UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – REDE RENORBIO

SANDRINE MARIA DE ARRUDA LIMA

BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR *Streptomyces* spp. ISOLADOS DA REGIÃO AMAZÔNICA COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.

RECIFE
2017

SANDRINE MARIA DE ARRUDA LIMA

BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR *Streptomyces* spp. ISOLADOS DA REGIÃO AMAZÔNICA COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.

Tese apresentada ao Progama de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

RECIFE

2017

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Lima, Sandrine Maria de Arruda

Bioprospecção de compostos produzidos por *Streptomyces* spp. isolados da região amazônica com potencial biotecnológico. / Sandrine Maria de Arruda Lima - Recife: O Autor, 2017.

124 folhas: il., fig., tab.
Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Biotecnologia, 2017.
Inclui referências

1. *Streptomyces* 2. Testes de toxicidade 3. Câncer I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orient.) II. Título

579.378 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2017-391

SANDRINE MARIA DE ARRUDA LIMA

BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR *Streptomyces* spp. ISOLADOS DA REGIÃO AMAZÔNICA COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.

Tese apresentada ao Progama de Pós-Graduação em Biotecnologia – RENORBIO da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

COMISSÃO EXAMINADORA

TITULARES

_____
Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco

_____
Profa. Dra. Ana Maria Souto-Maior
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Prof. Dr. André Luiz de Souza Barros
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

SUPLENTES

_____
Profa. Dra. Andrea Lopes Bandeira Delmiro Santana
Universidade Federal de Pernambuco

_____
Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes
Universidade Federal de Pernambuco

Recife, 18 de janeiro de 2017.

Dedico esta conquista a minha mãe, que iluminou o caminho da minha vida, e ao meu filho, William Catanho de Arruda, a quem eu espero poder fazer o mesmo. Compartilho com vocês mais esta vitória que Deus me concede e sou muito grata por vocês existirem em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por estar sempre presente na minha vida, por me amparar, me dar forças e coragem nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, **Adjair Severino de Lima** e **Sônia Maria de Arruda Lima**, pelo amor, apoio, investimentos e por tudo que sempre fizeram por mim em todos os momentos da minha vida.

Ao meu marido, **Wallace Catanho de Barros**, e meu filho, **William Catanho de Arruda**, pelo amor, dedicação, companheirismo, compreensão e, principalmente, por todos os momentos de alegria, tornando esses anos mais leves.

A minha orientadora, Profa. Dra. **Teresinha Gonçalves da Silva**, com admiração, carinho e respeito, por todas as oportunidades oferecidas desde o período da minha graduação, pela confiança, paciência, incentivo e ensinamentos que contribuíram muito para minha formação pessoal e profissional.

As Profas. Dras. **Gláucia Manoella de Souza Lima** e **Janete Magali de Araújo**, por terem aberto as portas do seu laboratório para mim, pela amizade, conversas, ensinamentos, incentivo, paciência e sugestões de melhoria no meu trabalho.

A Profa. Dra. **Renata Mendonça Araújo** que juntamente como o Prof. Dr. **Raimundo Braz Filho** conseguiram identificar minha molécula.

A Profa. Dra. **Karina Perrelli Randau**, pela atenção dada e ajuda na prospecção química dos meus extratos.

Aos amigos do **Laboratório de Prospecção Farmacotoxicológica de Produtos Bioativos (BIOFARMATOX)** pela ajuda direta e indireta nos experimentos, pelos momentos de alegria e descontração, em especial aos meus amigos **Cynthia Almeida**, **Jeyce Andrade**, **Karla Marques**, **Maria Rodrigues**, **Natalie Ribeiro** e **Temístocles Santana** com quem eu sempre pude contar.

A **Universidade Federal de Pernambuco**, em especial a todos que fazem parte do **Departamento de Antibióticos**, por ter me acolhido durante esses dez anos de vida acadêmica.

Ao **Laboratório de Microscopia e Microanálise do CETENE** pela realização da análise no microscópio eletrônico de varredura.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela concessão da bolsa.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, seja com uma palavra de incentivo, um sorriso ou pelo simples fato de acreditarem que eu seria capaz.

Muito obrigada!

Sandrine Maria de Arruda Lima

RESUMO

Os micro-organismos, em particular bactérias do gênero *Streptomyces*, são conhecidos por produzir um vasto número de metabólitos secundários bioativos de interesse farmacêutico. O objetivo deste estudo foi investigar as atividades antioxidante, antimicrobiana e anticâncer de metabólitos bioativos produzidos por *Streptomyces* spp., bem como sua toxicidade. A identificação taxonômica das linhagens foi realizada utilizando as técnicas de caracterização fenotípica e molecular. A produção dos metabólitos bioativos foi avaliada através de fermentação submersa e semi-sólida. Paralelamente, a atividade antioxidante foi analisada por meio dos ensaios DPPH, ABTS e fosfomolibdênio e a atividade antimicrobiana investigada pela concentração mínima inibitória. Os testes de atividade anticâncer foram realizados através do ensaio antiproliferativo do MTT, seguido dos testes de mecanismos de ação por citometria de fluxo para analisar a capacidade do composto em despolarizar a membrana mitocondrial, promover parada de ciclo celular e causar fragmentação no DNA. Para determinar a DL_{50} (dose letal mediana responsável por matar 50% de uma população em teste) foi realizada uma toxidade aguda *in vivo* utilizando camundongos albinos Swiss. *Streptomyce*s sp UFPEDA 3370 foi identificado como *S. hygroscopicus*. Os extratos apresentaram baixa atividade antioxidante, sendo o extrato metanólico da fermentação submersa o melhor para atividade antimicrobiana e citotóxica comparado aos demais. A elaiofilina foi isolada a partir desse extrato, sendo identificada por métodos espectroscópicos, apresentando menor concentração mínima inibitória frente *Enterococcus faecalis*. Na atividade anticâncer, a elaiofilina apresentou potencial inibitório em todas as linhagens neoplásicas testadas, com melhor atividade frente às células leucêmicas. Os testes por citometria de fluxo revelaram que a substância causa despolarização mitocondrial, parada de ciclo na fase G1 e fragmentação do DNA, o que indica uma provável atuação na via apoptótica de morte celular. A toxidade aguda revelou que a fração EB1, rica em elaiofilina, apresenta DL_{50} de 1000 mg/kg. Estes resultados demonstram que a substância em estudo tem potencial antimicrobiano e antiproliferativo, tornando-se um candidato para estudos clínicos.

Palavras chave: Elaiofilina. Citotoxicidade. Mecanismo de ação.

ABSTRACT

Microorganisms, particularly bacteria of the *Streptomyces* genus, are known for producing several active secondary metabolites of pharmaceutical interest. The main goal of this study was to evaluate the antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of the bioactive secondary metabolites produced by *Streptomyces* spp., and their toxicity. The taxonomic identification of the strains lineages was accessed by utilizing techniques of molecular and phenotypic characterization. The production of the bioactive metabolites was evaluated through submerged and semi-solid fermentation. In parallel, the antioxidant activity was analyzed through DPPH, ABTS and phosphomolybdenum and the antimicrobial activity was investigated using the microdilution method. The anticancer activity test was accessed by the MTT test followed by mechanisms of action tests using a flow cytometer, which could analyze the ability of the compound to depolarize the mitochondrial membrane, promote cell cycle arrest, and cause DNA fragmentation. To determine the LD 50 (median lethal dose responsible for killing 50% of a population under test) an acute toxicity was performed *in vivo* using Swiss albino mice. Ours results shows that *Streptomyce*s sp UFPEDA 3370 was identified as *S. hygroscopicus*. The extracts present low antioxidant activity, being the methanolic extract of the fermentation in submerged culture the best for antimicrobial and cytotoxic activity compared to the others. The elaiophyline isolated starting from this extract, identified by spectroscopic methods, showed the smallest minimum inhibitory concentration against *Enterococcus faecalis*. In the anticancer activity, elaiophiline showed inhibitory potential in all tested cancer cell lines, with the best results against leukemic cells. The flow cytometer tests showed that the substance causes D mitochondrial depolarization, cycle stop in G1 phase and DNA fragmentation, which indicates that the compound might act through apoptosis. The acute toxicity test revealed that an EB1 fraction, rich in elaiophylin, had a LD_{50} of 1000 mg/kg. These results demonstrate that our substance has antimicrobial and antiproliferative properties, which makes it a promissory candidate for clinical studies.

Keywords: Elaiophyline. Cytotoxicity. Mechanism of action.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos fármacos produzidos por micro-organismos: cefalosporinas, ciclosporina, rapamicina, estatinas. 20

Figura 2. Ciclo de vida de *Streptomyces* spp. 22

Figura 3. Data de descoberta dos principais antibióticos. Destaque para o gênero *Streptomyces*. 24

Figura 4. Características das células tumorais. 29

Figura 5. Ciclo celular. 30

Figura 6. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma. 31

Figura 7. Evolução de fármacos quimioterapêuticos. 32

Figura 8. Características moleculares da autofagia, necrose e apoptose 34

Figura 9. Vias de ativação da apoptose. 35

Figura 10. Modelo de regulação Ulk1 por AMPK e mTORC1 em resposta a sinais de glicose. 38

Figura 11. Via de sinalização da necroptose. 39

Figura 12. Fluxograma para obtenção do extrato metanólico da biomassa (EMeOH-B 3370) de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3370 em fermentação submersa, composto isolado, partição líquido-líquido com 2-butanol (FBuOH) e frações da fase butanólica (EB1, EB2A, EB2B e EB3M). 46

Figura 13. Fluxograma para obtenção das fases do extrato metanólico (EMeOH-3405) do fermentado de *Streptomyces* sp.UFPEDA 3405. FHex: Fase hexânica; FAcOEt: Fase acetoetílica; FBuOH: Fase butanólica; FH_2O I: Fase aquosa I; FH_2O II: Fase aquosa II; FH_2O III: Fase aquosa III. 48

Figura 14. Micromorfologia de *Streptomyces hygroscopicus* UFPEDA 3370 visualizada no microscópio eletrônico de varredura no aumento de 1.600 x (a), 50.000 x (b) e 100.000 x (c) após o crescimento em lamínula inclinada inserida no meio ISP-2 por 21 dias a 30 °C. (b) indica a cadeia de esporos e (c) a superfície da cadeia de esporos. 57

Figura 15. Árvore filogenética baseada em uma seqüência parcial do 16S DNAr, mostrando as relações entre *Streptomyces* sp. UFPEDA 3370 e outras espécies de *Streptomyces*. Divergência da seqüência de barras de 0,2%. 57

Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura dos esporos de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405, *Streptomyces* sp. UFPEDA 3412 e *Streptomyces* sp. UFPEDA 3413, visualizadas no aumento de 20.000 x. 58

Figura 17. Estrutura molecular da elaiofilina. 64

Figura 18. Espectro de ^{1}H NMR da elaiofilina em DMSO-d_6, 500 MHz. 66

Figura 19. Espectro de ^{13}C-CPD-NMR da elaiofilina em DMSO-d_6, 125 MHz. 67

Figura 20. Espectro de COSY da elaiofilina em DMSO-d_6. 68

Figura 21. Espectro de HSQC da elaiofilina em DMSO-d_6. 69

Figura 22. Espectro de HMBC da elaiofilina em DMSO-d_6. 70

Figura 23. Espectro MALDI e proposição de mecanismos para fragmentação da elaiofilina. Apenas os picos classificados como principais são mostrados. 71

Figura 24. Espectro de FT-IR da elaiofilina. 72

Figura 25. Análise morfológica das células K-562 pela coloração May-Grunwald-Giemsa após 24 h de incubação com elaiofilina. 99

Figura 26. Análise morfológica das células MOLT-4 pela coloração May-Grunwald-Giemsa após 24 h de incubação com elaiofilina. 99

Figura 27. Análise morfológica pela coloração May-Grunwald-Giemsa após 24 h de incubação com a partição FBuOH. 100

Figura 28. Despolarização mitocondrial determinada pela retenção do corante rodamina 123. 102

Figura 29. Citometria de fluxo do ciclo celular. 102

Figura 23. Citometria de fluxo da fragmentação do DNA. 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos antitumorais produzidos por *Streptomyces*. 26

Tabela 2. Micro-organismos testes utilizados na atividade antimicrobiana. 50

Tabela 3. Características culturais de *Streptomyces* spp. em diferentes meios ISP. 59

Tabela 4. Características bioquímicas, fisiológicas e resistência aos antibióticos de *Streptomyces* spp. 61

Tabela 5. RMN 1D e 2D (DMSO-d_6) atribuições de dados para elaiofilina. 65

Tabela 6. Prospecção química por cromatografia em camada delgada dos metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces hygroscopicus* UFPEDA 3370. 73

Tabela 7. Prospecção química por cromatografia em camada delgada dos metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces* spp. 74

Tabela 8. Teor de fenólicos totais dos extratos e fases de *Streptomyces* spp. 75

Tabela 9. Atividade antioxidante dos metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces* spp. 78

Tabela 10. Atividade antimicrobiana dos extratos obtidos a partir da fermentação em cultivo submerso e em meio sólido de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 em µg/mL. 80

Tabela 11. Atividade antimicrobiana das fases obtidas a partir do extrato metanólico de biomassa, EMeOH 9H-B (µg/mL). 81

Tabela 12. Atividade antimicrobiana das fraçõesobtidas a partir da fase butanólica (µg/mL). 82

Tabela 13. Atividade antimicrobiana da elaiofilina isolada de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 em µg/mL. 83

Tabela 14. Atividade antimicrobiana dos extratos de *Streptomyces* spp. em mg/mL. 84

Tabela 15. Atividade antimicrobiana das fases do extrato metanólico de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405 em mg/mL. 85

Tabela 16. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos extratos e fases de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 em linhagens tumorais testados na concentração de 50 µg/mL pelo método do MTT após 72 h de incubação. 88

Tabela 17. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dasfrações e elaiofilina de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 em linhagens tumorais testadas na concentração de 50 μg/mL pelo método do MTT após 72 h de incubação. 89

Tabela 18. Valores da concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}) e o intervalo de confiança (IC 95%) das fases em linhagens tumorais testadas pelo método do MTT após 72 h de incubação. 90

Tabela 19. Valores da concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}) e o intervalo de confiança (IC 95%) das frações e elaiofilina de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 em linhagens tumorais testadas pelo método do MTT após 72 h de incubação. 91

Tabela 20. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos extratos e fases *Streptomyces* spp., em linhagens tumorais na concentração de 50 μg/mL pelo método do MTT após 72 h de incubação. 92

