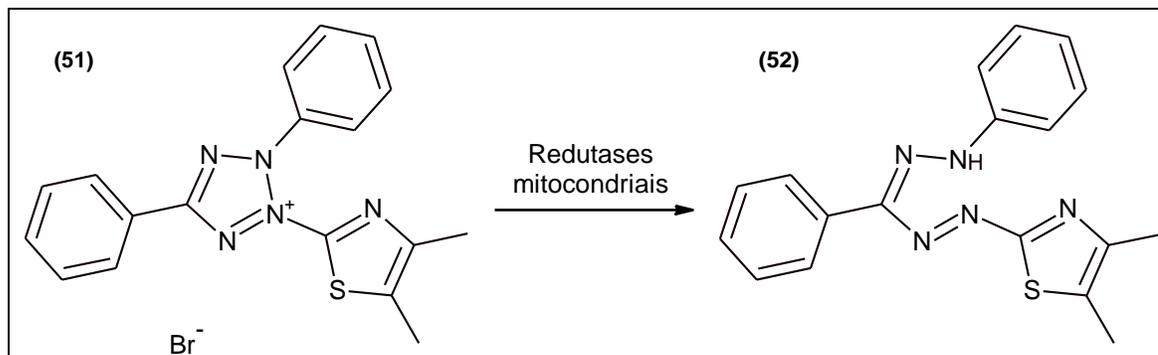


Figura 17. Conversão do sal MTT em azul de formazan.



Figura 18. Experimento de teste de citotoxicidade *in vitro* com células tumorais MDA-MB 435 de frações obtidas do caldo de cultivo do *Streptomyces carpaticus*.

As linhagens tumorais utilizadas, listadas na Tabela 12, foram cedidas pelo NCI, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino e 1% m/v de antibióticos (penicilina ou estreptomicina), mantidas em estufa a temperatura de 37°C, atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade onde foi realizado o monitoramento do crescimento celular com auxílio de microscópio de inversão a cada 24h. Quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura em uma concentração que variava entre 0,5 e 1,0 x 10<sup>6</sup> células/mL.

As amostras foram previamente diluídas em DMSO puro e estéril e em seguida testadas em diferentes concentrações, sendo que para extratos foram realizados testes a concentração de 50 µg/mL e para frações previamente purificadas foram realizados testes a concentração de 25 µg/mL. As amostras foram testadas em triplicatas e o quimioterápico Doxorrubicina foi utilizado como controle positivo.

As células foram semeadas em placas em diferentes concentrações (Tabela 12). As placas foram incubadas por 72 h em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas a 1500 rpm durante 15 min e o sobrenadante aspirado. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT 10% em RPMI 1640 e as placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> por 3 h. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min, tendo o sobrenadante aspirado e seu precipitado ressuspensionado em 150 µL de DMSO puro e agitado por 10 minutos até completa dissolução dos cristais de formazan. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 595nm.

Os experimentos foram analisados segundo a média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

Tabela 12. Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro* através do método do MTT.

<b>Linhagem Celular</b>	<b>Tipo Histológico do Câncer/Origem</b>	<b>Concentração de Plaqueamento (células/mL)</b>
HL-60	Leucemia promielocítica humana	$0,3 \times 10^6$
MDA-MB 435	Carcinoma de mama humano	$0,1 \times 10^6$
HCT-8	Carcinoma de cólon humano	$0,7 \times 10^5$
SF-295	Glioblastoma humano	$0,1 \times 10^6$

#### 4.2.10 Metodologia de preservação da linhagem *Streptomyces carpaticus*

O microrganismo em estudo foi preservado a partir de repiques proveniente de meio de cultura sólido, na forma de células vegetativas em meio líquido sob refrigeração à temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  e, ainda, na forma de esporos e micélios celulares liofilizados, segundo os procedimentos descritos a seguir. A preservação da linhagem pura do microrganismo é um passo importante na investigação científica, pois problemas com contaminações e mutações com alteração no metabolismo do microrganismo podem conduzir a falta de sucesso ou atraso na coleta de dados da pesquisa.

##### 4.2.10.1 Preservação em meio de cultura sólido

Foram realizados cultivos em meio sólido utilizando placas de Petri a fim de observar as características de crescimento em meio sólido da linhagem nos meios de cultura utilizados além de obter material de preservação nestas condições a serem mantidos refrigerado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Foram preparados três meios de cultura sólidos: Meio 4, Meio 5 e Meio DSMZ 65 descritos no item 4.2.2. Em seguida, os meios devidamente autoclavados foram vertidos nas placas de Petri até cobrir toda a superfície da placa e, então, deixados à temperatura ambiente a fim de se obter completa solidificação dos mesmos sendo que este procedimento foi realizado em ambiente asséptico. As placas foram armazenadas por 48 h em temperatura ambiente no intuito de verificar se houve contaminação das mesmas. Em seguida, foram inoculadas com o

*Streptomyces carpaticus* utilizando-se do método de propagação por estriamento com uso de alça esterilizada em chama. Foram inoculadas placas em triplicata para o microrganismo em estudo a uma temperatura de 30°C em incubadora vertical de forma estática sob a ausência da luz, devido à origem desta espécie ser de região com baixa luminosidade. As placas ficaram incubadas por 15 dias e foram observadas a cada três dias após a inoculação a fim de se observar as características de crescimento e eventual contaminação das mesmas.

O estudo da morfologia das colônias tal como cor, forma, estrutura, brilho e dimensões permite uma identificação preliminar, porém não definitiva, do microrganismo em meio sólido.

#### **4.2.10.2 Preservação em solução crioprotetora**

A preservação da linhagem em meio líquido é eficaz e extremamente útil pelo fato de facilitar o início de cultivos para a obtenção de caldo para realização de fracionamento, levantamento de variáveis cinéticas e outros.

Na preservação em meio líquido, o caldo de cultivo contendo células vegetativas do microrganismo foi armazenado em criotubos (frascos vial) a temperatura de -70°C. O procedimento se passa em três etapas conforme descrito na sequência:

1. Na primeira etapa o microrganismo foi reativado em meio líquido DSMZ 65 modificado (Tabela 7) em frasco Erlenmeyer de 500 mL utilizando volume de trabalho de 47 mL e células vegetativas do microrganismo previamente congeladas em criotubo foram utilizadas como inóculo. O frasco foi disposto em mesa agitadora a 200 rpm, temperatura de 28°C e ausência de luz. Nesta etapa o inóculo pode ser proveniente tanto de raspagem da cultura em placa de Petri ou de vial contendo a linhagem já previamente estocada. É importante frisar que o tamanho do inóculo define o período necessário para a passagem para a segunda etapa (etapa de crescimento). Inóculo pequeno (pequena quantidade de esporos e ou de células vegetativas) proporcionam uma fase de adaptação (fase “Lag”) extensa e ao contrário, inóculo grande (grande quantidade de esporos e ou células vegetativas) proporciona um rápido crescimento e passagem rápida para a fase de crescimento estacionário;

2. Na segunda etapa, após transcorridas 48 h de cultivo, observou-se crescimento da cultura devido à turvação e mudança de coloração do caldo. Em seguida o caldo

do frasco foi utilizado como inóculo para frascos Erlenmeyers de 500 mL de volume, utilizando aproximadamente 10% de volume de inóculo para a cultura. Decorridas 36 h de incubação em mesa agitadora nas mesmas condições de temperatura e agitação citadas na etapa 1, os frascos são retirados e servem de inóculo para novos frascos Erlenmeyers de 500 mL de volume onde foi utilizado 10% de volume de inóculo para cada frasco;

3. Na terceira e última etapa, novamente após transcorridas 36 h de cultivo, é adicionado glicerol previamente esterilizado obtendo assim uma solução final 10 % v/v de glicerol onde volumes de 3 mL desta solução contendo grande parte das células vegetativas em fase de crescimento exponencial foram transferidas, de forma asséptica, para vials estéreis com auxílio de pipeta automática. Os vials foram dispostos em banho de gelo durante 30 min e, em seguida, foram devidamente identificados e finalmente armazenados em ultrafreezer à temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.10.3 Preservação por liofilização de esporos celulares**

Para a obtenção de esporo celular foi realizado um cultivo em meio DSMZ 65 modificado sólido em frascos Erlenmeyers de 1 L utilizando volume de trabalho de 100 mL que foi inoculado com microrganismo proveniente de criotubos a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Os frascos foram dispostos em incubadora à temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  por um período de 20 dias. Após este período observou-se formação de colônias branco acinzentado na superfície do ágar. As colônias formadas foram então removidas utilizando solução salina contendo NaCl 0,9% m/v e Tween 80 0,1% m/v com uso de barra magnética previamente esterilizada. As etapas estão descritas na sequência:

1. Após verter a solução salina e a barra magnética no frasco de cultura sob condições assépticas, as colônias foram removidas do meio sólido pelo movimento da barra magnética utilizando um agitador magnético. Depois de realizado o procedimento nos frascos Erlenmeyers, o sobrenadante foi coletado e filtrado em seringa de 50 mL previamente esterilizada com algodão ou lã de vidro em seu interior. Essa suspensão de esporos foi filtrada para retirada dos restos de micélio e possíveis fragmentos de ágar. Para filtração a seringa foi encaixada em um tubo estéril. A suspensão de esporos foi colocada dentro da seringa para ser filtrada e, caso necessário, o êmbolo poderia ser utilizado para ajudar a forçar a filtração. A suspensão de esporos foi então centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e os esporos

ressuspendidos na solução lioprotetora (item 4.2.3), podendo ser então distribuídos nas ampolas. É importante salientar que os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar em condições assépticas;

2. Em seguida as amostras foram liofilizadas. Tanto no equipamento de liofilização de centrífuga como no convencional, a amostra foi congelada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes de ser introduzida no equipamento. Uma vez congelada a amostra e conectada no liofilizador foi estabelecido o vácuo para a sublimação da água da amostra. Esta etapa inicial é importante, pois a amostra não pode descongelar durante o processo de liofilização;

3. A última etapa constitui em fechar as ampolas. As ampolas ficam conectadas ao carrossel do liofilizador que precisa estar em constante vácuo. As ampolas foram então vedadas com auxílio de um maçarico. É também de grande importância vedar as ampolas a vácuo, pois outro grande vilão da preservação por liofilização é o oxigênio. Se acontecerem pequenas trincas no vidro isto pode levar à entrada de ar e então comprometer a qualidade da preservação.

#### **4.2.10.4 Preservação por liofilização de micélio celular**

Para a obtenção de micélio celular foi realizado um cultivo em meio DSMZ 65 modificado (Tabela 7) em frascos Erlenmeyers de 500 mL utilizando volume de trabalho de 50 mL. Primeiramente foi realizado o procedimento de reativação do microrganismo e, para isto, foi inoculado um frasco Erlenmeyer de 500 mL de volume contendo 47 mL de meio DSMZ 65 modificado utilizando como inóculo, microrganismo proveniente de criotubo a  $-70^{\circ}\text{C}$ . O frasco foi disposto em mesa incubadora a 200 rpm, temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  e ausência de luz. Após 48 h de cultivo observou-se crescimento celular devido à turvação e mudança de coloração do caldo de cultivo. Em seguida, o caldo foi utilizado como inóculo para frascos Erlenmeyers de 500 mL de volume, utilizando aproximadamente 10% de volume de inóculo para a cultura. Decorridas 36 h de incubação em mesa agitadora, os frascos foram retirados e serviram de inóculo para novos frascos Erlenmeyers de 500 mL de volume onde foi utilizado 10% de volume de inóculo. Decorridas 24 h de incubação em mesa agitadora, foram realizados os procedimentos descritos como segue:

1. Sob condições assépticas, o caldo de cultivo foi centrifugado a 11000 rpm por 15 minutos a 5 °C. Em seguida, ainda em condições assépticas, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspendido em solução salina contendo NaCl 0,9% m/v e Tween 80 0,1% m/v. Nesta etapa foi utilizado um agitador tipo vórtex para garantir a ressuspensão completa do pellet na solução salina;

2. Em seguida, o frasco foi novamente centrifugado nas mesmas condições descrita na etapa 1. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e descartado. O pellet remanescente foi ressuspendido com solução lioprotetora;

3. Com o auxílio de pipeta de Pasteur previamente autoclavada, um volume de 0,1-0,2 mL (4 a 8 gotas) foi transferido para ampolas estéreis e imediatamente vedadas com algodão estéril. Em seguida, as ampolas foram dispostas em banho de gelo durante 30 minutos e transcorrido o tempo, as mesmas foram levadas a ultrafreezer à temperatura de -70 °C. Os procedimentos seguintes são idênticos aos realizados nas etapas 2 e 3 do item 4.2.9.3. As células vegetativas, ao contrário dos esporos, necessitam de uma adaptação a mudança de temperatura para garantir maior viabilidade celular quanto estas forem reativas.

### **4.3 Cultivos em meio líquido**

Devido ao trabalho em desenvolvimento visar à capacidade de produção de substâncias de interesse produzidas pelo microrganismo e, sobretudo se tratar de uma linhagem ainda não estudada, foi de extrema importância o levantamento de informações acerca da cinética de crescimento e explorar a possível bioatividade presente nos extratos e frações obtidas através de partições líquido-líquido.

No intuito de obter a cinética de crescimento, extratos e diferentes frações necessários para a realização dos testes de bioatividade, foram realizados cultivos em meio líquido DSMZ 65 realizados em três distintas etapas com a linhagem de *Streptomyces carpaticus* durante o desenvolvimento do trabalho. As descrições das etapas e seus objetivos são descritos a seguir:

Etapa 1 – cultivo em incubador rotativo utilizando frascos Erlenmeyers com finalidade de confirmação da presença de atividade citotóxica no caldo de cultivo;

Etapa 2 – cultivos em biorreator com finalidade de obtenção de volume suficiente de caldo de cultivo para posterior isolamento de compostos de interesse;

Etapa 3 – cultivo em incubador rotativo em quatro diferentes meios de cultivo com a finalidade de avaliar o perfil de produção do composto de interesse.

#### 4.3.1 Protocolos de cultivos em incubador rotativo e em biorreator

O protocolo de preparo de inóculo e cultivo em incubador rotativo, ilustrado na Figura 19, está dividido em três etapas:

**1º Etapa (germinação do microrganismo):** Primeiramente realizou-se o procedimento de reativação dos microrganismos e para isto foi inoculado um número de frascos necessários de acordo com as necessidades de cada experimento sendo os frascos Erlenmeyers de 500 mL de volume contendo 47 mL de meio de cultivo utilizando 3 mL de suspensão proveniente de criotubo como inóculo. Os frascos foram dispostos em mesa incubadora a 200 rpm e 28°C por 48 h.

**2º Etapa (crescimento do microrganismo):** Após final do período de reativação, onde observou-se crescimento das culturas devido à turvação e mudança de coloração do caldo de cultivo, a suspensão contida nos frascos de cultura foi utilizada para inocular frascos Erlenmeyers de 500 mL de volume, contendo 45 mL de meio de cultivo, onde foram inoculados com 5 mL de suspensão sob condições assépticas e, em seguida, dispostos em mesa agitadora a 200 rpm e 28°C por 36 h.

**3º Etapa (produção):** Após a etapa de crescimento, a suspensão contida nos frascos Erlenmeyers foram utilizadas como inóculo para experimentos em frascos Erlenmeyers ou em biorreator. Nos experimentos em frascos Erlenmeyers, 100 mL de suspensão proveniente da etapa de crescimento foram inoculados em 900 mL de meio de cultura de produção, totalizando 1000 mL de caldo inicial. Volumes de 50 mL foram distribuídos para Erlenmeyers de 500 mL com auxílio de bomba peristáltica de alta vazão e os mesmos foram incubados em mesa agitadora a 200 rpm e 28°C dando início à etapa de produção que teve duração de aproximadamente 96 h. Em determinados tempos de cultivo, foram retiradas amostras que correspondiam ao volume de Erlenmeyers retirados da mesa incubadora. Em cada um dos dois cultivos em biorreator, que tiveram como objetivo a obtenção de matéria prima suficiente para os experimentos de partição e isolamento dos produtos com bioatividade, 1200 mL de suspensão proveniente da etapa de crescimento foram inoculados em 9800 mL de meio de cultura de

produção, totalizando 12000 mL de caldo inicial, dando início à etapa de produção. Os cultivos foram conduzidos a 28°C, pH constante em 7,2, vazão específica de alimentação de ar de 0,5 vvm, frequência de 300 rpm por 90 h. A frequência ajustada em 300 rpm foi utilizada porque estas condições definem uma mesma capacidade de transferência de oxigênio das obtidas em incubador rotativo (NETO, 2005).

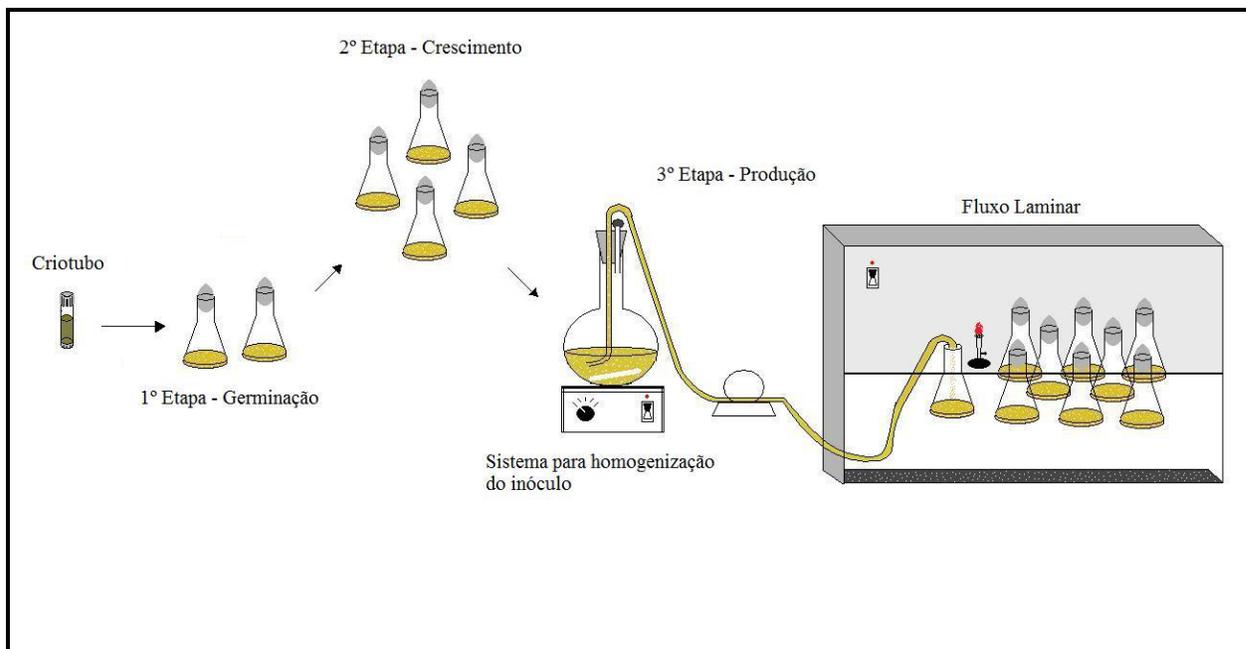


Figura 19. Esquema ilustrativo representado as três distintas etapas de preparo do inóculo que antecedem a coleta de amostras durante os experimentos em mesa incubadora com o microrganismo *Streptomyces carpaticus*.

#### 4.4 Empacotamento de coluna analítica

Foi realizado o empacotamento de coluna para uso em cromatografia líquida no laboratório do Grupo de Síntese Orgânica e CLAE do Programa de Pós-graduação em Química da UFSCar usando sorbente LiChrosorb<sup>®</sup> RP-18 (partícula de 7 $\mu$ m) da marca Merck. As dimensões da coluna analítica foram 4,6 mm de diâmetro interno x 250 mm de comprimento.

Para o empacotamento utilizou-se uma bomba pneumática em fase líquida Haskel TP-DSF. A coluna foi empacotada em tubo de aço inox com pressão máxima de 8000psi. Inicialmente, as tubulações foram limpas com os solventes acetona, hexano, solução aquosa de 10% de ácido nítrico, água e isopropanol, respectivamente.

A fase estacionária 2,0 g foi suspensa em 30 mL de metanol e sonicada por 30 segundos. Em seguida empacotou-se a coluna com 500 mL de metanol, sendo que foi eluído 200

mL de solvente de cima para baixo e 300mL no sentido oposto. A coluna foi condicionada com MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30) como fase móvel por 24 h. Para a avaliação da coluna empacotada foi realizado uma corrida cromatográfica no modo de eluição isocrático, utilizando como fase móvel os solventes MeOH:H<sub>2</sub>O na proporção de 70:30 numa vazão de 1,0 mL/min e comprimento de onda fixado em 254 nm no detector de UV. Foi utilizada a solução padrão 0,6 mg/L de Acetofenona e 0,7 mg/L de Benzofenona.

#### **4.5 Condições cromatográficas aplicadas nas análises por HPLC-UV e HPLC-IR**

As condições cromatográficas empregadas nas análises da Figura 38 foram modo de eluição gradiente com amostra numa concentração de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> e volume de injeção de 30 µL. Usou-se uma coluna Luna C18 (Phenomenex) com diâmetro de partícula de 5 µ e com as dimensões de 150 x 4.6 mm. A vazão de trabalho usado na análise foi de 1,0 ml.min<sup>-1</sup> onde a fase móvel A usada foi H<sub>2</sub>O e a fase B foi MeOH.

Para as análises da Figura 47 e 51 foram utilizadas as condições cromatográficas no modo de eluição isocrático onde a vazão de trabalho usado na análise foi de 0,9 ml.min<sup>-1</sup> usando MeOH como fase móvel. A concentração da amostra foi de 4,0 mg.mL<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20 µL. Usou-se uma coluna Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare).

A metodologia utilizada para quantificação de açúcares presentes no caldo de cultivo foi realizada com amostras previamente filtradas em 0,22 µm e analisadas via CLAE-IR utilizando coluna da marca Shodex (Sugar KS-802) (8.0 ID x 300 mmL) número H606031 e pré-coluna Shodex RSpak KC-G número F912156, fase móvel H<sub>2</sub>O, vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção 20 µL. A análise foi realizada na temperatura de 50 °C.

#### **4.6 Condições cromatográficas aplicadas nas análises por HPLC-ESI-MS para frações ativas**

As condições cromatográficas utilizadas nas análises das Figuras 37 a 42 foram uso de modo de eluição gradiente com t=0 min (H<sub>2</sub>O 80%/MeOH 20 %); t=40 min (H<sub>2</sub>O 0%/MeOH 100 %); t=45 min (H<sub>2</sub>O 0%/MeOH 100 %); t=50 min (H<sub>2</sub>O 80%/MeOH 20 %); t=60 min (H<sub>2</sub>O 80%/MeOH 20 %) empregando coluna Luna C18 (Phenomenex); diâmetro de partícula 5 µ; dimensões 150 x 4.6 mm; vazão de trabalho de 1,0 ml.min<sup>-1</sup>.

#### 4.7 Condições instrumentais aplicadas nas análises por HPLC-ESI-MS/MS via SRM

O método cromatográfico foi desenvolvido utilizando uma coluna analítica C18 LiChrosorb (Merck) (dimensões de 250 x 4,6 mm, 7 µm). A vazão da fase móvel foi 1,0 mL/min em método gradiente de análise com t=0 min (H<sub>2</sub>O 10%/MeOH 90 %); t=5 min (H<sub>2</sub>O 0%/MeOH 100 %); t=15 min (H<sub>2</sub>O 0%/MeOH 100 %); t=16 min (H<sub>2</sub>O 10%/MeOH 90 %); t=20 min (H<sub>2</sub>O 10%/MeOH 90 %).

A análise foi realizada com uso de divisor de vazão que enviava ao espectrômetro de massas um volume de 300 µL. A ionização das amostras foi realizada utilizando uma fonte ESI operando no modo positivo de análise. A temperatura utilizada no bloco da fonte foi de 90 °C e do sensor foi de 250°C. A vazão de nitrogênio do gás de desolvatação foi ajustado em 633 L/h e do nebulizador em 42 L/h. A voltagem do capilar foi mantida em 3,36 Kvolts, o cone em 39 Volts e a energia de colisão foi de 40 eVolts para a transição monitorada 1129→1084. O gás de colisão (argônio) foi mantido em uma pressão de  $1,7 \cdot 10^{-3}$  mBar durante todas as análises. No desenvolvimento da estimativa de produção foi utilizado 0,2 segundos para o parâmetro *dwell time* (período de tempo em cada *scan* de uma determinada transição no experimento de SRM) com um *inter scan delay* (intervalo de tempo entre *scan*) de 0,01 segundos.

Amostras de caldo de cultivo do *S. carpaticus* cultivadas em quatro diferentes meios (DSMZ 65, NBIMCC 185, DSMZ 246 e DSMZ 545) foram analisadas ao final do desenvolvimento da metodologia de estimativa de produção de Valinomicina. As amostras foram preparadas conforme indicado no item 4.9.

#### 4.8 Fracionamento das amostras obtidas do caldo de cultivo do *S. carpaticus*

As amostras obtidas no desenvolvimento do trabalho foram fracionadas de acordo com os respectivos fluxogramas representados nas Figuras que seguem.

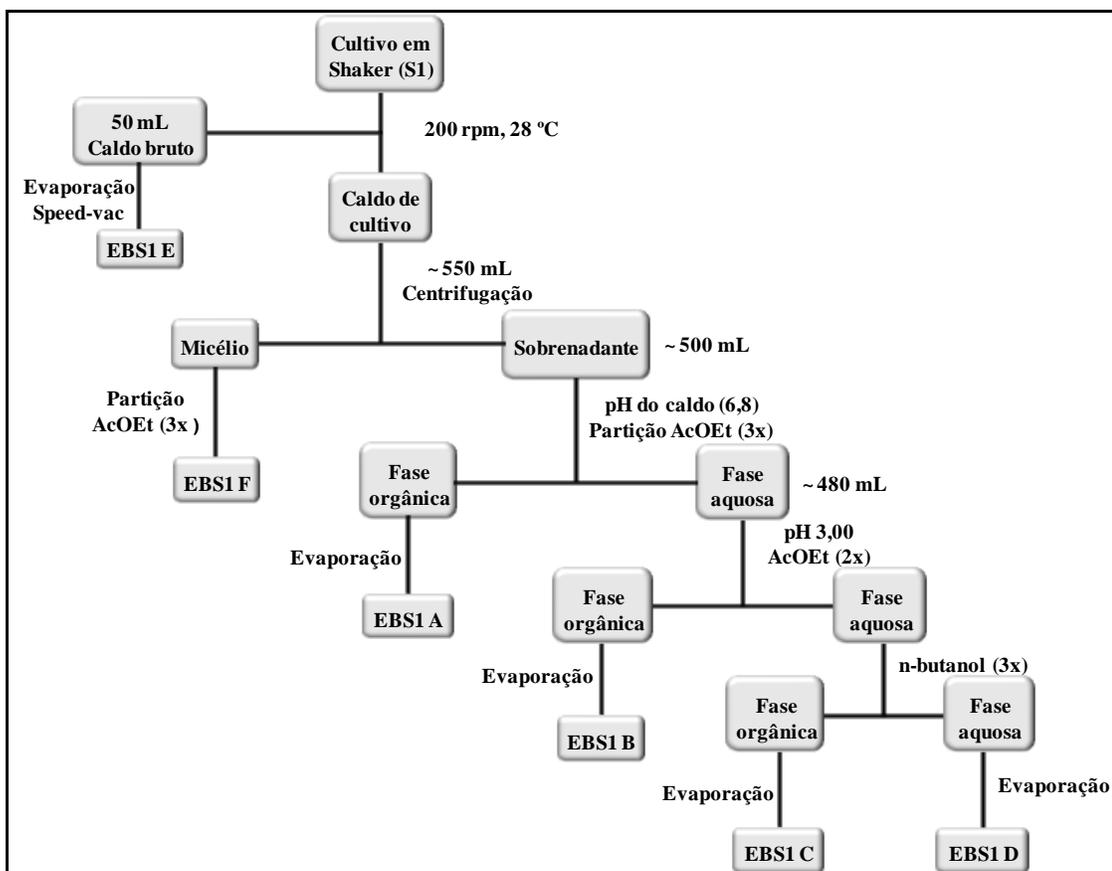


Figura 20. Fluxograma das etapas de fracionamento realizadas com o caldo de cultivo obtido no Experimento S1.

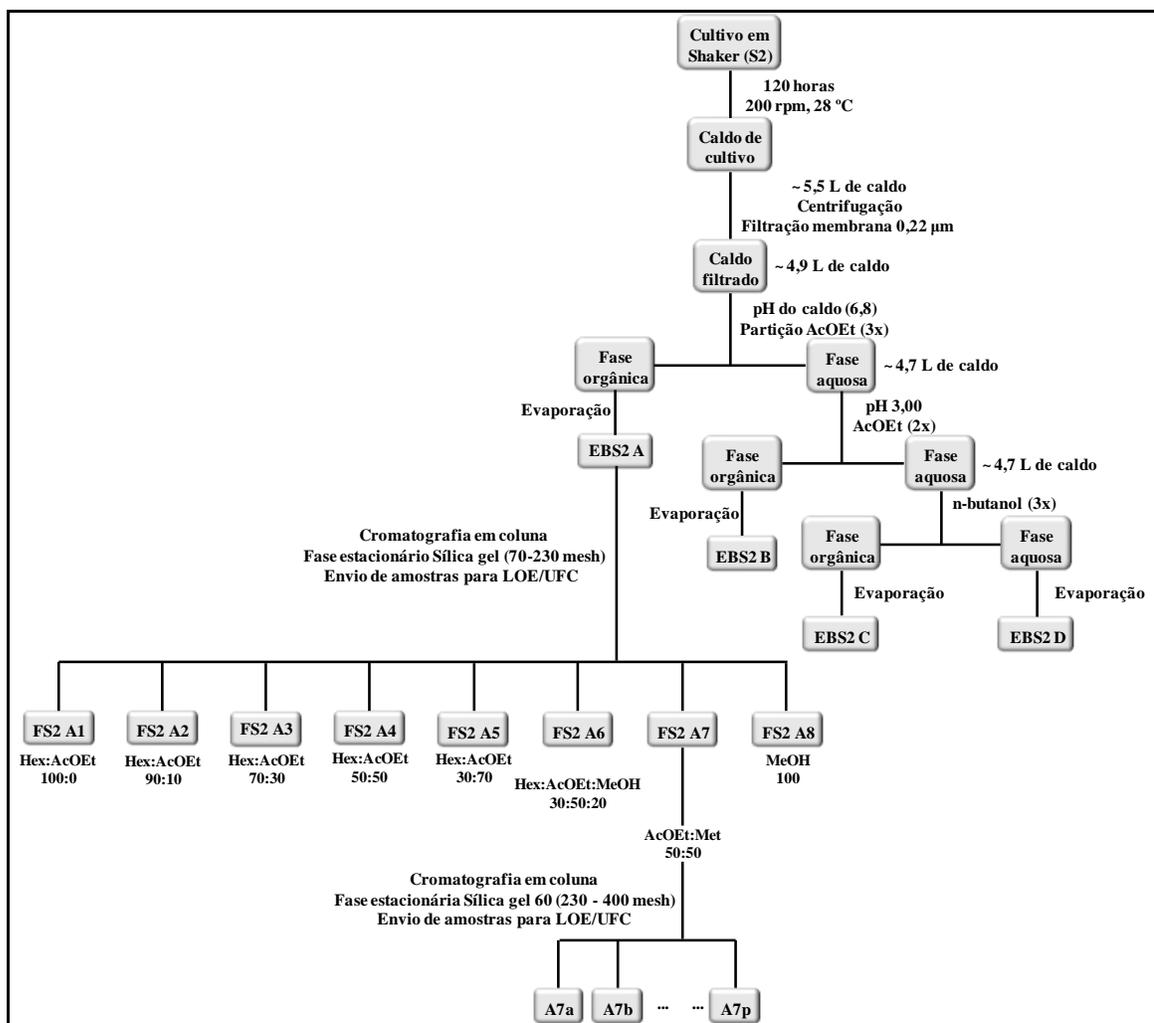


Figura 21. Fluxograma das etapas de fracionamento realizadas com o caldo de cultivo obtido no Experimento S2.

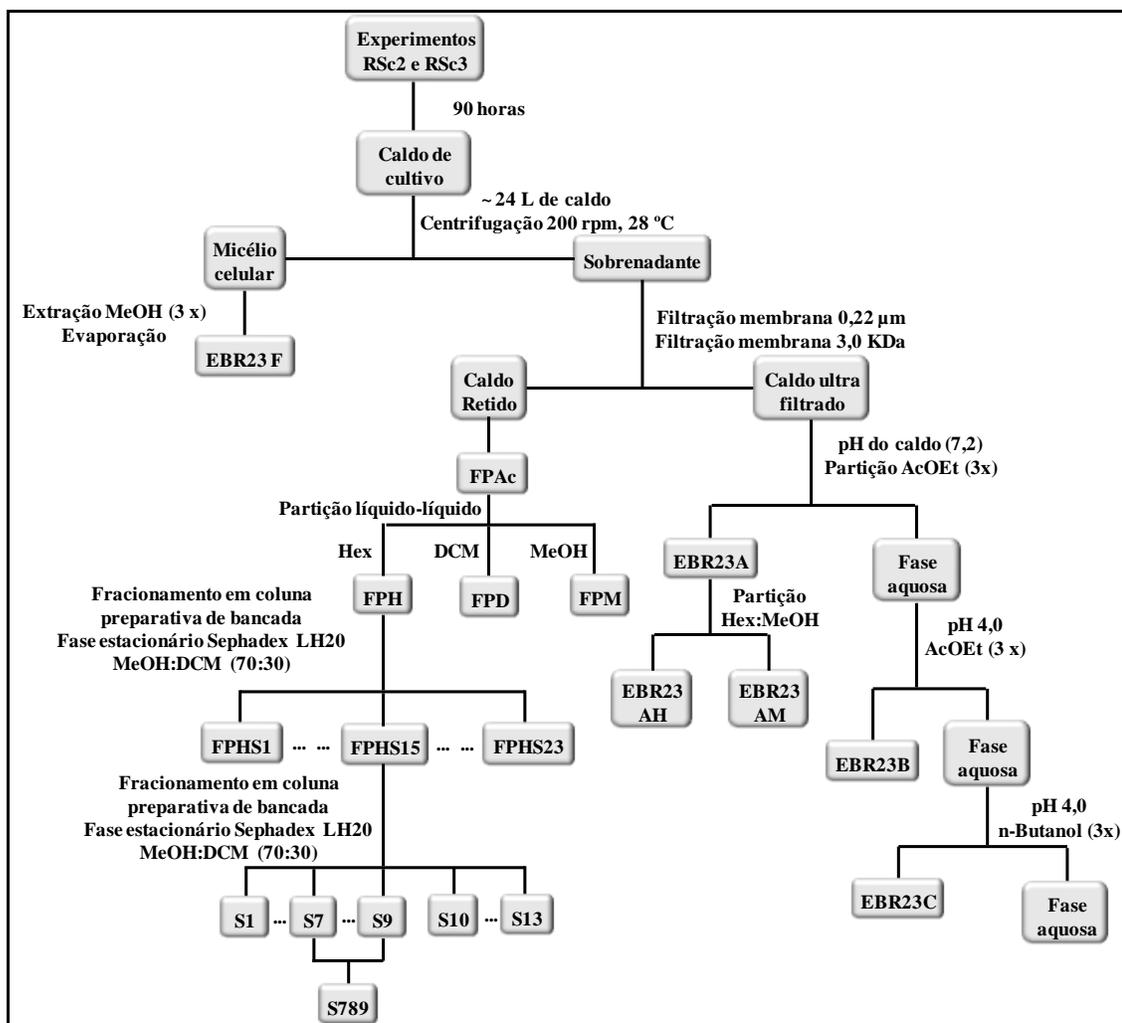


Figura 22. Fluxograma ilustrativo das etapas realizadas com o caldo de cultivo obtidos dos Experimentos RSc2 e RSc3.