Tabela 21. Valores da concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}) e o intervalo de confiança (IC 95%) dos extratos e fases de *Streptomyces* spp. em linhagens tumorais testadas pelo método do MTT após 72 h de incubação. 93

Tabela 22. Atividade hemolítica e citotóxica em células mononucleares do sangue periférico das frações e elaiofilina isolada de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370. 96

Tabela 23. Valores da concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}) e o intervalo de confiança (IC 95%) em K-562 e MOLT-4 da elaiofilina após 24 e 48 h de incubação. 98

Tabela 24. Valores da concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}) e o intervalo de confiança (IC 95%) em MOLT-4 da partição com butanol após 24 e 48 h de incubação. 100

Tabela 25. Consumo de água, ração, evolução ponderal e peso relativo dos órgãos de camundongos tratados com fração dos metabólitos secundários de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370. 106

Tabela 26. Efeito da fração EB1 do extrato metanólico da biomassa de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 sobre os parâmetros hematológicos de camundongos na toxicidade oral aguda. 107

Tabela 27. Consumo de água, ração, evolução ponderal e peso relativo dos órgãos de camundongos tratados com metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405. 108

Tabela 28. Efeito dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405 sobre os parâmetros hematológicos de camundongos na toxicidade oral aguda. 109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	(2,2- azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AMPK	*Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase* / Proteína cinase ativada por monofosfato de adenina
ANOVA	Análise de variância
Apaf-1	*Apoptotic Protease Activating Factor*-1 / Fator apoptótico ativado por protease
BHI	Brain Heart Infusion
CAET	Capacidade Antioxidante Equivalente em Trolox
CI_{50}	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
CMI	Concentração Mínima Inibitória
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMF	Concentração Mínima Fungicida
DISC	*Death Inducing Signaling Complex* / Complexo de sinalização indutor de morte
DL_{50}	Dose letal mediana responsável por matar 50% de uma população em teste
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle´s Medium*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNAr	*DNA ribosomal*
dNTP	*Deoxynucleotide triphosphates*
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FADD	*FAS* - A*ssociated Death Domain* / Dominio de morte associado ao FAS
FDA	*Food and Drug Administration*
FT	Fenólicos Totais

IAPs	Inibidores de apoptose
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISP	*International Streptomyces Project*
mg EAG/g	Miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato
MH	*Mueller Hinton*
MRSA	*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
PBMC	*Peripheral Blood Mononuclear Cells* / Células mononucleares do sangue periférico
PBS	*Phosphate Buffer Solution* / Solução tampão fosfato
PCR	*Polymerase Chain Reaction* / Reação em cadeia da polimerase
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio
mTOR	*Mechanistic Target of Rapamycin* / Alvo do mecanismo da rapamicina
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
SAB	*Sabouraud*
TBE	Tris/Borato/EDTA
TNF	*Tumor Necrosis Fator* / Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19

2.1. PRODUTOS NATURAIS 19

2.2. *Streptomyces* 21

2.2.1. Metabólitos Secundários Produzidos por *Streptomyces* 23

2.3. CÂNCER 28

2.3.1. Epidemiologia do Câncer 30

2.3.2. Tratamento 31

2.3.3. Vias de Morte 33

3. OBJETIVOS 41

3.1. OBJETIVO GERAL 41

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 41

4. METODOLOGIA 42

4.1. ISOLAMENTO DE *Streptomyces* spp. 42

4.2. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGUENS 42

4.2.1. Caracterização Cultural, Micromorfológica, Bioquímica, Fisiológica e Resistência aos Antibióticos 42

4.2.2. Caracterização Molecular do Gene 16S do DNAr 44

4.3. FERMENTAÇÃO, EXTRAÇÃO, PARTIÇÃO E FRACIONAMEENTO DOS METABÓLITOS BIOATIVOS 45

4.3.1. Fermentação Submersa 45

4.3.2. Fermentação Semi-Sólida 47

4.4. PROSPECÇÃO QUÍMICA E TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS 48

4.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 49

4.5.1. Método DPPH 49

4.5.2. Método ABTS 49

4.5.3. Método Fosfomolibdênio 49

4.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 50

4.6.1. Micro-organismos 50

4.6.2. Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida e Fungicida (CMB e CMF) 51

4.7. ATIVIDADE CITOTÓXICA 51

4.7.1. Células Tumorais 51

4.7.2. Células Mononucleares de Sangue Periférico Humano (PBMCs) 52

4.8. ATIVIDADE HEMOLÍTICA 52

4.9. ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO EM CÉLULAS LEUCÊMICAS 53

4.9.1. Análise Morfológica – Coloração por May-Grunwald-Giemsa 53

4.9.2. Análise por Citometria de Fluxo 53

4.10. TOXICIDADE AGUDA 54

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA 54

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES 56

5.1. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS 56

5.2. FERMENTAÇÃO, EXTRAÇÃO, PARTIÇÃO E FRACIONAMENTO DOS METABÓLITOS BIOATIVOS 62

5.3. OBTENÇÃO E ELUCIDAÇÃO DO COMPOSTO 64

5.4. PROSPECÇÃO QUÍMICA E TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS 72

5.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 76

5.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA 79

5.7. ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS TUMORAIS 87

5.8. ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO HUMANO (PBMCs) 95

5.9. ATIVIDADE HEMOLÍTICA 96

5.10. ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO 97

5.11. TOXICIDADE AGUDA 104

6. CONCLUSÃO..... 110

REFERÊNCIAS 111

1. INTRODUÇÃO

O câncer é considerado um grande problema de saúde pública. No Brasil, a estimativa da incidência de câncer para o ano de 2016 é de aproximadamente 596 mil casos (INCA, 2016). O tratamento padrão para essa doença baseia-se na cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A cirurgia juntamente com a radioterapia promovem a erradicação do tumor primário, mas um problema frequentemente encontrado é o reaparecimento da doença devido a células tumorais residuais e/ou metástases. Diante desse problema, associasse essas estratégias terapêuticas com a quimioterapia (WAYTECK et al., 2013).

Os agentes farmacológicos utilizados no tratamento do câncer incluem uma grande variedade de compostos que atuam de várias formas, interferindo nos mecanismos de sobrevivência da célula. O desenvolvimento de agentes anticâncer com acentuada seletividade para células tumorais é essencial, particularmente àqueles que podem vencer a resistência a terapias estabelecidas (SKRBO et al., 2015). Neste contexto, vale ressaltar a utilização de micro-organismos na pesquisa por novos agentes anticâncer. Bactérias do gênero *Streptomyces*, por exemplo, são precursores notáveis de produtos bioativos, onde a partir de seus metabólitos secundários, são produzidos mais de 85% dos antibióticos não-sintéticos (SAURAV; KANNABIRAN, 2012).

Além da atividade antibacteriana dos metabólitos de *Streptomyces*, são descritas na literatura, atividades antifúngica (WANG et al., 2015), antiviral (WEI et al., 2014), antioxidante (GAUTHAM; ONKARAPPA, 2013), antiparasitária (YAO et al., 2014) e anticancerígena (NOOMNUAL et al., 2015). São muitas as classes de compostos antitumorais produzidos por *Streptomyces*, algumas delas são utilizadas no tratamento quimioterápico como as antraciclinas, peptídeos não-ribossomal, indóis, policetídeos, mitomicinas e compostos alquilantes (NEWMAN; CRAGG, 2007; OLANO; MÉNDEZ; SALAS, 2009).

Dessa forma, o interesse da pesquisa em avaliar as atividades biológicas de compostos produzidos por *Streptomyces* spp. é justificado pelo potencial que o gênero apresenta em produzir metabólitos úteis na indústria farmacêutica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PRODUTOS NATURAIS

Ao longo dos séculos os seres humanos têm contado com a natureza para atender as suas necessidades básicas, utilizando-a inclusive como medicamentos para tratar um amplo espectro de doenças (CRAGG; NEWMAN, 2013). Os produtos naturais são substâncias derivadas de organismos vivos, com efeitos toxicológicos, terapêuticos, ou ainda sem efeito biológico conhecido. Diferentemente dos metabólitos primários, os produtos naturais ou metabólitos secundários, são produzidos em condições fisiológicas, sociais ou predatória específicas, estando relacionados a ecologia dos organismos produtores (CONTI; GUIMARÃES; PUPO, 2012).

Historicamente, os produtos naturais provenientes de plantas e animais foram praticamente a fonte de todos os medicamentos, principalmente dos agentes anticâncer e antimicrobiano (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Uma análise detalhada dos novos medicamentos aprovados para o tratamento do câncer pela FDA (*Food and Drug Administration*), entre 1940 e 2014, revelou que das 175 moléculas aprovadas, 131 (75%) são sintéticas, com 85 (49%) proveniente de produtos naturais ou derivado diretamente deles. Também existe o reconhecimento de um grande número de medicamentos produzido por micro-organismos e/ou interações microbianas (NEWMAN; CRAGG, 2014). Eles apresentam uma fonte abundante de metabólitos bioativos estruturalmente diversos, e muitos dos seus compostos produzidos servem de modelo para o planejamento e síntese de novos fármacos (CONTI; GUIMARÃES; PUPO, 2012).

A história do uso de micro-organismos como fonte de produtos naturais teve início após a descoberta acidental, por Alexander Fleming em 1929, da penicilina produzida pelo fungo filamentoso *Penicillium notatum* que controlava a proliferação bacteriana de *Staphylococcus aureus*. No entanto, uma década se passou até que técnicas de extração pudessem ser desenvolvidas e a penicilina se tornasse um fármaco. A ampla utilização terapêutica da penicilina na década de 1940, marcou o início de uma nova era na medicina, "a Idade de Ouro dos Antibióticos", e promoveu a investigação intensiva da natureza como fonte de novos agentes bioativos (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Alguns dos produtos mais importantes da indústria farmacêutica produzidos por micro-organismos incluem: agentes antibacterianos, tais como as penicilinas (das

espécies *Penicillium* spp.), cefalosporinas (de *Cephalosporium acremonium*), aminoglicósideos, tetraciclinas e outros policetídeos de muitos tipos estruturais (a partir de *Actinomycetales*); agentes imunossupressores, tais como as ciclosporinas (de *Trichoderma* spp. e *Tolypocladium* spp.) e rapamicina (a partir *Streptomyces* spp.); agentes redutores do colesterol, como mevastatina ou compactina (a partir de *Penicillium* spp.) e lovastatina (a partir de *Aspergillus* spp.); e antihelmínticos e antiparasitários, como ivermectinas (a partir *Streptomyces* spp.) (Figura 1) (CRAGG; NEWMAN, 2013).

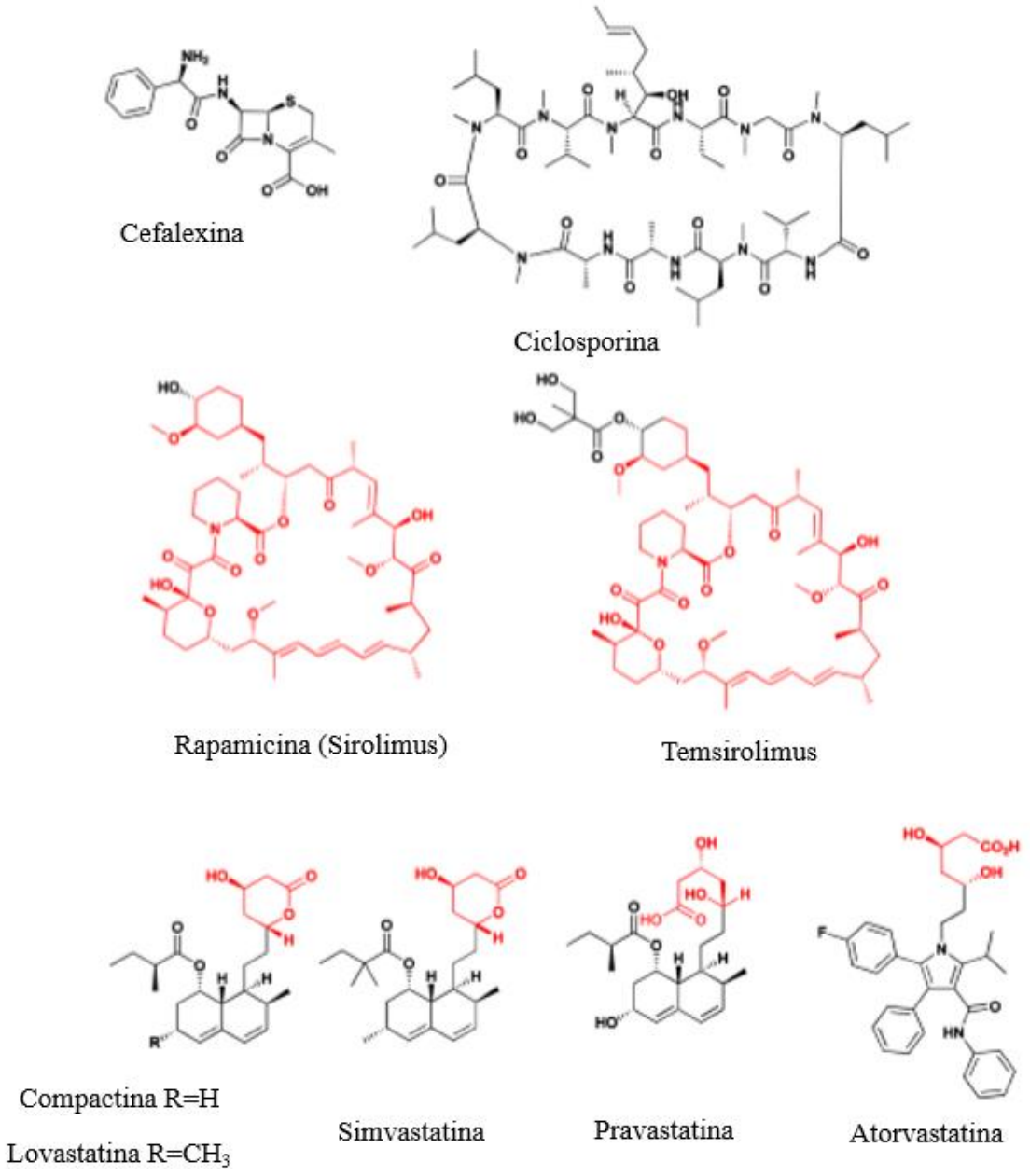


Figura 1. Estrutura química dos fármacos produzidos por micro-organismos: cefalosporinas, ciclosporina, rapamicina, estatinas (Adaptado de CRAGG; NEWMAN, 2013).