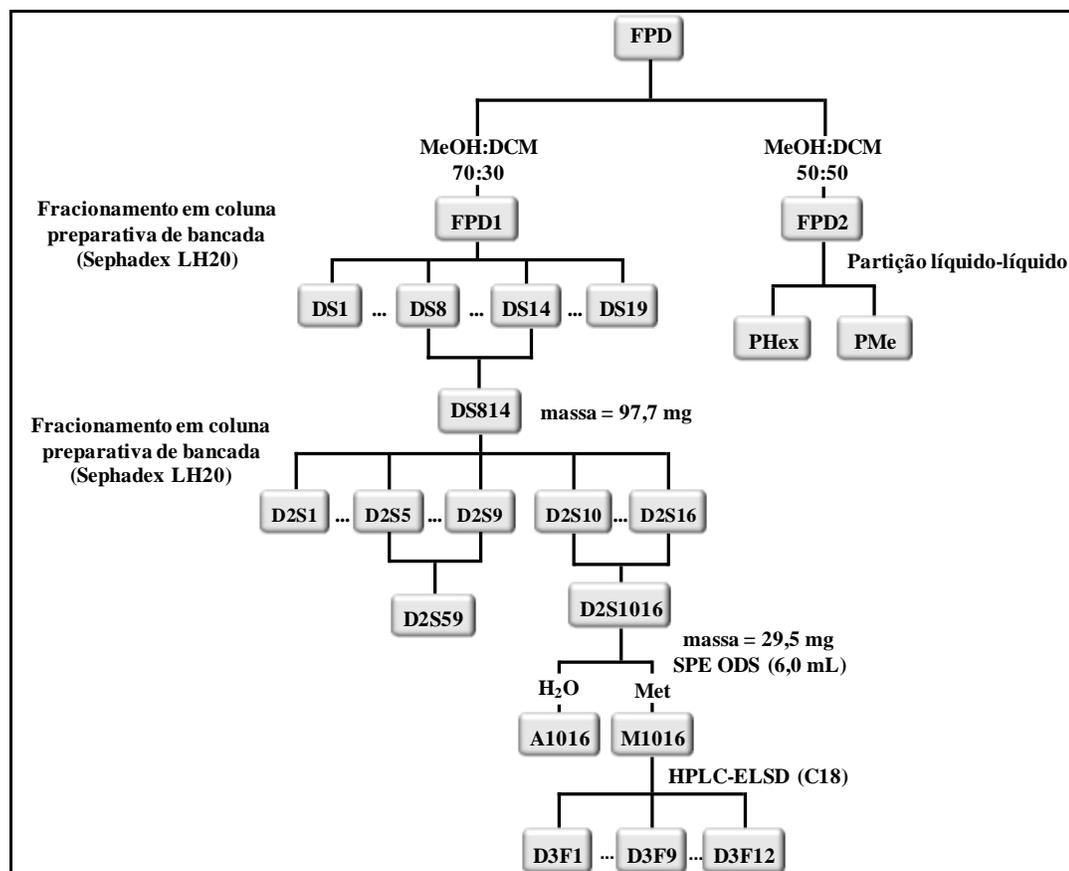


Figura 23. Fluxograma das etapas de fracionamento da fração FPD.

#### 4.9 Tratamento de amostras aplicado nas análises por CLAE-ESI-EM/EM

Para a obtenção do perfil de produção de Valinomicina nos meios de cultivo DSMZ 65, 246, 545 e NBIMCC 185 amostras de caldo de cultivo, para cada um dos quatro diferentes meios avaliados e em intervalos de 12 h de tempo do cultivo, foram analisadas em duplicata. Um volume de 1,5 mL de caldo, para cada intervalo avaliado, foram coletados e centrifugados por 15 min a 11000 rpm. Ao final da centrifugação foram transferidos volumes correspondente a 1 mL de sobrenadante de cada ponto de amostragem para frascos vial previamente identificados.

Ao final, cada amostra foi particionada sendo adicionado 500  $\mu$ L de AcOEt e agitado por 15 segundos em vórtex a cada uma das alíquotas de 1000  $\mu$ L de caldo anteriormente dispensadas em frasco vial. Ao término da extração, um volume de 300  $\mu$ L de sobrenadante (AcOEt) foram coletados e dispensados em vial sendo, cada amostra, particionada por três vezes

(n=3). A Figura 24 ilustra o procedimento de extração de Valinomicina nas amostras de caldo de cultivo.

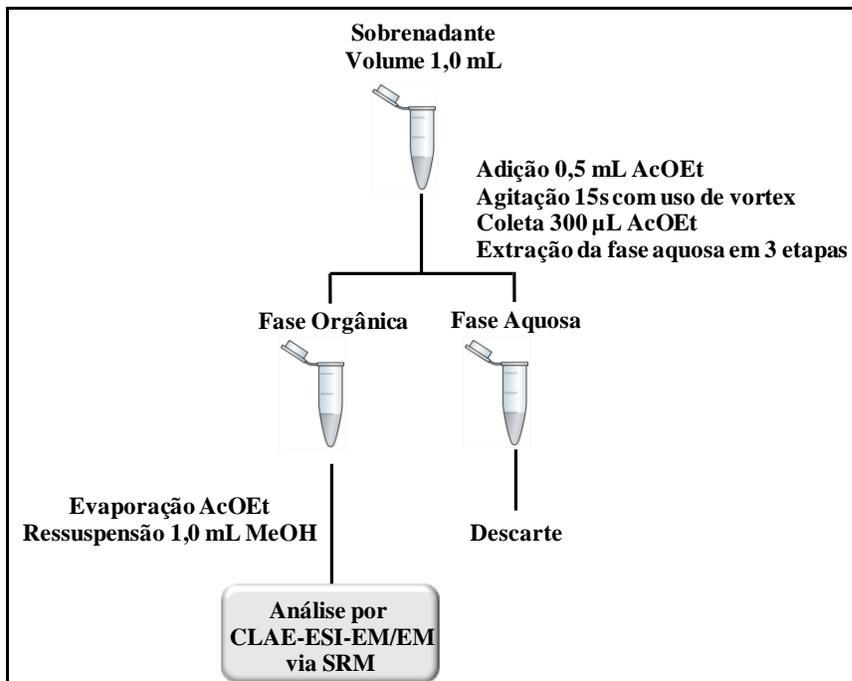


Figura 24 – Etapas de pré-tratamento de amostras realizadas com caldo de cultivo a serem analisadas por CLAE-ESI-MS/MS via SRM.

#### 4.10 Preparo de diazometano para metilação de ácidos carboxílicos

Para a preparação do diazometano, montou-se um sistema de destilação conforme o esquema ilustrado na Figura 25.

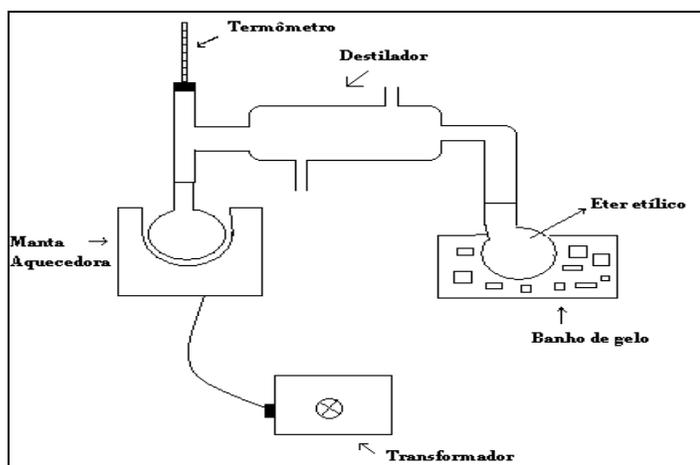


Figura 25. Ilustração de sistema para preparo de diazometano.

Dissolveu-se 2,14 g de p-toluilsulfonilmetilnitrosamida (diazald) em 30 mL de éter etílico. Em seguida, resfriou-se a solução em banho de gelo e adicionou-se a esta uma solução contendo 0,4 g de KOH em 10 mL de etanol 96%. O sistema ficou em repouso no banho de gelo por 5 min e em seguida foi destilado a uma temperatura de aproximadamente 65°C.

O destilado foi coletado em banho de gelo. Terminada a destilação, neutralizou-se a reação com ácido acético glacial. A reação está ilustrada na Figura 26, item A. Realizou-se a metilação adicionando-se a solução de diazometano à amostra a ser metilada até não haver mais desprendimento de gás nitrogênio conforme esquematizado no item B da Figura 26.

Para a derivatização (VOGEL, 1971) de amostras um volume de aproximadamente 1,0 mL de diazometano foi adicionado em frasco vial contendo 200 µg da amostra a ser metilada. Após completa evaporação da solução a amostra foi ressuspensa em 1,0 mL de DCM e posteriormente analisadas via CG-EM.

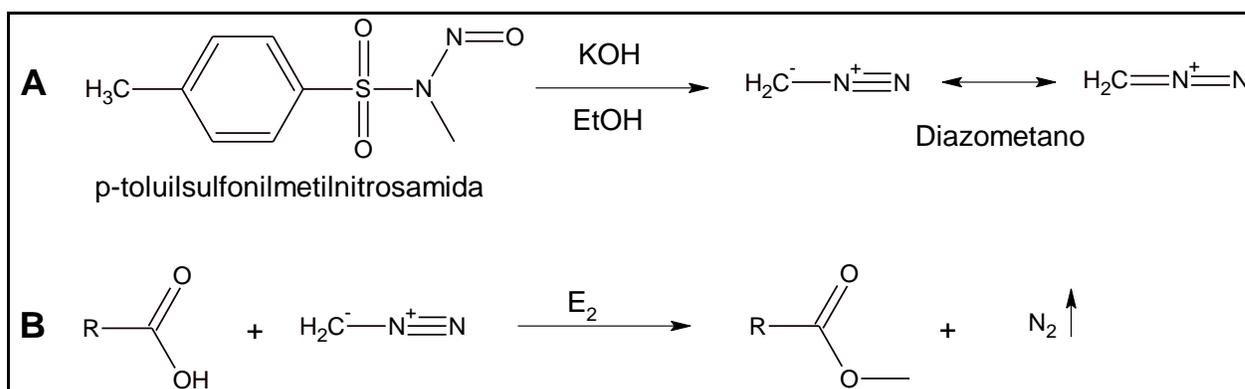


Figura 26. Em A, ilustração do procedimento para o preparado do diazometano. Em B temos a metilação da amostra.

#### 4.11 Análises por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

Alguns extratos e frações foram analisados via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas onde foi utilizada a rampa de temperatura detalhada na Figura 27.

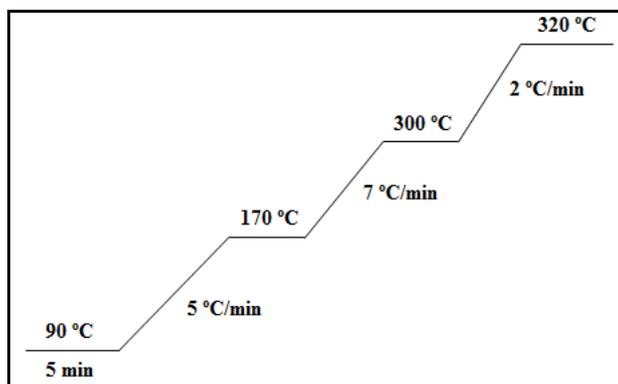


Figura 27. Detalhamento da rampa de temperatura utilizada na análise em CG-EM.

As condições empregadas foram: coluna DB-1 (J&B Scientific), 30m comprimento, diâmetro 0,25 mm, diâmetro de partícula de 0,25  $\mu\text{m}$ , temperatura do injetor 250°C, temperatura da interface 280°C, temperatura da fonte de ionização 180°C, volume da injeção 2,0  $\mu\text{L}$ , modo de ionização  $\text{EI}^+$ , faixa de detecção de massas  $m/z$  50 a 750 Da.

## 5 Resultados e discussão

O presente trabalho teve como ponto de partida a constatação, em extratos de caldos de cultivo do *Streptomyces carpaticus* obtidos com diferentes solventes orgânicos, da presença de composto capaz de inibir a proliferação de diferentes linhagens celulares através de ensaios de citotoxicidade realizados em células tumorais. Sempre foi respeitada a hipótese que a atividade apresentada poderia ser proveniente de uma única substância, do sinergismo entre diferentes substâncias ou ainda da presença de diferentes substâncias capazes de, individualmente, inibir o crescimento celular das linhagens celulares avaliadas.

### 5.1 Levantamento da cinética de crescimento celular e avaliação da atividade citotóxica em diferentes linhagens de células tumorais presente no caldo de cultivo do *Streptomyces carpaticus*.

*Streptomyces carpaticus* foi primeiramente relatado por Gause et al. (1983). Existe apenas um trabalho na literatura de estudos que envolvem a linhagem de *S. carpaticus* onde é relatado um produto com características terapêuticas obtido da linhagem na patente japonesa da Sekisui Chem. Ind. Co. Ltd. (1993) que aponta o extrato obtido com caldo de cultivo de *S. carpaticus* como tendo atividade inibitória de inflamações alérgicas. Entretanto, o princípio ativo responsável pela atividade relatada na patente não foi identificado.

As características morfológicas, nos três diferentes meios sólidos, da espécie de *Streptomyces* investigada estão dispostas na Tabela 13 e fotografias das culturas em meio sólido estão apresentadas nas Figuras 28 e 29.

Tabela 13. Características de morfologia e de cultura do microrganismo marinho *Streptomyces carpaticus*.

Características	Meio 4	Meio 5	DSMZ 65
Coloração da colônia na superfície	Branca	Branca acinzentada	Branca acinzentada
Coloração da colônia no verso da placa	Branca	Branca acinzentada	Cinza esverdeada
Produção de pigmentos hidrossolúveis	Não existe	Não existe	Verde oliva intenso
Forma da colônia	Micro-colônias com 0,1 cm de tamanho com superfície rugosa, colônia circular e bordas onduladas	Micro-colônias com 0,1 cm de tamanho com superfície convexa, colônias irregulares e bordas onduladas	0,4-0,5 cm de tamanho com superfície convexa, borda lisa, colônias circular



Figura 28. Fotografia da cultura de *Streptomyces carpaticus* BA-3 realizado em placas de petri em três diferentes meios sólidos após 14 dias de incubação a temperatura de 30 °C. Meio 4, meio DSMZ 65 e meio 5 da esquerda para direita.

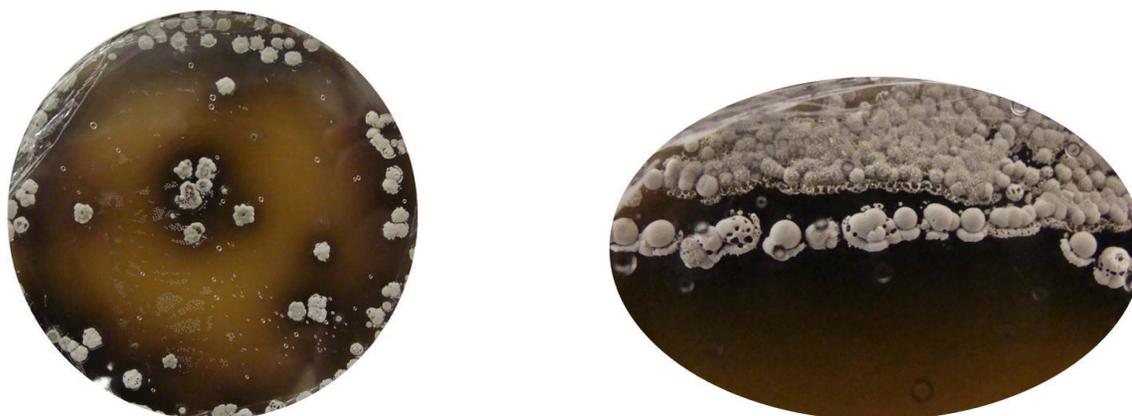


Figura 29. Produção de pigmentos hidrossolúveis verde oliva em meio sólido DSMZ 65.

As Figuras 30 e 31 ilustram imagens obtidas do micélio celular do *Streptomyces carpaticus* cultivado em meio sólido DSMZ 65.



Figura 30. Fotografias obtidas por microscopia óptica com aumento de 40x, 100x e 200x, respectivamente.

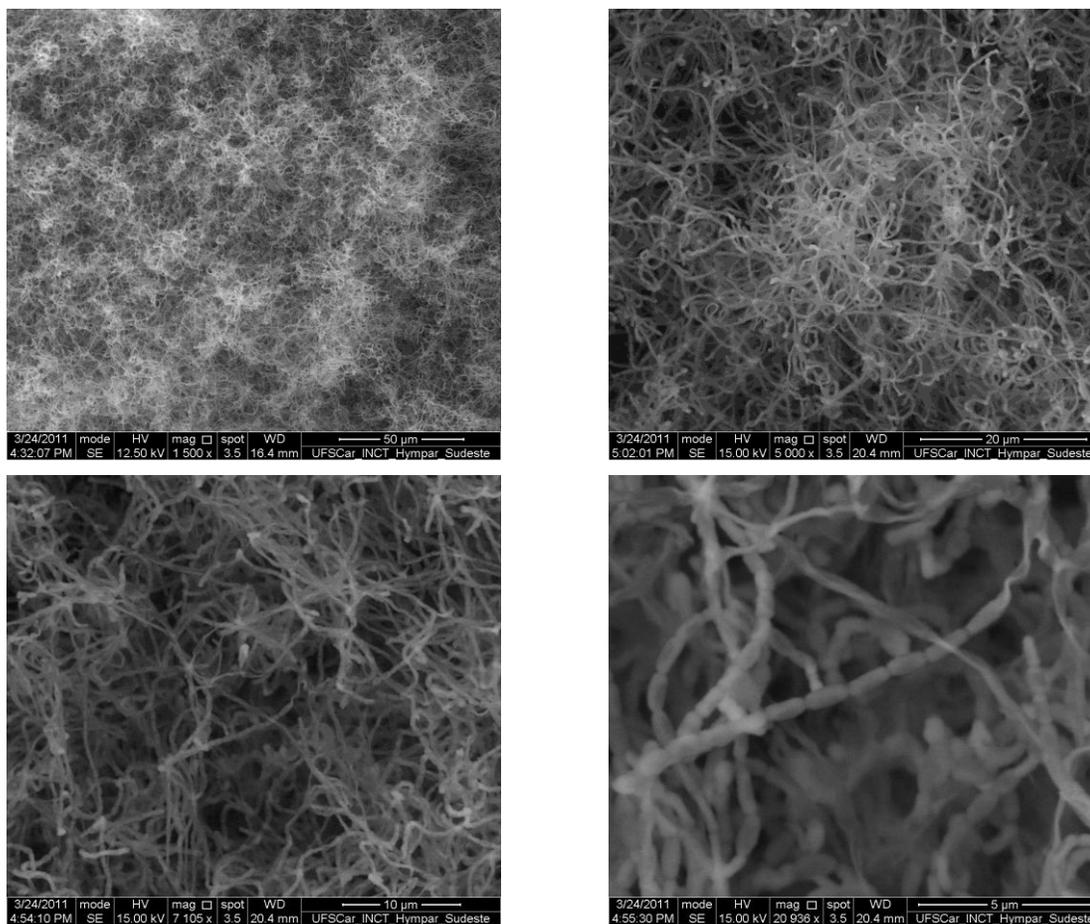


Figura 31. Crescimento do micélio celular com morfologia da cadeia de esporos em espiral estendido obtida por microscopia eletrônica de varredura com aquisição de imagem em condições ambiente em equipamento da FEI modelo Quanta 250.

A Figura 32 ilustra ampolas contendo o microrganismo em forma de esporo e micélio, respectivamente, obtidas pelas metodologias propostas nos itens 4.2.10.3 e 4.2.10.4.



Figura 32. Fotografia de ampolas contendo a linhagem de *Streptomyces carpaticus* liofilizada na forma de esporos e células vegetativas.

Inicialmente foi realizado experimento em incubador rotativo denominado S1 utilizando *Streptomyces carpaticus*. O experimento teve como objetivo principal confirmar a atividade citotóxica anteriormente encontrada no extrato do caldo de cultivo do microrganismo pelo grupo de pesquisa do LEB para a linhagem em estudo e levantar informações da cinética de crescimento do microrganismo nas condições de operação empregadas.

O Experimento S1 foi realizado em Erlenmeyers de 500 mL contendo 50 mL de caldo onde as condições de operação foram 200 rpm e 28°C, utilizando meio de cultura DSMZ 65 modificado, sendo adicionado sal marinho (*Red Sea Coral Pro Salt*), formulado especialmente para uso com água de osmose reversa, numa concentração de 33,33 g.L<sup>-1</sup>, no intuito de reproduzir as condições ambientais marinhas de crescimento do microrganismo uma vez que o mesmo foi isolado de sedimento marinho. As etapas de preparo de inóculo foram realizadas segundo o item 4.3.1, diferindo apenas na origem do inóculo (1ª Etapa) que, no caso, era proveniente da raspagem com alça de platina assepticamente de uma placa de Petri previamente cultivada com o microrganismo em avaliação.

A Figura 33 apresenta os resultados em termos de crescimento celular, consumo de substratos e pH durante o cultivo do Experimento S1A velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{\max}$ ) do *S. carpaticus* em frascos agitados (Experimento S1) foi calculada como sendo igual 0,042 h<sup>-1</sup> e o tempo de geração de 16,5 horas.

A análise da Figura 33 evidencia uma diminuição da concentração celular após aproximadamente 36 h do cultivo, o que pode ser explicado pelas condições não controláveis do valor de pH do meio de cultivo e também devido a possível limitação pela baixa concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura, uma vez que cultivos em Erlenmeyers não permitem o controle destas variáveis.

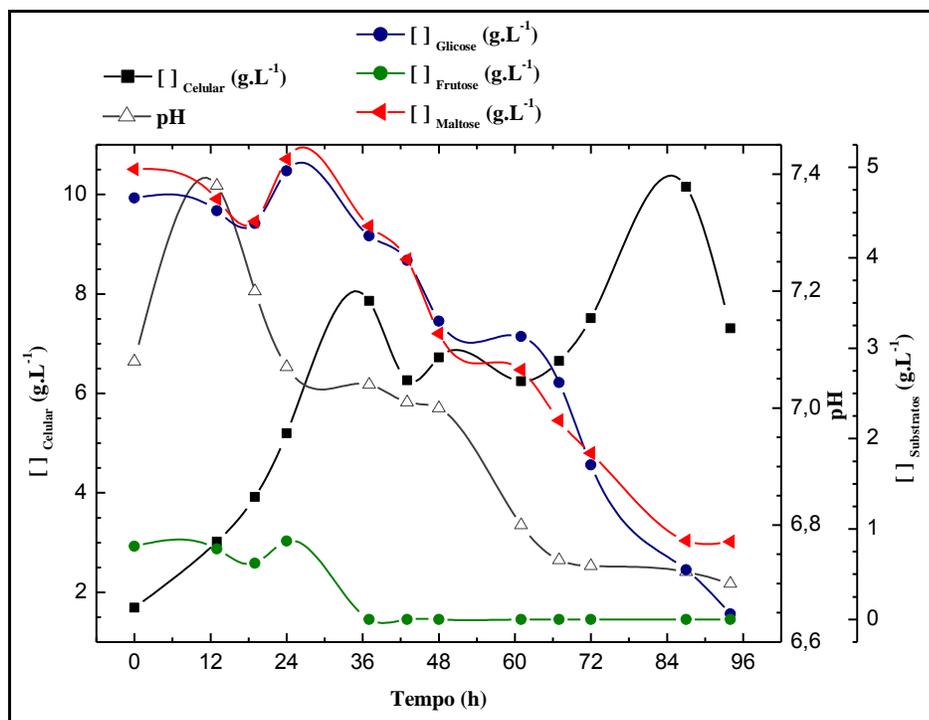


Figura 33. Evolução do crescimento celular, pH, consumo de glicose, maltose e frutose durante o Experimento S1 realizado com *S. carpaticus* em incubador rotativo com meio DSMZ 65 modificado.

Este experimento foi realizado com o intuito de se confirmar a presença de atividade citotóxica nos extratos obtidos a partir do caldo de cultivo do microrganismo em estudo. Logo, parte do caldo foi coletado depois de decorrido um tempo de cultivo de 61 h e outra parte após 96 h de cultivo, com intuito de avaliar se havia diferença significativa nos resultados de citotoxicidade devido ao prolongamento do cultivo. Um volume total de aproximadamente 550 mL de caldo de cultivo para cada um dos dois tempos de cultivo foi tratado segundo procedimento ilustrado na Figura 20 (item 4.8). O intuito em coletar caldos em diferentes tempos de cultivo foi o de avaliar uma possível variação nos resultados de citotoxicidade o que poderia inferir informações como a fase de produção do(s) composto(s) de interesse ou até mesmo uma possível degradação deste(s) no intervalo avaliado.

Em dois diferentes tempos de cultivo (61 e 90 h) foram coletados volumes de 550 mL de caldos de cultivo provenientes de 12 frascos Erlenmeyers que foram centrifugados a 4000 rpm à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi coletado e, em seguida, realizado o procedimento de extração segundo descrito na Figura 20. O corpo de fundo obtido da centrifugação (micélio) foi diluído em 40 mL de água deionizada, submetido à ultrassom com intuito de promover a lise celular e, após este procedimento, o sobrenadante obtido por centrifugação a 11000 rpm foi

particionado com AcOEt e devidamente evaporado. Também foram coletados 50 mL de caldo bruto obedecendo aos mesmos intervalos de coleta.

Os extratos foram enviados em sua totalidade em massas ao Laboratório de Oncologia Experimental (LOE/UFC) onde as amostras foram diluídas na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup>. A Tabela 14 ilustra os resultados obtidos com as amostras que foram testadas em concentração única 25 µg.mL<sup>-1</sup> exceto para os caldos brutos em que se utilizou de 50 µg.mL<sup>-1</sup> para testes de citotoxicidade com as linhagens SF-295, MDA-MB435 e HCT-8.

Tabela 14. Massas obtidas dos extratos no Experimento S1.

Origem	Tempo de cultivo	Massas das amostras					
		EBS1 A	EBS1 B	EBS1 C	EBS1 D	EBS1 E	EBS1 F
Experimento S1	61 h	25,9 mg	76,3 mg	30,5 mg	1,4948 g	332,3 mg	578,4 mg
	90 h	37,1 mg	47,7 mg	68,8 mg	1,6883 g	404,4 mg	787,2 mg

As amostras foram selecionadas de acordo com percentual de inibição do crescimento tumoral superior a 75% nas linhagens celulares utilizadas (GI>75%). Os resultados de citotoxicidade para estes extratos estão ilustrados na Tabela 15.

Tabela 15. Grau de inibição do crescimento celular (GI em %) das amostras em três linhagens tumorais testadas em diferentes concentrações. Valores correspondem à média (GI) ± Desvio Padrão (DP).

Intervalo (h)	Amostra	Concentração (µg/mL)	Grau de inibição (GI em %)					
			SF295		MDA-MB435		HCT-8	
			GI (%)	DP	GI (%)	DP	GI (%)	DP
61	EBS1 A	25	101,29	0,84	101,39	0,00	101,89	0,65
61	EBS1 B	25	100,89	0,56	101,91	0,74	103,26	0,29
61	EBS1 C	25	87,94	5,69	74,47	2,70	79,00	7,50
61	EBS1 D	25	28,13	5,76	1,80	4,30	36,68	2,74
61	EBS1 E	50	21,38	5,05	19,69	0,37	28,27	6,42
61	EBS1 F	25	90,77	0,00	76,90	1,23	92,56	0,72
90	EBS1 A	25	99,06	0,07	98,52	0,12	100,31	1,59
90	EBS1 B	25	85,41	1,97	78,90	1,35	78,38	1,15
90	EBS1 C	25	62,77	3,93	62,49	4,67	61,61	8,00
90	EBS1 D	25	32,85	1,33	10,48	4,30	30,97	0,14
90	EBS1 E	50	9,02	4,28	17,60	3,07	18,89	1,08
90	EBS1 F	25	91,91	1,47	74,13	0,74	92,51	3,53
-	DOX	25	98,78	0,54	99,32	0,65	95,87	3,43

Doxorrubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Os resultados apresentados na Tabela 15, além de confirmarem a presença de atividade citotóxica nos extratos obtidos do caldo de cultivo do microrganismo em estudo, mostraram também que houve uma pequena diferença na atividade citotóxica nos valores de inibição das frações EBS1 B e EBS1 C nos dois diferentes tempos de cultivo (61 e 90 h). Isso pode ser uma indicação de que há perda do composto responsável pela atividade em cultivos de longa duração. Contudo não se pode afirmar se essa perda é inerente à degradação do composto ou ao catabolismo pela linhagem, devido às alterações de disponibilidade de nutriente que pode ser retratada pela exaustão de glicose e maltose depois de transcorridos 60 horas de cultivo. Desta forma, o próximo passo foi obter um volume de caldo de cultivo que possibilitasse obtenção de maior quantidade em massa dos extratos que apresentaram atividade biológica descrita na Tabela 15, para dar início ao trabalho de isolamento da(s) substância(s) responsável(eis) pela atividade citotóxica relatada.

Desta forma, foi realizado novo experimento (S2) em shaker onde as condições de operação foram de 200 rpm de agitação e temperatura de 28°C. Optou-se pela realização do experimento em shaker, devido ao fato de haver pleno domínio do crescimento nestas condições de operação. O experimento foi realizado em frascos Erlenmeyers utilizando meio DSMZ 65 modificado com concentração de sal marinho de 33,3 g.L<sup>-1</sup>. As etapas de preparo de inóculo foram realizadas segundo o item 4.3.1.

Decorridas 120 horas de cultivo, os caldos provenientes de 110 frascos Erlenmeyers foram reunidos e o volume foi submetido à centrifugação e particionamento de acordo com fluxograma da Figura 21 (item 4.8). Após realizar a partição e obter os extratos evaporados EBS2 A, EBS2 B e EBS2 C, estes foram submetidos a experimento de RMN <sup>1</sup>H (Apêndice A, Figuras 69-70), com o intuito de obter o perfil de sinais de hidrogênios das substâncias majoritárias contidas nestes extratos.

Amostras dos extratos EBS2 A, EBS2 B e EBS2 C foram também enviadas ao LOE/UFC, com o objetivo de identificar o(s) extrato(s) que apresentavam atividade citotóxica. Os resultados apresentados na Tabela 16 mostram que o extrato EBS2 A foi o que apresentou maior potencial citotóxico, porém observou-se uma queda na porcentagem de inibição comparada com o mesmo extrato do experimento S1 (Tabela 15).

Tabela 16. Grau de inibição do crescimento celular (GI em %) das amostras em quatro linhagens tumorais testadas na dose única de 50µg/mL. Valores correspondem à média (GI) ± Desvio Padrão (DP).

Amostra	HL-60		MDA-MB435		HCT-8	
	GI (%)	DP	GI (%)	DP	GI (%)	DP
EBS2 A	2,13	5,69	93,64	8,31	59,79	2,60
EBS2 B	6,71	2,96	74,69	2,21	38,69	25,28
EBS2 C	0,00	0,00	0,00	0,00	20,20	0,87
EBS2 D	12,54	4,98	0,00	0,00	22,27	11,39
DOX	100,00	1,09	96,16	0,00	77,36	3,58

Doxorrubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Dando continuidade ao trabalho de isolamento, uma massa de 194 mg do extrato EBS2 A foi submetida a fracionamento em coluna filtrante, conforme ilustrado na Figura 21, obtendo por intermédio do fracionamento 8 frações (FS2 A1 a FS2 A8). Alíquotas destas frações foram enviadas ao LOE/UFC para análise da atividade citotóxica, sendo os resultados dessas análises apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Grau de inibição do crescimento celular (GI em %) das amostras em quatro linhagens tumorais testadas na dose única de 50µg/mL. Valores correspondem à média (GI) ± Desvio Padrão (DP).

Amostra	HL-60		SF 295		MDAMB-435		HCT 8	
	GI (%)	DP	GI (%)	DP	GI (%)	DP	GI (%)	DP
FS2A1	0,00	0,00	0,00	0,00	1,10	7,72	8,90	2,57
FS2A2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
FS2A3	70,55	2,30	75,45	0,52	56,66	1,01	81,16	1,29
FS2A4	0,00	0,00	43,19	5,45	30,53	8,18	60,30	2,67
FS2A5	0,00	0,00	0,00	0,00	12,79	0,18	0,00	0,00
FS2A6	0,00	0,00	0,00	0,00	6,36	3,03	0,00	0,00
FS2A7	27,93	31,55	91,25	14,89	100,00	0,18	102,01	0,09
FS2A8	8,97	1,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DOX	97,62	0,89	65,22	4,09	100,00	0,64	80,90	0,55

Doxorrubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

A fração FS2 A7 apresentou elevado potencial citotóxico e um novo fracionamento foi realizado conforme ilustrado na Figura 21. As frações obtidas foram enviadas ao LOE/UFC para análise de atividade citotóxica, sendo os resultados dessas análises apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Grau de inibição do crescimento celular (GI em %) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 25µg/mL. Valores correspondem à média ± Desvio Padrão (DP).

Amostra	SF 295		MDAMB-435		HCT-8	
	GI (%)	DP	GI (%)	DP	GI (%)	DP
A7-A	28,21	2,69	22,78	2,27	6,62	0,27
A7-B	14,62	0,20	24,11	1,89	17,71	1,49
A7-C	12,72	1,89	9,15	0,20	9,00	1,13
A7-D	0,00	0,00	0,00	0,00	15,27	1,41
A7-E	4,05	1,58	0,00	0,00	5,06	1,67
A7-F	0,00	0,00	0,00	0,00	8,00	1,28
A7-G	6,66	1,68	0,00	0,00	4,31	1,61
A7-H	7,85	0,80	9,92	1,64	14,14	1,34
A7-I	-19,97	4,08	4,47	8,20	13,32	2,66
A7-J	8,63	1,28	0,00	0,00	8,06	2,07
A7-K	3,13	0,27	21,24	4,37	30,36	0,18
A7-L	24,62	3,59	21,03	2,57	13,51	0,97
A7-M	6,02	1,39	0,00	0,00	30,55	3,10
A7-N	0,00	0,00	0,00	0,00	16,39	0,80
A7-O	42,51	1,97	47,45	1,84	27,60	2,83
A7-P	0,00	0,00	2,52	0,69	18,21	3,37
A7-Q	0,00	0,00	0,00	0,00	17,83	3,01
DOX	81,98	3,37	98,76	1,57	94,58	1,66

Doxorrubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Segundo os resultados ilustrados na Tabela 18, houve perda da atividade citotóxica antes apresentada, pois nenhuma das frações testadas apresentou atividade acima de 75%. A perda de atividade citotóxica pode ser atribuída à possível degradação do(s) composto(s) bioativo(s) ou mesmo ao sinergismo de compostos que, anteriormente juntos apresentavam atividade e, quando separados, não mais a possuíam. Logo, a perda drástica da atividade citotóxica apresentada e a pequena quantidade de substância presente tanto na fração FS2 A3 (m=3,0 mg) quanto na fração FS2 A7 (m=16,7 mg) conduziram para as atividades descritas na seqüência.

## 5.2 Levantamento da cinética de crescimento celular do *Streptomyces carpaticus* em biorreator e isolamento de composto bioativo.

Previamente foram realizados cinco cultivos em biorreatores convencionais com volume de trabalho superior àqueles dos experimentos em incubador rotativo e de forma a obter maior quantidade de caldo de cultivo ao término do experimento. Os cultivos foram realizados

em dornas de 5,0 L de volume útil, sendo utilizado um volume de meio de 4,0 L. O meio de cultura utilizado foi o DSMZ 65 modificado, com concentração de sal marinho de 33,3 g.L<sup>-1</sup> à temperatura em 28°C, frequência de agitação de 800 rpm e vazão específica de alimentação de ar de 0,5 vvm. Foi observado nesses cultivos baixo crescimento celular, possivelmente devido ao emprego de agitação intensa (800 rpm), o que pode ter causado morte celular devido ao cisalhamento, impedido o crescimento do microrganismo.

Logo, na seqüência foi realizado novo cultivo em biorreator de bancada (RSc1), agora com volume de trabalho de 10,0 L e condições de operação de 300 rpm de frequência de agitação, temperatura de 28°C, vazão específica de alimentação de ar de 0,5 vvm e pH controlado em 7,2 durante os cultivos através da adição de soluções de NaOH e/ou HCl 1M. As etapas de preparo de inóculo foram realizadas segundo descrito no item 4.3.1. Foi utilizado meio DSMZ 65 e 10% de volume de inóculo.

Os resultados apresentados na Figura 34 ilustram a evolução do crescimento celular, consumo de açúcares redutores totais e de concentração de oxigênio dissolvido durante o experimento RSc1. Observa-se que houve evidente diminuição da concentração celular após 24 h de cultivo, possivelmente proporcionada pela limitação por falta de oxigênio dissolvido no caldo, além da diminuição das concentrações de glicose e maltose no mesmo período, pois estes substratos são as principais fontes de carbono disponíveis para o microrganismo no experimento.

A velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{max}$ ), apresentada pelo microrganismo cultivado em biorreator e operado no modo batelada foi calculada como sendo igual a 0,045 h<sup>-1</sup> e o tempo de geração também obtido na fase exponencial de crescimento celular foi de 15,5 horas.

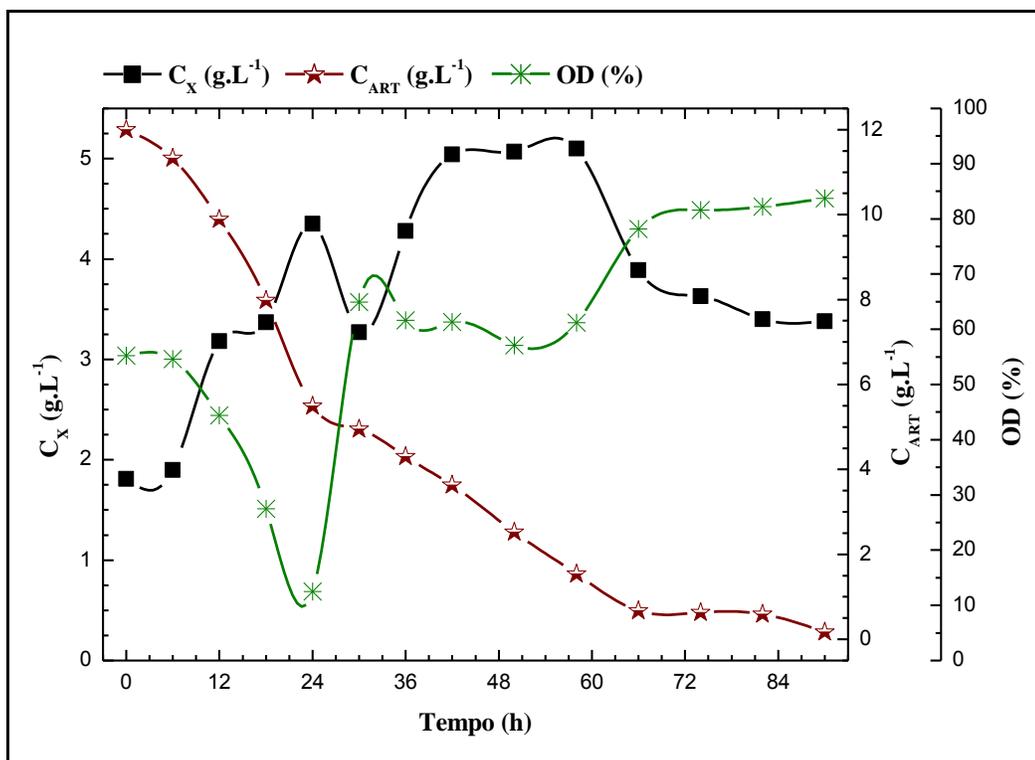


Figura 34. Evolução do crescimento celular, consumo de açúcares redutores totais e oxigênio dissolvido durante o Experimento RSc1.

Um volume de aproximadamente 9,0 L de caldo de cultivo foi obtido no final do experimento RSc1. O caldo de cultivo coletado foi centrifugado a 4000 rpm e 4°C. O caldo centrifugado (sobrenadante) foi filtrado em membranas com tamanhos de poro de 0,22  $\mu$ m e 3,0 kDa, respectivamente, no intuito de se obter um caldo livre de micélio e moléculas com massa molar acima de 3,0 kDa. Após tentativa de concentração do caldo filtrado em Speed Vac, de forma a obter um caldo concentrado antes de realizar as partições orgânicas, no intuito de evitar o uso demasiado de solventes orgânicos, foi observado contaminação do mesmo, caracterizada pela sua turvação e que foi confirmada por microscopia óptica.

Como a continuidade do tratamento do caldo objetivava ao possível isolamento de substância(s) de origem duvidosa, uma vez que a contaminação dispersa no caldo moléculas do metabolismo primário e secundário do microrganismo contaminante optou-se pelo descarte do mesmo.

Dois novos cultivos em biorreator de bancada (RSc2 e RSc3) com volume de trabalho de 12,0 L e condições de operação idênticas ao Experimento RSc1 foram então realizados com o intuito de obter caldo de cultivo para as etapas de isolamento, objetivando obter

a(s) substância(s) de interesse em quantidade suficiente para a realização dos testes citotóxicos e elucidação estrutural. As etapas de preparo de inóculo foram realizadas segundo descrito no item 4.3.1. A Figura 35 ilustra o biorreator usado nos cultivos objetivando obtenção de quantidades de caldo de cultivo superior àquelas obtidas nos cultivos realizados em frascos erlenmeyers.

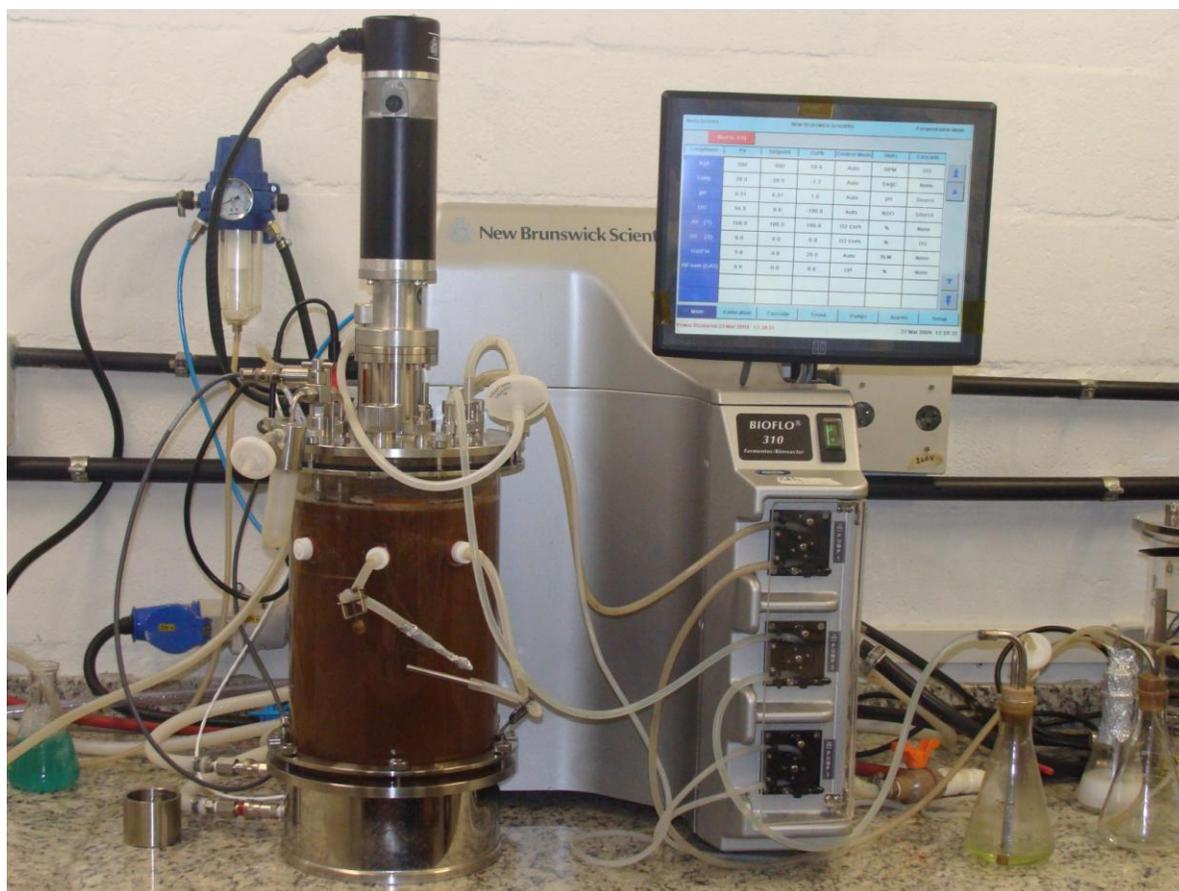


Figura 35. Cultivo do *S. carpathicus* em biorreator - Experimento RSc3 com volume de trabalho de 12 L.

Os resultados representados nas Figuras 36 e 37 apresentam a evolução do crescimento celular, consumo de açúcares redutores totais e de concentração de oxigênio dissolvido durante os experimentos RSc2 e RSc3.

As velocidades específicas máximas de crescimento celular ( $\mu_{\max}$ ) foram iguais a  $0,047 \text{ h}^{-1}$  para ambos os experimentos (RSc2, RSc3). Os tempos de geração obtidos na fase exponencial de crescimento celular foram de 14,8 horas. A análise das Figuras 36 e 37 evidenciam uma diminuição da concentração celular depois de decorridas aproximadamente 24 h nos experimentos RSc2 e RSc3. Tal comportamento foi idêntico nos três experimentos em reator

convencional. Nota-se uma diminuição do crescimento celular em aproximadamente 24 horas para os experimentos em reator convencional, seguido por um período de diminuição da concentração celular e retomada do crescimento celular, porém com uma velocidade específica menor. Este comportamento possivelmente é desencadeado por uma soma de fatores nos quais se incluem a limitação do crescimento pela demanda de oxigênio dissolvido no meio de cultivo, diminuição da concentração de maltose e glicose no mesmo período (dados não mostrados) que podem desencadear menor demanda destes substratos, relacionada ao crescimento e maior demanda direcionada a manutenção das unidades celulares presentes no cultivo, sendo estes substratos as principais fontes de carbono disponíveis para o microrganismo nos experimentos.

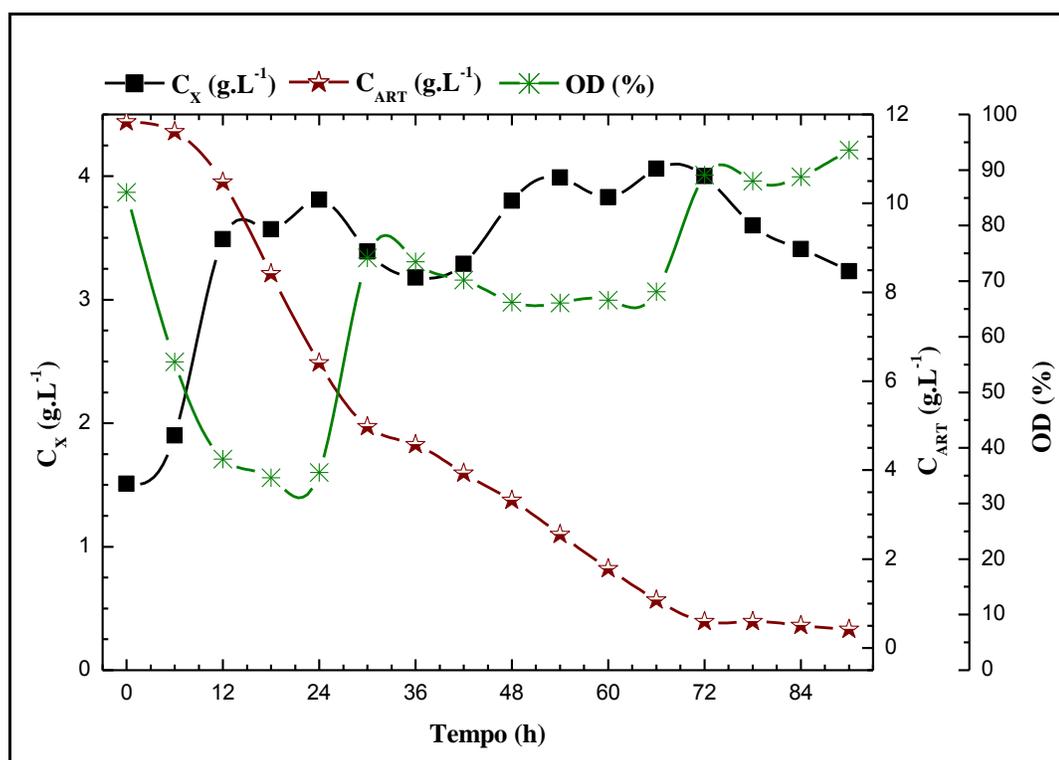


Figura 36. Evolução do crescimento celular, consumo de açúcares redutores totais e concentração de oxigênio dissolvido durante o Experimento RSc2.

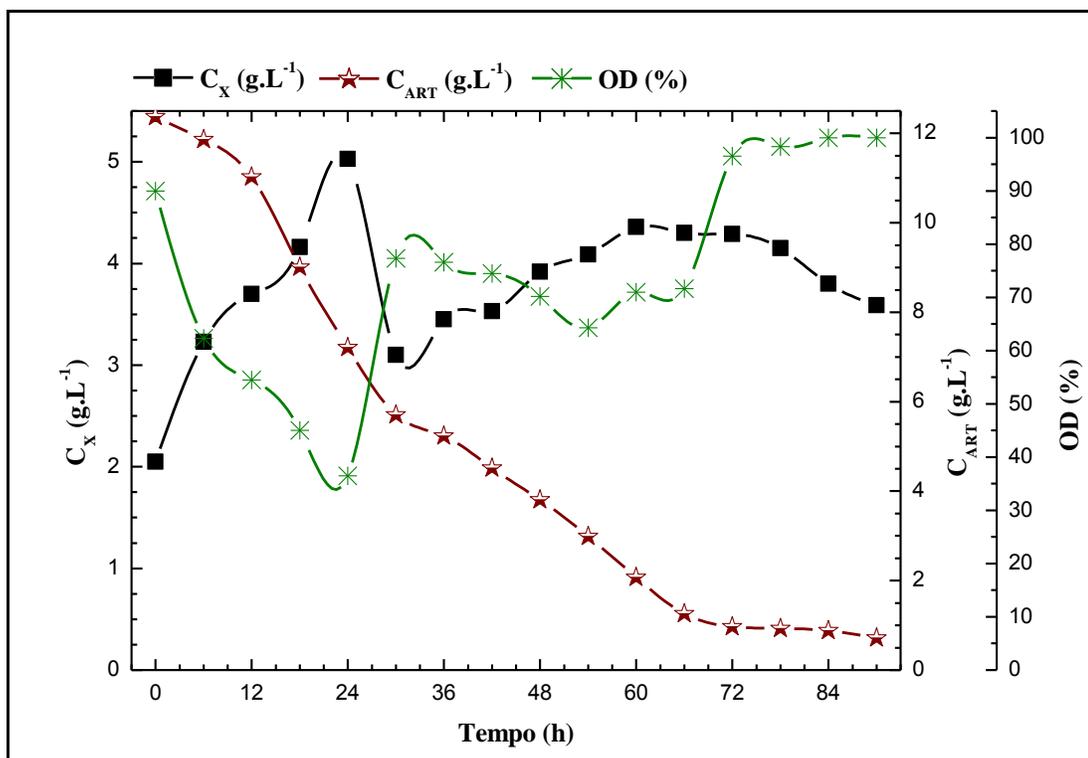


Figura 37. Evolução do crescimento celular, consumo de açúcares redutores totais e concentração de oxigênio dissolvido durante o Experimento RSc3.

A Tabela 19 ilustra os valores de alguns parâmetros de cultivo dos três experimentos realizados em reator convencional nas mesmas condições de operação.

O caldo de cultivo coletado no final dos experimentos RSc2 e RSc3 foram reunidos e submetidos a centrifugação a 4000 rpm e temperatura de 4°C, sendo o micélio obtido submetido a extração orgânica conforme ilustrado na Figura 22 (item 4.8). O sobrenadante foi filtrado em membranas de 0,22  $\mu\text{m}$  e 3,0 kDa respectivamente, no intuito de se obter um caldo filtrado livre de micélio e moléculas com massa molecular acima de 3,0 kDa.

Tabela 19. Valores das variáveis de cultivo obtidos nos experimentos realizados em reatores convencionais para o microrganismo em estudo.

Variáveis	Experimentos		
	RSc1	RSc2	RSc3
$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	0,045	0,047	0,047
$t_G$ (h)	15,5	14,8	14,8
$Y_{X/C_{ART}}$ (g.g <sup>-1</sup> )	0,39	0,38	0,45

Objetivando evitar possíveis contaminações do caldo de cultivo, logo após o término dos experimentos, o mesmo foi micro (0,22  $\mu\text{m}$ ) e ultra-filtrado (3,0 kDa) e em seguida realizadas as partições orgânicas e os extratos obtidos foram devidamente secos. Alíquotas dos extratos foram enviadas ao LOE/UFC com o objetivo de identificar o(s) extrato(s) que apresentavam atividade citotóxica.

Os resultados apresentados na Tabela 20 mostram que para os Experimentos RSc2 RSc3 as frações FPH e FPD apresentaram alta atividade citotóxica frente as linhagens testadas. Foi observado nesta etapa, que a atividade antes presente no extrato vinda da primeira partição do caldo com AcOEt, agora estava presente na frações oriundas do caldo retido. Isto pode ser explicado pelo fato de que nos Experimentos S1 e S2 não foi realizado a filtração em membrana com diâmetro de poro de 3,0 kDa e com isso a(s) substância(s) eram carreadas através dos poros de diâmetro de 0,22  $\mu\text{m}$  e ficavam contidas no caldo filtrado que após realização da partição em solvente orgânico, ficavam contidas na fração vinda da primeira partição em AcOEt. Agora, como o procedimento adotado empregou o uso de diâmetro de membrana de 3,0 kDa, esta(s) substância(s) permaneceram retidas no filtro e desta forma após o caldo retido ser particionado com AcOEt esta(s) substância(s) foram arrastadas para o extrato FPAc. O extrato FPAc foi submetido a partição líquido-líquido com diferentes solventes orgânicos com o objetivo de obtermos frações com características de solubilidade distintas. Desta forma, após o particionamento foram obtidas três diferentes frações (FPH, FPD e FPM) conforme ilustrado na Figura 22.

Tabela 20. Grau de inibição do crescimento celular (GI em %) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50 $\mu\text{g/mL}$ . Valores correspondem à média (GI)  $\pm$  Desvio Padrão (DP).

Amostra	SF 295		MDAMB-435		HCT-8	
	GI (%)	DP	GI (%)	DP	GI (%)	DP
EBR23 A	57,16	0,92	4,80	0,13	0,00	0,00
EBR23 AH	59,22	1,19	31,02	1,18	0,00	0,00
EBR23 AM	85,25	1,32	47,65	3,26	3,55	1,80
EBR23 B	48,58	0,92	0,00	0,00	0,00	0,00
EBR23 F	46,52	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00
FPH	90,01	2,51	100,00	0,13	68,63	4,25
FPD	100,00	0,40	100,00	1,18	100,00	0,24
FPM	26,97	0,98	10,17	5,46	24,88	0,6
DOX	96,90	2,64	96,98	0,24	84,25	2,13

Doxorrubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Assim, as frações FPH e FPD apresentaram elevado potencial de inibição do crescimento das linhagens testadas e os demais extratos não apresentaram atividade biológica relevante. Apesar das frações EBR23A e EBR23B não terem apresentado resultados satisfatórios nos testes citotóxicos, a Figura 38 apresenta o cromatograma CLAE-UV destas frações e mostra a presença de inúmeras substâncias presentes nas mesmas, o que é evidenciado pelas bandas cromatográficas nos cromatogramas e que podem ser exploradas posteriormente, haja visto o fato de não existir relatos de isolamento de substâncias oriundas do microrganismo em questão.

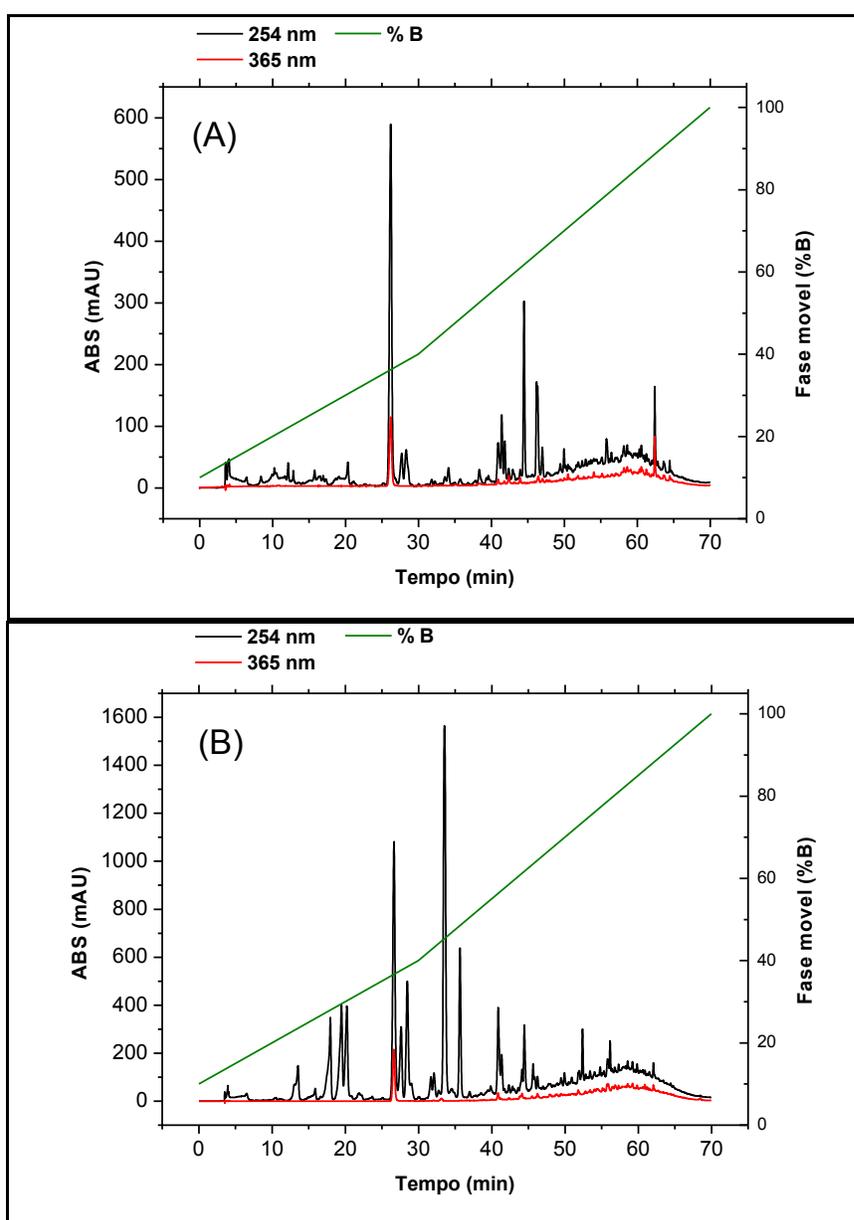


Figura 38. Cromatogramas das frações EBR23A (A) e EBR23B (B).

A fração FPH foi submetida à cromatografia de exclusão molecular utilizando como fase estacionária Sephadex LH20 a qual gerou 23 novas frações que foram enviadas ao LOE/UFC para serem analisadas. A Tabela 21 apresenta os resultados obtidos destas frações.

Tabela 21. Grau de inibição do crescimento celular (GI em %) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 25µg/mL para a fração FPH 14 e 50 µg/mL para as demais frações. Valores correspondem à média (GI) ± Desvio Padrão (DP).

Amostra	SF 295		MDAMB-435		HCT-8	
	GI (%)	DP	GI (%)	DP	GI (%)	DP
FPH	91,41	0,16	72,91	1,67	84,50	1,28
FPD	100,00	0,05	100,00	0,28	100,00	0,12
FPHS14	89,41	0,16	65,59	2,59	80,62	0,43
FPHS15	92,99	0,76	93,07	0,37	86,96	0,12
FPHS17	18,15	1,58	0,00	0,00	21,21	0,06
FPHS18	23,31	0,71	0,00	0,00	13,22	4,27
FPHS21	49,12	1,25	67,94	9,25	44,09	0,92
DOX	97,45	2,13	96,59	2,64	97,14	0,24

Doxorrubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Pode-se observar pelos resultados apresentados na Tabela 21 que as frações FPHS14 e FPHS15 apresentaram elevado potencial citotóxico, sendo então estas frações juntamente com a fração FPHS13 por apresentar o mesmo comportamento cromatográfico em CCD, analisadas por experimentos de espectrometria de massas no LaBioMMi. Também foi determinada a concentração mínima inibitória (IC<sub>50</sub>), capaz de inibir o crescimento da linhagem em 50% para algumas das frações em apenas uma linhagem tumoral SF-295 (Glioblastoma), cujos os resultados estão apresentados na Tabela 22. A IC<sub>50</sub> é geralmente obtida por ser o valor de concentração que mais se aproxima do valor ideal a ser utilizado em pacientes.

Tabela 22. Grau de inibição do crescimento celular (IC<sub>50</sub> em µg.mL<sup>-1</sup>) das amostras FPH, PPD, FPHS14 e FPHS15 em linhagem tumoral SF-295. Em parênteses encontram-se os intervalos de confiança.

Amostra	IC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )
FPH	0,9691 (0,5479 – 1,714)
FPD	0,7197 (0,5884 – 0,8804)
FPHS14	0,7086 (0,5809 – 0,8645)
FPHS15	0,005437 (0,0009537 – 0,03100)

A  $IC_{50}$  para a fração FPHS15 foi de  $5,44 \text{ ng.mL}^{-1}$ , um valor muito baixo se tratando ainda de uma fração ainda não purificada. Apenas a título de comparação, o medicamento Paclitaxel (3), fármaco aprovado pelo FDA no combate a alguns tipos de cânceres apresenta  $IC_{50}=5,7 \text{ nM}$  ou  $4,87 \text{ ng.mL}^{-1}$  para a linhagem MDAMB-435 e  $IC_{50}=11,5 \text{ nM}$  ou  $9,82 \text{ ng.mL}^{-1}$  para a linhagem SKOV-3 (SOUZA, 2004).

A Figura 39 apresenta os resultados obtidos nos experimentos de CLAE-EM (ESI-) e (ESI+), operando com potencial no cone ajustado em 35 e 30 eV respectivamente em concentração de  $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  das frações FPHS13, FPHS14 e FPHS15. Pode-se observar que os perfis do TIC das três frações foram semelhantes, porém pela resposta dos testes de bioatividade ilustrados nas Tabelas 21 e 22, a fração FPHS15 apresentou maior citotoxicidade, o que pode ser interpretado como uma maior concentração do(s) composto(s) responsável pela atividade nesta fração. Assim, esta fração foi então selecionada para realização de novos experimentos. Outra informação importante que pode ser observada através da análise dos cromatogramas CLAE-DAD da Figura 40 é que não houve absorção na região do DAD (210 a 400 nm) dos compostos com tempo de retenção entre 5 e 50 min sendo apenas os compostos que eluíram no início da corrida cromatográfica, capazes de absorver no UV na concentração analisada.

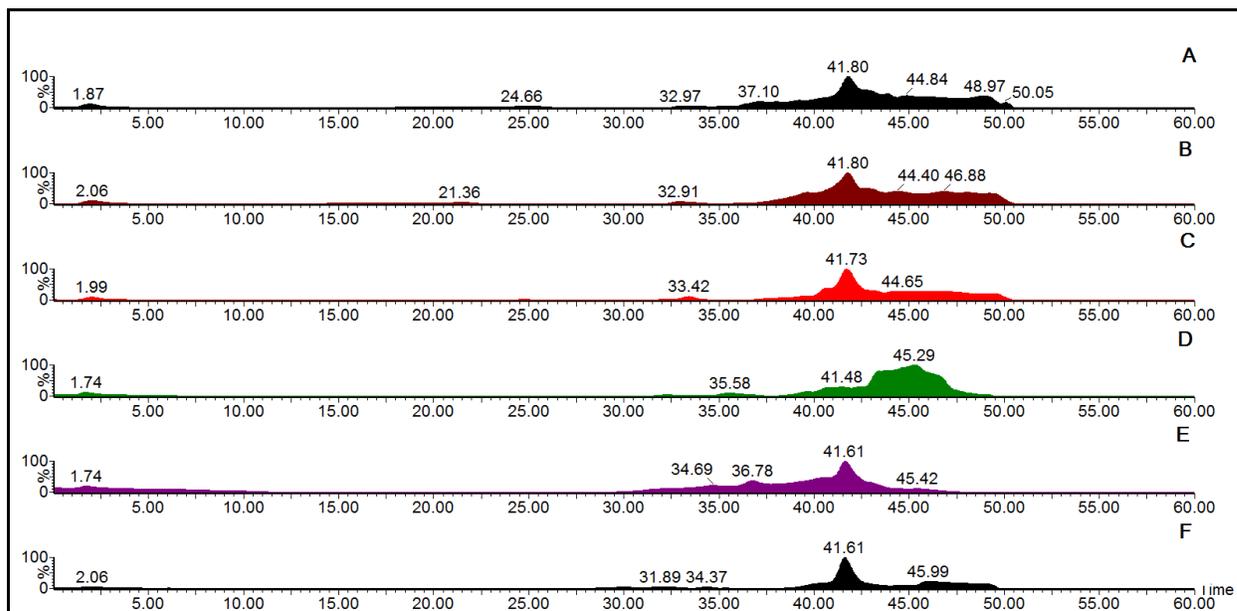


Figura 39. Resultados dos experimentos de CLAE-EM das frações FPHS13, FPHS14 e FPHS15 no modo ESI- em A, B e C e no modo ESI+ em D, E e F.

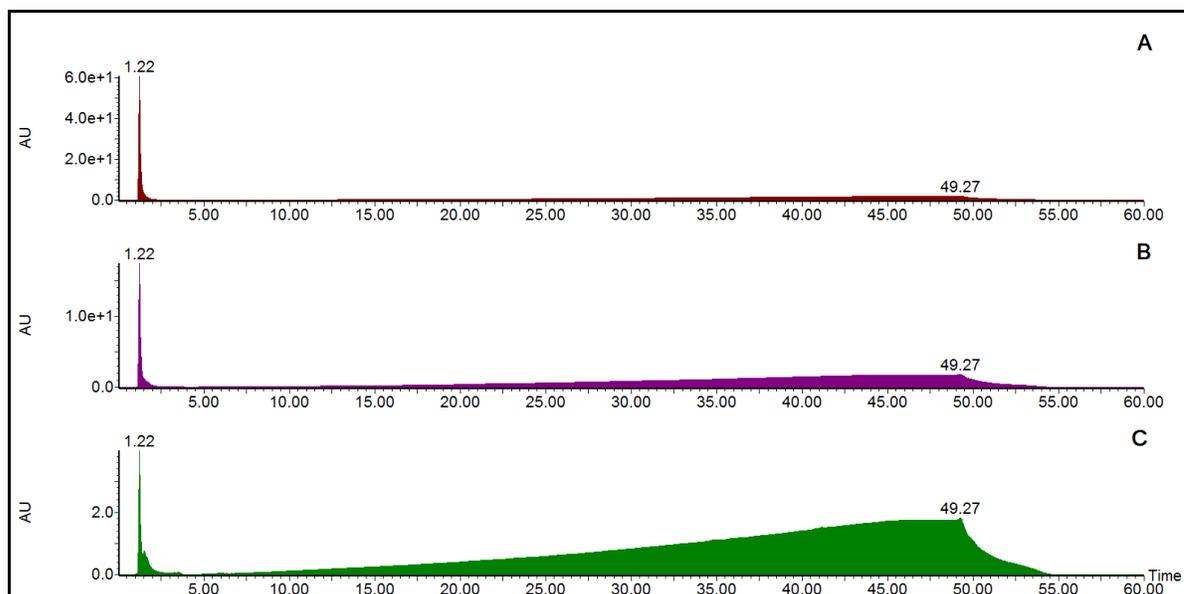


Figura 40. Em A, B e C os cromatogramas CLAE-DAD (210-400 nm) das frações FPHS13, FPHS14, FPHS15 respectivamente.

Na Figura 41 estão apresentados os espectros de massas da fração FPHS15 ESI- (A) e ESI+ (B) gerados após processados os TIC (C e E), respectivamente. Com estes resultados, foi possível inferir (Figura 41 A e B) que um dos compostos presentes nesta fração possui MM de 1111 Da. Pode-se observar no espectro de massas (Figura 41B), a formação do íon  $m/z$  1134 que corresponde a formação de aduto com sódio  $[M+Na]^+$ . Na Figura 41 (A) observa-se a formação do íon  $m/z$  1110 que corresponde à molécula deprotonada  $[M-H]^-$ . Na Figura 41 (D e F), observa-se o cromatograma do íon selecionado  $m/z$  1110 e  $m/z$  1134 da fração FPHS15 ESI- e ESI+.

No intuito de se confirmar a massa molecular do composto presente na fração FPHS15, além dos respectivos fragmentos gerados pela molécula fragmentada em ambos os modos de ionização (ESI- e ESI+), análises de íons produtos, íons precursores e de perdas neutras características do íon  $m/z$  1110 foram realizadas e estão ilustrados na Figura 42. As aquisições no modo ESI+ não foram muito elucidativas devido à complexação do analito com sódio.

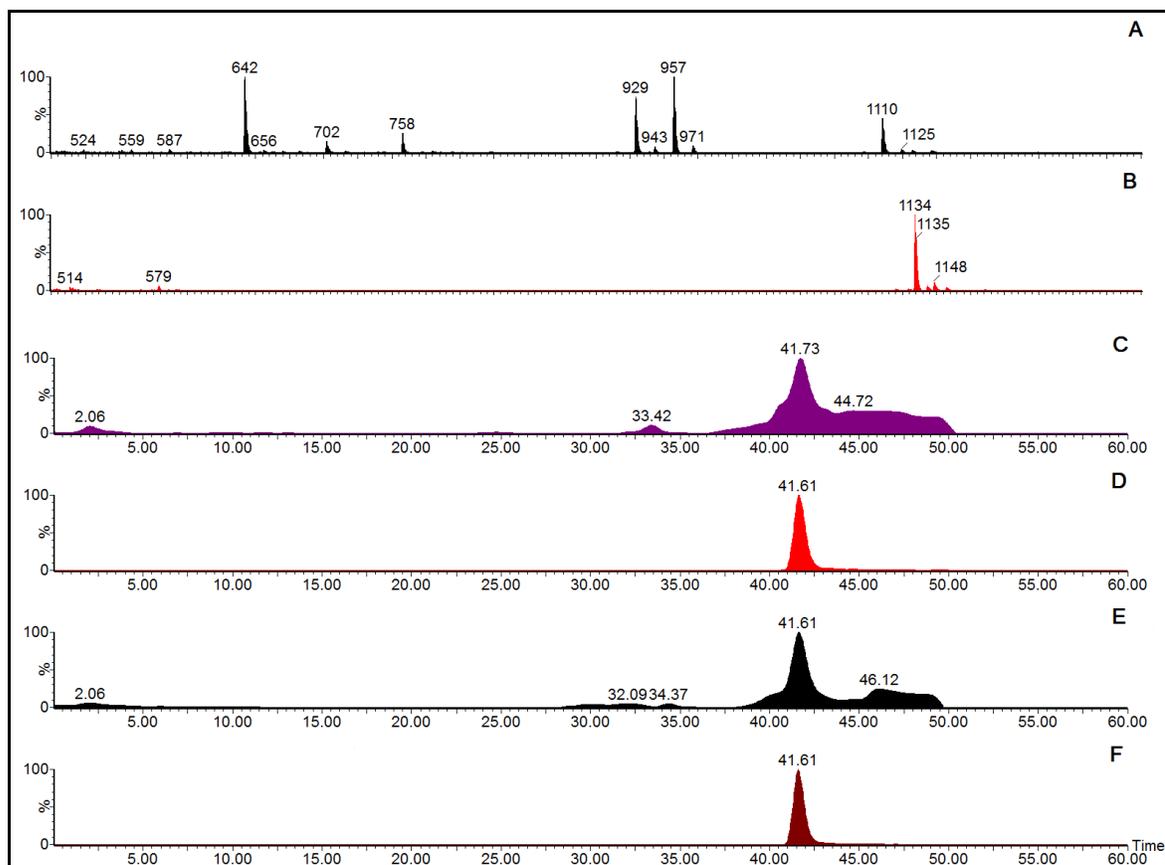


Figura 41. Espectros de massa da fração FPHS15 (A e B) após processados os TIC ESI- e ESI+ que estão apresentados em C e E. Os cromatogramas de íon selecionado para  $m/z$  1110 (D) e 1134 (F), respectivamente.

Pode-se afirmar, baseado nos resultados coletados nas análises apresentadas na Figura 42, que os íons de razão  $m/z$  188, 216, 387, 758, 929, 957 foram gerados pela fragmentação do íon  $m/z$  1110. Observa-se ainda perdas característica de 28 e 171 unidades de massa no padrão de fragmentação apresentado.