Micro-organismos, especialmente da ordem Actinomycetales, são a fonte da grande maioria dos agentes antimicrobianos aprovados pela FDA. Toda a sequenciação do genoma revelou que estes organismos possuem muito mais aglomerados de genes biossintéticos do que os previstos a partir dos resultados de análises químicas efetuadas. Isto sugere que há uma oportunidade inexplorada para novas descobertas de compostos dentro das sequências do genoma de Actinobactérias. Por exemplo, a sequência do genoma de *Streptomyces avermitilis* revela agrupamentos de genes que codificam para a produção de 37 metabólitos secundários, no entanto, apenas 13 produtos naturais têm sido relatados a partir deste micro-organismo (SANCHEZ et al., 2012). Nessa busca permanente por novas drogas, além de ativar agrupamentos de genes biossintéticos silenciosos, é preciso explorar novos ambientes de nicho bacterianos para descobrir novos espaços químicos. A ênfase nesses microambientes inexplorados tem atraído a atenção significativa entre a comunidade de produtos naturais ao longo dos últimos anos (WALSH; FISCHBACH, 2010).

2.2. *Streptomyces*

O gênero *Streptomyces* pertencente ao filo das Actinobactérias, caracterizam-se como um grupo de bactérias aeróbicas, Gram-positivas, que apresentam crescimento semelhante ao de fungos filamentosos. Crescem por filamentos ramificados chamados micélios e dispersam-se por esporos (CHATER, 2011), por esta razão são frequentemente referidos, de maneira informal, como actinomicetos. Suas semelhanças com os fungos limitam-se à morfologia superficial, pois todos seus representantes são procariotos, e seus filamentos têm um diâmetro bem inferior ao dos fungos eucarióticos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

São conhecidas mais de 500 espécies de *Streptomyces*, frequentemente encontradas no solo, porém, algumas espécies podem ser encontradas em ambientes aquáticos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Crescem, preferencialmente, em pH alcalino ou neutro e requerem um menor potencial hídrico se comparadas com outras bactérias. São de fácil identificação em placas de ágar, devido à sua aparência pulverulenta, à alta aderência ao meio e ao odor de terra molhada, peculiar do metabólito gasoso, geosmina. Características como cor dos micélios aéreos e forma como estes se agregam são espécies específicas e fundamentais na taxonomia das espécies (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Os *Streptomyces* possuem um único cromossomo linear, com cerca de 8 a 10 Mb dependendo da espécie, altos índices de Guanina-Citosina no DNA e plasmídeos que podem ser circulares ou lineares (HWANG et al., 2014). Outra característica do genoma desse gênero é a presença de grupos de genes que codificam enzimas biossintéticas responsáveis pela síntese de metabólitos secundários, com uma grande variedade de estruturas químicas, incluindo policetídeos, lactâmicos, peptídeos não-ribossomais e terpenos (NETT et al., 2009).

O ciclo de vida desse gênero é iniciado com a germinação do esporo, quando este se encontra em condições favoráveis de temperatura e nutrientes, formando um filamento germinativo que cresce, dando origem a hifa vegetativa, não septada, que se ramifica formando os micélios vegetativos. Em resposta a diminuição de nutrientes ou outra condição limitante, ocorre o crescimento de micélios aéreos (esporóforos) que quebram a tensão superficial, escapando do ambiente aquoso onde se encontram os micélios vegetativos. Esses esporóforos germinativos se diferenciam formando septos, originando as cadeias de esporos, chamados conídios (Figura 2), com a liberação de esporos fecha um ciclo de crescimento (HWANG et al., 2014). A produção do antibiótico é normalmente ligada a diferenciação, como mostrado, embora nem todos os antibióticos de *Streptomyces* são produzidos na fase estacionária (RYAN et al., 2012).

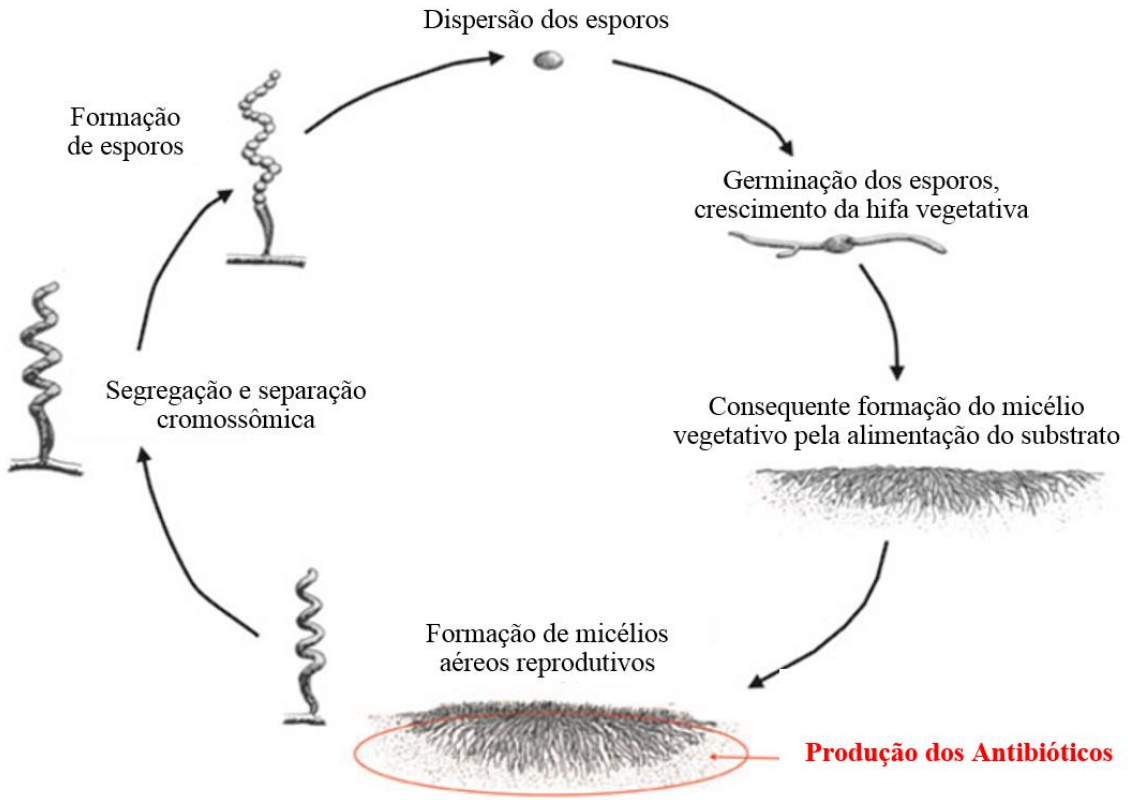


Figura 2. Ciclo de vida de *Streptomyces* spp. (Adaptado de RYAN et al., 2012).

Em comparação com os endosporos produzidos por *Bacillus*, os esporos dos *Streptomyces* são menores e mais resistentes a condições adversas, apresentam pigmentação acinzentada e podem sobreviver por longos períodos no estado desidratado (FLARDH; BUTTNER, 2009).

2.2.1. Metabólitos Secundários Produzidos por *Streptomyces*

A produção de metabólitos secundários por *Streptomyces* se dá na fase germinativa, quando ocorre o processo de esporulação, isso ocorre em condições limitantes de nutrientes ou sob outras situações de estresse ambiental (HWANG et al., 2014). Os metabólitos são secretados com o objetivo de inibir a proliferação de outros micro-organismos, no meio pobre, aumentando a chance de germinação de seus esporos e consequentemente sua sobrevivência (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Antunes e colaboradores (2013), enfatiza a influência de fontes nutricionais como carbono, nitrogênio e minerais na produção de antibióticos em isolados de *Streptomyces*, assim como, os fatores ambientais tempo, temperatura e pH.

Antibióticos

Uma das características marcantes do gênero *Streptomyces* está na capacidade de produzir antibióticos. A história dos antibióticos derivados de *Streptomyces* iniciou-se com a descoberta da streptotricina em 1942, e com a descoberta de estreptomicina dois anos mais tarde, quando os cientistas intensificaram a busca de antibióticos nesse gênero. Hoje em dia, 80% dos antibióticos são obtidos a partir de *Streptomyce*s, sendo o gênero mais importante dentro do filo das Actinobactérias (Figura 3) (PROCÓPIO et al., 2012).

As principais classes de antibióticos produzidos por *Streptomyces* incluem aminoglicosídeos, antraciclinas, glicopeptídeos, β-lactâmicos, macrolídeos, nucleosídeos, peptídeos, polienos, poliésteres e tetraciclinas (ANTUNES et al., 2013). Esse gênero não produz só antibióticos, ele também é precursor de uma ampla variedade de compostos com várias atividades biológicas relacionadas: compostos indólicos, benzaldeídos, cumarinas e lactonas que apresentam ação antifúngica (KAVITHA et al., 2010; TAECHOWISAN et al., 2005; PRABAVARHY; MATHIVANAN; MURUGESAN, 2006); trioxacarcinas, pirocol e evermectina com atividade antiparasitária (BURG et al., 1979; DIETER et al., 2003; MASKEY et al., 2004);

alcalóides, oligonucleotídeos e benzastatina com atividade antiviral (CHOKEKIJCHAI et al., 1995; LEE et al., 2003); além de aminoglicosídeos herbicida (LEE et al., 2007).

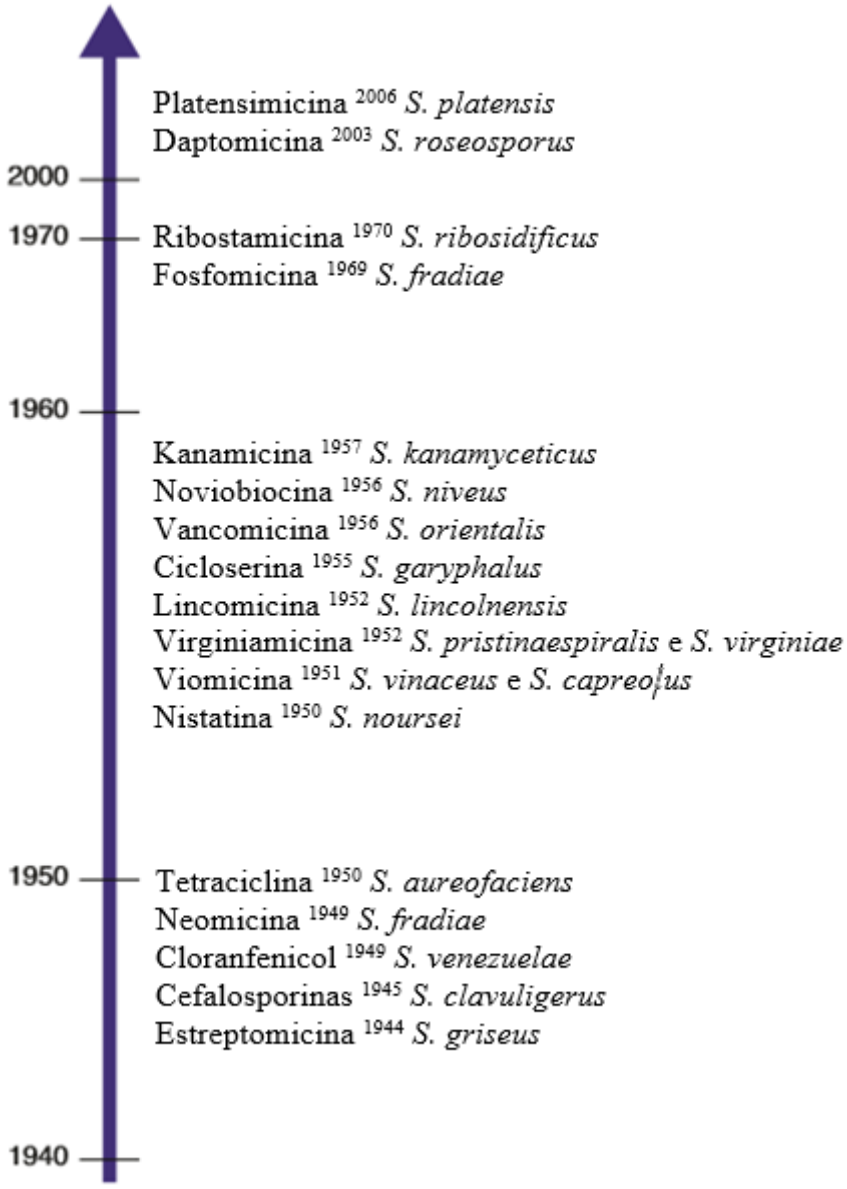


Figura 3. Data de descoberta dos principais antibióticos. Destaque para o gênero *Streptomyces* (Adaptado de PROCÓPIO et al., 2012).

A inibição do crescimento bacteriano é um processo complexo que começa com a interação física da molécula e seus grupamentos específicos, envolvendo alterações bioquímicas, moleculares e estruturais, como: replicação do DNA, síntese do RNA, síntese da parede celular e síntese de proteínas (KOHANSKI; DWYER; COLLINS, 2010). Apesar do sucesso da descoberta dos antibióticos, e os avanços no processo de sua

produção, as doenças infecciosas continuam sendo a segunda principal causa de morte mundial, com aproximadamente 17 milhões de mortes por ano, afetando principalmente crianças e idosos (PROCÓPIO et al., 2012). Isso é responsabilidade das populações bacterianas com resistência aos antibióticos, que pode ser devida a alterações genéticas (mutações) ou aquisição de genes de resistência (entre organismos de taxonomia diferente), provocando alterações no local de ação do fármaco, dificultando a ação do antibiótico (ANDERSSON; HUGHES, 2010).

Antioxidante

Um antioxidante é uma substância química que impede a oxidação de outros produtos químicos. Eles protegem os principais componentes celulares por neutralizar os efeitos prejudiciais dos radicais livres, que são subprodutos naturais de metabolismo das células (BADARINATH et al., 2010). Esses radicais livres são responsáveis por causar um grande número de doenças, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, desordens neurais, doença de Alzheimer, leve disfunção cognitiva, doença de Parkinson, doença hepática induzida pelo álcool, colite ulcerosa, envelhecimento e aterosclerose (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013).

As substâncias antioxidantes podem ser naturais ou artificiais. Os antioxidantes naturais são encontrados principalmente em plantas, na forma de compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos, alcoóis, tocoferóis, tocotrienóis), ácido ascórbico e carotenóides. Enquanto, os antioxidantes artificiais, os principais exemplos são butil-hidroxi-tolueno (BHT) e o butil-hidroxi-anisol (BHA) (MATTOS et al, 2009).

Além das plantas, micro-organismos do gênero *Streptomyces* também são capazes de produzir antioxidantes naturais. O extrato acetoetílico de *S. lavendulae* SCA5 apresentou teor de compostos fenólicos com atividade antioxidante (KUMAR et al., 2014), a mesma atividade foi encontrada em extratos de *S. lydicus* A2 (LERTCANAWANICHAKUL et al., 2015) e *S. parvulus* VITJS11 (NAINE et al., 2015).