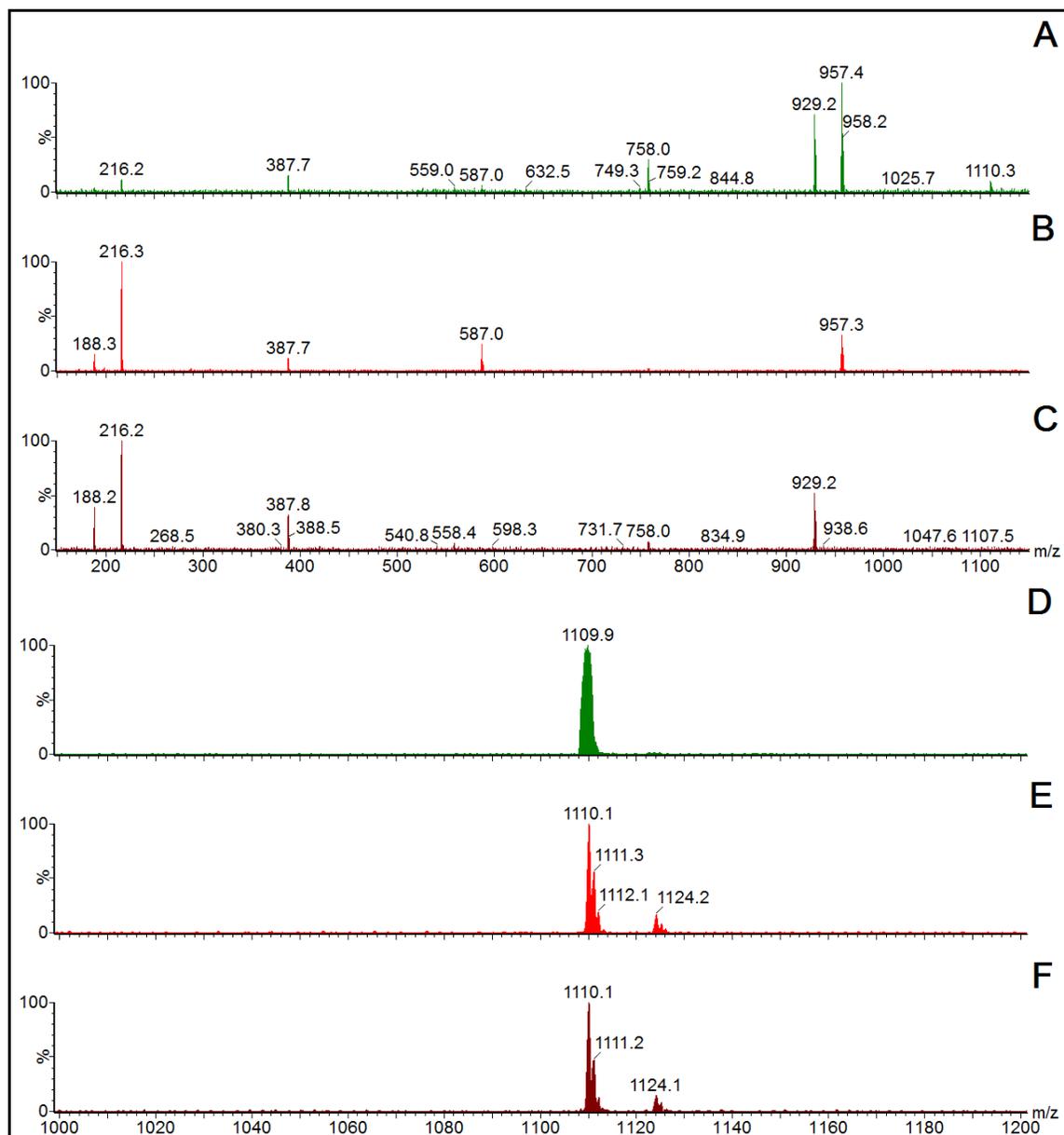


Figura 42. FPMS15 analisada por inserção direta no modo ESI- do íon selecionado. A) íon produto de  $m/z$  1110 (25 eV); B) íon produto de  $m/z$  957 (35 eV); C) íon produto de  $m/z$  929 (30 eV); D) íon precursor de  $m/z$  957 (25 eV); E) perda neutra de  $m/z$  153 (25 eV); F) perda neutra de  $m/z$  181 (25 eV).

Com o intuito de avaliar a presença dos íons  $m/z$  1110 e 1134 nas três frações FPMS13, FPMS14 e FPMS15, o que poderia ser um indício da atividade citotóxica encontrada ser proveniente do composto MM 1111, foi obtido o cromatograma de íon selecionados destas respectivas  $m/z$  1110 para o modo ESI- e  $m/z$  1134 para o modo ESI+ destas respectivas frações, nas mesmas condições cromatográficas da Figura 39. Analisando a Figura 43 pode-se concluir que das três frações estudadas, somente a FPMS13 não possui os íons selecionados.

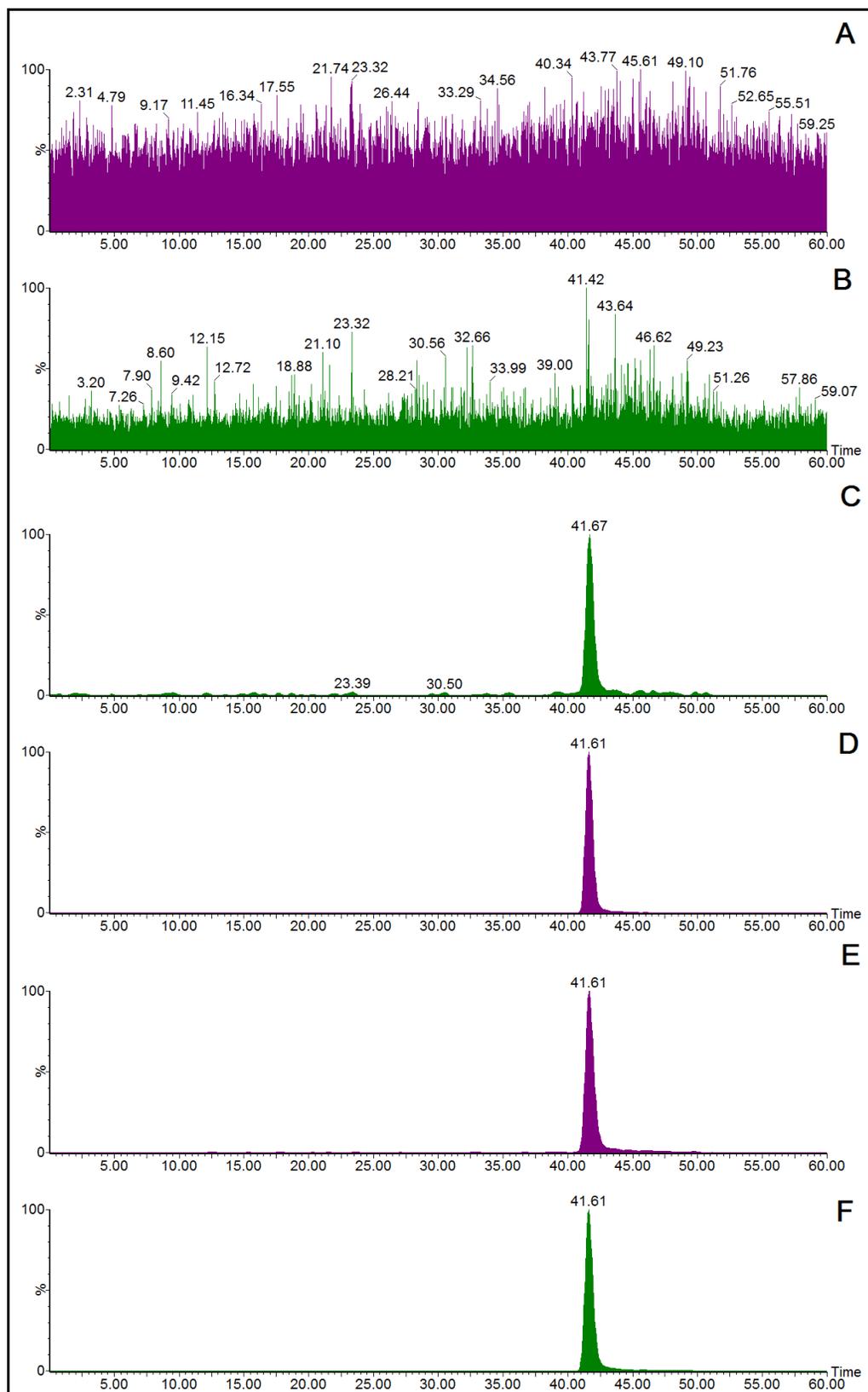


Figura 43. Cromatogramas de íon selecionado  $m/z$  1110 (ESI-) e  $m/z$  1134 (ESI+) das frações FPHS13 (A e B), FPHS14 (C e D) e FPHS15 (E e F).

Assim, a amostra FPHS15 (massa de 30 mg), por não estar totalmente pura, foi submetida à cromatografia de exclusão molecular, onde a fase estacionária empregada foi Sephadex LH20, conforme ilustrado na Figura 22. As frações coletadas foram submetidas a avaliação por CCD onde foram reunidas as frações S7, S8 e S9 dando origem a fração S789. Alíquotas das frações S789, S10 e S12 foram enviadas ao LOE/UFC para a realização dos ensaios biológicos. As demais frações não foram enviadas para realização do ensaio biológico devido à limitação de massa (< 1,0 mg). Os espectros de RMN <sup>1</sup>H das frações S10 e S12 estão disponíveis nas Figuras 73 e 74 (Apêndice A). A Tabela 23 apresenta os resultados do ensaio biológico das frações obtidas.

Tabela 23. Grau de inibição do crescimento celular ( $IC_{50}$  em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) das amostras S789, S10 e S12 em linhagens tumorais. Em parênteses encontram-se os intervalos de confiança.

Amostra	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )		
	SF-295	MDAMB-435	HCT-8
S789	>10	>10	>10
S10	0,01273 (0,008612 – 0,01475)	0,01893 (0,009904 – 0,03617)	0,01273 (0,01094 – 0,01482)
S12	>10	>10	>10

O cromatograma de íon selecionado mostrado na Figura 44, obtido no modo ESI+, usando as condições cromatográficas idênticas às usadas para análises mostradas na Figura 39 permitiu afirmar que somente as frações S10 e S11 produziram o íon selecionado  $m/z$  1134, que é correspondente ao aduto de sódio ( $[M+Na]^+$ ). A Figura 45 mostra o espectro de massa processado da banda cromatográfica em 42 min para ambas as frações S10 e S11 nos modos ESI+ e ESI- de ionização.

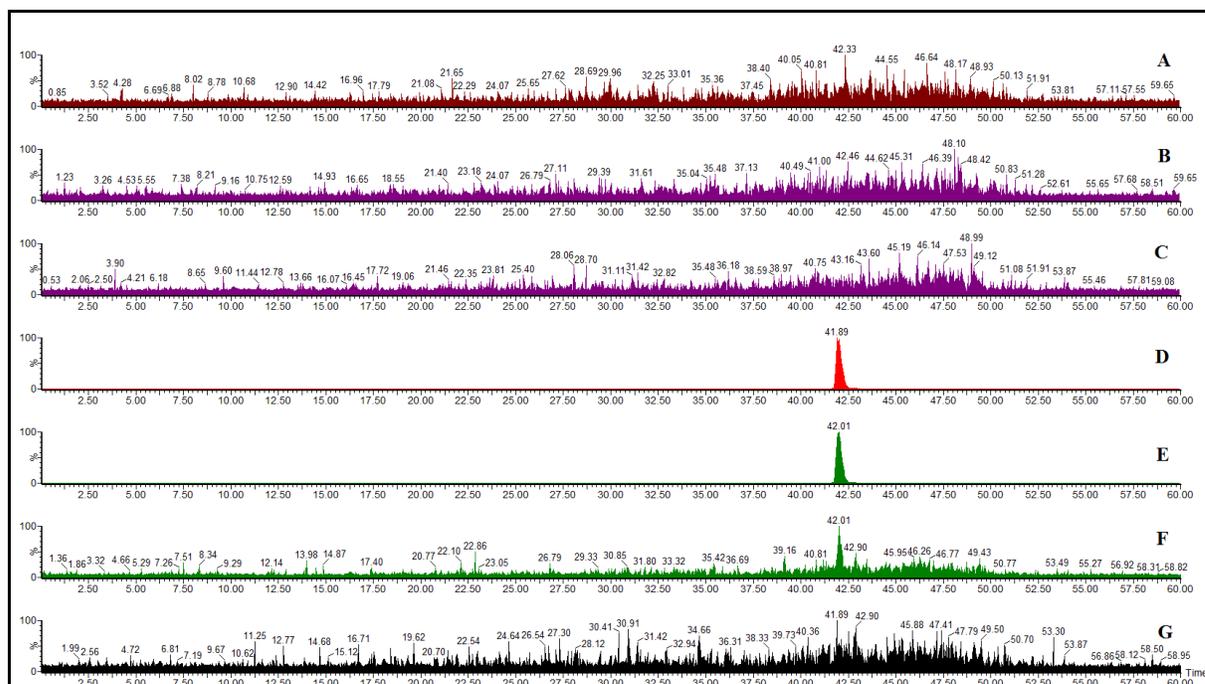


Figura 44. Cromatogramas de íon selecionado  $m/z$  1134 das frações S7 (A), S8 (B), S9 (C), S10 (D), S11 (E), S12 (F) e S13 (G).

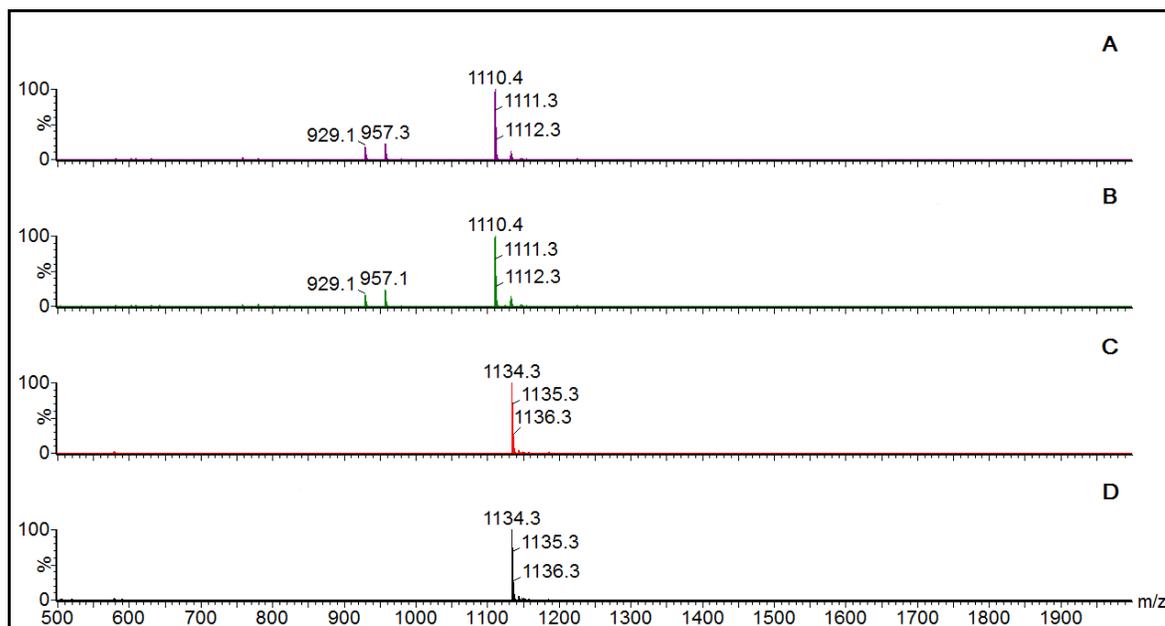


Figura 45. Espectros de íons totais gerados para as frações S10 e S11 respectivamente pelo processamento da banda cromatográfica em 42 min – (A) e (B): ESI- e (C) e (D): ESI+.

A análise da Figura 73 (A) (Apêndice A) que corresponde ao espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração S10, mostrou dois sinais na região desblindada do espectro, em  $\delta$  8,42 e 8,29 ppm, que integram para 1 hidrogênio cada. Esses sinais são típicos de hidrogênios ligados a átomo de nitrogênio (Figura 73B). Na região mais blindada do espectro os dois dubletos em  $\delta$  1,10 e 1,06

ppm referem-se a hidrogênios metílicos (H-9 e H-10) ligado a CH; o multiplete em  $\delta$  2,32 (H-8) ppm corresponde a um hidrogênio metínicos (CH) vizinho a CH<sub>3</sub>. Os dubletos encontrados em  $\delta$  4,10 (H-7) e  $\delta$  3,99 (H-15) ppm, (Figura 73C), são hidrogênios metínicos vizinhos a heteroátomos por estarem em região desblindada do espectro. Os sinais observados no espectro de RMN, juntamente com a perda de 28 unidades de massa, característica de perda neutra de CO no espectro de massas sugerem a presença do aminoácido valina na molécula. Assim, a consulta à literatura levando em consideração os dados de EM e RMN adquiridos levaram à hipótese do composto em investigação ser o ciclodepsipeptídeo Valinomicina (Figura 46).

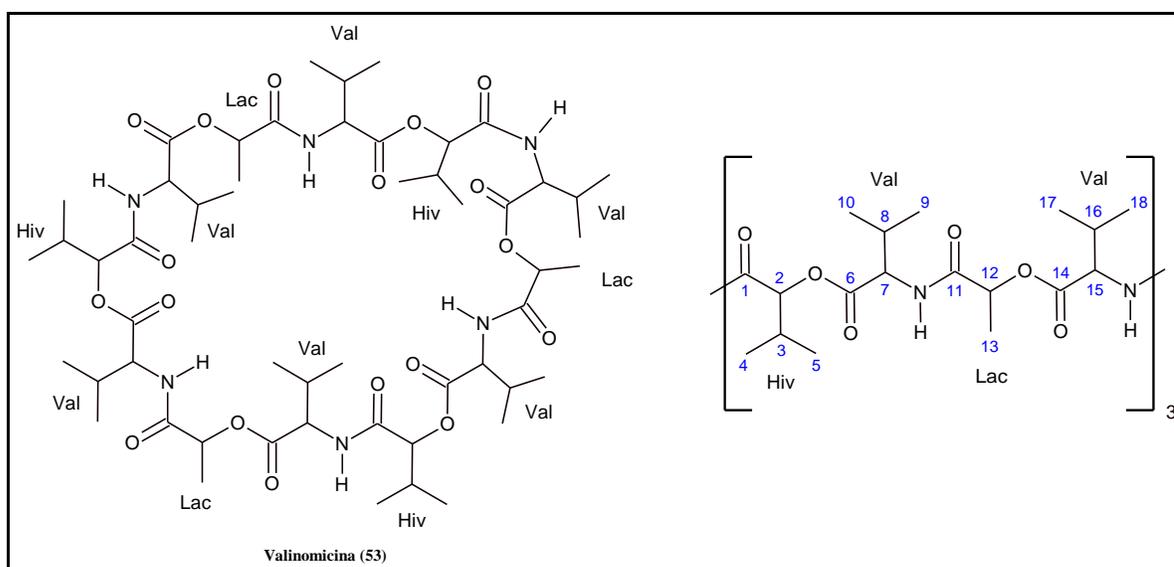


Figura 46. Estrutura molecular do composto Valinomicina.

Valinomicina é um conhecido ciclododecadepsipeptídeo com estrutura cíclica composta de doze membros que se alternam entre aminoácidos (valina) e hidroxiaácidos (ácido láctico e ácido  $\alpha$ -hidroxi-isovalérico) (D-Hiv-D-Val-L-Lac-L-Val)<sub>3</sub>. Essa molécula possui fórmula molecular C<sub>54</sub>H<sub>90</sub>N<sub>6</sub>O<sub>18</sub> e foi primeiramente isolada do caldo de *Streptomyces fulvissimus* em 1955 por Brockmann e Schmidt-Kastner (1955) e, desde então, tem sido isolada de culturas de espécies de *Streptomyces*, conforme apresentado na Tabela 24. Nos primórdios de sua descoberta, a Valinomicina atraiu a atenção de inúmeros grupos de pesquisa devido ao seu efeito notável em relação à permeabilidade em membranas lipídicas biológicas e artificiais para cátions monovalentes, sendo o íon potássio mais específico (GISIN; MERRIFIELD; TOSTESON, 1969) e vem sendo aplicada em vários campos da ciência com uso em membrana seletiva de íons em

eletrodos que determinam íons potássio (ROSS, 1990) e ainda apresentando variadas atividades biológicas como indutor de apoptose em células de ovário de hamster chinês (CHO) (ABDALAH et al., 2006) dentre outras apresentadas na Tabela 24. Ristow et al. (1974) provaram que a biossíntese de Valinomicina é não ribossomal ao realizarem a síntese *in vitro* de Valinomicina sendo a adição do aminoácido L-[<sup>14</sup>C]Valina mostrou que este é racemizado e incorporado ao produto. Ristow também mostrou que os aminoácidos L-Valina, L-Treonina e L-Alanina como precursores do ácido láctico. Anke e Lipmann (1977) afirmam, através de estudos com marcação isotópica, que o substrato ácido láctico é facilmente incorporado ao composto Valinomicina nas células vegetativas ao contrário do que acontece com alanina.

Tabela 24. Diferentes espécies de *Streptomyces* produtoras de Valinomicina.

Microorganismo	Origem do isolamento	Atividade relatada	Referência
<i>Streptomyces fulvissimus</i>	bolor	antibiótico	Brockmann e Schmidt-Kastner (1955)
<i>Streptomyces</i> sp. (PRL 1642) (ATCC 23836)	solo	antibiótico	Vining e Taber (1957); Taber e Vining (1957)
<i>Streptomyces tsusimaensis</i> (ATCC 15141)	solo	antibiótico	Nishimura et al. (1964)
<i>Streptomyces roseochromogenes</i> NRRL B-1233	n.i <sup>a</sup>	pesticida	Patterson e Wright (1970)
<i>Streptomyces griseus</i> var. <i>flexipertum</i> var. nov.	solo de área de alimentação de gado	antibiótico inseticida e acaricida	Heisey et al. (1988)
<i>Streptomyces levoris</i> A-9	solo	bactericida	Perkins et al. (1990)
<i>Streptomyces griseus</i> 2/ppi, 8/ppi, 10/ppi, 1/k	ar, poeira e materiais de construção	toxina mitocondrial	Andersson et al. (1998)
<i>Streptomyces anulatus</i>	amostras de solo e fezes	anticâncer e antibiótico	Pettit et al. (1999)
<i>Streptomyces exfoliates</i>	galhos de árvore não identificada	anticâncer e antibiótico	Pettit et al. (1999)
<i>Streptomyces padanus</i> TH-04	pêssegos	antifúngica	Lim et al. (2007)
<i>Streptomyces</i> sp. (M10)	solo de pomar	antifúngica	Park et al. (2008)
<i>Streptomyces</i> sp. strain 22 and 34	esponjas do mediterrâneo	antiparasitária	Pimentel-Elardo et al. (2010)

<sup>a</sup> não informado

Assim, o padrão analítico Valinomicina (98% pureza, código V0627) da Sigma-Aldrich (Brasil) foi adquirido e submetido à cromatografia de exclusão molecular usando coluna Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare) em diferentes comprimentos de onda. Como o cromatograma apresentou três bandas cromatográficas, as mesmas foram coletadas e a banda em

destaque na Figura 47, após experimentos de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 79, Apêndice A), *full scan* (Figura 48) e o espectro de íons produto de  $m/z$  1112 (Figura 49), revelou o composto Valinomicina.

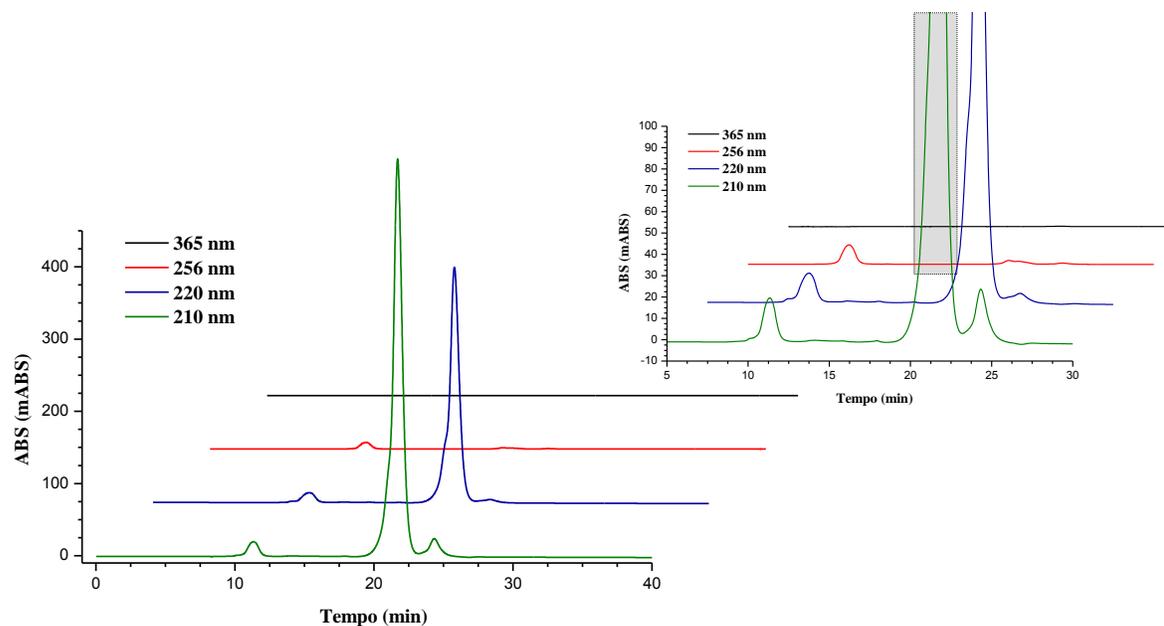


Figura 47. Perfil cromatográfico CLAE-UV em diferentes comprimentos de onda de Valinomicina comercial.

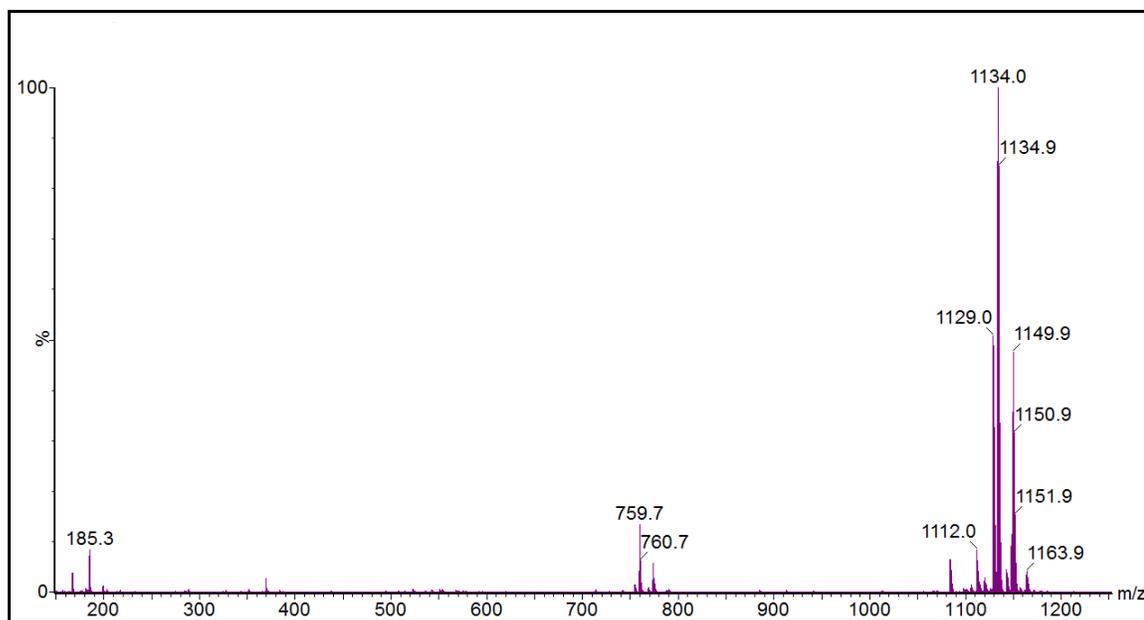


Figura 48. *Full scan* no modo ESI+ do composto Valinomicina (Sigma-Aldrich, V0627), solução 100  $\mu\text{g/mL}$  em MeOH, volume de injeção 20  $\mu\text{L}$ .

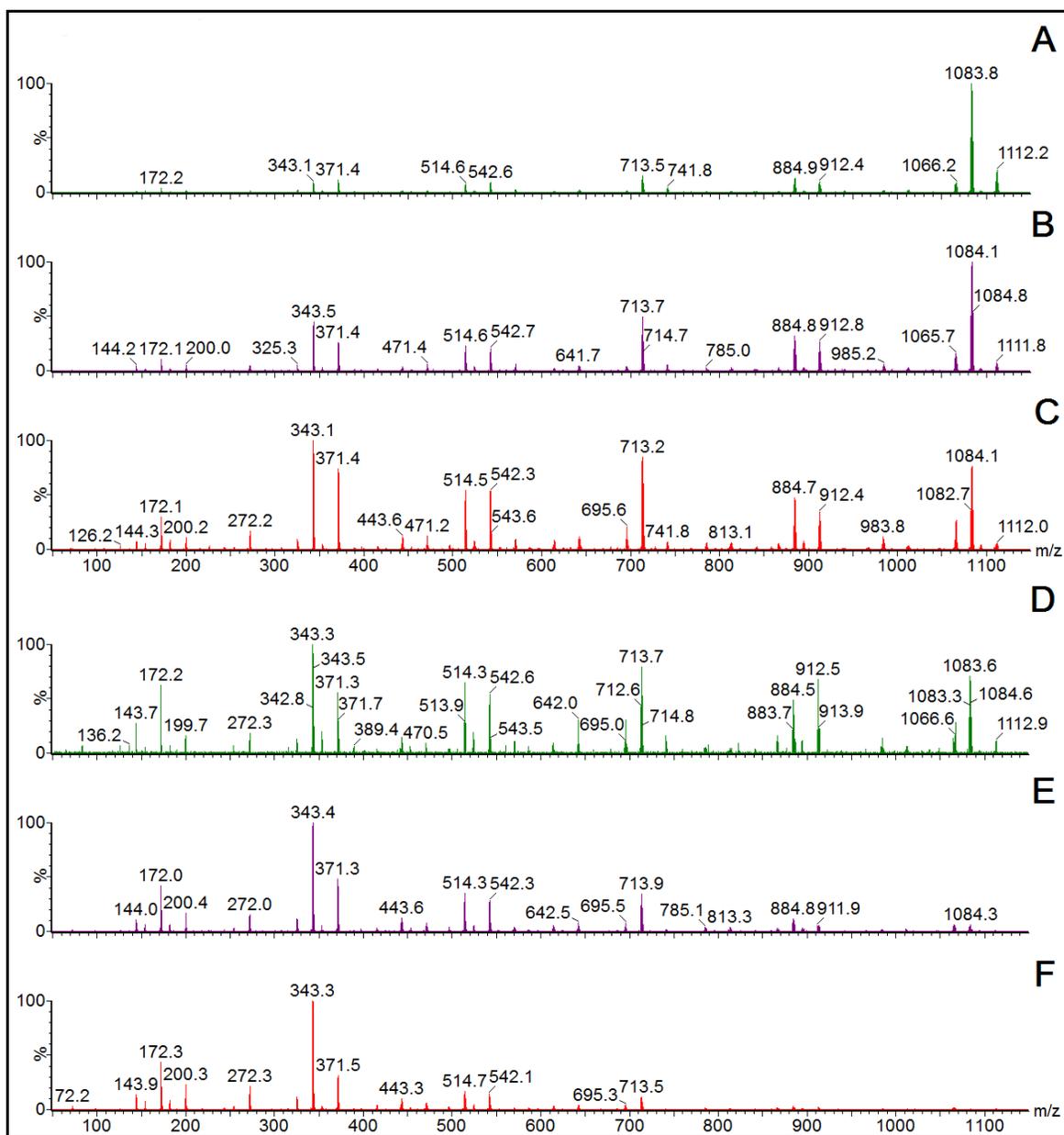


Figura 49. Perfil de íons produto de  $m/z$  1112 (ESI+) gerados em diferentes potências aplicados na célula de colisão do espectrômetro de massas para o padrão Valinomicina. Em A, B, C, D, E e F foram utilizados 30, 35, 38, 40, 45 e 50 eV respectivamente.

A adição de um próton na ionização por eletrospray (ESI) no modo positivo de análise na estrutura de polipeptídios pode levar a formação de seis diferentes fragmentos iônicos (Figura 50) que podem ser usadas para a interpretação de espectros de fragmentação de peptídeos obtidos usando espectrometria de massas em *tandem*.

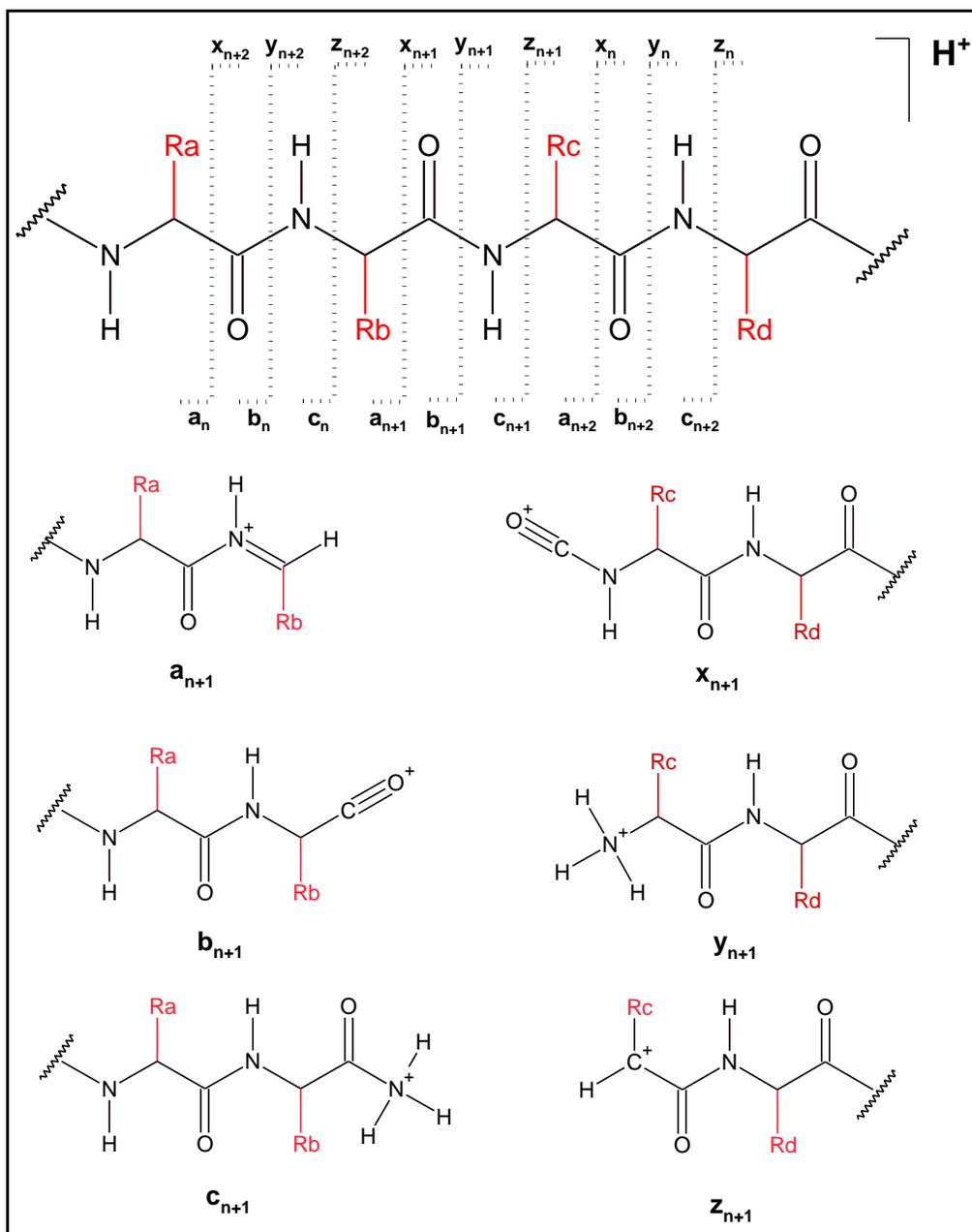


Figura 50. Esquema geral de fragmentos gerados na ionização de polipeptídios por ESI+ proposto por Roepstorff e Folhlman (1984) e Johnson et al. (1988).