Antineoplásicos

Substâncias produzidas por *Streptomyces* utilizadas no tratamento do câncer começaram a surgir por volta de 1940 com a descoberta de actinomicina D. Desde então, muitas outras substâncias com propriedades anticâncer têm sido isoladas desse gênero

(DEMAIN; SANCHEZ, 2009). Hoje, são muitas as classes de compostos anticancerígenos produzidos por *Streptomyces*, algumas delas clinicamente úteis, tais como antraciclinas, peptídeos, glicosídeos, enediinas, indóis, policetídeos, antimetabólicos, carzinofilina e mitomicinas (Tabela 1) (NEWMAN; CRAGG, 2007; OLANO; MÉNDEZ; SALAS, 2009).

Tabela 1. Compostos antitumorais produzidos por *Streptomyces*.

Composto	Classe estrutural	Organismo
[2]1-hidroxi-1-nor-resistomicina	Policetídeos	*S. chibaensis*
[2]Indol-3,6-dissubstituido	Indóis	*Streptomyces* sp.
[1]Aclarubicina	Antraciclinas	*S. galilaeus*
[2]Actinofuranona	Policetídeos	*Streptomyces* sp.
[1]Actinomicina D	Peptídeos cíclicos	*S. antibioticus*
[2]Altemicidina	Isoprenóides	*S. sioyaensis*
[2]Ammosamidas	Pirroloiminoquinonas	*Streptomyces* sp.
[1]Bleomicina	Peptídeos não-ribossomal	*S. verticillus*
[2]Bohemamina	Pirrolizidinas	*Streptomyces* sp.
[2]Caboxamicina	Benzoxazóis	*Streptomyces* sp.
[2]Calcomicina	Policetídeos	*Streptomyces* sp.
[1]Daunomicina	Antraciclinas	*S. peucetius*
[1]Doxorrubicina	Antraciclinas	*S. peucetius*
[3]Epirribicina	Antraciclinas	*Streptomyces* sp.
[2]Equinosporinas	Acetal lactonas	*S. albogriseolus*
[2]Lajolamicina	Peptídeos não-ribossomal	*S. nodosus*
[2]Marineosina	Polipirróis	*Streptomyces* sp.
[1]Mitomicinas C	Mitomicinas	*S. caespitosus*
[3]Mitramicina	Policetídeos	*S. argilaceous*
[3]Neocarzinostatina	Enediinas	*Streptomyces* sp.
[1]Nogalomicina	Antraciclinas	*S. nogalater*
[3]Pentostatina	Antimetabólicos	*S. antibioticus*
[2]Piperazimicinas	Peptídeos não-ribossomal	*Streptomyces* sp.
[1]Porfiromicina	Mitomicinas	*S. ardus*
[3]Resitoflavina	Policetídeos	*S. chinaensis*
[2]Estaurosporina	Indóis carbazólicos	*Streptomyces* sp.
[2]Estreptoclorina	Indóis	*Streptomyces* sp.
[2]Estreptocordina	Metilpiridinas	*Streptomyces* sp.
[2]Estreptopirrolina	Tetrahidropirrois	*Streptomyces* sp.
[1]Terramicina	Tetraciclinas	*S. rimosus*
[2]Tetracenomicina D	Policetídeos	*Streptomyces* sp.
[3]Valrubicina	Antraciclinas	*Streptomyces* sp.

[1]BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE ADOLPHO LUTZ, 2014; [2]OLANO; MÉNDEZ; SALAS, 2009; [3]DEMAIN; SANCHEZ, 2009.

Mesmo com a abundante variedade de compostos isolados, a pesquisa por novas substâncias anticâncer ainda é imprescindível devido ao contínuo desenvolvimento de resistência aos medicamentos quimioterápicos, assim como a elevada toxicidade e os efeitos colaterais relacionados. Portanto, é necessária a investigação de novas substâncias com menos efeitos secundários e/ou com maior eficiência terapêutica (OLANO; MÉNDEZ; SALAS, 2009).

As antraciclinas formam uma das principais classes de agentes antineoplásicas por serem ativas contra vários tipos de cânceres distintos, superando qualquer outra classe (DEMAIN; SANCHEZ, 2009). São usadas no tratamento de leucemias, linfomas, sarcoma, mieloma múltiplo, cânceres de mama, ovário e pulmão. As antraciclinas agem estimulando a clivagem do DNA pela topoisomerase II ou inibindo sua síntese, assim como a do RNA. Contudo, esta é uma classe demasiadamente cardiotóxica, tendo seus efeitos agravados dependendo de doses cumulativas, limitando seu uso clínico (SMITH et al., 2010; VOLKOVA; RUSSELL, 2011).

Mitramicina é um policetídeo aromático com atividade antibacteriana e anticâncer isolado de *Streptomyces argillaceus* (LOMBÓ et al., 1996). É um importante fármaco usado no tratamento do câncer testicular, cujo o mecanismo de ação se dá através da ligação a sequências de DNA ricas em guanina e citosina, inibindo a ligação de fatores transcricionais como Sp1; esta substância também pode regular indiretamente a transcrição de genes por metilação das histonas. O uso frequente desse fármaco o torna organotóxico para rins, fígado e sistema hematopoiético sendo um obstáculo para o tratamento clínico (DEMAIN; SANCHEZ, 2009). Outro exemplo de policetídeo, a Borrelidina, que primeiramente foi extraída de *Streptomyces rochei* e depois encontrado em isolados de *S. parvulus*, *S. albovinaceus* e *S. griseus*. Este tem a propriedade de inibir a angiogênese tumoral, ativando as caspases 3 e 8 conduzindo às células dos capilares à apoptose, dessa forma, colapsam capilares recém formados e eliminam novos aparecimentos. Embora seja um excelente anticancerígeno, não é uma substância bem sucedida no tratamento em seres humanos, devido seu alto nível de toxicidade (VINO; LOKESH, 2008).

A estreptozotocina é um agente alquilante produzido por *Streptomyces achrmogenes*, constituído de uma D-glicopiranose e de uma metilnitrosourea. Apresenta toxidade específica para as células β das ilhotas pancreáticas, são transportadas para dentro das células pelas GLUT2, por apresentarem semelhanças estruturais com moléculas de glicose (WANG; GLEICHMANN, 1998). É usado no tratamento de câncer

de células das ilhotas pancreáticas e tem como efeito colateral o desenvolvimento de diabetes mellitus nos pacientes tratados (DEMAIN; SANCHEZ, 2009).

2.3. CÂNCER

O termo câncer é usado para designar uma doença complexa de característica genética, causada principalmente por fatores ambientais que alteram a expressão de genes responsáveis pela codificação de proteínas com papel crítico na regulação da homeostasia celular (SHEN; LAIRD, 2013). O câncer surge devido ao acúmulo de alterações na expressão de proto-oncogenes (genes responsáveis pelo controle positivo da divisão e diferenciação celular, como *c-Myc*, *c-Fos* e *c-Ras*) ou de genes supressores de tumor (genes envolvidos no controle negativo do ciclo celular e na regulação da apoptose, como p53, Rb, p19, p21, p27, Bcl-2 e Bax), impedindo a proliferação celular normal (OUYANG et al., 2012; WANG; SUN, 2010). O processo de carcinogênese ocorre de forma lenta, podendo levar anos para células cancerosas se proliferar e originar um tumor visível (INCA, 2016).

Hanahan e Weinberg (2011) descrevem dez características das células cancerígenas (Figura 4), que compreendem autossuficiência de sinais de crescimento; resistência a sinais antiproliferativos; evasão do sistema imune; proliferação ilimitada; inflamação; invasão tecidual e metástase; angiogênese; instabilidade genética e mutação; resistência à morte celular; e reprogramação do metabolismo energético.

A capacidade das células cancerígenas de manterem autossuficiência em sinais proliferativos podem ser adquiridas de duas formas distintas: por estimulação da produção de seus próprios fatores de crescimento, respondendo com a expressão de receptores de membrana (via autócrina) ou podem enviar sinais para células normais, presentes no estroma associado ao tumor, que correspondem com a produção de fatores de crescimento (via parácrina); ou, com a intensificação dos níveis de fatores de crescimento, as células cancerígenas que aumentam seus respectivos receptores de membrana, mecanismo cíclico conhecido como *feedback* positivo (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Além das alterações genéticas, os fatores do microambiente tumoral são atualmente conhecidos por regular a progressão do processo maligno, sendo incluído como um novo paradigma em indicações do câncer (SHEN; LAIRD, 2013; HANAHAN; WEIMBERG, 2011). Além de células cancerígenas em distintos estágios de

diferenciação, esse microambiente inclui fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e mastócitos, os quais respondem a vários estímulos e comunicam-se por meio do contato físico ou por mediadores inflamatórios (GALES et al., 2013).

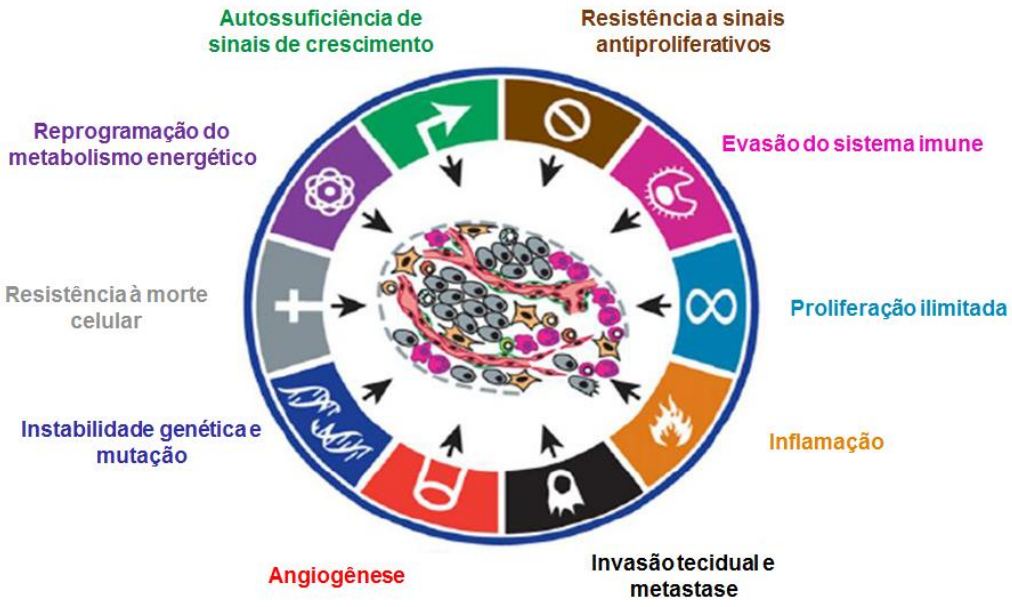


Figura 4. Características das células tumorais (Adaptado de HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Apenas uma mutação na célula dificilmente levará à formação de um tumor maligno, sendo necessárias duas ou mais modificações genéticas, que irão progressivamente alterar os mecanismos responsáveis pelo ciclo celular, diferenciação e morte celular (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

Durante o ciclo celular, a progressão da célula de uma fase para outra é controlada por pontos distintos de checagem que encontram-se na entrada na fase S (ponto de checagem G1-S), na entrada da mitose (ponto de checagem G2-M) e durante a mitose, na entrada da anáfase (Figura 5). Defeitos nos pontos de checagem podem levar a um acúmulo de anormalidades no DNA e subseqüentes perturbações patológicas. A ativação do ponto de checagem permite o reparo da lesão detectada. Se o reparo não for possível, o ciclo celular é interrompido induzindo a morte celular. Mutações nesses pontos são evidenciadas em muitos tipos de câncer (HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013).

O gene supressor de tumor p53, nomeado guardião do genoma, exerce um papel essencial na regulação do ciclo celular, controlando o estado do DNA antes que a célula entre na fase S. Uma das funções mais importantes desse gene é a sua capacidade para

induzir a morte celular por apoptose, sendo capaz também de responder ao estresse oxidativo, inibir a proliferação celular, angiogênese e metástase. A interrupção desta rota promove a progressão do tumor e resistência à quimioterapia (ALENZI; LOTFY; WYSE, 2010; JAFARNEJAD; LI, 2012).

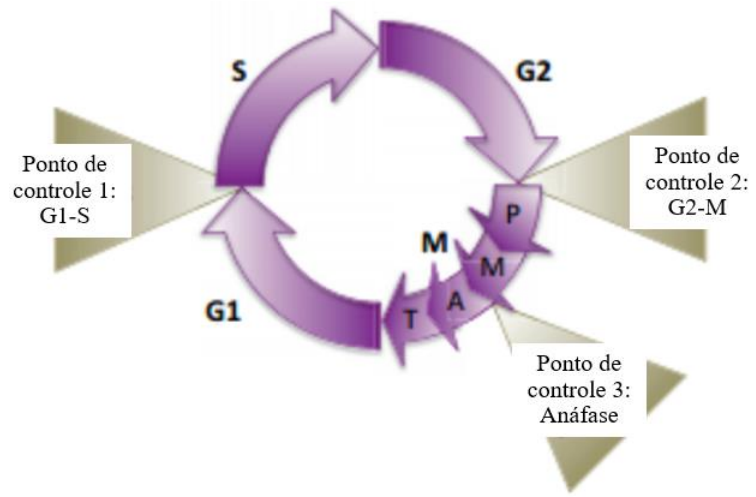


Figura 5. Ciclo celular (Adaptado de HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013).

As modificações nos genes controladores do ciclo celular são desencadeadas por fatores endógenos como, mutações gênicas herdadas, erros aleatórios na replicação do DNA, idade avançada, inflamação crônica, deficiência nos sistemas endócrino e imunológico; por fatores exógenos como, exposição à radiação ionizante e não-ionizante, metais pesados e agentes biológicos específicos como bactérias (*Helicobacter pylori*), vírus (vírus Epstein Barr, papiloma vírus humano, vírus linfotrópico da célula humana I e II e vírus da hepatite B) e parasitas (*Schistosoma haemotobium*, *Clonorchis sinensis* e *Opisthorchis vivarium*). Outros fatores importantes são fatores ambientais e estilo de vida como, ausência de atividade física, obesidade, desnutrição e hábitos alimentares que incluem ingestão de agentes xenobióticos tabaco, álcool, conservantes e pesticidas (JEMAL et al., 2010).

2.3.1. Epidemiologia do Câncer

O câncer é o principal problema de saúde pública em muitos países no mundo. Nos Estados Unidos da América, por exemplo, é a segunda principal causa de morte, onde

estimativas indicam que em poucos anos irá superar as doenças cardiovasculares (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015).

No Brasil, desde 1995, são elaborados relatórios sobre a estimativa da incidência de câncer, onde para o ano de 2016 será registrado aproximadamente 596 mil casos. Para os homens são esperados aproximadamente 295.200 casos e para as mulheres 300.800 casos, incluindo o câncer de pele não melanoma, que é o mais incidente para ambos os sexos, seguido do câncer de próstata, traqueia, brônquio, pulmão, cólon, reto, estômago e boca para o sexo masculino; e câncer de mama, cólon, reto, colo do útero, traqueia, brônquio, pulmão e estômago para o sexo feminino (Figura 6). Estes dados reforçam a gravidade do câncer no país (INCA, 2016).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens	Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 6. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma (Adaptado INCA, 2016).

2.3.2. Tratamento

Durante o século XX, apesar do processo neoplásico ser reconhecido, pouco se sabia sobre os mecanismos biológicos de transformação, progressão tumoral e medicina molecular. Em 1950, o tratamento compreendia basicamente a remoção cirúrgica do tumor, mas nas últimas décadas esse tratamento tem evoluído (WYLD; AUDISIO; POSTON, 2015).

Em 1960, a radioterapia tornou-se uma ferramenta valiosa para o controle local e regional da doença. Através da radiação ionizante, por exemplo, são formadas pequenas partículas carregadas eletricamente que depositam essa energia quando passam pelas células cancerosas para matá-las. O principal objetivo desse método terapêutico é privar células cancerosas em potencial de sua multiplicação (divisão celular) (BASKAR et al.,

2012). Aproximadamente dos 50% de pacientes que recebem essa terapia durante o curso da doença, 40% apresentam tratamento curativo (BEGG, STEWART, VENS, 2011). O rápido progresso dessa terapêutica é impulsionado pelos avanços nas técnicas de imagem, sistemas de planejamento de tratamento computadorizados, máquinas de tratamento de radiação (com produção melhorada de raios-X e entrega de resultado), bem como uma melhor compreensão da radiobiologia da terapia de radiação (THARIAT et al., 2013).

A radiação pode ser realizada em combinação com outros métodos terapêuticos para o tratamento. Quando realizada antes da cirurgia (terapia neoadjuvante), por exemplo, a radiação tem como objetivo reduzir o tumor, e se usada após a cirurgia (terapia adjuvante), destruir possíveis células tumorais microscópicas que não foram removidas cirurgicamente (BASKAR et al., 2012). Entretanto, a cirurgia e a radioterapia não são capazes de erradicar o câncer metastático. Neste caso, o tratamento precisa atuar de forma sistêmica em todos os órgãos, como a terapêutica por quimioterápicos (PETERS e BROWN, 2015).

Em 1940, começaram a surgir os primeiros quimioterápicos, como as mostardas nitrogenadas e os fármacos antifolatos (Figura 7). A mostarda nitrogenada usada inicialmente na guerra química destruiu o tecido da medula óssea e a linfa dos indivíduos expostos acidentalmente a esse gás. Nos anos seguintes, a mostarda nitrogenada juntamente com outros agentes alquilantes, tomou o centro do palco no tratamento de doenças malignas hematológicas, incluindo leucemia, linfoma, doença de Hodgkin e mieloma múltiplo (PALUMBO et al., 2013; PETERS e BROWN, 2015).

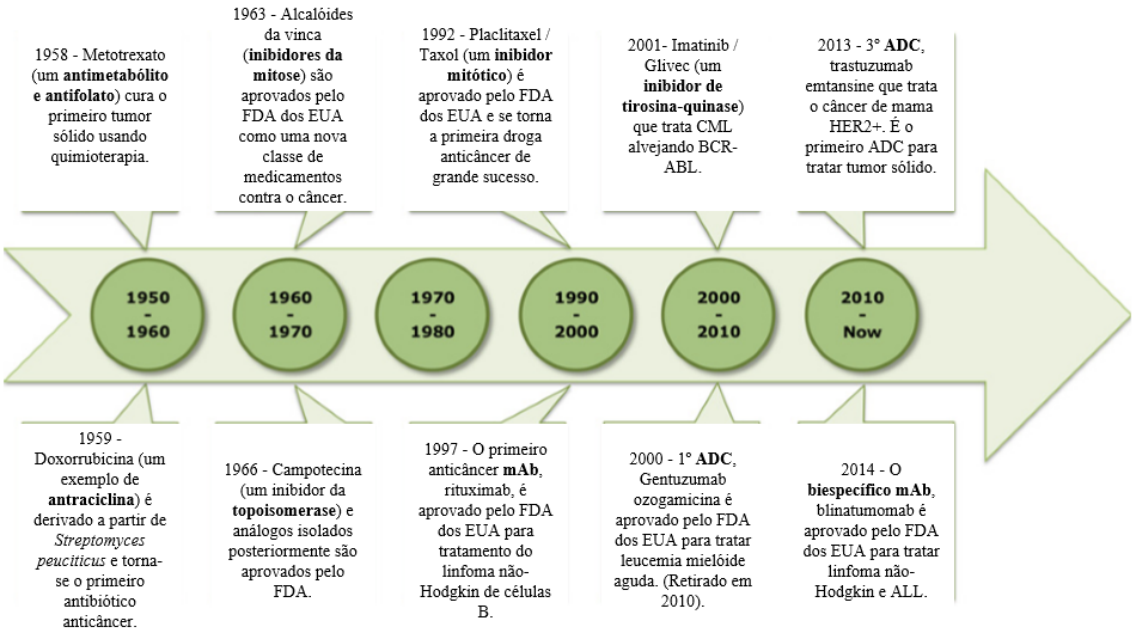


Figura 7. Evolução de fármacos quimioterapêuticos (Adaptado de PETERS e BROWN, 2015).

Apesar de grande progresso no campo da quimioterapia do câncer, muitos fármacos antitumorais eficazes disponíveis no mercado apresentam toxicidade não específica (afetam tecidos normais que se dividem rapidamente), estreita janela terapêutica (faixa entre a dose mínima eficaz e a dose máxima permitida) e aumento das taxas de resistência (UTKU, 2011). Estas preocupações enfatizam a necessidade de se afastar dos tratamentos antineoplásicos convencionais e explorar novas maneiras de lidar com a doença (PETERS e BROWN, 2015).

A imunoterapia, conhecida como vacinas contra o câncer, é uma outra estratégia de combate à doença. Em 2010, o FDA aprovou a primeira vacina deste tipo - Sipuleucel T (Provenge) - para tratar o câncer de próstata. Essa vacina desencadeia uma resposta imune para destruir as células malignas, proteger os pacientes contra metástase e recidiva tumoral (UTKU, 2011). Outras estratégias como a terapia hormonal e a terapia gênica também encontram-se disponíveis (NAIKI et al., 2012; TOUCHEFEU et al., 2010).

2.3.3. Vias de Morte Celular

Segundo Ouyang e colaboradores (2012), apoptose, autofagia e necrose são as principais vias de morte celular envolvidas no câncer e podem ser distintas por suas diferenças morfológicas e moleculares, conforme mostra a Figura 8.

Apoptose

Um tipo de morte celular caracterizada pelo encolhimento celular, formação de prolongamentos na membrana (*blebs*) e fragmentação da membrana em corpos apoptóticos. Com o encolhimento, as célula tornam-se menores em tamanho, o citoplasma denso e as organelas mais juntas, ocorrendo a condensação da cromatina (picnose). O fosfolipídeo da membrana, fosfatidilserina, torna-se exposto na superfície da celular e os corpos apoptóticos formados, que contém material nuclear e citoplasmático, são fagocitados por macrófagos, não havendo o extravassamento de material pró-infamatório (APRAIZ; BOYANO; ASUMENDI, 2011; HASSAN et al., 2014, OUYANG et al., 2012).

A apoptose participa de vários processos fisiológicos vitais, como a formação dos dedos durante o desenvolvimento fetal, a involução da glândula mamária após o período de amamentação, o colapso endometrial durante a menstruação e o controle da

proliferação de tumores (VERBRUGGE; JOHNSTONE; SMYTH, 2010). Diversas patologias podem ser causadas por alterações nos genes responsáveis pelo processo apoptótico, como câncer e doenças neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer e Huntington) (KOFF; RAMACHANDIRAN; BERNAL-MIZRACHI, 2015).

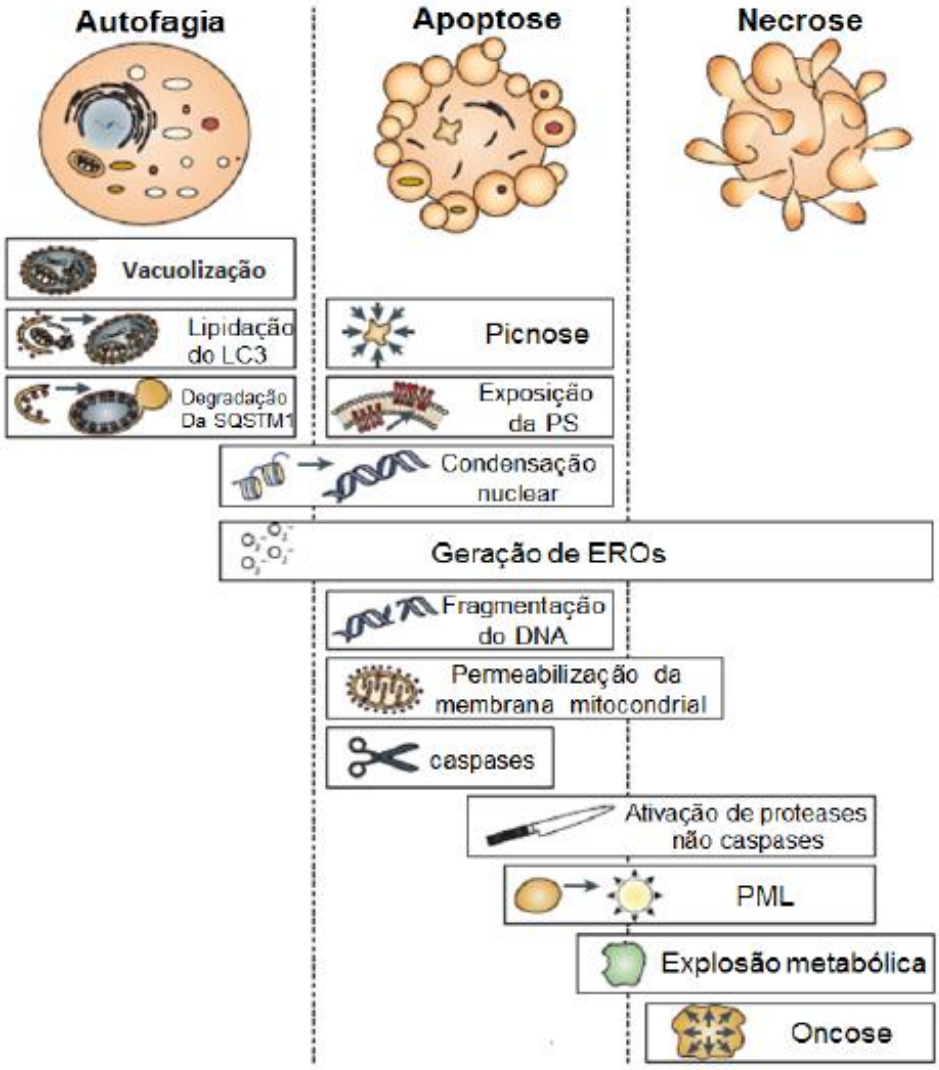


Figura 8. Características moleculares da autofagia, necrose e apoptose (Adaptado de KEPP et al., 2011). LC3 – Também conhecido como MAP1LC3 (Proteínas 1 Associadas a Microtúbulos de Cadeia Leve 3); SQSTM1 – Sequestossoma 1; MMP – Permeabilização da membrana mitocondrial; PML – Permeabilização da membrana lisossomal; PS – Fosfatidil serina; EROS – Espécies reativas de oxigênio.

Existem duas vias principais de ativação da apoptose (Figura 9), via intrínseca (conhecida como via mitocondrial) e a via extrínseca (conhecida como via receptora da morte)(HANAHAN; WEINBERG, 2011).

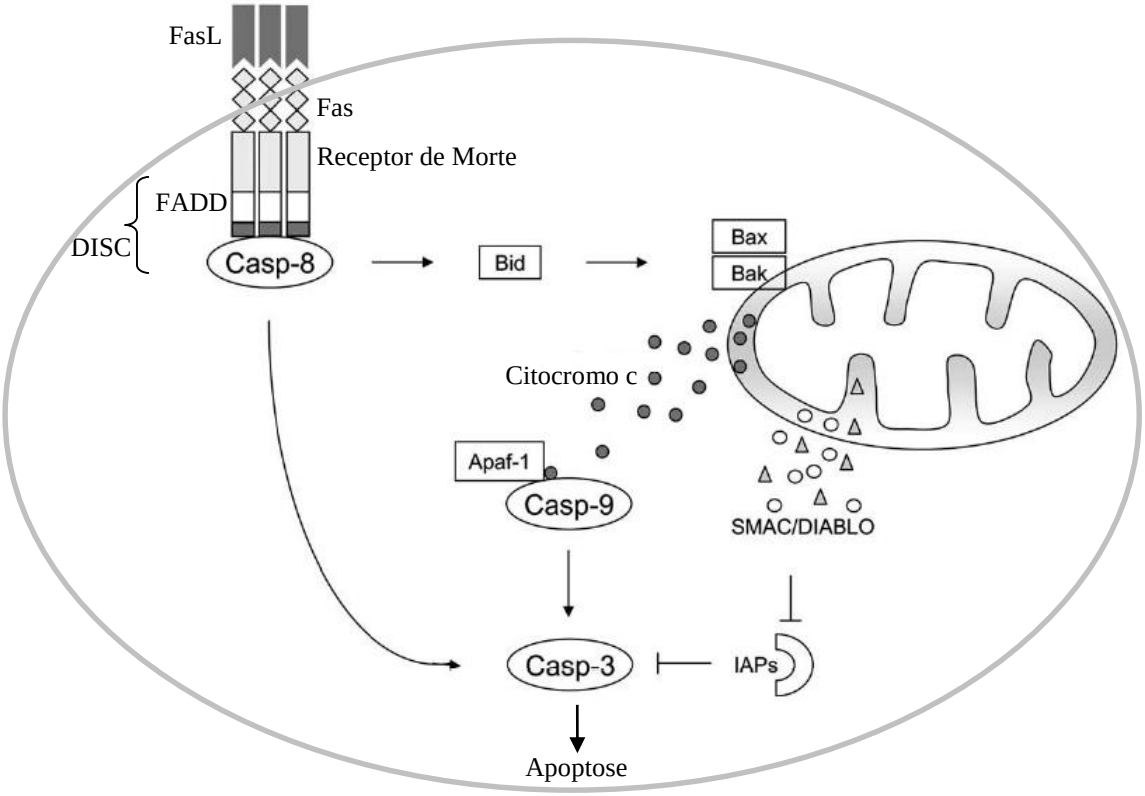


Figura 9. Vias de ativação da apoptose. Via intríseca - Liberação de citocromo *c* regulada principalmente pela Bcl-2 família de proteínas, composta por membros pró- apoptótico e anti-apoptótico. O citocromo *c*, juntamente com Apaf-1 ativa a procaspase 9 que por sua vez ativa procaspases efetoras (exemplo, caspase 3). As proteínas mitocondriais libertadas Smac/DIABLO antagonizam os inibidores da apoptose (IAPs). Via extrínseca - Desencadeamento dos receptores de morte resultando na montagem DISC, que resulta na ativação de caspases iniciadoras (exemplo, caspase 8) que por sua vez, ativam diretamente caspases efetoras. As duas vias se cruzam, a caspase 8 pode ativar Bid facilitando a liberação do citocromo *c* (Adaptado de BRUIN; MEDEMA, 2008).