Valinomicina foi isolada da fração FPHS15 por cromatografia conforme ilustrado na Figura 51 e confirmada pelo espectro de fragmentação obtido por espectrometria de massas em *tandem* na Figura 52.

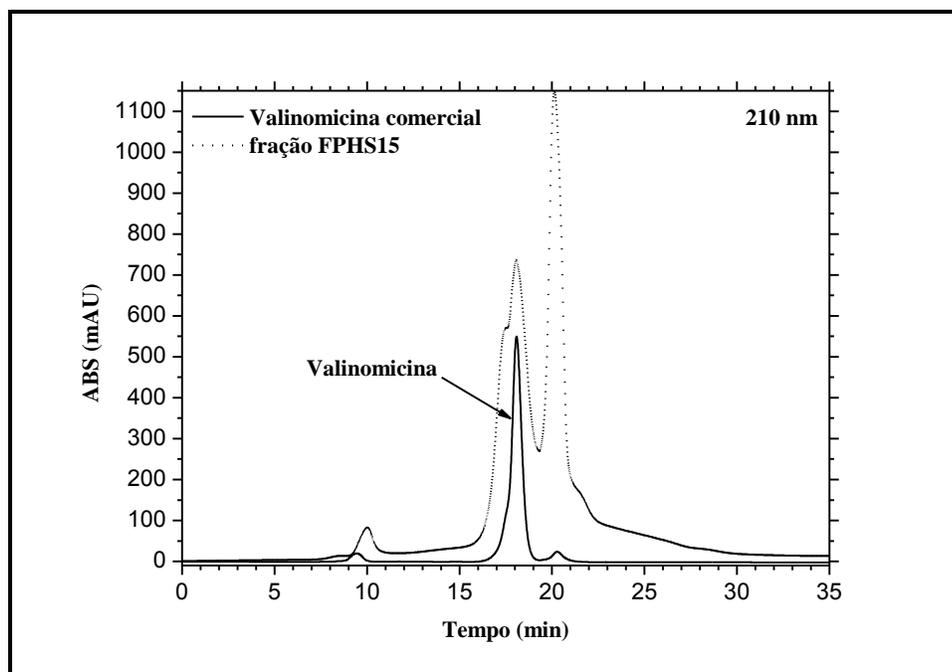


Figura 51. Perfil cromatográfico CLAE-UV de Valinomicina comercial e da fração FP15.

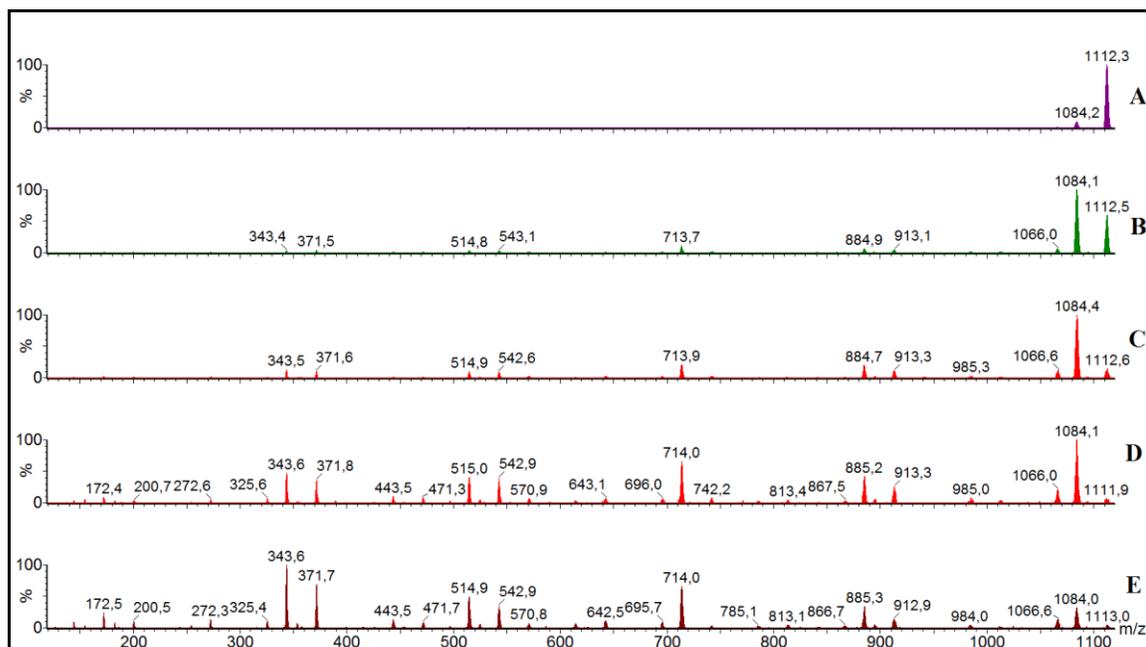


Figura 52. Comparação do perfil de íons produto de  $m/z$  1112 (ESI+) gerados em diferentes potenciais aplicados na cela de colisão do espectrômetro de massas utilizados para a fração FPep. Em A, B, C, D e E foram utilizados 20, 30, 35, 40 e 45 eV respectivamente.

Na Figura 53 estão representados os espectros de íons produto  $m/z$  1112 para o padrão comercial de Valinomicina e para o composto isolado do caldo fermentativo do *S. carpaticus*. A Tabela 25 apresenta as respectivas perdas no espectro de íons produto de  $m/z$  1112.

Tabela 25. Diferentes fragmentos obtidos do espectro EM/EM de  $m/z$  1112.

<b>Fragmento iônico (<math>m/z</math>)</b>	<b>Fragmento perdido</b>	<b>Perda (Da)</b>
1084,1	CO	28
1012,6	Val	100
984,9	CO-Val	127
940,7	Val-OAla	171
913,4	CO-OAla-Val; Val-OVal	199
885,2	CO-Val-OVal	227
840,6	Val-OAla-Val	271
813,4	Val-OVal-Val; CO-Val-OAla-Val	299
786,4	CO-Val-OVal-Val	326
741,9	OAla-Val-OVal-Val; OVal-Val-OAla-Val	370
713,9	CO-OAla-Val-OVal-Val; CO-OVal-Val-OAla-Val	398
643,1	Val-OAla-Val-OVal-Val	470
615,2	CO-Val-OAla-Val-OVal-Val	497
570,9	OAla-Val-OVal-Val-OAla-Val	541
542,8	CO-OAla-Val-OVal-Val-OAla-Val; OVal-Val-OAla-Val-OVal-Val	569
514,9	CO-OVal-Val-OAla-Val-OVal-Val	597
471,7	Val-OAla-Val-OVal-Val-OAla-Val	641
443,7	CO-Val-OAla-Val-OVal-Val-OAla-Val	669
371,7	(-Val-OAla-Val-Oval) <sub>2</sub> ; (-OAla-Val-OVal-Val) <sub>2</sub>	470
343,6	CO(-OAla-Val-OVal-Val) <sub>2</sub> ; CO(-Val-OAla-Val-Oval) <sub>2</sub>	768
272,4	(-Val-OAla-Val-Oval) <sub>2</sub> Val	840
200,5	(-Val-OAla-Val-Oval) <sub>2</sub> Val-OAla	911
172,4	(-Val-OVal-Val-OAla) <sub>2</sub> Val-OVal; CO(-Val-OAla-Val-Oval) <sub>2</sub> Val-OAla	939
144,2	CO(-Val-OVal-Val-OAla) <sub>2</sub> Val-OVal	967

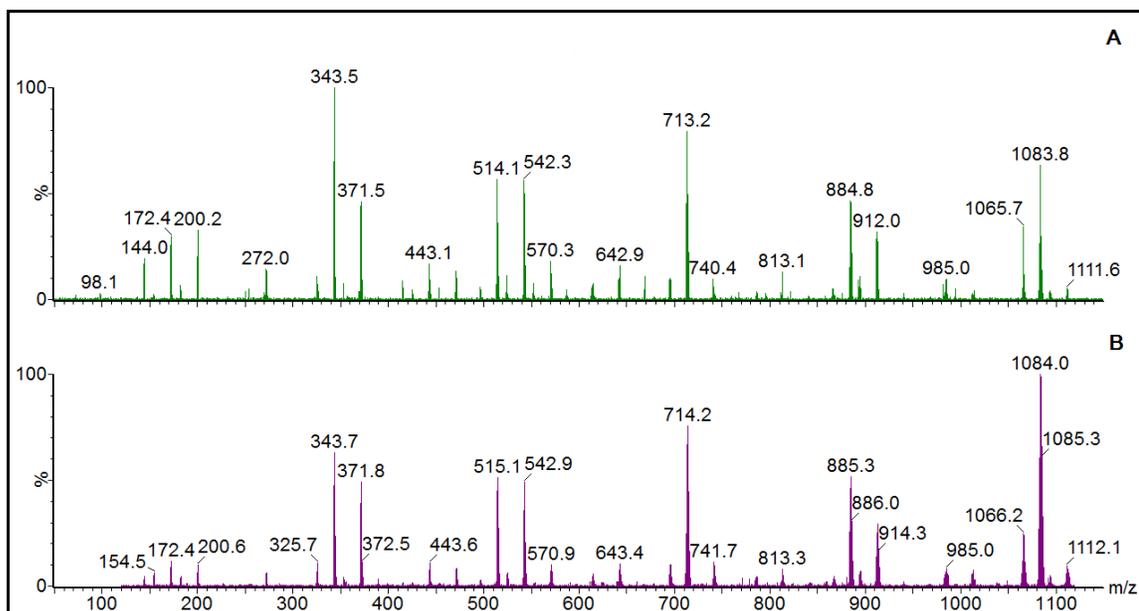


Figura 53. Comparação do padrão de fragmentação do íon  $m/z$  1112.0 para o padrão comercial Valinomicina em (A) e para o composto com atividade antiproliferativa isolado do caldo de fermentação do *S. carpaticus* (B) obtidos por CID (40 eV) ESI+-EM/EM.

O fracionamento da fração FPD, conforme ilustrado na Figura 23, também conduziu ao isolamento de Valinomicina por partição orgânica da fração FPD2 usando hexano e solução hidroalcoólica MeOH:H<sub>2</sub>O (8:2) conforme sugerido por Pettit et al. (1999) e confirmado pelo RMN <sup>1</sup>H da fração hexânica PHex (2,5 mg) (Figura 80, Apêndice A).

O desvio de luz plana polarizada ( $[\alpha]_D$ ) de literatura para o composto Valinomicina é +30,8° ( $c$  0,5, MeOH) (LIM et al., 2007). O valor encontrado para a amostra isolada foi de +30,4° ( $c$  0,625, MeOH).

A Tabela 26 apresenta os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para a fração FPHS15 e para a Valinomicina isolada do caldo de cultivo do *S. carpaticus* ensaiados em quatro diferentes linhagens de células tumorais. Observa-se que os valores obtidos para IC<sub>50</sub> da fração purificada (FPep) variaram de 2 a 10 ng.mL<sup>-1</sup>. Valores similares para a linhagem SF-295 e outras linhagens foram encontrados no trabalho de Pettit et al. (1999). Em recente trabalho publicado na literatura Lofrumento et al. (2011) afirmam que o uso de Valinomicina para combater o câncer por indução de apoptose continua a ser uma possibilidade a ser explorada.

Tabela 26. Grau de inibição do crescimento celular ( $IC_{50}$  em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) das amostras FPHS 15 e FPep em quatro diferentes linhagens tumorais. Em parênteses encontram-se os intervalos de confiança.

Amostra	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )			
	SF-295	MDAMB-435	HCT-8	HL-60
FPHS15	0,018 (0,010 – 0,031)	0,0135 (0,055 – 0,332)	0,008 (0,004 – 0,013)	0,034 (0,026 – 0,045)
FPep	0,002 (0,001 – 0,004)	0,009 (0,002 – 0,043)	0,002 (0,001 – 0,003)	0,010 (0,008 – 0,012)

### 5.3 Isolamento de ácido 14-metilpentadecanóico

O fracionamento de FPD1 conforme foi ilustrado na Figura 23 conduziu à obtenção da fração D3F9. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  dessa fração D3F9 (Figura 75, Apêndice A) observou-se dois singletos na região mais blindada do espectro ( $\delta$  0,87 e 0,85) que integraram para três hidrogênios cada. Esses sinais são típicos de metila ligados a CH. Os dois singletos em  $\delta$  0,87 e 0,85 ppm encontram-se correlacionados via HSQC ao sinal de carbono em  $\delta$  22,45 ppm (C-15 e C-16) (Figura 77, Apêndice A). No espectro de COSY (Figura 76, Apêndice A) acoplaram com o hidrogênio em  $\delta$  1,51 ppm (septeto) e no mapa de contorno do HMBC (Figura 78, Apêndice A) observou-se a correlação de  $\delta$  0,87 e 0,85 ppm com os sinais em  $\delta$  22,45 ppm (C-15 e C-16),  $\delta$  27,46 ppm (C-14) e  $\delta$  39,09 ppm (C-13).

O quadrupeto observado em  $\delta$  1,15 ppm no espectro de RMN  $^1\text{H}$  integrou para dois hidrogênios típicos de  $\text{CH}_2$  e acoplou com o sinal bastante intenso em  $\delta$  1,25 ppm (usando COSY  $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) sugerindo a presença de uma cadeia metilênica longa. O singletto largo observado em  $\delta$  1,25 ppm no espectro de RMN  $^1\text{H}$  integrou para dezoito hidrogênios típico de  $\text{CH}_2$  que correlacionaram com os sinais em  $\delta$  29,67 ppm (C-4 a C-12) via HSQC, e via HMBC com  $\delta$  29,67 ppm (C-4 a C-12) e  $\delta$  39,09 ppm (C-13).

O septeto observado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  em  $\delta$  1,51 ppm integrou para um hidrogênio típico de CH. Este mesmo septeto em  $\delta$  1,51 encontra-se correlacionado via HSQC ao sinal de carbono em  $\delta$  27,46 ppm (C-14), e no experimento de COSY acoplou com os hidrogênios metílicos em  $\delta$  0,87 e 0,85 ppm, bem como correlacionou via HMBC correlacionou com  $\delta$  22,45 (C-15 e C-16).

O quintupeto em  $\delta$  1,63 ppm, observado no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , integrou para dois hidrogênios e correlaciona (HSQC) com o sinal de carbono em  $\delta$  24,86 ppm (C-3); no experimento de COSY acoplou com os sinais em  $\delta$  2,35 ppm (H-2) e  $\delta$  1,25 (H-4); e, via o mapa de contorno do HMBC, correlacionou com  $\delta$  29,67 (C-4).

O tripleto em  $\delta$  2,35 ppm observado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  integrou para dois hidrogênios e encontram-se ligado (HSQC) ao sinal de carbono em  $\delta$  33,68 ppm (C-2); no experimento de COSY acoplou com o sinal em  $\delta$  1,63 ppm (quintupletto); e, via o mapa de contorno do HMBC, correlacionou com  $\delta$  178,15 (C-1),  $\delta$  24,86 (C-3) e  $\delta$  29,67 (C-4).

Os respectivos deslocamentos químicos atribuídos aos sinais de hidrogênio e carbono via mapa de contorno do experimento de HSQC estão representados na Tabela 27.

Tabela 27. Deslocamentos químicos atribuídos aos sinais de hidrogênios e carbonos via mapa de contorno do HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , RMN 400 MHz) da substância D3F9.

Posição	Multiplicidade	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	-	-	178,15
2	tripleto	2,35	33,68
3	quintupletto	1,63	24,86
4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12	singleto	1,25	29,67
13	quarteto	1,14	39,09
14	septeto	1,51	27,46
15	singleto	0,87	22,45
16	singleto	0,85	22,45

Para a confirmação da estrutura uma alíquota desta fração foi metilada com diazometano e analisada via GC-MS onde temos o cromatograma de íons totais (Figura 54-A) e o espectro de massas (Figura 54-B). Pode-se observar a presença dos íons  $m/z$  74, 87 e 143, que são característicos de ésteres de ácidos graxos, devido às fragmentações destas moléculas que estão descritas na Figura 55. Com os dados obtidos podemos afirmar que a amostra D3F9 corresponde ao ácido 14-metilpentadecanóico (ácido isopalmítico) (Figura 56).

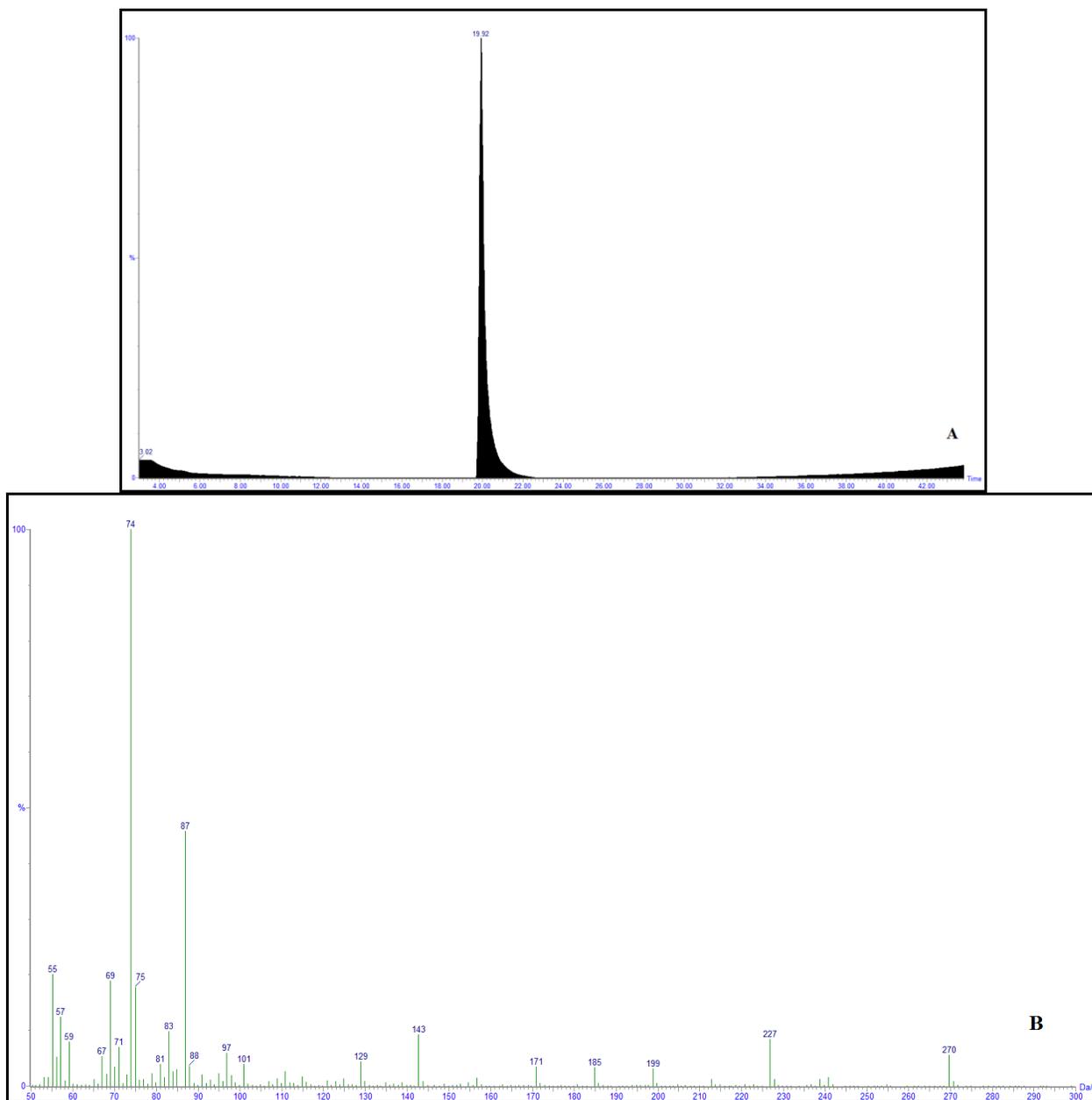


Figura 54. Em A tem-se o TIC obtido por análise em GS-EIMS. Em B tem-se o espectro de fragmentação após processamento da banda com tempo de retenção em 19,92 em A.

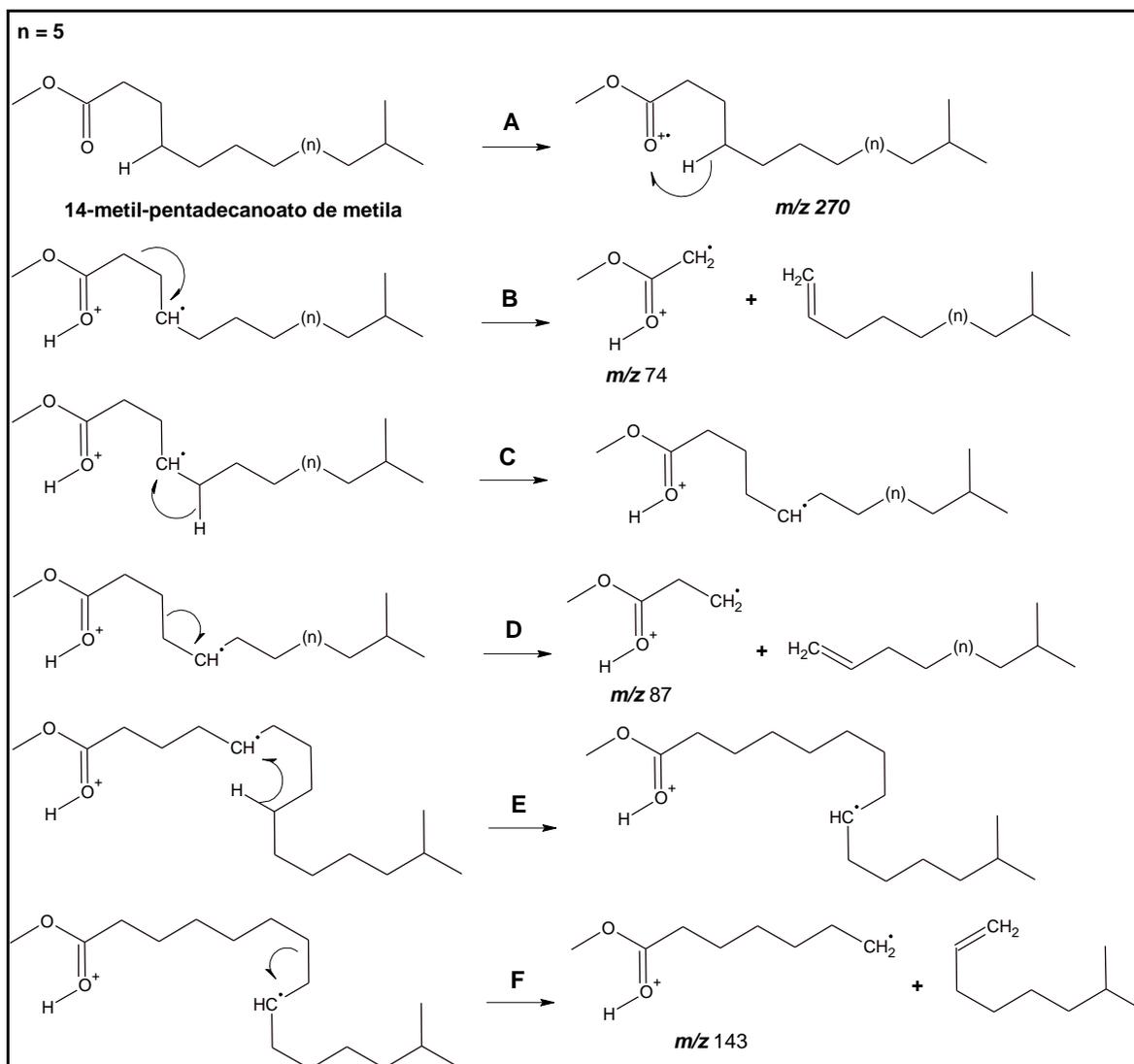


Figura 55. Fragmentos característicos de ésteres de ácidos graxos. Em **A** tem-se a ionização por impacto eletrônico seguida pela migração de hidrogênio. Em **B** tem-se a fragmentação na ligação  $\alpha$ - $\beta$  (rearranjo de McLafferty) gerando o íon  $m/z$  74. Em **C** e **D** tem-se uma migração de hidrogênio seguida da fragmentação no  $C_3$ - $C_4$  gerando o íon  $m/z$  87. Em **E** e **F** tem-se uma migração de hidrogênio seguida da fragmentação no  $C_7$ - $C_8$  gerando o íon  $m/z$  143.

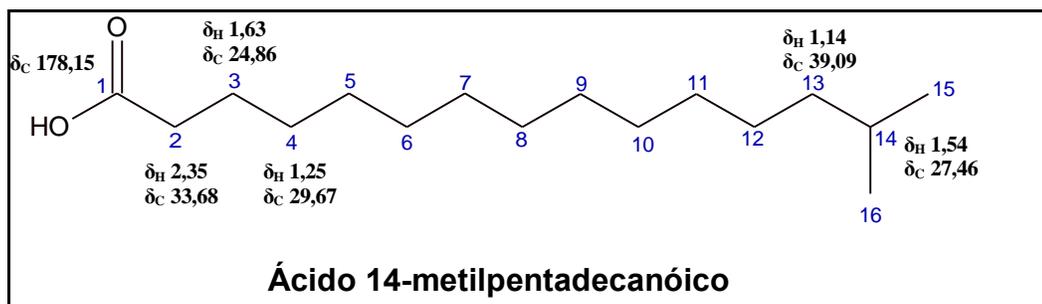


Figura 56. Fórmula estrutural do ácido 14-metilpentadecanóico.

#### 5.4 Desenvolvimento de estimativa de produção de Valinomicina no caldo de cultivo do *Streptomyces carpaticus*.

Na literatura não são encontradas informações sobre valores de concentração de Valinomicina em caldos de cultivo de nenhuma das linhagens produtoras. Uma vez que essa informação é de suma importância para o desenvolvimento do bioprocessamento, pois é a variável resposta nos casos de estudo de otimização da produção, faz-se necessário o desenvolvimento de uma metodologia de produção.

Assim, após o isolamento e obtenção do composto com a atividade biológica relatada realizou-se o desenvolvimento de uma metodologia para estimar a produção de Valinomicina usando CLAE-ESI-EM/EM, com padronização externa. As análises foram feitas com detecção via monitoramento seletivo de íons (SRM), com transições definidas através dos estudos de espectros de íons produtos, o que permitiu a quantificação do analito em baixas concentrações.

As condições de ionização para a Valinomicina por ESI+ foram estabelecidas durante a obtenção dos espectros de íon produto provenientes do padrão comercial. Após a obtenção do perfil de fragmentação da molécula, escolheu-se quais seriam as transições selecionadas para a estimativa de produção de Valinomicina.

Como os experimentos de *full scan* revelaram formação do  $[M+H]^+$  ( $m/z$  1112) e dos adutos de amônio ( $[M+NH_4]^+$ ,  $m/z$  1129), de sódio ( $[M+Na]^+$ ,  $m/z$  1134) e de potássio ( $[M+K]^+$ ,  $m/z$  1150), realizou-se a comparação dos cromatogramas SRM para quatro transições ( $[M+H]^+$ , 1112→1084,  $[M+NH_4]^+$ , 1129→1084;  $[M+Na]^+$ , 1134→592;  $[M+K]^+$ , 1150→607) e apenas para a transição  $[M+NH_4]^+$ . As respectivas transições foram escolhidas considerando os resultados obtidos nos espectros de íon produto para os quatro íons que estão representados na Figura 57. Como não foi observada diferença na área obtida para os cromatogramas SRM, optou-se na Figura 58 por monitorar apenas a transição 1129→1084, uma vez que as fases móveis utilizadas foram tamponadas com tampão formiato de amônio 1 mM (pH 3,5) e, sendo assim, proporcionava o aumento da corrente iônica de  $[M+NH_4]^+$ .

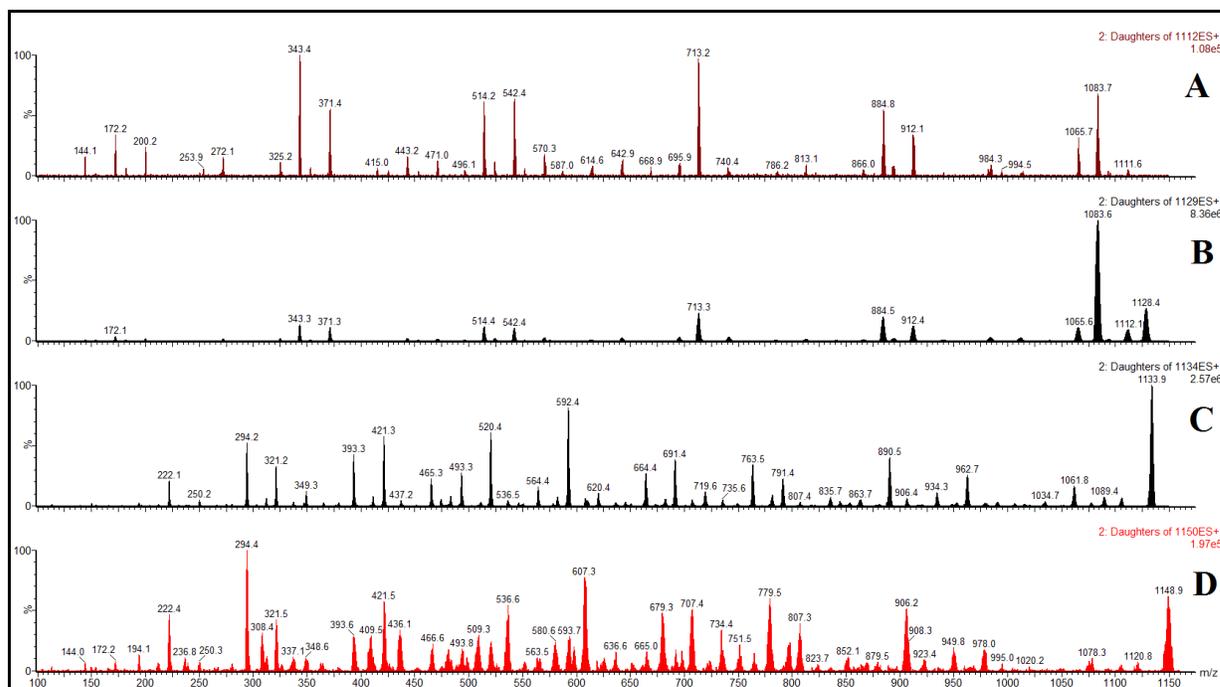


Figura 57. Espectro de íons produto para diferentes íons formados para o padrão Valinomicina. A -  $[M+H]^+$   $m/z$  1112  $m/z$  (CID 40 eV), B -  $[M+NH_4]^+$   $m/z$  1129 (CID 40 eV), C -  $[M+Na]^+$   $m/z$  1134 (CID 75 eV), D -  $[M+K]^+$   $m/z$  1150 (CID 90 eV).

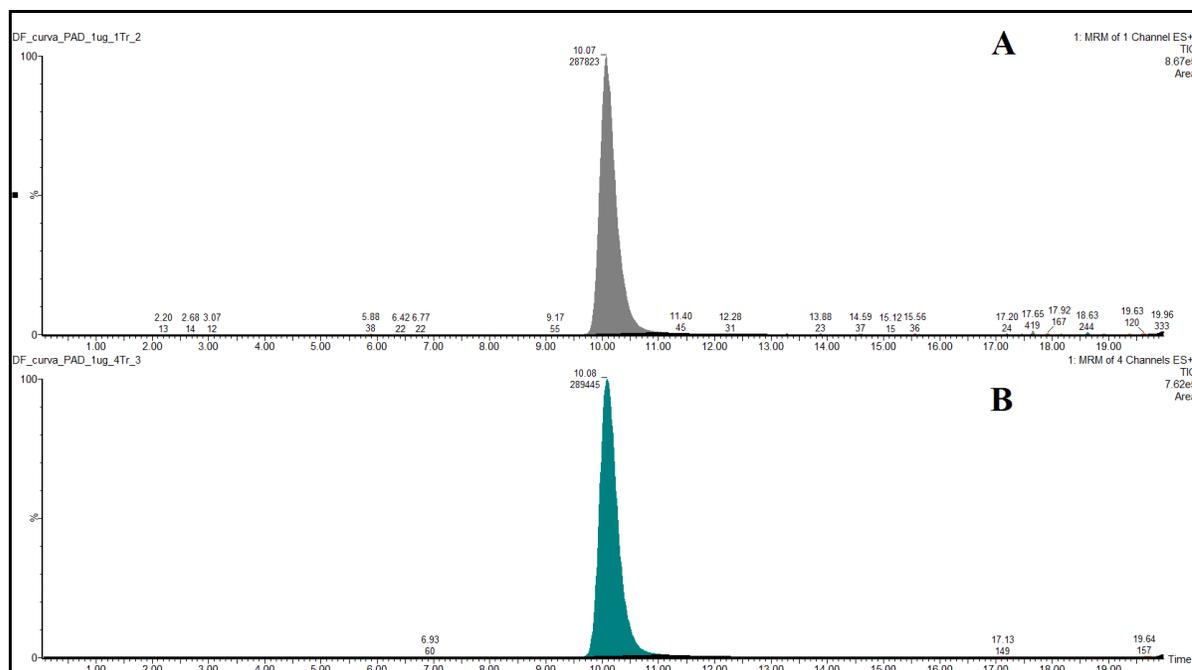


Figura 58. Cromatograma SRM para o composto Valinomicina. Solução  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  MeOH. Em A monitoramento da transição 1129 $\rightarrow$ 1084. Em B monitoramento das transições 1112 $\rightarrow$ 1084, 1129 $\rightarrow$ 1084, 1134 $\rightarrow$ 592, 1150 $\rightarrow$ 607.

Como pode-se observar na Figura 59, os valores obtidos para os coeficientes de correlação ( $r$ ) e de determinação ( $r^2$ ) foram ambos de 0,999 usando fator de peso  $1/x$ . As concentrações utilizadas foram de 3, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 e 3000  $\text{ng.mL}^{-1}$ .

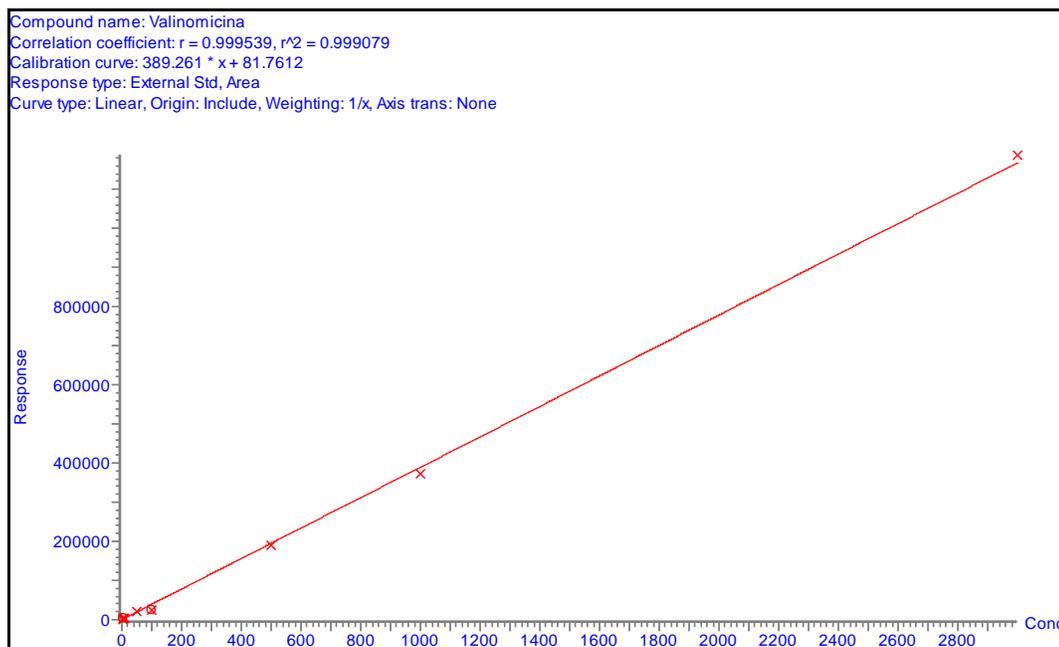


Figura 59. Curva de calibração para o padrão Valinomicina no intervalo de concentrações de 3 a 3000  $\text{ng.mL}^{-1}$ .