Via Intrínseca

A via intríseca é ativada por sinais de estresse intracelular ou extracelular, como ausência de fatores de crescimento, danos ao DNA, hipoxia, altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), infecção viral ou ativação de oncogenes. Esses sinais levam a permeabilização da membrana mitocondrial externa, induzindo a formação de poros (HUANG; FRETER, 2015). A abertura desses poros é regulada pelos membros da família Bcl-2 anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-w) e pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bad, Bik) (CHIPUK et al., 2010; LIU et al., 2011). Os membros pró-apoptóticos Bax ou Bak liberam proteínas apoptogênicas, como citocromo *c*, Smac/DIABLO e Omi/HtrA2 do

espaço intermembranar da mitocôndria para o citosol (Figura 9) (BRUNELLE; ZHANG, 2010; LOPEZ; TAIT 2015; TAIT et al., 2010).

No citosol, o citocromo *c* forma um complexo com a Apaf-1 (fator apoptótico ativado por protease) e a procaspase 9, formando o apoptossomo. Para ser ativada, a procaspase 9 precisa estar ligada ao citocromo *c* e a Apaf-1 (HUANG; FRETER, 2015). Uma vez ativada, a caspase 9 ativa a procaspase 3 que vai ativar outras procaspases efetoras, desencadeando uma cascata de sinalização que terminando com a morte celular por apoptose (LIU et al., 2011).

Enquanto o citocromo *c* atua na ativação de caspases, o Smac/Diablo e Omi/HtrA2 atuam inibindo um grupo de proteínas citosólicas antiapoptóticas denominadas de IAPs (inibidores de apoptose). As IAPs podem se ligar e inibir sítios ativos das caspases 3, 6 e 7, bloqueando-as. O Smac/diablo e Omi/HtrA2 liberado da mitocôndria é capaz de antagonizar as IAPs, protegendo as caspases da inibição, permitindo a continuidade do processo apoptótico (BRUNELLE; ZHANG, 2010; LOPEZ; TAIT 2015; TAIT et al., 2010).

Via Extrínseca

A via extrínseca é desencadeada por receptores transmembrânicos que pertencem a família dos receptores fator de necrose tumoral (rTNF), entre eles rTNF1, Fas e DR4 (Figura 9). Os ligantes desses receptores de morte pertencem à família de proteínas do fator de necrose tumoral (TNF), como TNF-α, FasL e TRIALR1. Os receptores são caracterizados por um domínio de morte citoplasmático, este é ativado após a ligação do ligante com o receptor, exemplo FasL/Fas. O domínio de morte ativado liga-se e ativa uma proteína denominada FADD (dominio de morte associada à Fas). O complexo proteína Fas, domínio de morte FADD e procaspase 8 ou 10 é chamado DISC (complexo de sinalização indutor de morte) que converte as procaspases 8 ou 10 em suas respectivas caspases ativas, e estas caspases ativas convergem na cascata apoptótica intrínseca ativando as caspases efetoras 3, 6 e 7, culminando com a morte celular por apoptose (LIU et al., 2011; STEGEHUIS et al., 2010; VERBRUGGE; JOHNSTONE; SMYTH, 2010).

As vias apoptóticas intrínsecas e extrínsecas (Figura 9) podem se cruzar, quando a caspase 8 cliva a proteína Bid em sua forma ativa tBid. Sendo um membro pró-apoptótico da família Bcl-2, tBid induz Bax ou Bak à permeabilização da membrana

mitocondrial e liberação do citocromo *c*, amplificando o processo de morte celular através da via mitocondrial (BRUNELLE; ZHANG, 2010).

Autofagia

Um importante processo de morte celular associado a apoptose é chamado de autofagia (FUCHS; STELLER, 2015). Existem três principais vias de autofagia: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. Macroautofagia (daqui em diante referida como autofagia) é um fenômeno mais lento e especialmente restrito, em que partes do citoplasma são sequestradas para dentro de autofagossomos, vesículas com membrana dupla contendo organelas citosólicas, que se fundem com lisossomos e são digeridos por hidrolases lisossomais (LEE et al., 2010; MARIÑO et al., 2014).

A autofagia é considerada uma resposta adaptativa, a fim de aumentar a sobrevivência e pode resultar em morte celular. Além de atuar na homeostasia celular, esse processo ou a falta dele, pode contribuir para o desenvolvimento e aumento de diversas condições patológicas, incluindo o câncer (NAGELKERKE et al., 2015). Várias proteínas e vias relacionadas à sinalização autofágica são desreguladas durante o processo de transformação maligna, o que resulta na redução do processo autofágico e consequente desenvolvimento do câncer. Além desta relação, células malignas podem induzir autofagia quando sofrem ação de alguns quimioterápicos (PANDA et al., 2015). Esse benefício terapêutico pode ser realizado de duas maneiras: por inibição, onde a função citoprotetora da autofagia é eliminada, induzindo formas não autofágicas de morte celular; e por estimulação, na qual a degradação autofágica excessiva do conteúdo citoplasmático estimula a morte celular por autofagia. Ambas as estratégias podem ser combinadas com os tratamentos convencionais do câncer para melhorar a eficácia terapêutica (NAGELKERKE et al., 2015).

A via mais descrita como reguladora de autofagia é a via mTOR (alvo do mecanismo da rapamicina), que age associada a ativação da via AKT, a via de proteínas homólogas a Ras ou pela via AMPK (proteína cinase ativada por monofosfato de adenina). De um modo geral, altos níveis de nutrientes e fatores de crescimento estimulam a via mTOR, que por sua vez inibe autofagia (TRISTÃO et al., 2012; LEE et al., 2010). A inibição da via mTOR por estímulos fisiológicos ou farmacológicos ativa a autofagia por reprimir a interação entre ULK1, ULK2, proteínas da famíla ATG (proteínas

relacionadas a autofagia) e seus alvos (complexo beclina 1) (Figura 10) (KIM; VIOLLET; GUAN, 2011).

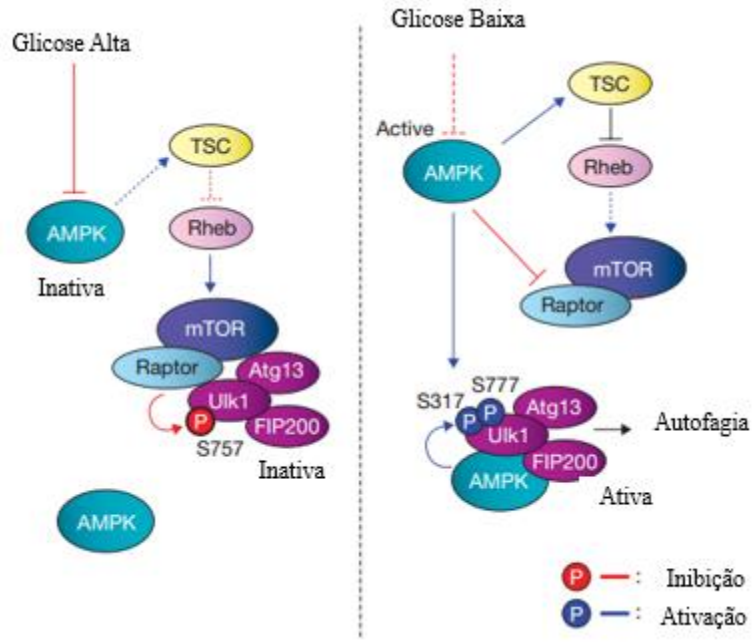


Figura 10. Modelo de regulação Ulk1 por AMPK e mTORC1 em resposta a sinais de glicose. Esquerda: quando a glicose é suficiente, AMPK é inibido e mTORC1 ativado. O mTORC1 fosforila Ulk1 em Ser 757 para evitar a interação Ulk1 com AMPK. Direita: quando o nível de energia celular é limitada, AMPK é ativada e mTORC1 inibido por AMPK através da fosforilação de TSC2 e Raptor. Fosforilação de Ser 757 é diminuída, e Ulk1 pode interagir e ser fosforilada por AMPK em Ser 317 e Ser 777. O AMPK fosforilado em Ulk1 é ativo e inicia a autofagia (Adaptado de Kim; Viollet; Guan, 2011).

Necrose

Durante muito tempo a morte celular por necrose esteve associada a injúrias ou danos acidentais que levavam a morte celular prematura (ALMAGRO; VUCIC, 2015). Mas, atualmente a necrose é considerada um processo de morte celular controlada geneticamente, onde a destruição do tecido é irreversível e ocorre após falha bioenergética por níveis excessivos de cálcio citosólico ou por espécies reativas de oxigênio (ROS) (BAUMANN, 2012; VASEVA et al., 2012).

A necrose é caracterizada pelo inchaço de organelas e células (oncose), ruptura da membrana plasmática e libertação de conteúdos intracelulares. Esse tipo de morte celular é composto por diferentes subtipos, como necroptose, partanatos, oxitose, ferroptose, ETose, NETose, pironecrose e piroptose (BERGHE et al., 2014).

A necroptose, por exemplo, é um processo altamente regulado e bem compreendido a nível molecular, sendo um mecanismo de *back-up* para as células que são destinadas a morte quando a via apoptótica encontra-se comprometida (BERGHE et al., 2014; ALMAGRO; VUCIC, 2015). A ativação de receptores de morte, como rTNF, pode provocar esse subtipo de morte celular por necrose independente de caspase, mas dependente da atividade de um domínio de morte contendo quinase, o receptor 1(RIP1, também conhecido como RIPK1) que forma o complexo RIP1-RIP3 (necrosomo) (Figura 11) (PAPATRIANTAFYLLOU, 2012).

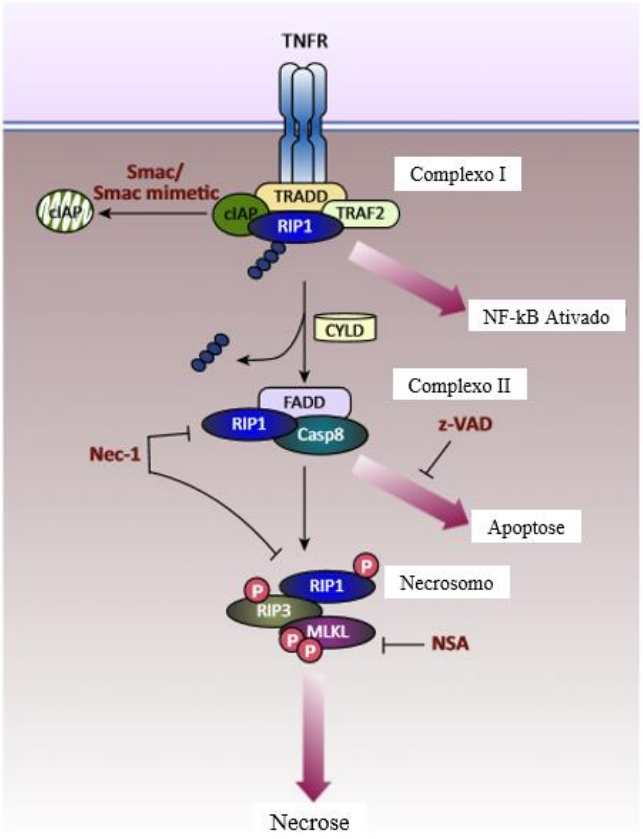


Figura 11. Via de sinalização da necroptose. A ligação do receptor fator 1 de necrose tumoral (rTNFR1) mais proteína do domínio de morte (TRADD) mais receptor fator 2 de necrose tumoral (rTNF2 ou TRAF2) leva à formação do complexo I, que interage com o receptor quinase 1 (RIP1) e inibidores celulares da apoptose (cIAP). RIP1 se modifica e sinaliza a ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB). A enzima CYLD modifica RIP1 novamente e dissocia-o do receptor de morte (rTNFR1). RIP1 mais dominio de morte associada ao Fas (FADD) juntamente com a procaspase 8 leva à formação do complexo II. Nesse novo complexo, a caspase 8 ativa convergem na cascata apoptótica ativando as caspases efetoras 3/7, inativando blocos de necrose por clivagem, RIP1 e RIP3. Quando a caspase 8 é inibida por Z-VAD, RIP1 e RIP3 formar o complexo ativo de morte necrótica (necrosomo). RIP3 recruta uma proteína de domínio quinase de linhagem mista (MLKL) e fosforila MLKL em T357 e S358, provocando sua ativação levando a morte celular por necrose (Adaptado de SUN; WANG, 2014).

Diante do exposto, descobrir e compreender vias que sinalizam a morte celular, juntamente com moléculas que ativam estas vias torna-se importante para oncologia, principalmente quando essas estratégias são independentes dos mecanismos clássicos de morte, encorajando a descoberta de vias alternativas de morte celular como alvos promissores para novas terapias e moléculas, que além de induzir a morte celular, apresentem uma maior seletividade para as células cancerígenas, ou seja, quimioterápicos mais eficientes (KELLY; STRASSER, 2011; MOHAMMAD et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar as atividades antioxidante, antimicrobiana e anticâncer *in vitro*, assim como a toxicidadede *in vivo*, de metabólitos produzidos por *Streptomyces* spp. isolados da rizosfera de *Paullinia cupana* (Kunth) variedade sorbilis [(Mart.) Ducke] de Maués – Amazonas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a espécie de *Streptomyces*, com melhor atividade, através das técnicas clássica e molecular;
- Produzir metabólitos secundários em fermentação, extrair, isolar, purificar e caracterizar um metabólito presente no extrato metanólico de *Streptomyces* sp UFPEDA 3370;
- Avaliar a atividade antioxidante de extratos e fases;
- Investigar a atividade antimicrobiana de extratos, fases, frações e produto isolado;
- Determinar o efeito citotóxico de extratos, fases, frações e produto isolado em células tumorais humanas e em células mononucleares de sangue periférico, bem como sua atividade hemolítica em eritrócitos humanos;
- Analisar a morfologia das células tratadas com fases e produto isolado;
- Verificar se o produto isolado promove despolarização da membrana mitocondrial, bloqueio do ciclo celular e fragmentação do DNA;
- Determinar a toxicidade aguda (DL_{50}) dos extratos e frações.

4. METODOLOGIA

4.1. ISOLAMENTO DE *Streptomyces* spp.

As linhagens bacterianas *Streptomyces* sp. UFPEDA 3370, *Streptomyces* sp. UFPEDA 3413, *Streptomyces* sp. UFPEDA 3412 e *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405 foram isoladas do solo da rizosfera de *Paullinia cupana* (Kunth) var. sorbilis (Mart.) Ducke, uma planta nativa do Amazonas-Brasil, conhecida como guaraná. O isolamento de das linhagens de *Streptomyces* spp. foi realizado utilizando a técnica de espalhamento (ELLIAH et al., 2004), em que 10 g de solo foram suspensos em 90 mL de solução estéril de tampão fosfato salino. A amostra foi submetida a agitação (180 rpm, 15 minutos), incubada a 50 ºC durante 10 minutos e diluída em série até 10^{-5}. Alíquotas de 100 µL de 10^{-3} a 10^{-5} foram espalhadas em meio Extrato de Levedura – Arginina sólido (ALA) (0,03 g L-arginina; 0,1 g Glicose; 0,1 g Glicerol; 0,03 g K_2HPO_4; 0,02 g $MgSO_4.7H_2O$; 0,03 g NaCl; 0,1 g extrato de levedura; 0,1 mL de solução de traços (1 g $FeSO_4.7H_2O$; 0,1 g $MnSO_4.7H_2O$; 0,1 g $CuSO_4.5H_2O$; 0,1 g $ZnSO_4.7H_2O$) adicionado a benlate 100 µg/mL e penicilina 3,5 µg/mL. As placas foram incubadas a 30 ºC durante 21 dias (SILVA, 2010). As cepas foram depositadas na Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos (UFPEDA) sob imersão em óleo mineral e liofilizada.

4.2. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS

4.2.1. Caracterização Cultural, Micromorfológica, Bioquímica, Fisiológica, Resistência aos Antibióticos e Estudo da Parede Celular

A caracterização cultural das linhagens como crescimento, cor do micélio aéreo, cor do micélio no substrato e difusão de pigmento no meio foi estudada no meio Triptona - Extrato de Levedura - Ágar (ISP-1), Extrato de Malte - Extrato de Levedura - Ágar (ISP-2), Farinha de aveia - Ágar (ISP-3), Sais inorgânicos - Amido - Ágar (ISP-4), Glicerol - Asparagina - Ágar (ISP-5), Peptona - Extrato de ferro - Ágar (ISP-6) e Tirosina - Ágar (ISP-7) (SHIRLING e GOTTLIEB, 1966), sendo os meios ISP-6 e ISP-7 utilizados para avaliar a produção de pigmentos melanóides.

Para a caracterização micromorfológica, as cepas foram cultivadas em placa de Petri com meio ISP-2 ágar onde foram inseridas lamínulas, em posição inclinada, para o

crescimento do micélio aéreo sobre sua superfície e incubadas por 21 dias a 30 °C (WILLIAMS et al., 1989). As lamínulas foram retiradas, observadas ao microscópio óptico e depois, fixadas em uma solução contendo glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 12 h a 4 °C, lavadas três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 10 min e pós-fixadas, por 1 h, em uma solução contendo tetróxido de ósmio e cacodilato de sódio 0,1 M na proporção 1:1 (v/v). Após o período de pós-fixação, as lamínulas foram lavadas três vezes com água miliq por 10 min e desidratada em série crescente de acetona (30% - 5 min; 50% - 5 min; 70% 15 min; 100% - 1 h). Para finalizar o processamento, as amostras foram para o ponto crítico (secura total) e depois metalizadas com ouro. No microscópio eletrônico de varredura QUANTA 200 FEG foi visualizado o tipo da cadeia de esporo e a característica de sua superfície.

A caracterização bioquímica foi realizada através dos ensaios de utilização de fontes de carbono (D-frutose, D-galactose, D-manose, D-melezitose, D-xilose, lactose, L-arabinose, L-ramnose, maltose, manitol, raffinose, sacarose e trealose) e nitrogênio (arginina, cisteína, fenilalanina, histidina, L-asparagina, L-metionina, prolina, serina, treonina e valina); enquanto a caracterização fisiológica foi feita através da capacidade da cepa de crescer em diferentes concentrações de NaCl (2, 5, 7, 9 e 12%), temperaturas (30, 37 e 45 °C) e pH (5,6, 7, 8 e 9) (SHIRLING e GOTTLIEB, 1966).

Para verificar a resistência aos antibióticos, uma suspensão de cada linhagem foi inoculada em placa de Petri contendo meio ISP-2 ágar. Sobre o meio inoculado foram colocados os discos de antibióticos: amicacina 30 µg, ampicilina 10 µg, amoxicilina 10 µg, cefotaxina 30 µg, ciprofloxacina 5 µg, cloranfenicol 30 µg, eritromicina 15 µg, estreptomicina 10 µg, imipenem 10 µg, norfloxacina 10 µg, oxacilina 1 µg, penicilina G 10 U, rifampicina 5 µg, tetraciclina 30 µg e vancomicina 30 µg. Após a colocação dos discos, as placas foram incubadas por 5 dias a 30 °C (SHIRLING e GOTTLIEB, 1966).

A cromatografia em camada delgada do hidrolisado da parede celular de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3370 foi realizada para a identificação dos isômeros do ácido diaminopimélico (LL-DAP ou Meso-DAP) presente na parede celular das actinobactérias. A fase móvel foi composta por metanol-água-ácido clorídrico 6 N-piridina (80:26:4:10, v/v) e a fase fixa por placas de celulose (Merck n° 5716 20x20). Na fase fixa foram aplicadas 2 µL do padrão do ácido diaminopimélico (DAP) a 0,19% p/v, 2 µL da amostra e 2 µL dos padrões *Streptomyces regensis* UFPEDA 3053 e *Nocardia asteroides* UFPEDA 3503, representando os isômeros LL-DAP e Meso-DAP, respectivamente. A cuba foi previamente saturada por 2 h e a corrida ocorreu por

aproximadamente 5 h. A placa seca foi revelada borrifando uma solução de ninhidrina a 0,2% p/v em butanol saturado com água e em seguida aquecida por 5 min a 100 ˚C (STANECK; ROBERTS, 1974).

4.2.2. Caracterização Molecular do Gene 16S do DNAr

As cepas foram cultivadas em meio ISP-2 líquido sob agitação por 16 h (200 rpm 30 ˚C) e depois 1 mL dessa cultura foi centrifugada por 5 min a 12.000 rpm. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante. A eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1x corado com Sybr Safe foi adotada para avaliar a integridade do DNA. O gel foi visualizado através do transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentado.

O gene 16S do DNAr foi amplificado a partir do DNA genômico por PCR, utilizando os oligonucleotídeos universais para Eubacteria 27f (5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3') e 1492r (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (WEISBURG et al., 1991) em volume final de 25 µL contendo 50 ng de DNA, 0,2 µM de cada dNTP, 3 µM de $MgCl_2$, 5 pmols de cada oligonucleotídeo, 1,5 U/µL de Taq-polimerase, tampão da enzima 1x e 11,75 µL de água ultrapura estéril. A reação em cadeia de polimerase foi conduzida em termociclador programado para realizar desnaturação inicial a 94 ˚C por 4 min, seguida de 25 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (94 ˚C / 1 min, 52 ˚C / 30 seg e 72 ˚C / 2 min, respectivamente) e um ciclo final de extensão a 72 ˚C por 10 min. Após a amplificação, 5 µL da reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TBE 1x corado com Sybr Safe a 3 volts/cm^{-1} para visualizar um fragmento de aproximadamente 1350 pares de base. O produto da amplificação foi purificado e sequenciado pela empresa Macrogen (Seul, Córeia do Sul). A seqüência de genes foi comparada com todas as sequências depositadas no banco de dados do *Genebank*, utilizando o software *Blast* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). As seqüências mais similares foram utilizadas na construção da árvore filogenética, com as sequências alinhadas usando o software ClustalW e a árvore filogenética construída utilizando o MEGA 5.1. A árvore filogenética foi inferida utilizando o algoritmo Neighbor-joining com modelo de substituição Kimura 2-parâmetros e com suporte de valores de *bootstrap* de 1000 pseudo-réplicas.

4.3. FERMENTAÇÃO, EXTRAÇÃO, PARTIÇÃO E FRACIONAMENTO DOS METABÓLITOS BIOATIVOS

4.3.1. Fermentação Submersa

O inóculo foi obtido pelo cultivo de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3370 em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio ISP-2 líquido com inoculação de seis blocos de gelose de 10 mm de diâmetro retirados do crescimento em forma de tapete da linhagem em ISP-2 ágar, cultivada por 14 dias a 30 °C, e submetido a agitação por 48 h (200 rpm, 30 °C). Para fermentação, 50 mL do inóculo foi adicionado em Fernenbach de 2800 mL com 500 mL do meio líquido MPE submetido à agitação por 96 h (200 rpm, 30 °C). Após a fermentação, a biomassa foi separada do líquido fermentado por centrifugação a 3.000 rpm durante 3 min e, subsequentemente, o líquido fermentado filtrado.

A biomassa foi extraída três vezes com metanol na proporção 1:2 (p/v) para obtenção do extrato metanólico da biomassa (EMeOH-B 3370), enquanto o líquido fermentado extraído duas vezes com acetato de etila na proporção 1:3 (c) para obtenção do extrato acetoetílico (EMeOH-LM 3370). As extrações ocorreram à temperatura ambiente sob agitação de 200 rpm, sendo os extratos concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida a 50 °C.

O extrato metanólico de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3370 foi diluído em água destilada e particionado com *n*-hexano, acetato de etila e 2-butanol nas proporções de 1:3 para obter as fases hexânica (FHex), acetoetílica (FAcOEt) e butanólica (FBuOH). Os extratos particionados foram concentrados em rotaevaporador a 50 °C e as fases aquosas provenientes de cada partição a 100 °C para obtenção das fases: FH_2O I, FH_2O II e FH_2O III.

A fase butanólica (FBuOH) foi fracionada utilizando cromatografia em coluna *flash* (26,5 x 2,6 cm) sobre gel de sílica (230 – 400 Mesh), na fase estacionária e, uma fase móvel gradiente $CHCl_3$:MeOH (9:1, 8:2, 7:3, v/v) e MeOH. As frações que apresentaram um perfil semelhante foram reunidas, sendo obtidas três frações: EB eluída no sistema $CHCl_3$:MeOH (9:1, v/v); EB2 eluída no sistema $CHCl_3$:MeOH (8:2 e 7:3, v/v); e EB3M em MeOH. Essas frações foram concentradas em rotaevaporador a 50 °C e reavaliadas. Observou-se que a fração EB2 quando dissolvida em CH_2Cl_2:MeOH (1:1,

v/v) formou um precipitado branco, denominado EB2B que foi separado do dissolvido, denominado EB2A. Esses extratos foram novamente concentrados (Figura 12).

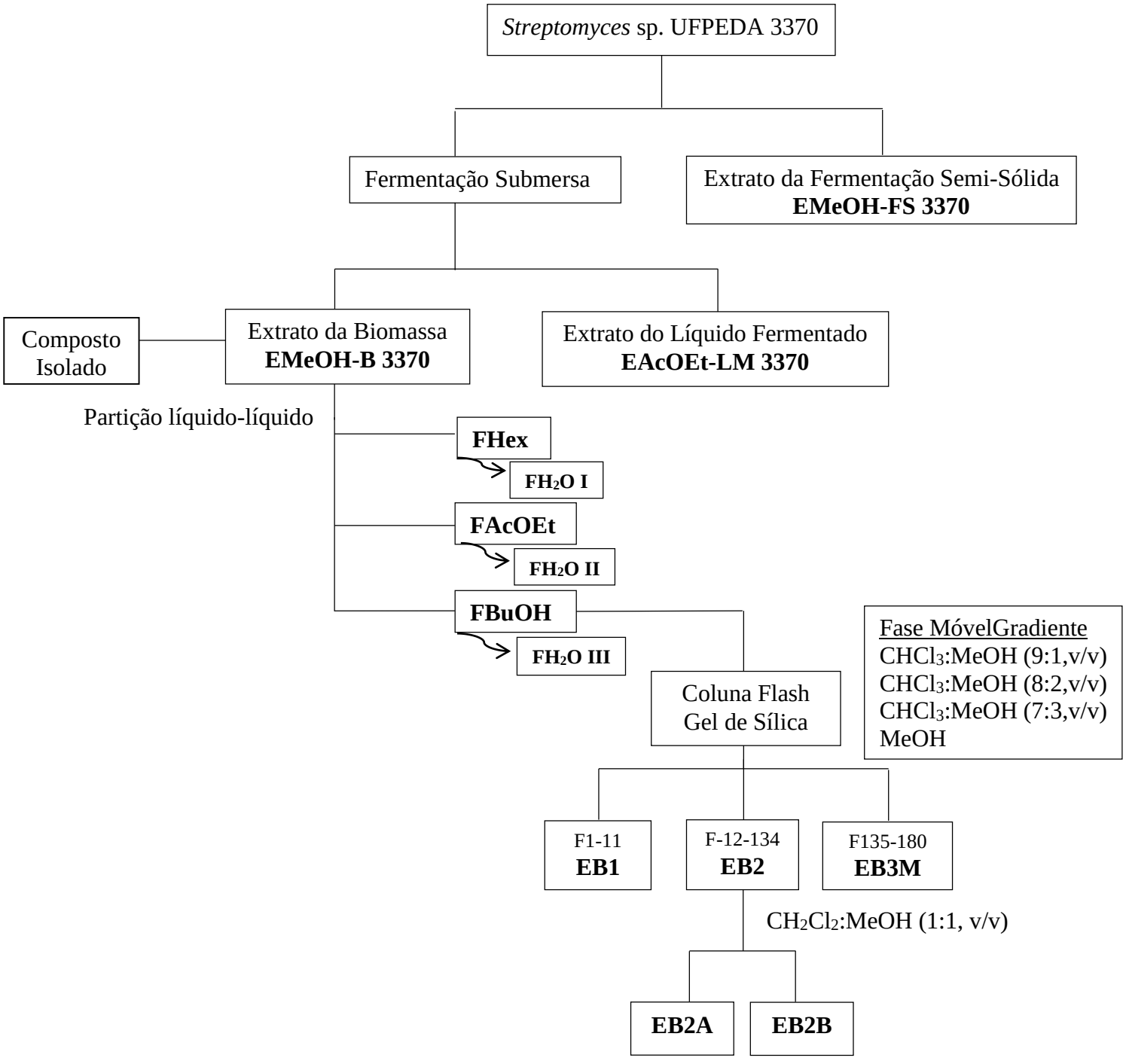


Figura 12. Fluxograma para obtenção do extrato metanólico da biomassa (EMeOH-B 3370) de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3370 em fermentação submersa, composto isolado, partição líquido-líquido com 2-butanol (FBuOH) e frações da fase butanólica (EB1, EB2A, EB2B e EB3M).