A análise da Figura 60 nos forneceu uma relação sinal ruído (S/N) de aproximadamente 55000, obtendo-se assim um limite de quantificação (LOQ) do método de 3,0  $\text{ng.mL}^{-1}$  (S/N=50). Uma vez que o desenvolvimento do método tem como interesse específico possibilitar a estimativa da produção de Valinomicina, permitindo assim a obtenção do perfil da sua produção em diferentes meios de cultivo, e como não existe nenhuma metodologia desenvolvida na literatura, este estudo se faz de grande importância para o grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar, que visa posteriores estudos de otimização do processo e aumento de escala da produção.

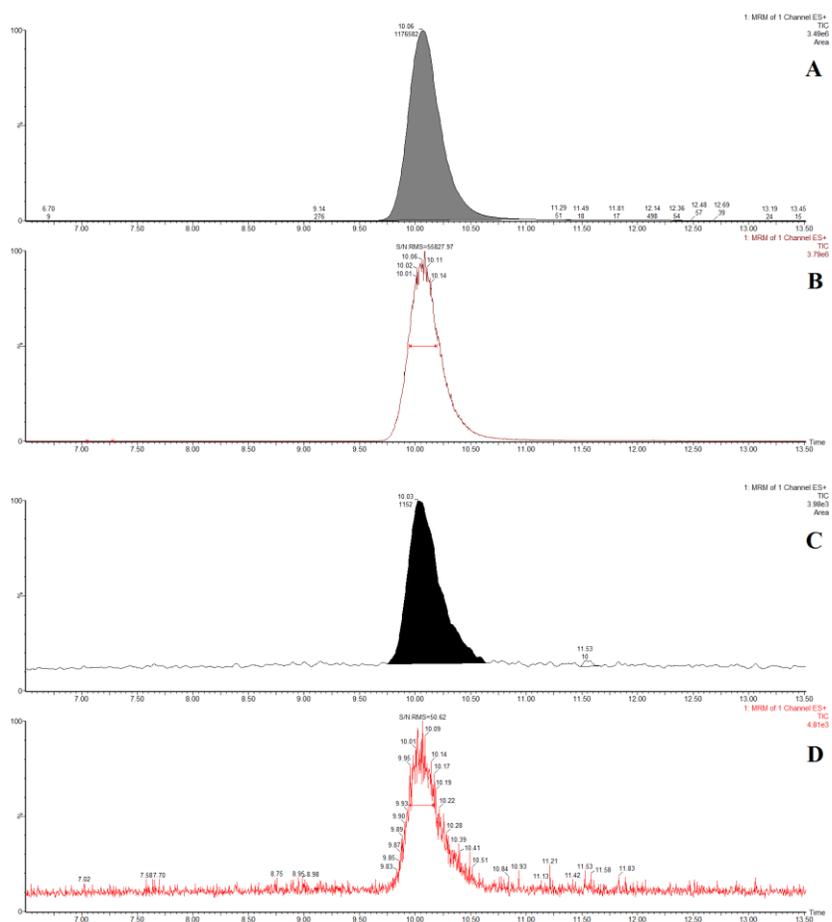


Figura 60. Cromatogramas SRM para o composto Valinomicina. A transição monitorada foi 1129→1084. Em A e B maior concentração da curva de calibração. Em C e D menor concentração da curva de calibração.

A especificidade do método foi avaliada pela comparação dos cromatogramas com detecção por SRM apresentados na Figura 61, obtidos para as amostras fortificadas e amostras branco, ou seja, meio de cultura sem inoculação de microrganismo que no caso em específico foram quatro diferentes meios.

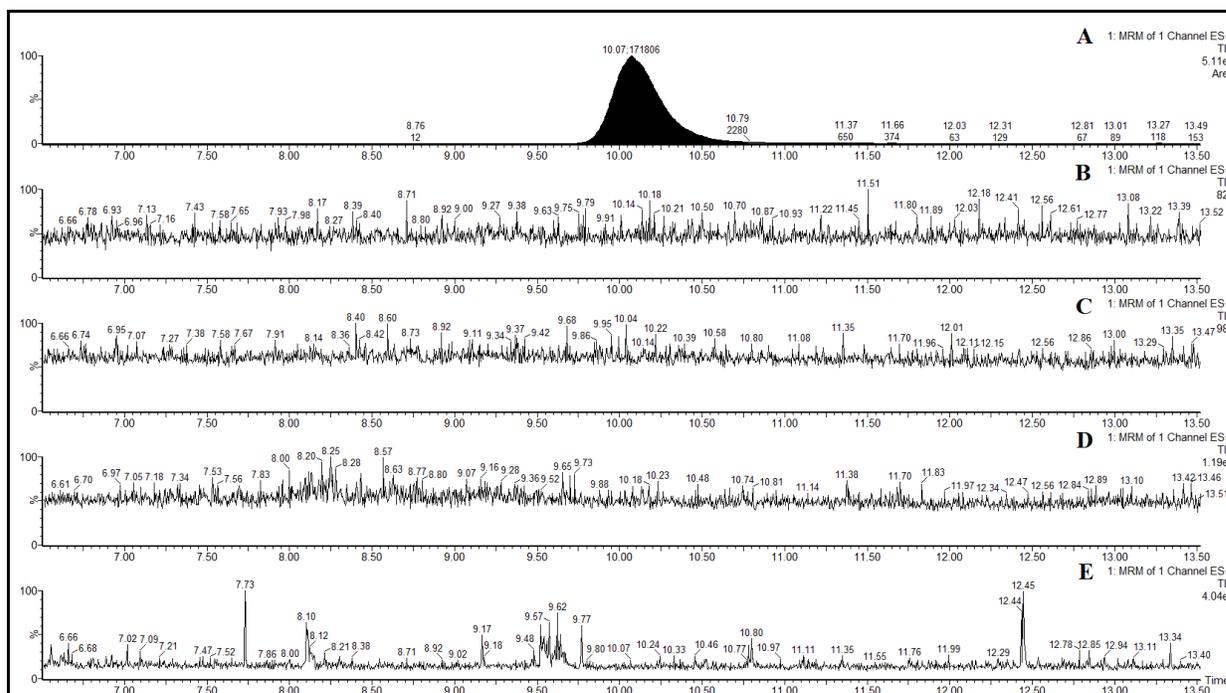


Figura 61. Cromatogramas com detecção por SRM para o composto Valinomicina (transição monitorada 1129→1084). Em A amostra de meio DSMZ 65 sem adição inóculo fortificada com padrão na concentração de 500  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Em B, C, D e E temos os cromatogramas para os meios DSMZ 65, NBIMCC 185, DSMZ 246 e DSMZ 545 respectivamente sem fortificação (brancos).

Para o desenvolvimento da metodologia de estimativa de produção de Valinomicina ao longo do tempo em caldos fermentativos foi levado em consideração o fato de que a matriz (caldo de cultivo) é dinâmica, ou seja, a cada intervalo de tempo decorrido dos cultivos, as concentrações dos substratos variam além de poder ocorrer ainda surgimento de metabólitos ou mesmo esgotamento de outros nutrientes presentes no caldo. Como a metodologia desenvolvida visou gerar dados de estimativa da produção de Valinomicina no caldo fermentado livre de células, foi realizado o estudo da recuperação capaz de gerar informação acerca da eficiência de extração do método empregado.

A construção da curva de estimativa de produção foi realizada utilizando o controle (branco) e 7 amostras coletadas em intervalos de 12 h para cada meio avaliado. Foram avaliadas as eficiências de extração de Valinomicina da amostra inicial de cultivo (0 h) e do ponto final de cultivo (72 h) uma vez que a avaliação da eficiência da extração para todos os intervalos (pontos) de cultivo seria inviável. A eficiência de extração para cada meio de cultivo foi obtida em função da porcentagem do analito investigado, pela comparação dos resultados de

amostras fortificadas (caldo de cultivo acrescido de padrão externo) e submetidas ao processo de extração, com os resultados de amostras que foram submetidas ao processo de extração para em seguida serem fortificadas com solução padrão conhecida. As concentrações analisadas foram de  $3,6 \text{ ng.mL}^{-1}$ , que corresponde a 120% do menor intervalo da curva de calibração, e  $2,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ , que corresponde a aproximadamente 83 % do maior intervalo da curva de calibração. Como nenhum dos pontos que foram avaliados estava isento do composto Valinomicina (o ponto 0 h recebe o inóculo o qual já contém Valinomicina) foi realizado, para cada amostra, três etapas distintas. Uma foi a extração e ressuspensão (ESR) sem fortificação da amostra, a segunda foi a extração seguida da fortificação e ressuspensão (EFR) da amostra e a terceira foi a fortificação da amostra seguida da extração e ressuspensão (FER) sendo que a eficiência da extração (em %) foi calculada pela razão  $[(EFR-ESR)/(FER-ESR)] \times 100$ .

O procedimento de extração de Valinomicina nas amostras de caldo foi realizado conforme descrito no item 4.9. Assim, para cada intervalo de tempo do cultivo foram realizadas análises em duplicata onde a uma alíquota de  $1000 \text{ } \mu\text{L}$  de sobrenadante dispensa em frasco vial era adicionado  $500 \text{ } \mu\text{L}$  de AcOEt e agitado por 15 segundos em vórtex. Em seguida, um volume de  $300 \text{ } \mu\text{L}$  era coletado e dispensando em vial. Cada amostra foi particionada por três vezes ( $n=3$ ).

Os resultados obtidos apresentados na Tabela 28 mostraram a eficiência da metodologia experimental sem variação significativa nos valores de recuperação nos dois intervalos analisados (0h e 72h), evidenciando assim que parece não haver nenhum efeito relativo à mudança na matriz para a extração nas amostras analisadas.

Tabela 28. Valores obtidos para a recuperação (em %) do composto Valinomicina produzida pelo *S. carpathicus* em quatro diferentes meios de cultivo. Valores são média  $\pm$  desvio padrão.

Eficiência da Extração (n=3)				
Meio	Concentração Teórica ( $\text{ng.mL}^{-1}$ )	0 h	72 h	Valor Global
DSMZ 65	3,6	96,26 $\pm$ 23,63	98,71 $\pm$ 16,49	97,49 $\pm$ 20,06
	2500	86,82 $\pm$ 11,66	67,80 $\pm$ 12,47	77,31 $\pm$ 12,07
NBIMCC 185	3,6	95,25 $\pm$ 14,34	91,40 $\pm$ 12,54	93,33 $\pm$ 13,44
	2500	86,31 $\pm$ 5,48	96,35 $\pm$ 8,23	91,33 $\pm$ 6,86
DSMZ 246	3,6	94,26 $\pm$ 14,21	95,69 $\pm$ 20,54	94,98 $\pm$ 17,38
	2500	73,38 $\pm$ 12,29	99,87 $\pm$ 14,65	86,63 $\pm$ 13,47
DSMZ 545	3,6	91,84 $\pm$ 19,65	95,60 $\pm$ 21,84	93,72 $\pm$ 20,75
	2500	78,32 $\pm$ 9,50	89,83 $\pm$ 19,74	84,08 $\pm$ 14,62

Foram realizados cultivos em duplicata onde foram analisadas as concentrações de Valinomicina em diferentes intervalos de tempo, em quatro meios de cultura (DSMZ 65, NBIMCC 185, DSMZ 246 e DSMZ 545). Os cultivos foram realizados em mesa agitadora rotativa (*shaker*) em Erlenmeyers de 500 mL contendo 50 mL de caldo onde as condições de operação foram 200 rpm e temperatura de 28°C. As etapas de preparo de inóculo estão descritas no item 4.3.1.

As Figuras 62, 63, 64 e 65 apresentam os resultados de crescimento celular e produção de Valinomicina para cada um dos meios analisados. Nas Tabelas 29-36 (Apêndice B) estão apresentados os dados coletados durante os experimentos. Dentre os quatro meios de cultivo estudados, pode-se afirmar que o meio DSMZ 545 (Figura 66) foi o que alcançou a maior concentração celular, porém os resultados obtidos não permitem fazer qualquer ligação da concentração celular com a concentração de Valinomicina produzida (Figura 67). O meio NBIMCC 185 se destacou como o meio, dentre os avaliados, que mais produziu Valinomicina. Foi observado ainda que a produção de Valinomicina possa estar ligada a presença de glicose como fonte de carbono uma vez que foi observada concentrações muito baixas de Valinomicina naqueles meios onde há baixa concentração de glicose (DSMZ 545) ou mesmo ausência de glicose (DSMZ 246). Uma vez que o metabolismo da glicose pode levar a formação de ácido láctico esta informação corrobora com os resultados de Anke e Lipmann (1977).

Pettit et al. (1999) isolaram 0,67 g de Valinomicina de 925 L de caldo de cultivo de *S. anulatus* o que é um rendimento ainda mais baixo quando comparado com o resultado encontrado para o meio NBIMCC 185. É importante ressaltar que trabalhos semelhantes na literatura envolvendo o isolamento de Valinomicina em cepas de actinomicetos apresentam cultivos com volume de trabalho de caldos fermentativos na casa de dezenas a centenas de litros (PETTIT et al., 1999; PATTERSON e WRIGHT, 1970).

Os dados gerados nesta pesquisa asseguram perfeitamente a realização de cultivos em escalas de centenas de litros uma vez que o domínio das características de crescimento celular foram adquiridas no que diz respeito para fins de obtenção de quantidade de volume de caldo fermentado. É importante ressaltar que não há nenhum relato de estudos de crescimento do *S. carpathicus* em frascos erlenmeyers ou mesmo em reator de bancada na literatura.

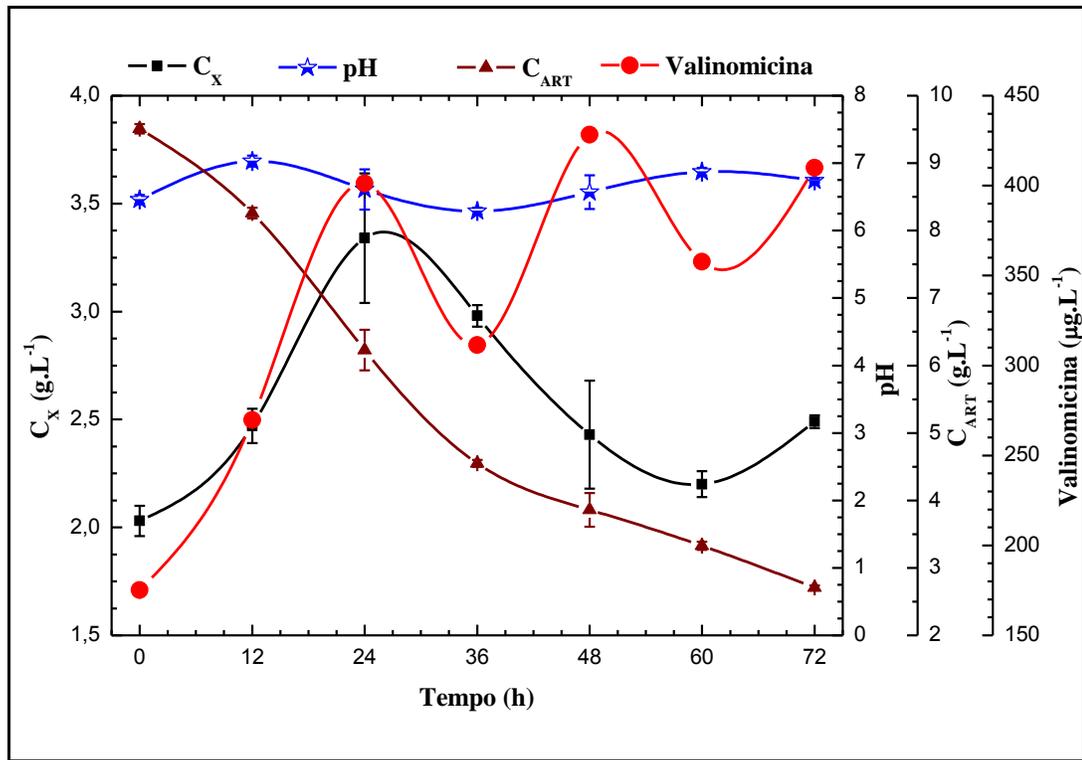


Figura 62. Evolução do crescimento celular, consumo de açúcares redutores totais, pH e produção de Valinomicina em meio DSMZ 65.

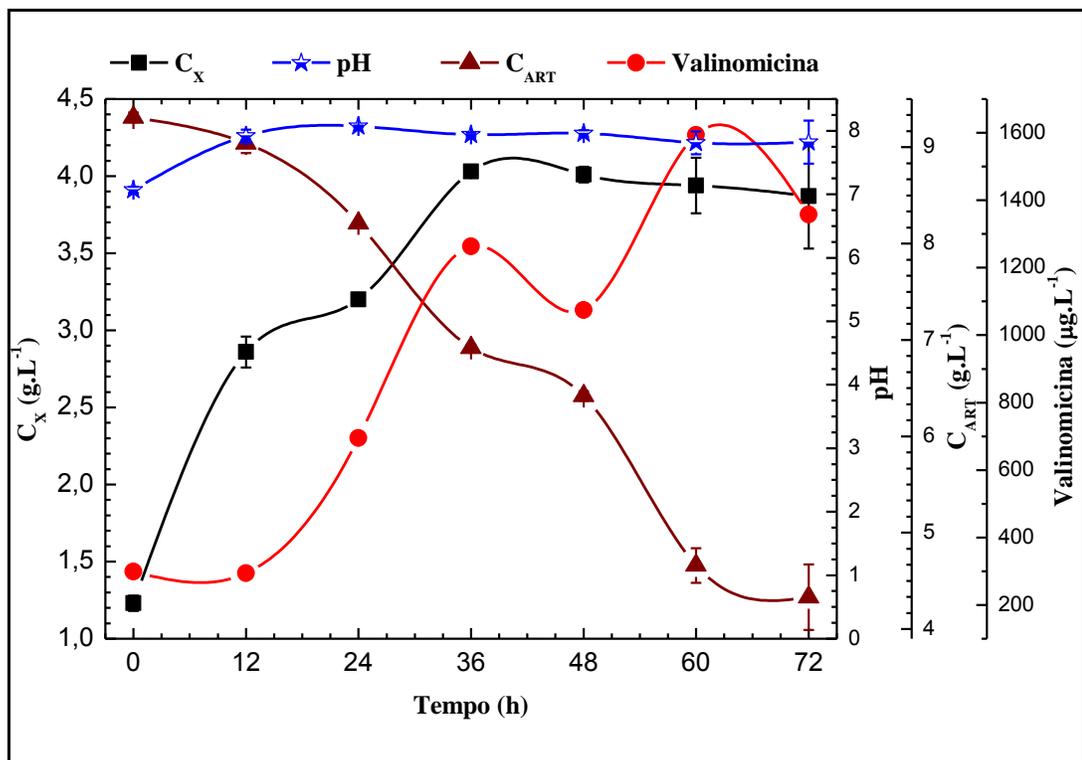


Figura 63. Evolução do crescimento celular, consumo de açúcares redutores totais, pH e produção de Valinomicina em meio NBIMCC 185.

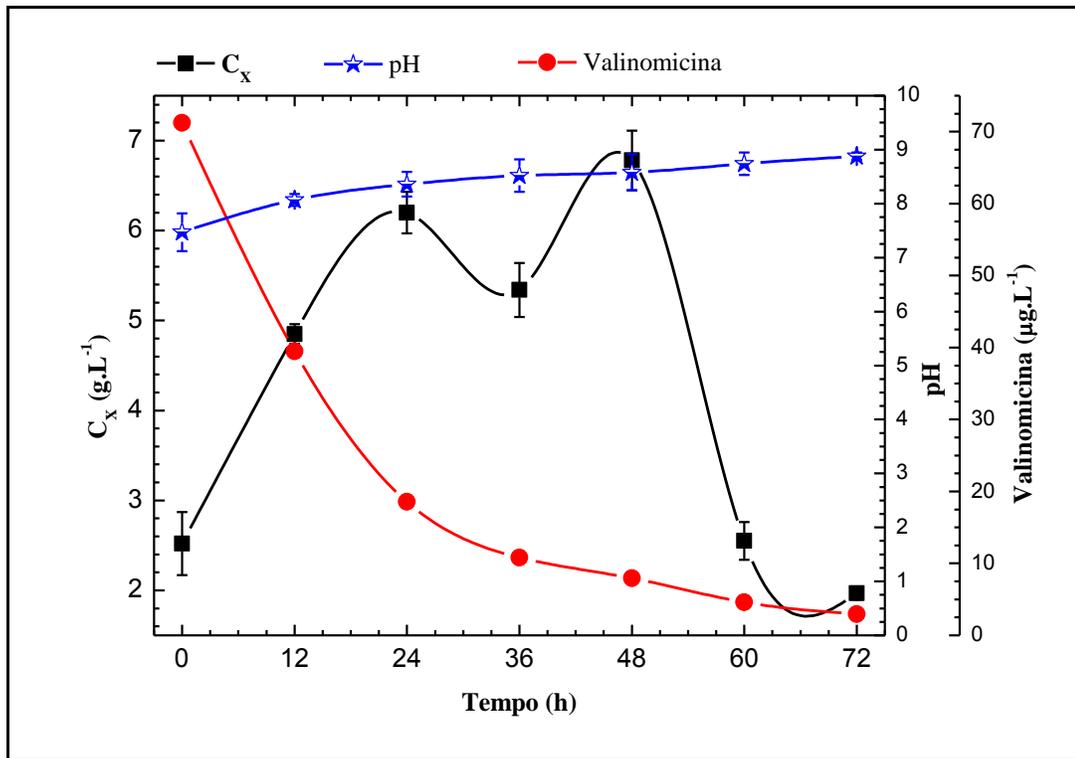


Figura 64. Evolução do crescimento celular, consumo de açúcares redutores totais, pH e produção de Valinomicina em meio DSMZ 246.

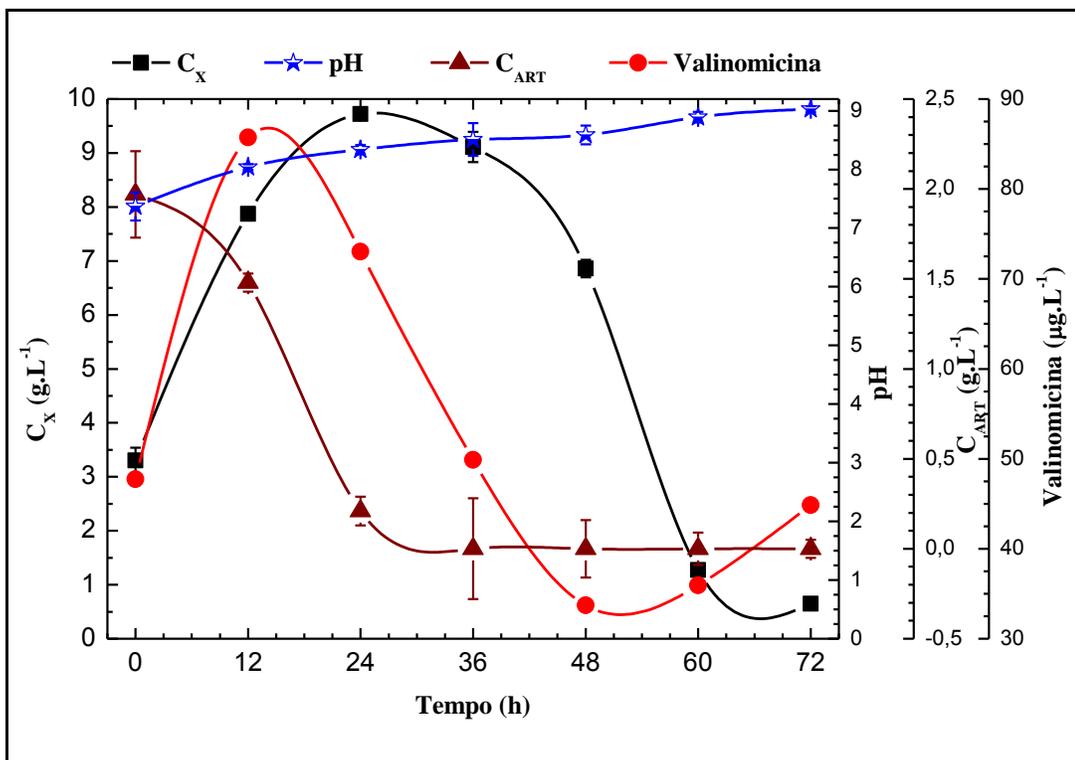


Figura 65. Evolução do crescimento celular, consumo de açúcares redutores totais, pH e produção de Valinomicina em meio DSMZ 545.

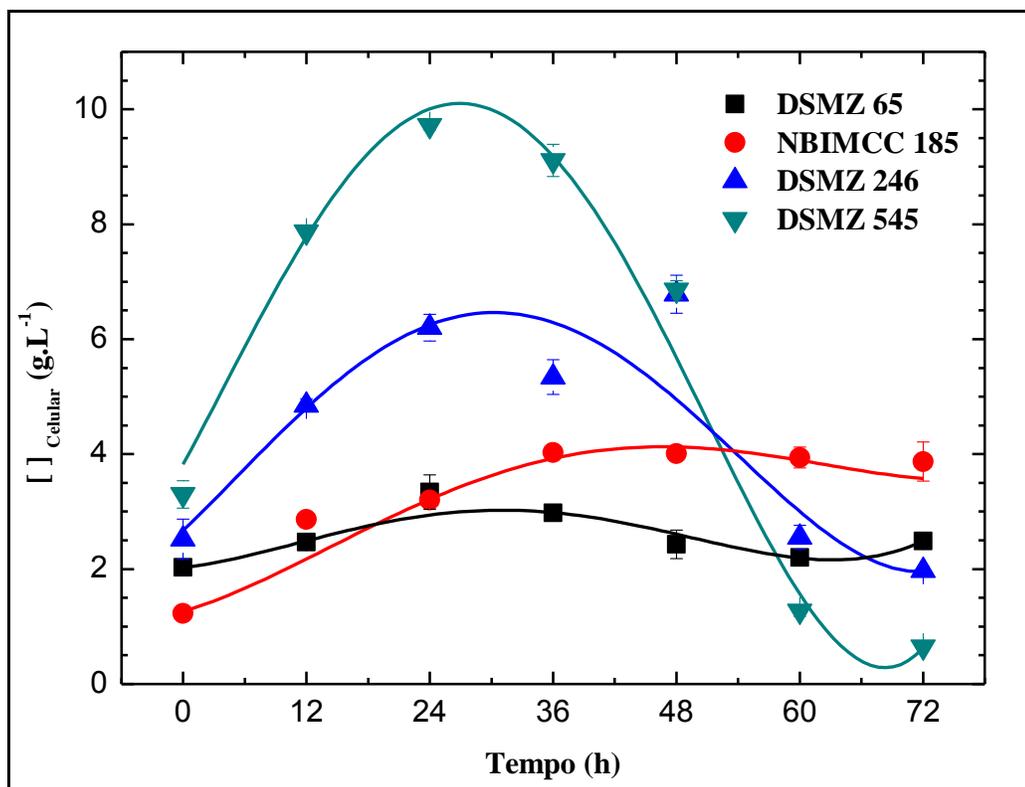


Figura 66. Crescimento celular obtido no cultivo do *S. carpaticus* nos meios DSMZ 65, 246, 545 e NBIMCC185.

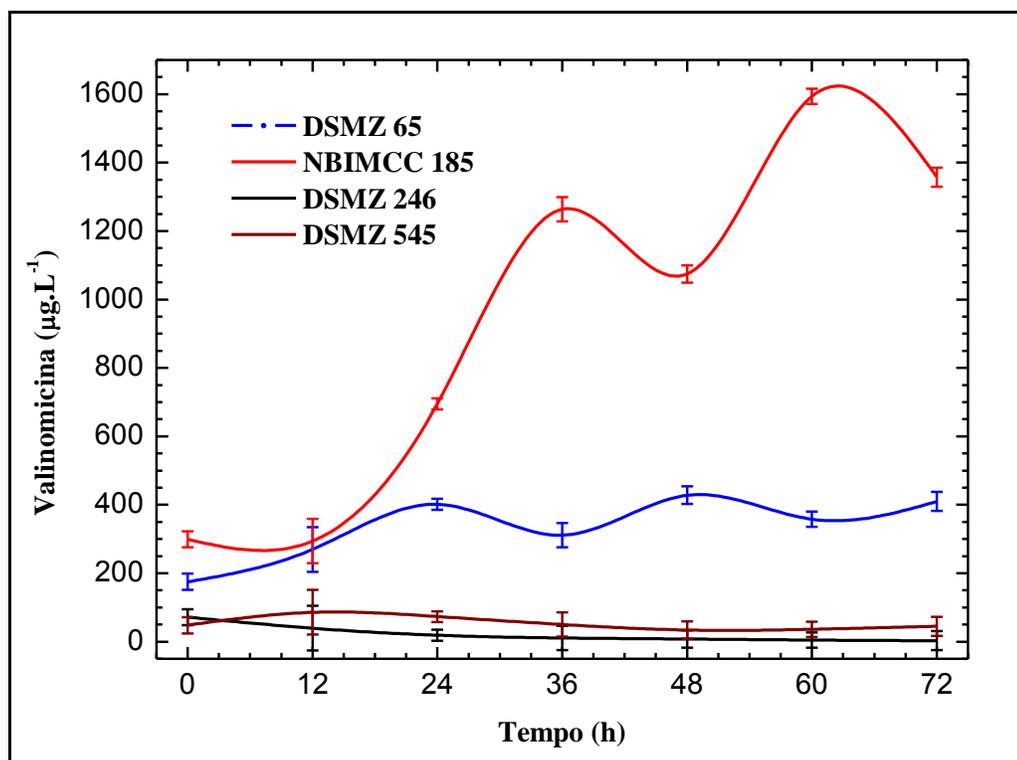


Figura 67. Perfil de produção de Valinomicina dos diferentes meios avaliados.

## 6 Conclusões

Frações de caldos de cultivo de *S. carpaticus* apresentaram bioatividade contra diferentes linhagens de células tumorais, demonstrando a possível existência de substância com bioatividade citotóxica específica nunca antes detectada em culturas de *S. carpaticus*.

O uso de módulos de microfiltração (0,22  $\mu\text{m}$ ) e ultrafiltração (3,0 kDa) em sequência permitiram um *clean-up* do caldo, bem como a pré-concentração do analito a ser purificado, uma informação importante para o desenvolvimento da etapa de purificação (*down-stream*) do produto, favorecendo desta forma o uso de menor volume de solventes orgânicos. Esta informação é importante para processos industriais uma vez que esses módulos já são empregados em processos de purificação em larga escala.

O uso de ensaios antiproliferativos e da espectrometria de massas orientaram o fracionamento bioguiado direcionado das amostras para o levantamento de informações que permitiram a elucidação estrutural da molécula.

Após sucessivos passos de purificação das frações ativas chegou-se ao isolamento do ciclodepsipeptídeo Valinomicina. Os valores de concentração de inibição ( $\text{IC}_{50}$ ) obtidos para o Valinomicina, frente às quatro diferentes linhagens de células tumorais apresentaram baixas concentrações que variaram entre 2 e 10  $\text{ng.mL}^{-1}$ .

A maior limitação encontrada durante todo o desenvolvimento do trabalho foi a pequena quantidade em massa das frações que apresentavam atividade citotóxica frente ao bioensaio realizado. A baixa concentração do composto em investigação presente no caldo de cultivo foi comprovada através de metodologia de análise desenvolvida por CLAE-DAD-EM/EM via SRM.

A análise comparativa da produção de Valinomicina nos diferentes meios avaliados demonstrou que o melhor resultado de 1,6  $\text{mg.L}^{-1}$  foi encontrado em meio NBIMCC 185 contendo maior concentração de glicose entre os meios testados, corroborando com as informações da literatura.

Além da Valinomicina, foi detectada a presença de ácido isopalmítico no caldo de cultivo, estando esse composto presente nas diferentes frações obtidas, interferindo diretamente no isolamento da substância principal que foi o composto Valinomicina.

Em termos de novidade científica, o presente trabalho apresenta o segundo relato de substância com bioatividade proveniente de culturas de *S. carpaticus* e o primeiro relato da presença de um composto com alta atividade contra diferentes linhagens de células tumorais sintetizado por *S. carpaticus*, no caso o composto identificado como sendo o ciclododecadepsipeptídeo Valinomicina.

A grande contribuição deste trabalho deve-se ao domínio das características de crescimento do microrganismo em análise e ao desenvolvimento de metodologia de estimativa de produção de Valinomicina por CLAE-ESI-EM/EM via SRM, uma vez que estes dados são imprescindíveis para estudos posteriores visando a otimização do processo de produção de Valinomicina em diferentes modos de operação do biorreator. Vale ainda ressaltar que apesar da Valinomicina ter sido isolada na década de 50 e ser comercializada como padrão analítico por várias empresas como Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, A. G. Scientific, Inc., Cayman Chemical, Merck (Calbiochem<sup>®</sup>) não existe nenhum artigo na literatura que apresenta a produção de Valinomicina nas cepas que apresentam capacidade produtora.

No meu ponto de vista seria importante, como etapa de continuação deste trabalho, a validação da metodologia de quantificação do composto Valinomicina em caldo de cultivo o que permitiria a obtenção da produção do composto Valinomicina pelo *S. carpaticus* bem como em outros Streptomicetos que também possuem capacidade de produção do composto.

## 7 Bibliografia

ABDALAH, R.; et al. Valinomycin-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *Neuroscience Letters*, v. 105, p. 68-73, 2006.

ABRAHAM, E. P. Cephalosporins 1945-1986. *Drugs*, v. 34, supplement 2, p.1-14, 1987.

AMADOR, M. L. et al. Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. *Annals of Oncology*, v. 14, p. 1607-1615, 2003.

ANDERSSON, M. A. et al. The Mitochondrial Toxin Produced by *Streptomyces griseus* Strains Isolated from an Indoor Environment Is Valinomycin. *Appl Environ Microbiol* v. 64, n. 12, p. 4767-4773, 1998.

ANKE, T.; LIPMANN, F. Studies on the biosynthesis of Valinomycin. *FEBS Letters*, v. 82, n. 2, p. 337-340, 1977.

BAGGALEY, K. H.; BROWN, A. G.; SCHOFIELD, C. J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. *Natural Products Report*, v. 14, n. 4, p. 309-333, 1997.

BPATISTA-NETO, A. et al. A study on Clavulanic Acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, feed-batch and continuous process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 22, n.4, p. 557-563, 2005.

BASAK, K.; MAJUNDAR, S. K. Mineral nutrition of *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 8, n. 4, p. 391-395, 1985.

BENTLEY, R. Mycophenolic acid: A one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. *Chemical Reviews*, v. 100, p. 3801-3826, 2000.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites: A personal view. *The Journal of Antibiotics*, v. 58, n. 1, p. 1-26. 2005.

BERLINCK, R. G. et al. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in brazil. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 510-522, 2004.

BERRIGE, M. V. et al. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*, n. 4, p. 14-19, 1996.

BEWICK, M. W.; WILLIAMS, S. T.; VELTKAMP, C. Growth and ultrastructure of *Streptomyces venezuelae* during chloramphenicol production. *Microbios.*, v. 16, p. 191-199, 1976.

BIFFI, G. et al. Metabolic behavior and Chlortetracycline production by *Streptomyces aureofaciens* in liquid culture. *Applied Microbiology*, v. 2, n. 5, p. 288-293, 1954.

Biota-FAPESP divulga resultados de chamada. Disponível em <<http://www.fapesp.br/matéria/5775>>. Acesso em: 04/08/2010.

BORDOLOI, G. N. et al. Isolation and structure elucidation of a new antifungal and antibacterial antibiotic produced by *Streptomyces* sp. 201. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 65, n. 8, p. 1856-1858, 2001.

BORUWA, J. et al. Synthesis, absolute stereochemistry and molecular design of the new antifungal and antibacterial antibiotic produced by *Streptomyces* sp. 201. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 14, n. 13, p. 3571-3574, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2010. 98 p.

BROCKMANN H, SCHMIDT-KASTNER G. Valinomycin I, XXVII. Mitteil. über Antibiotica aus Actinomyceten. *Chemische Berichte*, v. 88, n. 1, p. 57-61, 1955.

BURKHOLDER, P. R.; PFISTER, R. M.; LEITZ, F. H. Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. *Applied Microbiology*, v. 14, n. 4, p. 649-653, 1966.

BUSH, K. The coming of age of antibiotics: discovery and therapeutic value. *Annals of The New York Academy of Sciences, Antimicrobial Therapeutics Review*, v. 1213, p. 1-4, 2010.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal Natural Products*, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

CAFFREY, P.; LYNCH, S.; FLOOD, E.; FINNAN, S.; OLIYNYK, M. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chemistry & Biology*, v. 8, n. 7, p. 713-723, 2001.

CARLSON, J. C. et al. Isolation and characterization of Tirandamycins from a marine-derived *Streptomyces* sp. *Journal of Natural Products*, v. 72, n. 11, p. 2076—2079, 2009.

CARVALHO, C. C. C. R. de; FERNANDES, P. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. *Marine Drugs*, v. 8, p. 705-727, 2010.

CARVALHO, H. et al. DNA damage induced by the anthracycline cosmomycin D in DNA repair-deficient cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 65, n. 5, p. 989-994, 2010.

CHENG, Y. R.; FANG, A.; DEMAINE, A. L. Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis by *Streptomyces hygroscopicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 43, n. 6, p. 1096-1098, 1995.

CHIN, Y. et al. Drug discovery from natural sources. *The AAPS Journal*; v. 8, n. 2, article 28, 2006. Disponível em <http://www.aapsj.org>. Acesso em 01/08/2007.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M. A.; WASH, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology*, v. 24, n. 12, p. 1541-1550, 2006.

CORREA, A. G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. *Química Nova*, v. 18, n. 5, p. 460-467, 1995.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, v. 60, p. 52-60, 1997.

CRAIK, D. J.; SCANLON, M. Marine toxins as a starting point for drugs. In: BOTANA, L. M. *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology and detection*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000. p. 715-740.

DANIEL, J. F. DE S.; FILHO, E. R. Peptaibols of *Trichoderma*. *Natural Products Report*, v. 24, p. 1128-1141, 2007.

DARKEN, M. A.; BERENSON, H.; SHIRK, R. J.; SJOLANDER, N. O. Production of tetracycline by *Streptomyces aureofaciens* in synthetic media. *Applied Microbiology*, v. 8, n. 1, p. 46-51, 1960.

DAVIDSON, R. N.; BOER, M.; RITMEIJER, K. Paromomycin. *The Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, v. 103, n. 7, p. 653-660, 2009.

DECARIS, L. J. Study of a strain of *Streptomyces lavendulae* producing a new antibiotic: framycetin. *Rev. Pathol. Gen. Physiol. Clin.*, v. 53, n. 648, p. 676-679, 1953.

DEMAIN, A. L. Induction of microbial secondary metabolism. *International Microbiology*, v. 1, p. 259-264, 1998.

DENIS, J. N. et al. Highly efficient, practical approach to natural taxol. *Journal of the American Chemical Society*, v. 110, n. 17, p. 5917-5919, 1988.

DENIS, J. N.; CORREA, A.; GREENE, A. E. An improved synthesis of the Taxol side chain and of RP 56976. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 55, n. 6, p. 1957-1959, 1990.

DOEKEL, S.; MARAHIEL, M. A. Biosynthesis of natural products on modular peptide synthetases. *Metabolic Engineering*, v. 3, p. 64-77, 2001.

DU, L.; SHEN, B. Identification and characterization of a type II peptidyl carrier protein from the bleomycin producer *Streptomyces verticillus* ATCC 15003. *Chemistry and Biology*, v. 6, p. 507-517, 1999.

DULMAGE, H. T. The production of Neomycin by *Streptomyces fradiae* in synthetic media. *Applied Microbiology*, v. 1, n. 2, p. 103-106, 1953.

ELANDER, R. P.; Industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 61, p. 385-392, 2003.

EPPELMANN, K.; DOEKEL, S.; MARAHIEL, M. A. Engineered biosynthesis of the peptide antibiotic Bacitracin in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 34824-34831, 2001.

FARID, M. A. et al. Optimization of the cultivation medium for natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *Journal of Basic Microbiology*, v. 40, n. 3, p. 157-166, 2000.

FAULKNER, D. J. Marine pharmacology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 77, p. 135-145, 2000.

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

FIEDLER, H. et al. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 87, p. 37-42, 2005.

GAO, H. et al. Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 17, p. 4012-4016, 2009.

GAUZE, G. F. et al. A guide for the determination of actinomycetes. Genera *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, and *Chainia*. Moscow: Nauka, 1983.

GERMAN COLLECTION OF MICROORGANISMS AND CELL CULTURES. List of Medium. Disponível em: <[http://www.dsmz.de/microorganisms/media\\_list.php](http://www.dsmz.de/microorganisms/media_list.php)>. Acesso em: 27/07/2011.

GISIN, B. F.; MERRIFIELD, R. B.; TOSTESON, D. C. Solid-phase synthesis of the cyclododecapeptide Valinomycin. *Journal of the American Chemical Society*, v. 91, n. 10, p. 2691-2695, 1969.

GORAJANA A. et al. 1-Hydroxy-1-norresistomycin, a new cytotoxic compound from a marine Actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUBN1/7. *Journal Antibiotics*, v.58, n. 8, p. 526-529, 2005.

GORAJANA A. et al. Cytotoxic compounds from the marine actinobacterium *Streptomyces corchorusii* AUBN1/7. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, v.32, n. 3, p. 295-300, 2006.

GREER, F. M.; MORRIS, H. R. Electrospray mass spectrometry of peptides, proteins and glycoproteins. *Protein Sequencing Protocols*, v. 211, p. 195-210, 2008.

GRIFFITHS, W. J. et al. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochemical Journal*, v. 355, p. 545-561, 2001.

GULLO V. P. et al. Drug discovery from natural products. *Journal Ind. Microbiology Biotechnology*, v. 33, p. 523-531, 2006.

HAAVIK, H. I. On the physiological meaning of secondary metabolism. *Folia Microbiologica*, v. 24, n. 4, p. 365-367, 1979.

HAMILL, R. L.; HOEHN, M. M.; BOECK, L. D. Process for preparing Tunicamycin. Uniter States Patent, US Patent 4,336,333, 1982.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008. DOI:10.1016/j.drudis.2008.07.004

HEISEY, R. M. et al. Production of Valinomycin, an Insecticidal Antibiotic, by *Streptomyces griseus* var. *flexipertum* var. *nov.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 36, n. 6, p. 1283-1286, 1988.

HERNÁNDEZ, I. L. C. et al. Dipeptide metabolites from the marine derived bacterium *Streptomyces acrymicini*. *Journal Brazilian Chemistry Society*, v. 15, n. 3, p. 441-444, 2004.

HERNÁNDEZ, I. L. C. Metabólitos secundários obtidos de bactérias (*Streptomyces*) isoladas de sedimento marinho. 5/12/2002. Tese (Doutorado em Química – Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

HILL, R. A. Marine natural products. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. B: Org. Chem.*, v. 100, p. 169-189, 2004. DOI: 10.1039/b401747c

HOFFMANN, E. DE. Tandem mass spectrometry: a primer. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 31, p. 129-137, 1996.

HOLTON, R. A. et al. First total synthesis of Taxol. 2. Completion of the C and D rings. *Journal of the American Chemical Society*, v. 116, n. 4, p. 1599-1600, 1994.

HOPWOOD, D. A. *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. First edition. New York: Oxford University Press, 2007. 272 p.

INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List N° 22. v. 36, n. 4, p. 573-576, 1986.

JENSEN, P. R. et al. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 87, p. 43-48, 2005.

JIA, B.; JIN, Z. H.; MEI, L. H. Medium optimization based on statistical methodologies for pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 144, n. 2, p. 133-143, 2008.

JIN, Z. H.; CEN, P. L. Improved production of spiramycin by mutant *Streptomyces ambofaciens*. Journal of Zhejiang University Science, v. 5, n. 6, p. 689-695, 2004.

JOHNSON, R. S. MARTIN, S. A.; BIEMANN, K. Collision-induced fragmentation of (M+H)<sup>+</sup> ions of peptides. Side chain specific sequence ions. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, v. 86, p. 137-154, 1988.

JONSBU, E; ELLINGSEN, T. E.; NIELSEN, J. Effects of nitrogen sources on cell growth and production of nystatin by *Streptomyces noursei*. The Journal of Antibiotics, v. 53, n.12, p. 1354-1362, 2000.

Jr. RINEHART, K. L. et al. Structures of the didemmins, antiviral and cytotoxic depsipeptides from a Caribbean tunicate. Journal of the American Chemical Society, v. 103, n. 7, p. 1857-1859, 1981.

KANG, S. G. et al. New beta-lactamase inhibitory protein (BLIP-I) from *Streptomyces exfoliatus* SMF19 and its roles on the morphological differentiation. Journal of Biological Chemistry, v. 275, n. 22, p. 16851-16856, 2000.

KECK, G. E. et al. Total synthesis of Bryostatin 1. Journal of the American Chemical Society, v. 133, n. 4, p. 744-747, 2011

KELECOM, A. Secondary metabolites form marine microorganisms. Annals of the Brazilian Academy of Sciences, v. 74, n. 1, p. 151-170, 2002.

KINO, T. et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. The Journal of Antibiotics, v. 40, n. 9, p. 1249-1255, 1987.

KISS, G. B.; SZÉLL, V.; AMBRUS, G.; OTT, I. Selective quantitative determination of tobramycin from fermentation broth. Acta Microbiologica Hungarica, v. 35, n. 2, p. 89-92, 1988.

KLEINKAUF, H.; VON DÖHREN, H. Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. European Journal of Biochemistry, v. 192, p. 1-15, 1990.

KLEINKAUF, H.; VON DÖHREN, H. A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*, v. 236, p. 335-351, 1996.

KORN-WENDISCH, F.; KUTZNER, H. J. The Family Streptomycetaceae. In: BALOWS, A.; TRUPER, H. G.; DWORKIN, M., HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: edophysiology, isolation, identification, application*. New York, Springer-Verlag, 1992. v. 1., p. 921-995.

LAATSCH, H. Marine bacterial metabolites. In: P. Proksch and W.E.G. Müller, Editors, *Frontiers in Marine Biotechnology*, Horizon Bioscience, 2006.

LABORATÓRIO DE ONCOLOGIA EXPERIMENTAL. Disponível em: [http://www.unifac.med.br/loe/conteudo.asp?ref=loe\\_publicacoes](http://www.unifac.med.br/loe/conteudo.asp?ref=loe_publicacoes). Acesso em: 20/07/2011.

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

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

LIM, T. H. et al. Antifungal activity of Valinomycin, a Cyclodepsipeptide from *Streptomyces padanus* TH-04. *Natural Product Sciences*, v. 13, n. 2, p. 144-147, 2007.

LOFRUMENTO, D. D. et al. Valinomycin induced energy-dependent mitochondrial swelling, cytochrome *c* release, cytosolic NADH/cytochrome *c* oxidation and apoptosis. *Apoptosis*. 2011. DOI: 10.1007/s10495-011-0628-7.

MARAHIEL, M. A. Multidomain enzymes involved in peptide synthesis. *FEBS Letters*, v. 307, n. 1, p. 40-43, 1992.

MARCO, E. et al. Structural basis for the binding of Didemnins to human elongation factor eEF1A and rationale for the potent antitumor activity of these marine natural products. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, n. 18, p. 4439-4452, 2004.

MARTIN, N. I. et al. Isolation, structural characterization, and properties of Mattacin (Polymyxin M), a cyclic peptide antibiotic produced by *Paenibacillus kobensis* M. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 15, p. 13124-13132, 2003.

McINTYRE, J. J.; BULL, A. T.; BUNCH, A. W. Vancomycin production in batch and continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, n. 4, p. 412-420, 1996.

MOCEK, U. et al. Biosynthesis of the modified peptide antibiotic thiostrepton in *Streptomyces azureus* and *Streptomyces laurentii*. *Journal of the American Chemical Society*, v. 115, n. 18, p. 7992-8001, 1993.

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

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

NAKAE, K. et al. Migrastatin, a new inhibitor of tumor cell migration from *Streptomyces* sp. MK929-43F1 – taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *Journal of antibiotics*, v. 53, n. 10, p. 1130-1136, 2000.

NATIONAL BANK FOR INDUSTRIAL MICROORGANISMS AND CELL CULTURES. Media. Disponível em: <<http://www.nbimcc.org/cat/Catalog%272005/Media.html>>. Acesso em: 02/02/2011.

NISHIMURA, H. et al. Two antibiotics identical with nocactin and Valinomycin obtained from a *Streptomyces tsusimaensis*, n. sp. *The Journal of Antibiotics* A17, p. 11-22, 1964.

OKAMI, Y. et al. New aminoglycoside antibiotics, istamycins A and B. *The Journal of Antibiotics*, v. 32, n. 9, p. 964-966, 1979.

OKAZAKI, T.; KITAHARA, T.; OKAMI, Y. Studies on marine microorganisms. IV A new antibiotic SS-228 Y produced by *Chainia* isolated from shallow sea mud. *The Journal of Antibiotics*, v. 28, n. 3, p. 176-184, 1975

OMURA, S. et al. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, v. 98, n. 21, p. 12215-12220, 2001.

PARK C. N. et al. Antifungal Activity of Valinomycin, a Peptide Antibiotic Produced by *Streptomyces* sp. Strain M10 Antagonistic to *Botrytis cinerea*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 18, n. 5, p. 880-884, 2008.

---

PATTERSON, E. L.; WRIGHT, D. P. Process for controlling insects, nematodes and mites using Valinomycin. United States Patent Office, patent number 3,520,973, 1970.

PAUL, C.; GRAEBER, M.; STUETZ, A. Ascomycins: promising agents for the treatment of inflammatory skin diseases. *Expert Opinion Investigational Drugs*, v. 9, n. 1, p. 69-77, 2000.

PERKINS, J. B. et al. *Streptomyces* Genes Involved in Biosynthesis of the Peptide Antibiotic Valinomycin. *Journal of Bacteriology*, v. 172, n. 6, p. 3108-3116, 1990.

PESCHKE, J. D.; HANEFELD, U.; LAATSCH, H. Biosynthesis of the marine antibiotic Pentabromopseudilin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 69, p. 628-630, 2005.

PETTIT, G. R. et al. Isolation and structure of bryostatin 1. *Journal American Chemistry Society*, v. 104, n. 24, p. 6846-6848, 1982.

PETTIT, G. R. et al. The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent: Dolastatin 10. *Journal of the American Chemical Society*, v. 109, n. 22, p. 6883-6885, 1987.

PETTIT, R. K.; PETTIT, G. R.; HAZEN, K. C. Specific activities of Dolastatin 10 and peptide derivatives against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 42, n. 11, p. 2961-2965, 1998.

PETTIT, G. R. et al. Antineoplastic agents. Part 409: Isolation and structure of Montanastatin from a terrestrial actinomycete. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 7, n. 5, p. 895-899, 1999.

PIMENTEL-ELARDO S. M. et al. Anti-Parasitic Compounds from *Streptomyces* sp. Strains Isolated from Mediterranean Sponges. *Marine Drugs*, v. 8, p. 373-380, 2010.

PRICE-WHELAN, A.; DIETRICH, L. E. P.; NEWMAN, D. K. Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chemical Biology*, v. 2, n. 2, p. 71-78, 2006.

RACHEV, R. et al. A new antibiotic, TH818, and its properties. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 37, p. 21-26, 2003.

RISTOW, H.; SALNIKOW, J.; KLEINKAUF, H. Biosynthesis of Valinomycin. *FEBS Letters*, v. 42, n. 2, p. 127-130, 1974.

ROEPSTORFF, P.; FOLHLMAN, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*, v. 11, n. 11, p. 601, 1984.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Primeira Edição, Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. 325 p.

ROGERS, T. O.; BIRNBAUM, J. Biosynthesis of fosfomycin by *Streptomyces fradiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 5, n. 2, p. 121-132, 1974.

ROMERO, F. et al. Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine Micromonospora. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *The Journal of Antibiotics*, v. 50, n. 9, p. 734-737, 1997.

ROSA, J. C. Influência das condições de transferência de oxigênio na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. 2002. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

ROSS, P.; JOHNSTON, A. J.; JUDD, A. K. Immobilized Valinomycin molecule for K<sup>+</sup> sensor. United States Patent, patent number: 4,973,394, 1990.

SANKARAN, L.; POGELL, B. M. Biosynthesis of Puromycin in *Streptomyces alboniger*: regulation and properties of O-demethylpuromycin O-methyltransferase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 8, n. 6, p. 721-732, 1975.

SASAKI, T. et al. Cedarmycins A and B, new antimicrobial antibiotics from *Streptomyces* sp. TP-A0456. *The Journal of Antibiotics*, v. 54, n. 7, p. 567-572, 2001.

SASAKI, T. et al. Watasemycins A and B, new antibiotics produced by *Streptomyces* sp. TP-A0597. *The Journal of Antibiotics*, v. 55, n. 3, p. 249-255, 2002.

SEKISUI CHEM. IND. CO. LTD. Preparation for treatment of allergic inflammation – comprises extracting substances from cultures of actinomycetes e. g. *Streptomyces carpaticus* using organic solvent. JP 05279262-A, 1993.

SHIOMI, K. et al. A new antibiotic, antimycin A(9), produced by *Streptomyces* sp K01-0031. *Journal of Antibiotics*, v. 58, n. 1, p. 74-78, 2005.

62ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC. Ciências do Mar: herança para o futuro. Disponível em <<http://boletim.sbp.org.br/n10.php>>. Acesso em: 04/08/2010.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.

SHU, Y. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal Natural Products*, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SILVA, J. J. R. F.; SILVA, J. A. L. D-aminoácidos em biologia – mais do que se julga. *Química Nova*, v. 32, n. 2, p. 554-561, 2009.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SOUZA, G. D. DE. Toxinas produzidas por fungos dos gêneros *Fusarium* e *Alternaria*: Aspectos analíticos e químico-ecológicos. 2009. 253 p. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

SOUZA, M. V. N. de. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. *Química Nova*, v. 27, n. 2, p. 308-312, 2004.

SNYDER, L. R.; KIRK, J. J.; GLAJCH, J. L. Non-ionic samples: reversed-and normal-phase HPLC. In: *Practical HPLC method development*. New York: John Wiley and Sons, 1997. p. 233-291.

TABER, W. A.; VINING, L. C. Amidomycin, a new antibiotic from a *Streptomyces* species; production, isolation, assay, and biological properties. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 3, n. 7, p. 953-965, 1957.

TAKASHIMA, Y. et al. Production of daunorubicin by immobilized growing *Streptomyces peucetius* cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 2, p. 106-109, 1987.

TRAUGER, S. A.; WEBB, W.; SIUZDAK, G. Peptide and protein analysis with mass spectrometry. *Spectroscopy*, v. 16, p. 15-28, 2002.

TRISCHMAN, J. A. et al. Salinamides A and B: anti-inflammatory depsipeptides from a marine streptomycete. *Journal of the American Chemical Society*, v. 116, n. 2, p. 757-758, 1994.

VANDERLINDE, R. J.; YEGIAN, D. Streptomycin-dependent bacteria in the identification of Streptomycin-producing microorganisms. *Journal of Bacteriology*, v. 56, n.3, p. 357-361, 1948.

VINING, L. C.; TABER, W. A. Amidomycin, a new antibiotic from a *Streptomyces* species, chemical structure. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 35, p. 1109-1116, 1957.

VOGEL, A. J. Análises de química orgânica qualitativa. São Paulo, EPU, p. 1020-1023, 1971.

WAKSMAN, S. A. Streptomycin: Background, isolation, properties and utilization. *Science*, v. 118, n. 3062, p. 259-266, 1953.

WEBER, J. M.; WIERMAN, C. K.; HUTCHINSON, C. R. Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythreus*. *Journal of Bacteriology*, v. 164, n. 1, p. 425-433, 1985.

WIJESEKARA, I.; KIM, S. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: prospects in the Pharmaceutical industry. *Marine Drugs*, v. 8, p. 1080-1093, 2010.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 88, n. 20, p. 4451-4459, 1984.

YOSHIMOTO, Y. et al. MK800-62F1, a new inhibitor of apoptotic cell death, from *Streptomyces diastatochromogenes* MK800-62F1. *The Journal of Antibiotics*, v. 53, n. 6, p. 569-574, 2000.

YOU-YOUNG, J. et al. Functional analysis of Spectinomycin biosynthetic genes from *Streptomyces spectabilis* ATCC 27741. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 13, n.6, p. 906-911, 2003.

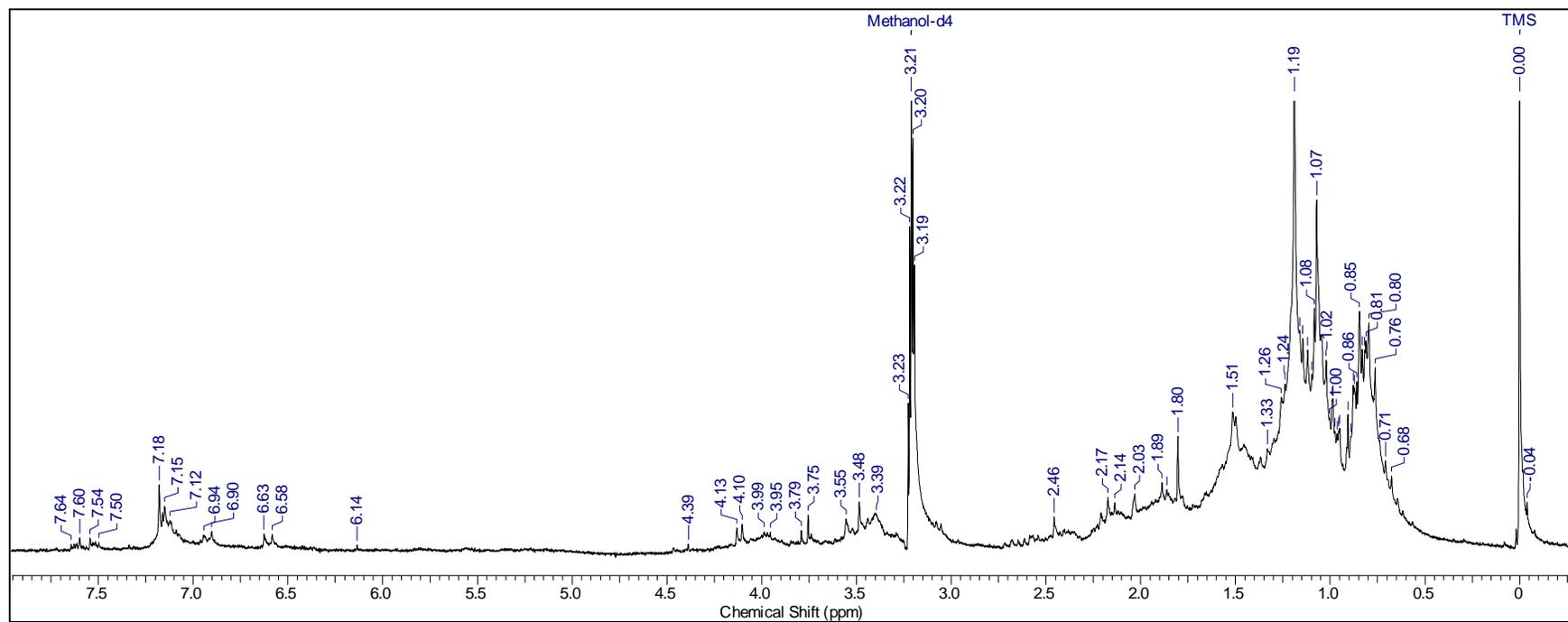
YOUNG, M. D.; KEMPE, L. L.; BADER, F. G. Effects of phosphate, glucose, and ammonium on cell growth and lincomycin production by *Streptomyces lincolnensis* in chemically defined media. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 27, n. 3, p. 327-333, 1985.

YOUNGWAN, S. et al. New polyene macrolide antibiotics from *Streptomyces* sp. M90025. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 10, n. 2, p. 176-180, 2000.

ZOTCHEV S. B. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines. *Journal of Biotechnology*. [Epub ahead of print]. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.06.002.

ZYGMUNT, W. A. Oxytetracycline formation by *Streptomyces rimosus* in chemically defined media. *Applied Microbiology*, v. 9, n. 6, p. 502-507, 1961.

## 8 APÊNDICE A

Figura 68. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , RMN 200 MHz) do extrato EBS2A.

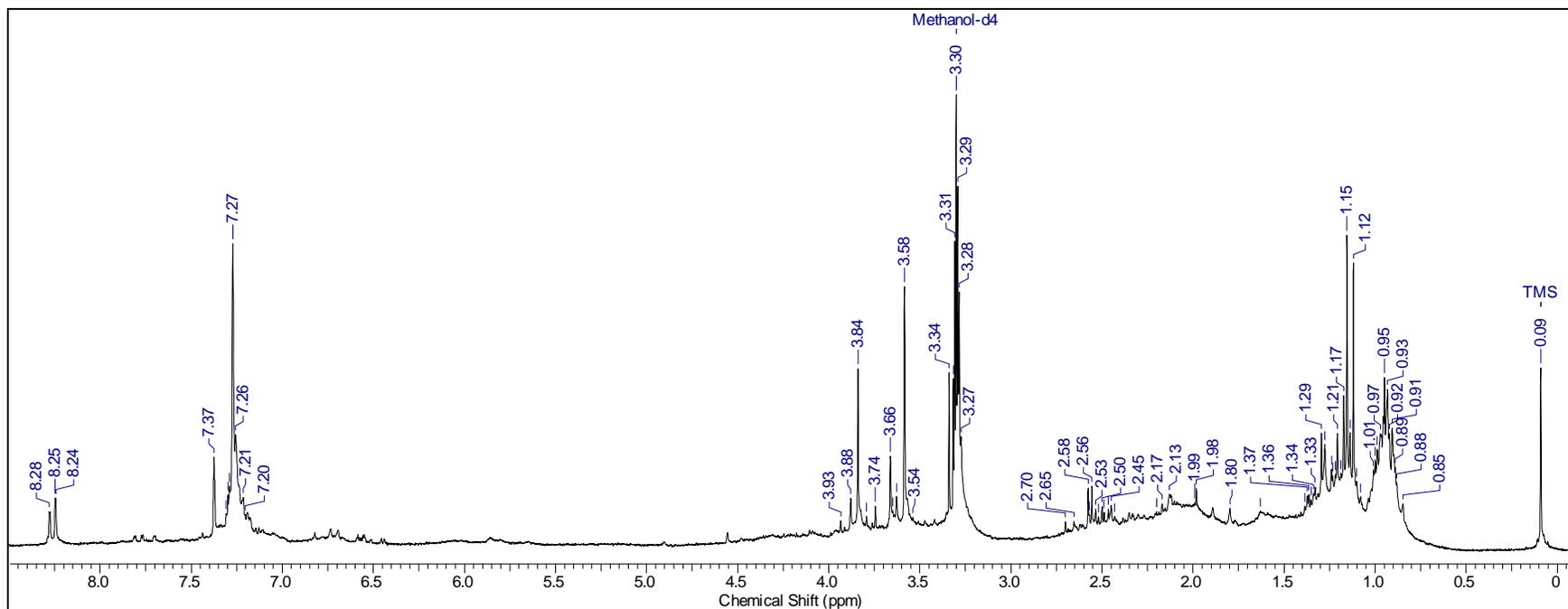


Figura 69. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , RMN 200 MHz) do extrato EBS2B.

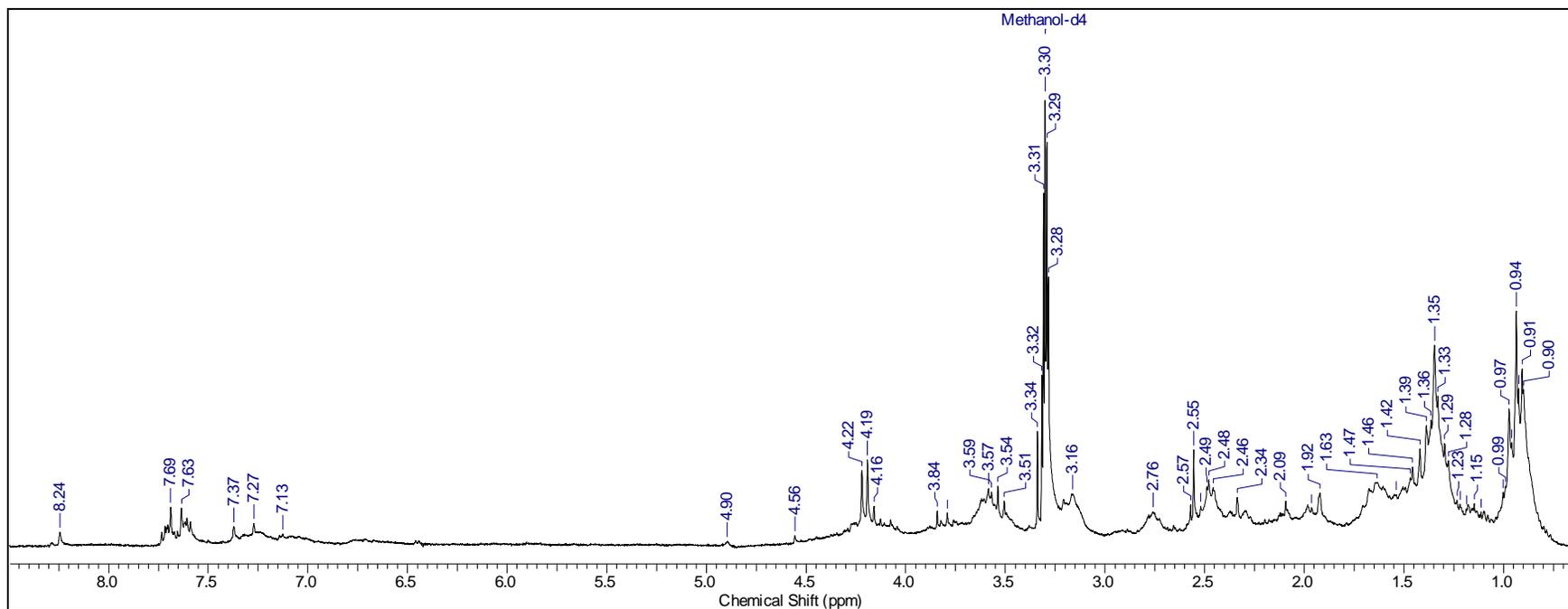


Figura 70. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , RMN 200 MHz) do extrato **EBS2C**.

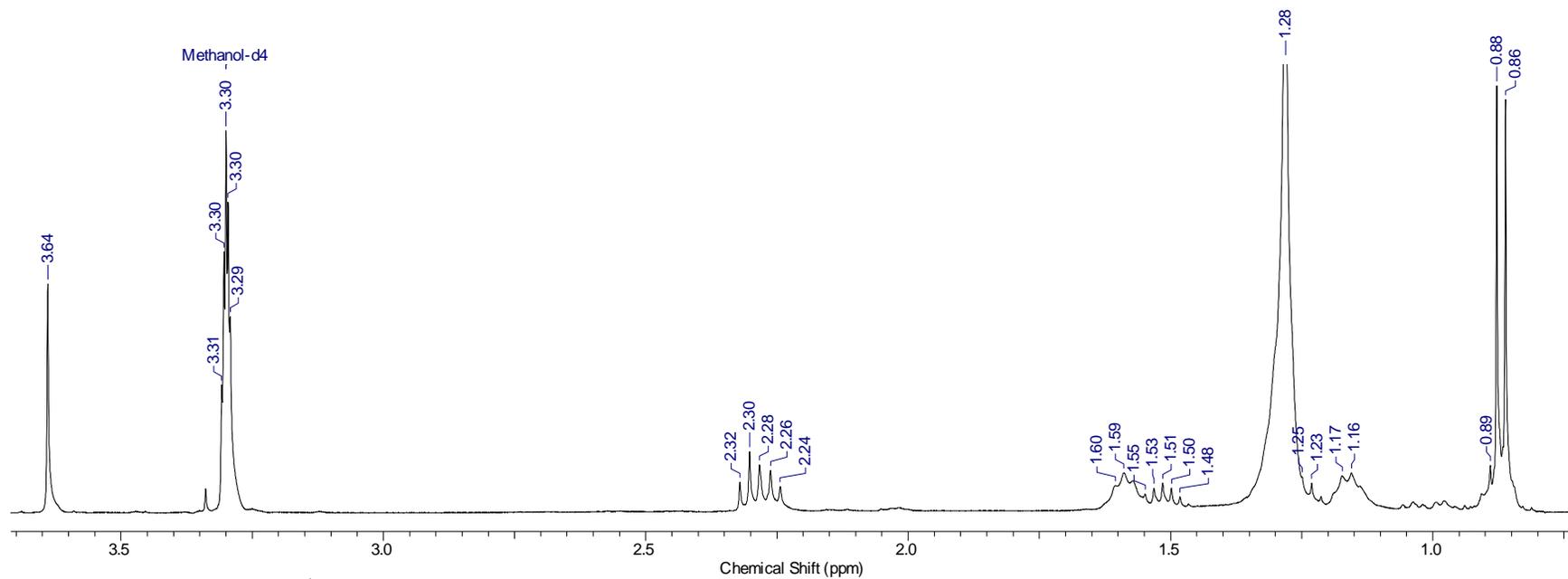


Figura 71. Espectros de RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, RMN 400 MHz) da fração **FPHS15**.

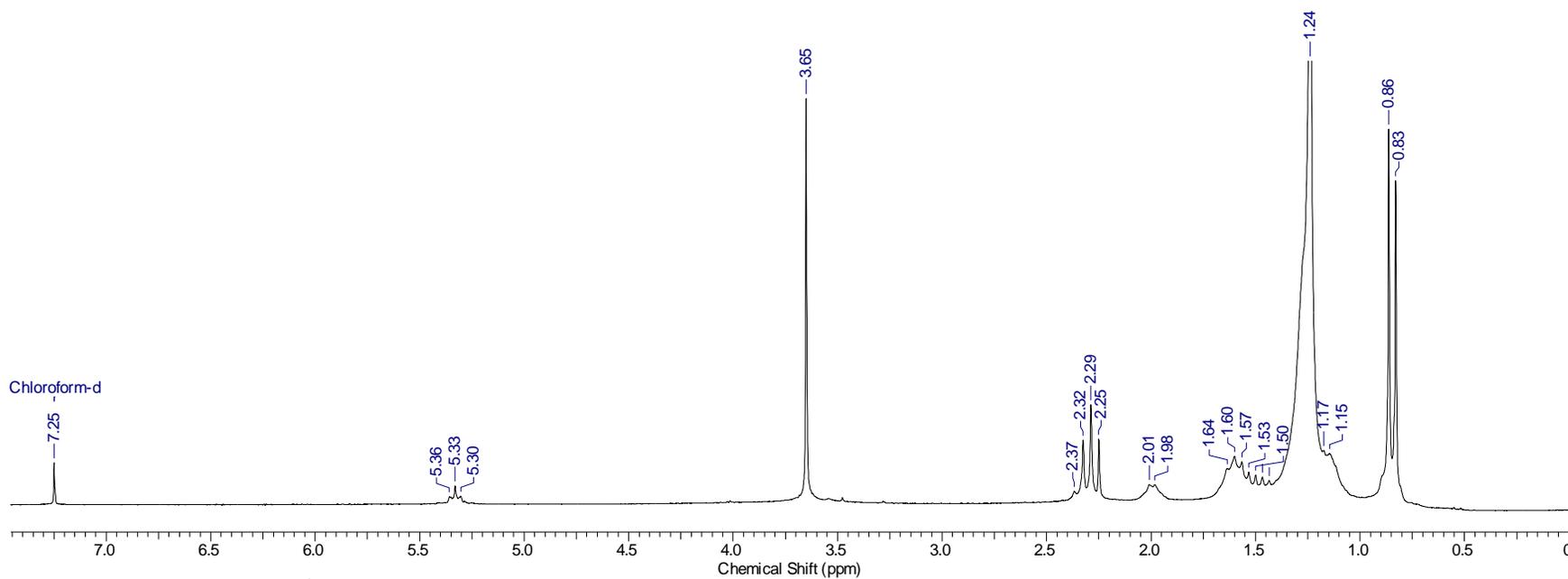


Figura 72. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , RMN 400 MHz) da fração **FPHS18**.

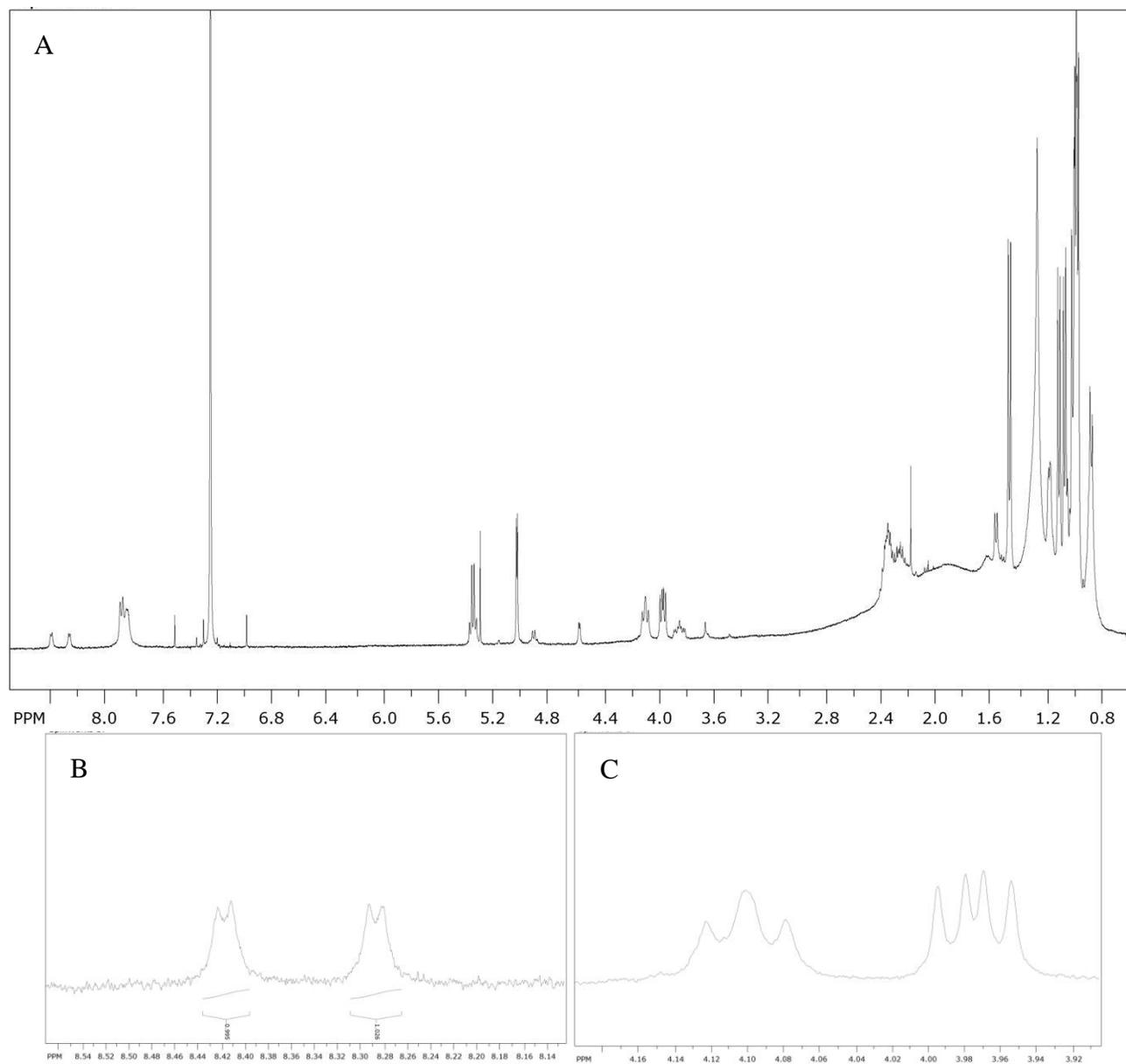


Figura 73. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , RMN 400 MHz) da fração S10 (A). B e C são ampliações de algumas regiões do espectro.

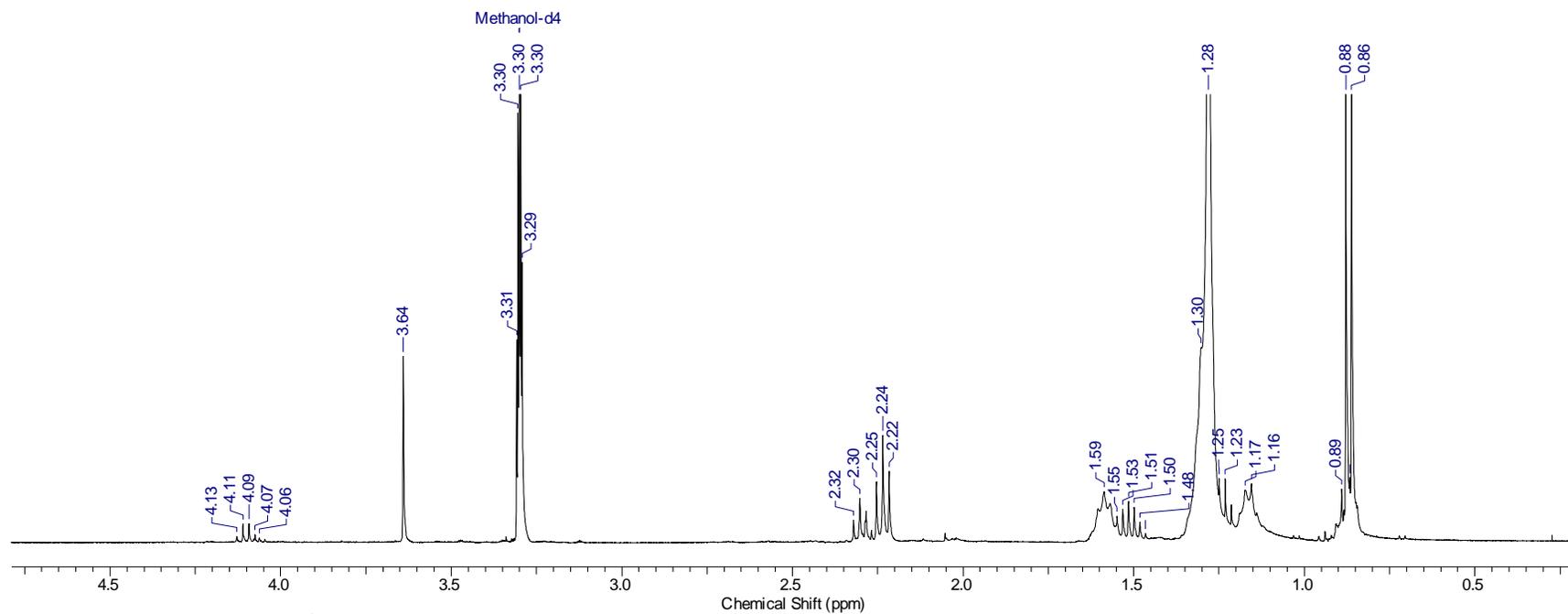


Figura 74. Espectros de RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, RMN 400 MHz) da fração **S12**.

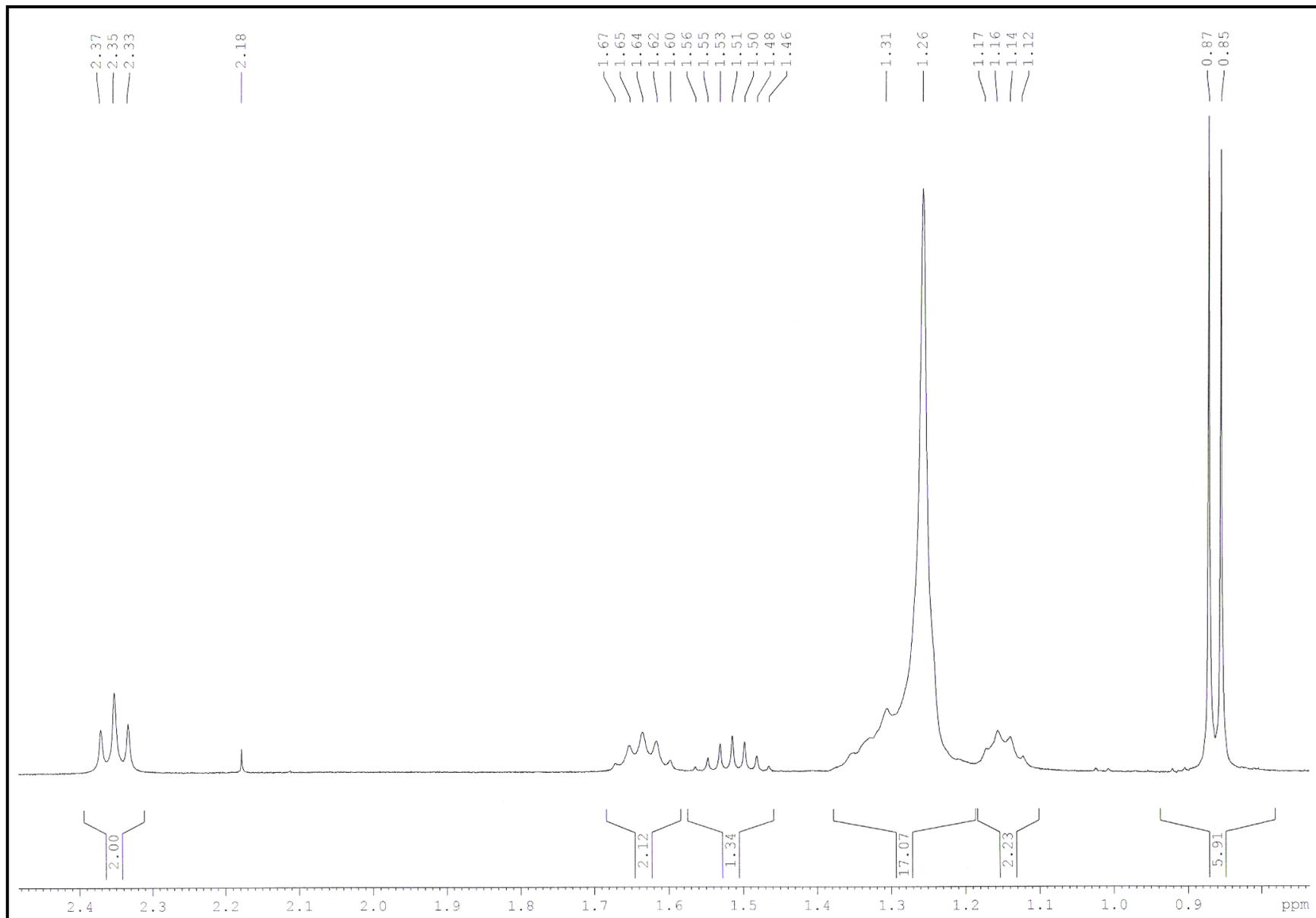


Figura 75. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , RMN 400 MHz) da substância D3F9.



Figura 76. Espectros de COSY (CDCl<sub>3</sub>, RMN 400 MHz) da substância D3F9.

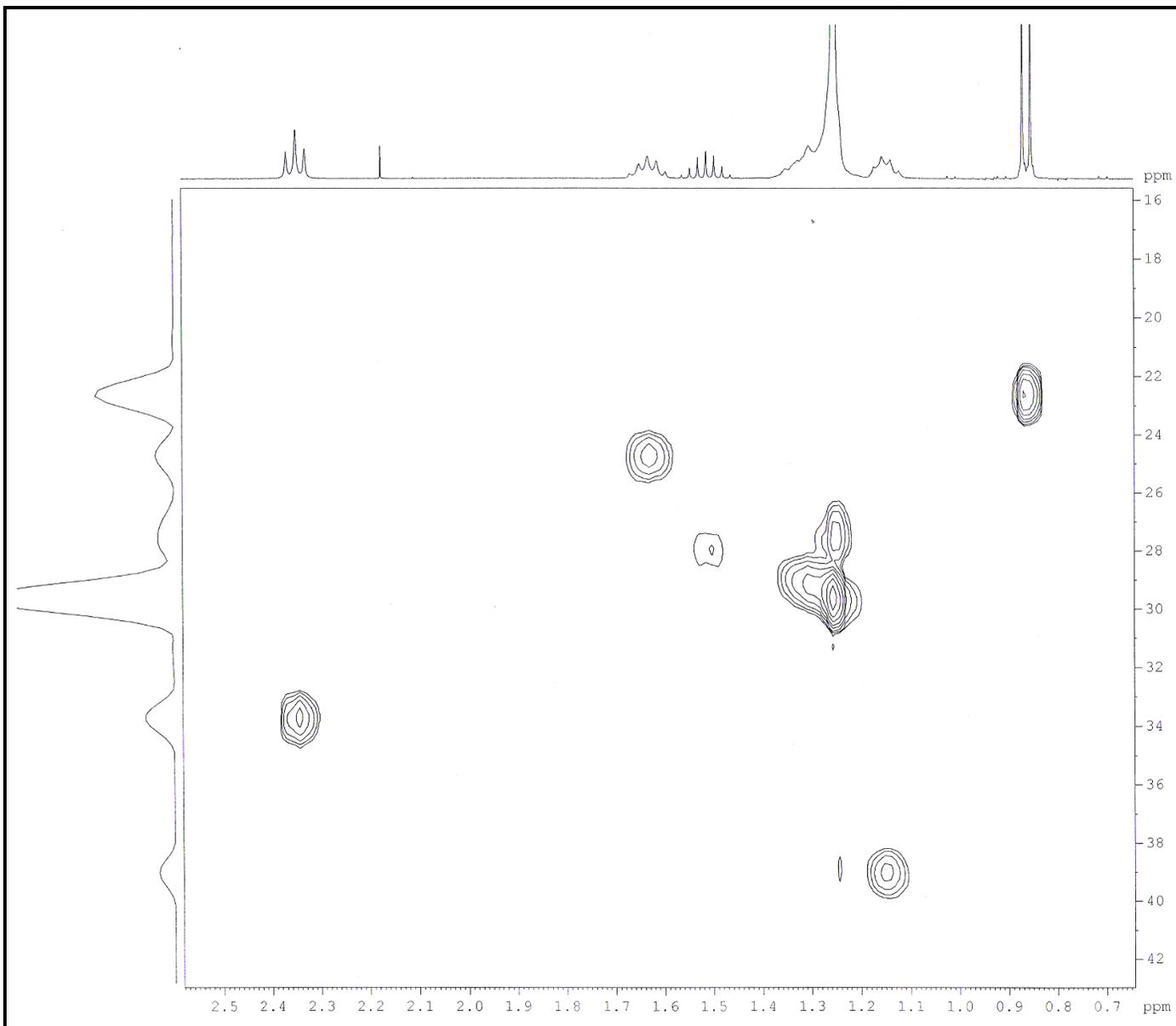


Figura 77. Mapas de contorno de HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , RMN 400 MHz) da substância D3F9.

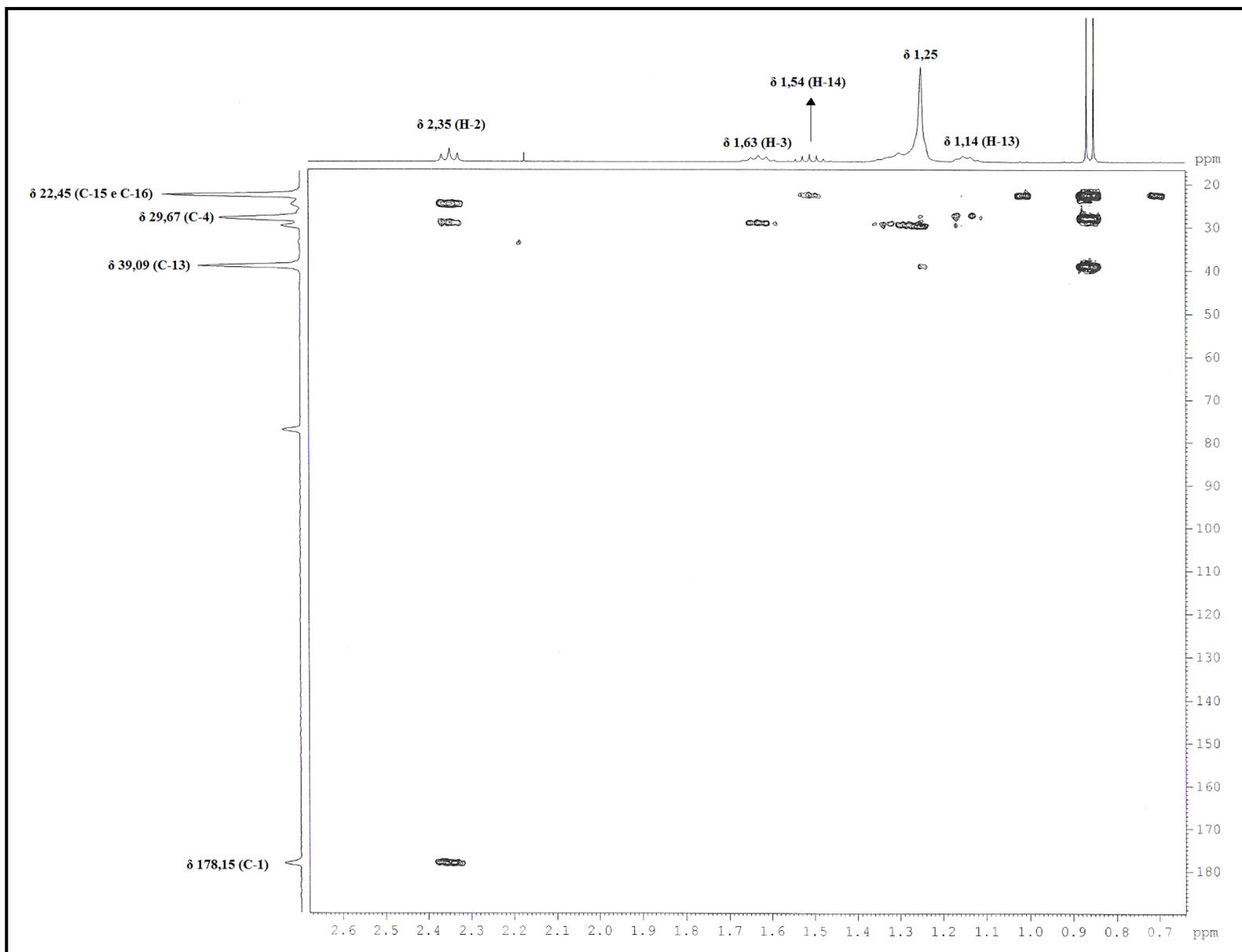


Figura 78. Mapas de contorno de HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , RMN 400 MHz) da substância D3F9.

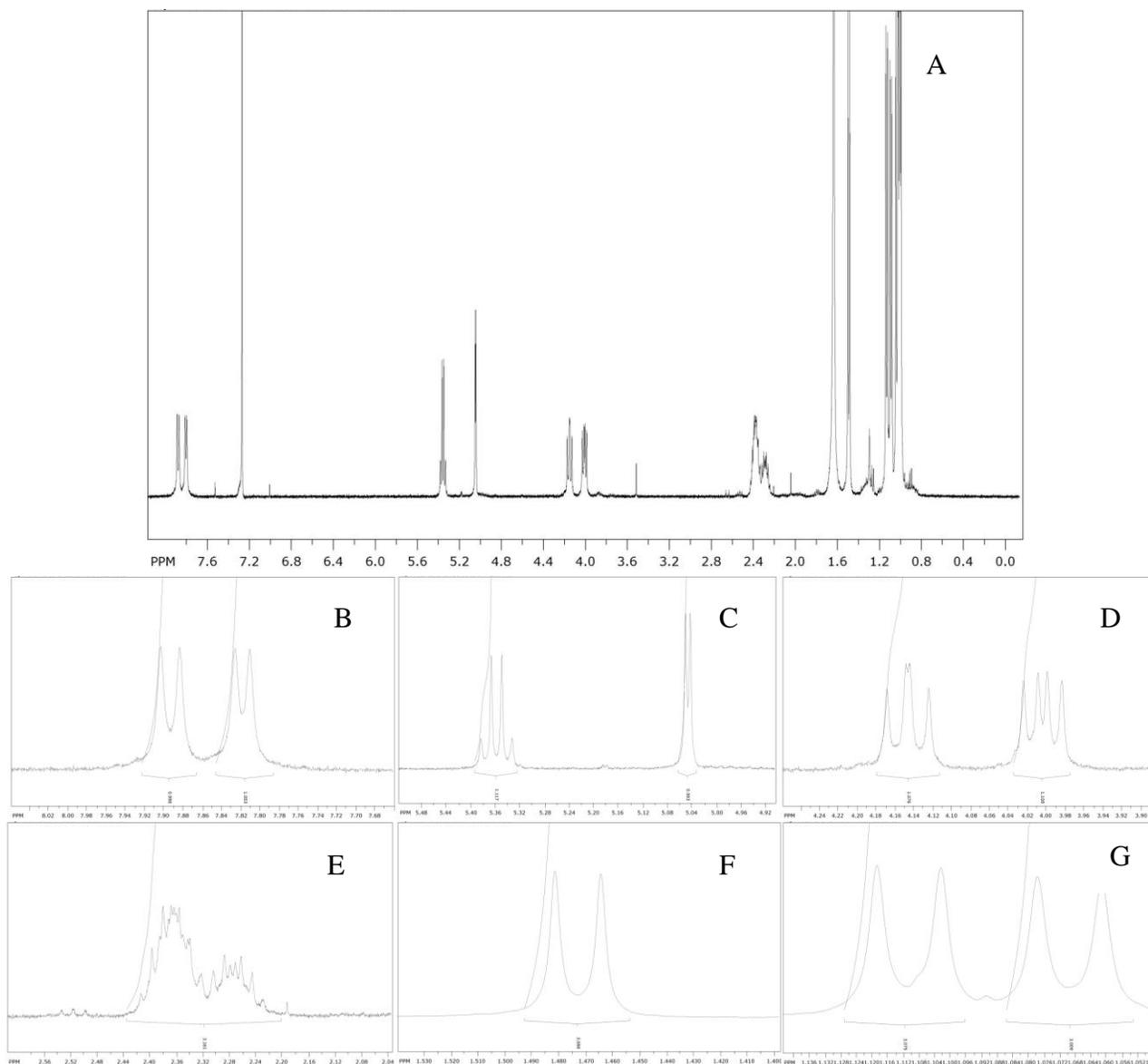


Figura 79. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , RMN 400 MHz) da banda selecionada na Figura 47 que foi coletada por injeção do padrão Valinomicina por CLAE-UV (210 nm) (A). B, C, D, E, F e G ampliações de algumas regiões do espectro.

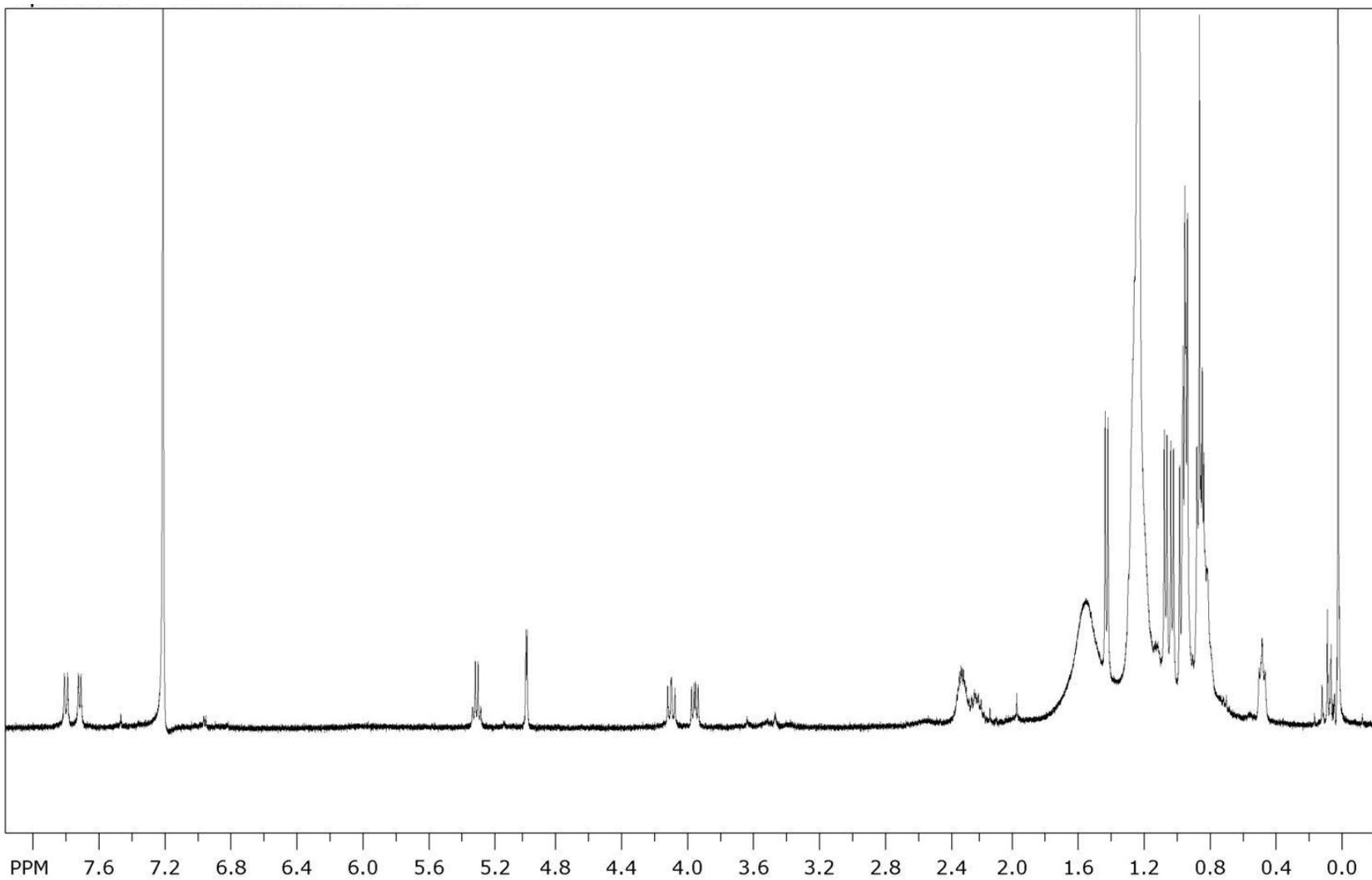


Figura 80. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , RMN 400 MHz) da fração PHex.

## 9 APÊNDICE B

Tabela 29. Valores das concentrações de açúcares obtidos no cultivo *S. carpaticus* em meio DSMZ 65.

Tempo (h)	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )		Maltose (g.L <sup>-1</sup> )		Frutose (g.L <sup>-1</sup> )		$C_{ART} = C_{Glu} + \frac{360}{342} \times C_{Mal} + C_{Fru}$			
	DSMZ 65 - 1	DSMZ 65 - 2	DSMZ 65 - 1	DSMZ 65 - 2	DSMZ 65 - 1	DSMZ 65 - 2	DSMZ 65 - 1	DSMZ 65 - 2	$\bar{X}$	$\sigma$
0	4,51	4,52	4,41	4,44	0,34	0,33	9,49	9,52	9,51	0,02
12	4,48	4,48	3,50	3,42	0,14	0,14	8,30	8,22	8,26	0,04
24	3,96	3,92	2,31	2,04	0,0	0,0	6,39	6,07	6,23	0,16
36	3,50	3,52	1,00	0,97	0,0	0,0	4,55	4,54	4,55	0,01
48	3,12	3,22	0,66	0,65	0,0	0,0	3,81	3,90	3,86	0,04
60	2,86	2,44	0,65	0,65	0,0	0,0	3,54	3,12	3,33	0,21
72	1,99	2,10	0,63	0,63	0,0	0,0	2,65	2,76	2,71	0,06

Tabela 30. Valores da concentração celular, pH e Valinomicina obtidos no cultivo *S. carpaticus* em meio DSMZ 65.

Tempo (h)	Massa Seca (g.L <sup>-1</sup> )				pH				Valinomicina (ng.mL <sup>-1</sup> )			
	DSMZ 65 - 1	DSMZ 65 - 2	$\bar{X}$	$\sigma$	DSMZ 65 - 1	DSMZ 65 - 2	$\bar{X}$	$\sigma$	DSMZ 65 - 1	DSMZ 65 - 2	$\bar{X}$	$\sigma$
0	1,96	2,11	2,03	0,07	6,45	6,46	6,46	0,00	151,66	198,59	175,13	23,47
12	2,55	2,39	2,47	0,08	7,05	7,00	7,03	0,02	334,83	204,47	269,65	65,18
24	3,04	3,64	3,34	0,30	6,66	6,55	6,61	0,06	417,24	385,13	401,19	16,05
36	2,93	3,03	2,98	0,05	6,28	6,29	6,29	0,00	346,79	276,02	311,41	35,39
48	2,68	2,18	2,43	0,25	6,56	6,57	6,57	0,01	402,74	453,71	428,23	25,48
60	2,26	2,14	2,20	0,06	6,89	6,84	6,87	0,02	379,91	335,44	357,68	22,23
72	2,52	2,46	2,49	0,03	6,69	6,78	6,74	0,04	438,00	381,94	409,97	28,03

Tabela 31. Valores das concentrações de açúcares obtidos no cultivo *S. carpaticus* em meio NBIMCC 185.

Tempo (h)	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )		Maltose (g.L <sup>-1</sup> )		Frutose (g.L <sup>-1</sup> )		$C_{ART} = C_{Glu} + \frac{360}{342} \times C_{Mal} + C_{Fru}$			
	NBIMCC 185 - 1	NBIMCC 185 - 2	NBIMCC 185 - 1	NBIMCC 185 - 2	NBIMCC 185 - 1	NBIMCC 185 - 2	NBIMCC 185 - 1	NBIMCC 185 - 2	$\bar{X}$	$\sigma$
0	9,34	9,27	VND	VND	VND	VND	9,34	9,27	9,31	0,04
12	9,05	9,02	VND	VND	VND	VND	9,05	9,02	9,04	0,02
24	8,31	8,11	VND	VND	VND	VND	8,31	8,11	8,21	0,10
36	7,00	6,84	VND	VND	VND	VND	7,00	6,84	6,92	0,08
48	6,35	6,49	VND	VND	VND	VND	6,35	6,49	6,42	0,07
60	5,05	4,27	VND	VND	VND	VND	5,05	4,27	4,66	0,39
72	4,42	4,24	VND	VND	VND	VND	4,42	4,24	4,33	0,09

VND – valores não detectados nas análises

Tabela 32. Valores da concentração celular, pH e Valinomicina obtidos no cultivo *S. carpaticus* em meio NBIMCC 185.

Tempo (h)	Massa Seca (g.L <sup>-1</sup> )				pH				Valinomicina (ng.mL <sup>-1</sup> )			
	NBIMCC 185 - 1	NBIMCC 185 - 2	$\bar{X}$	$\sigma$	NBIMCC 185 - 1	NBIMCC 185 - 2	$\bar{X}$	$\sigma$	NBIMCC 185 - 1	NBIMCC 185 - 2	$\bar{X}$	$\sigma$
0	1,17	1,28	1,23	0,05	7,05	7,08	7,07	0,02	324,83	273,3	299,07	25,77
12	2,96	2,76	2,86	0,10	7,92	7,92	7,92	0,00	286,61	301,74	294,18	7,56
24	3,21	3,19	3,20	0,01	8,05	8,09	8,07	0,02	628,46	762,14	695,30	66,84
36	4,05	4,00	4,03	0,03	7,91	7,96	7,94	0,02	1397,38	1129,7	1263,54	133,84
48	4,06	3,96	4,01	0,05	7,95	7,96	7,96	0,00	1145,37	1002,96	1074,17	71,20
60	4,12	3,76	3,94	0,18	7,81	7,8	7,81	0,00	1654,06	1532,82	1593,44	60,62
72	4,21	3,53	3,87	0,34	7,81	7,83	7,82	0,01	1267,25	1447,73	1357,49	90,24

Tabela 33. Valores das concentrações de açúcares obtidos no cultivo *S. carpaticus* em meio DSMZ 246.

Tempo (h)	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )		Maltose (g.L <sup>-1</sup> )		Frutose (g.L <sup>-1</sup> )	
	DSMZ 246 - 1	DSMZ 246 - 2	DSMZ 246 - 1	DSMZ 246 - 2	DSMZ 246 - 1	DSMZ 246 - 2
0	VND	VND	VND	VND	VND	VND
12	VND	VND	VND	VND	VND	VND
24	VND	VND	VND	VND	VND	VND
36	VND	VND	VND	VND	VND	VND
48	VND	VND	VND	VND	VND	VND
60	VND	VND	VND	VND	VND	VND
72	VND	VND	VND	VND	VND	VND

VND – valores não detectados nas análises

Tabela 34. Valores da concentração celular, pH e Valinomicina obtidos no cultivo *S. carpaticus* em meio DSMZ 246.

Tempo (h)	Massa Seca (g.L <sup>-1</sup> )				pH				Valinomicina (ng.mL <sup>-1</sup> )			
	DSMZ 246 - 1	DSMZ 246 - 2	$\bar{X}$	$\sigma$	DSMZ 246 - 1	DSMZ 246 - 2	$\bar{X}$	$\sigma$	DSMZ 246 - 1	DSMZ 246 - 2	$\bar{X}$	$\sigma$
0	2,17	2,87	2,52	0,35	7,45	7,48	7,47	0,02	75,57	66,86	71,22	4,35
12	4,96	4,73	4,85	0,11	8,09	8,04	8,07	0,03	50,25	28,71	39,48	10,77
24	5,97	6,43	6,20	0,23	8,37	8,35	8,36	0,01	17,71	19,42	18,57	0,85
36	5,64	5,05	5,34	0,30	8,48	8,56	8,52	0,04	9,71	11,92	10,82	1,10
48	7,11	6,45	6,78	0,33	8,55	8,61	8,58	0,03	7,42	8,45	7,94	0,52
60	2,34	2,76	2,55	0,21	8,73	8,74	8,74	0,00	4,16	5,05	4,61	0,44
72	1,90	2,04	1,97	0,07	8,86	8,89	8,88	0,02	3,31	2,58	2,95	0,36

Tabela 35. Valores das concentrações de açúcares obtidos no cultivo *S. carpaticus* em meio DSMZ 545.

Tempo (h)	Glicose (g.L <sup>-1</sup> )		Maltose (g.L <sup>-1</sup> )		Frutose (g.L <sup>-1</sup> )		$C_{ART} = C_{Glu} + \frac{360}{342} \times C_{Mal} + C_{Fru}$			
	DSMZ 545 - 1	DSMZ 545 - 2	DSMZ 545 - 1	DSMZ 545 - 2	DSMZ 545 - 1	DSMZ 545 - 2	DSMZ 545 - 1	DSMZ 545 - 2	$\bar{X}$	$\sigma$
	0	1,96	1,98	VND	VND	VND	VND	1,96	1,98	1,97
12	1,47	1,49	VND	VND	VND	VND	1,47	1,49	1,48	0,01
24	0,17	0,25	VND	VND	VND	VND	0,17	0,25	0,21	0,04
36	0,0	0,0	VND	VND	VND	VND	0,0	0,0	0,00	0,00
48	0,0	0,0	VND	VND	VND	VND	0,0	0,0	0,00	0,00
60	0,0	0,0	VND	VND	VND	VND	0,0	0,0	0,00	0,00
72	0,0	0,0	VND	VND	VND	VND	0,0	0,0	0,00	0,00

VND – valores não detectados nas análises

Tabela 36. Valores da concentração celular, pH e Valinomicina obtidos no cultivo *S. carpaticus* em meio DSMZ 545.

Tempo (h)	Massa Seca (g.L <sup>-1</sup> )				pH				Valinomicina (ng.mL <sup>-1</sup> )			
	DSMZ 545 - 1	DSMZ 545 - 2	$\bar{X}$	$\sigma$	DSMZ 545 - 1	DSMZ 545 - 2	$\bar{X}$	$\sigma$	DSMZ 545 - 1	DSMZ 545 - 2	$\bar{X}$	$\sigma$
0	3,54	3,06	3,30	0,24	7,37	7,36	7,37	0,00	51,01	44,42	47,72	3,29
12	7,82	7,92	7,87	0,05	8,00	8,08	8,04	0,04	85,84	85,63	85,74	0,11
24	9,64	9,81	9,72	0,08	8,31	8,36	8,34	0,02	67,58	78,46	73,02	5,44
36	8,83	9,39	9,11	0,28	8,50	8,52	8,51	0,01	54,54	45,25	49,90	4,65
48	6,70	7,02	6,86	0,16	8,55	8,63	8,59	0,04	31,84	35,62	33,73	1,89
60	1,36	1,18	1,27	0,09	8,87	8,91	8,89	0,02	32,97	38,93	35,95	2,98
72	0,69	0,60	0,65	0,05	9,00	9,05	9,03	0,03	48,79	40,89	44,84	3,95

CLAE-DAD-EM cromatografia em fase líquida de alta eficiência detector de arranjo de diodo espectrômetro de massas