Obtenção do Composto

O extrato metanólico da biomassa de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3370 depois de resfriado a 4 °C por 12 h formou alguns precipitados brancos que foram filtrados com papel de filtro qualitativo. A elucidação da estrutura química desse composto (Figura 12) foi realizada através de métodos espectroscópicos (IV, UV, RMN uni- e bi-dimensional).

4.3.2. Fermentação Semi-Sólida

O inóculo foi obtido pelo cultivo de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3370, *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405, *Streptomyces* sp. UFPEDA 3412 e *Streptomyces* sp. UFPEDA 3413 em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio ISP-2 líquido com inoculação de 20 blocos de gelose de 10 mm de diâmetro retirados do crescimento em forma de tapete da linhagem em ISP-2 ágar, cultivada por 14 dias a 30 °C, e submetidos à agitação por 48 h (200 rpm, 30 °C). Para fermentação, 10 mL do inóculo foi adicionado em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 90 g de arroz parboilizado cozido (obtido comercialmente) incubado por 21 dias a 30 °C.

Ao fermentado semi-sólido foi adicionado 150 mL de metanol e deixados por 48 h a 30 °C. Em seguida, o extrato foi filtrado e adicionado mais 100 mL de metanol por 24 h a 30 °C. O extrato foi novamente filtrado e concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida a 50 °C.

O extrato metanólico de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405 (EMeOH 3405) foi diluído em água destilada e particionado com *n*-hexano, acetato de etila e 2-butanol nas proporções de 1:3 para obter as fases hexânica (FHex), acetoetílica (FAcOEt) e butanólica (FBuOH). As fases orgânicas foram concentradas em rotaevaporador a 50 °C e as fases aquosas a 100 °C para obtenção das fases: FH_2O I, FH_2O II e FH_2O III (Figura 13).

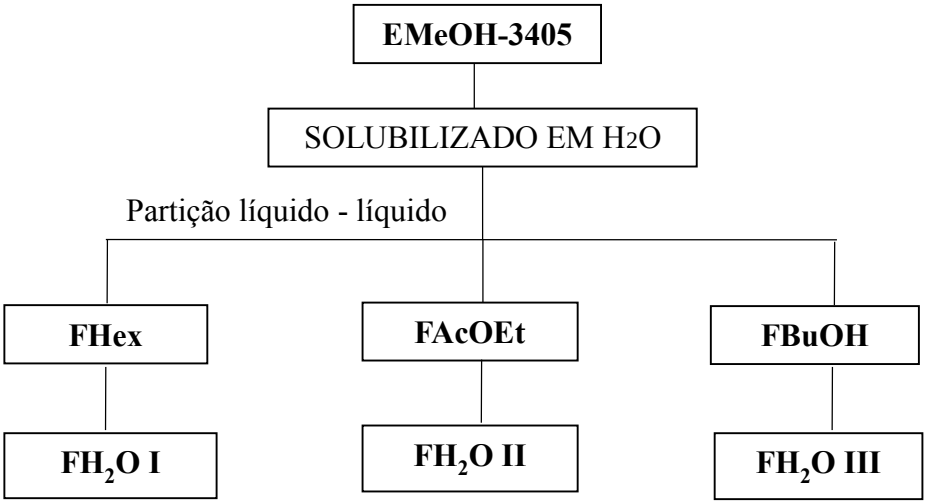


Figura 13. Fluxograma para obtenção das fases do extrato metanólico (EMeOH-3405) do fermentado de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405. FHex: Fase hexânica; FAcOEt: Fase acetoetílica; FBuOH: Fase butanólica; FH_2O I: Fase aquosa I; FH_2O II: Fase aquosa II; FH_2O III: Fase aquosa III.

4.4. PROSPECÇÃO QUÍMICA E TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

Alíquotas de 10 µL dos extratos e fases foram analisados por CCD em cromatofolhas de alumínio TLC contendo Sílica Gel 60 F_{254} (Merck) para identificação das classes de metabólitos secundários: alcalóides, açúcares redutores, compostos fenólicos, flavonoides, taninos, triterpenos - esteróides e saponinas. Foram empregadas diversas fases móveis e reveladores específicos (HARBORNE, 1998).

O teor de fenólicos totais foi determinado de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (modificado de Singleton and Rossi, 1965), empregando-se o ácido gálico como composto fenólico padrão. Os extratos e fases foram solubilizados em EtOH com concentração final de 1 mg/mL. Uma alíquota de 30 µL de cada amostra foi transferida para a placa de 96 poços, seguido da adição de água, carbonato de sódio 15% m/v e o reativo de Folin-Ciocalteu, resultando na concentração final de 100 µg/mL. Após 2 h, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro a 760 nm. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de fenólicos totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com soluções do padrão de ácido gálico e expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g).

4.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1. Método DPPH

A atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams et al. (1995). Através de triagem preliminar, os extratos e fases foram preparados em concentrações variando de 0,1 a 5 mg/mL foram transferidas para placas de 96 poços e adicionada a solução de DPPH (23,6 µg/mL em EtOH). O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. Após 30 min de agitação ao abrigo da luz, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 517 nm. A atividade sequestradora (AS%) foi expressa em percentual de acordo com a equação: AS% = 100 x [(Abs controle – Abs amostra) / Abs controle]. O valor de CE_{50} é a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% do radical livre de DPPH.

4.5.2. Método ABTS

O radical catiônico $ABTS^{+}$ foi formado pela reação de 2,45 mM de persulfato de potássio com 7 mM de 2,2 azinobis-(3-etilbenzotiazolina 6-ácido sulfônico), armazenado no escuro, à temperatura ambiente, durante 16 h. Uma vez formado, o radical $ABTS^{+}$ foi diluído em etanol até obter-se uma medida com absorbância de 0,70 ± 0,05 em comprimento de onda de 754 nm. Em 980 µL da solução contendo o radical foram adicionados 20 µL dos extratos e fases (1 mg/mL), agitando-se por 20 seg. Após 6 min da reação ao abrigo da luz, a absorbância foi medida (RE et al., 1999). O Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8 tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) foi utilizado como padrão nas concentrações de 0; 500; 1000; 1500; 2.000 e 2500 mM em etanol. Os resultados foram expressos em µM de CAET (capacidade antioxidante equivalente em Trolox) por grama do extrato e em porcentagem de inibição oxidativa.

4.5.3. Método do Fosfomolibidênio

Esta técnica baseia-se na determinação espectrofotométrica da redução do Mo^{+6} a Mo^{+5}, com subsequente formação de um complexo fosfato-Mo^{+5} (PRIETO et al., 1999). Alíquotas de 0,1 mL dos extratos e fases (1 mg/mL) foram dissolvidos em água destilada e acrescidas de 1 mL da solução reagente (ácido sulfúrico 600 mM, fosfato de sódio 28

mM e molibdato de amônio 4 mM). As amostras foram mantidas em tubos fechados e incubados a 95 °C por 90 min. Após resfriamento à temperatura ambiente, foi determinada a absorbância a 695 nm. A atividade antioxidante total foi expressa em relação ao ácido ascórbico e calculada pela fórmula: AAT% = (Abs amostras – Abs branco) x 100 / (Abs ácido ascórbico – Abs branco).

4.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.6.1. Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana foram provenientes da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA) (Tabela 2).

Tabela 2. Micro-organismos testes utilizados na atividade antimicrobiana.

Bactérias Gram-positivas	**Bactérias Gram-negativas**
Staphylococcus aureus UFPEDA 02	*Escherichia coli* UFPEDA 224
Staphylococcus aureus UFPEDA 663*	*Escherichia coli* UFPEDA 64
Staphylococcus aureus ORSA UFPEDA 700*	*Escherichia coli* UFPEDA 261
Staphylococcus aureus UFPEDA 705*	*Escherichia coli* UFPEDA 262
Staphylococcus aureus ORSA UFPEDA 707*	*Serratia marcescens* UFPEDA 352
Staphylococcus aureus ORSA UFPEDA 709*	*Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396
Staphylococcus aureus ORSA UFPEDA 718*	*Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416
Bacillus subtilis UFPEDA 86	
Micrococcus luteus UFPEDA 100	
Enterococcus faecalis UFPEDA 138	
Bactéria Álcool-Ácido Resistente	
Mycobacterium smegmatis UFPEDA 71	
Leveduras	**Fungos Filamentosos**
Candida albicans UFPEDA 1007	*Aspergillus niger* UFPEDA 2003
Candida krusei UFPEDA 1002	*Colletotrichum* sp. UFPEDA 2561
Malassezia furfur UFPEDA 1320	*Colletotrichum* sp. UFPEDA 2562

* Isolados Clínicos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco: *S. aureus* UFPEDA 663 (Ponta de cateter), *S. aureus* UFPEDA 700 (Secreção de úlcera), *S. aureus* UFPEDA 705 (Ferida operatória), *S. aureus* UFPEDA 707 (Secreção traqueal), *S. aureus* UFPEDA 709 (Exsudato purulento), *S. aureus* UFPEDA 718 (Secreção traqueal), *P. aeruginosa* UFPEDA 64 (Secreção peniana), *P. aeruginosa* UFPEDA 261 (Ferida operatória), *P. aeruginosa* UFPEDA 262 (Secreção de úlcera).

4.6.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Bactericida e Fungicida (CMB e CMF)

A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) foi realizada através da técnica de microdiluição, em placas de 96 poços, conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008; CLSI, 2010). Os extratos e fases foram testados em concentrações variando de 0,15 a 5 mg/mL. A concentração mínima bactericida (CMB) e a concentração mínima fungicida (CMF) foram determinadas pela subcultura dos poços da CMI em placa de Petri contendo o meio sólido BHI, MH ou SAB, incubada a 37 °C por 18-24 h para bactérias e a 30 °C por 48 h para levedura.

4.7. ATIVIDADE CITOTÓXICA

4.7.1. Células Tumorais

As linhagens de células utilizadas foram HEp-2 (carcinoma epidermóide de laringe), HT-29 (câncer de cólon), SKBR-3 e MCF-7 (câncer de mama), NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão), HL-60 (leucemia promielocítica aguda), K-562 (leucemia mielocítica crônica), K-562 LUCENA (leucemia mielocítica crônica resistente a vincristina) e MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda) obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 nM de L-glutamina a 37 °C com 5% de CO_2.

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (10^5 células/poço para células aderidas e $0{,}3x10^6$ células/poço para células em suspensão). Após 24 h, os extratos e fases foram adicionados aos poços em concentração única (50 µg/mL). Os extratos e/ou frações que inibiram o crescimento celular acima de 70% em mais de três linhagens utilizando a concentração de 50 µg/mL, foram submetidos ao teste de citotoxicidade em várias concentrações (0,00019 - 50 µg/mL) para obtenção da CI_{50} (concentração da amostra que inibe 50% do crescimento celular). A doxorrubicina (0,009 - 5 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Após 72 h de incubação com os produtos, foi adicionado em cada poço 25 µL de MTT (5 mg/mL). Após 3 h, o meio de cultura com o excesso de MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço para a dissolução dos cristais de

formazan (ALLEY et al., 1988). A absorbância foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

4.7.2. Células Mononucleares do Sangue Periférico Humano (PBMCs)

As células PBMC (linfócitos e monócitos) foram obtidas a partir de 3 mL de sangue periférico de voluntários saudáveis, acrescida de 5 mL de PBS. O experimento foi realizado de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº 61757616.0.0000.508). As etapas até o isolamento incluíram a adição de 3 mL de Ficoll Histopaque-1077, seguida por 30 min de centrifugação a 1500 rpm e aspiração das células mononucleares presentes na região intermediária entre as células vermelhas e o soro. A suspensão de linfócitos foi transferida para outro tubo ao qual foi adicionado PBS até o volume de 11 mL e centrifugado por 20 min a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de linfócitos ressuspendido em 2 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina, 100 μg/mL estreptomicina para uma concentração final de final 10^6 células/mL. A proliferação de linfócitos foi induzida pela adição de 3% de fitohemaglutinina, um mitógeno que atua sobre os linfócitos T (LIU et al., 2004).

Para determinar a citotoxicidade com PBMCs, os extratos e fases foram adicionados às culturas de células na placa de 96 poços em concentrações seriadas (0,39 - 50 μg/mL). Após 48 h de incubação dos produtos a 37 °C com atmosfera de 5% de CO_2 e 95% de umidade, adicionou-se10 μL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue. A microplaca foi reincubada durante 24 h e as absorbâncias medidas no espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) (AHMED et al.,1994).

4.8. ATIVIDADE HEMOLÍTICA

O ensaio hemolítico foi realizado com sangue periférico de voluntários saudáveis de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº 61757616.0.0000.508). Os eritrócitos foram lavados com solução salina (NaCl 0,85% + $CaCl_2$ 10 mM) por centrifugação (3000 rpm, 5min), o sobrenadante foi descartado e o precipitado

ressuspendido em solução salina para se obter uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Esse experimento foi realizado em placas de 96 poços: 100 µL de solução salina (controle negativo); 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo (branco); 80 µL de solução salina + 20 µL de Triton X – 100 a 1% (controle positivo); 100 µL de solução salina + 100 µL dos extratos e fases que apresentaram citotoxicidade em células tumorais (0,01525 a 2000 µg/mL) diluídas em DMSO a 10% foram plaqueados. Em seguida, 100 µL da solução de eritrócitos foram plaqueadas em todos os poços. Após incubação de 1 h, sob agitação constante à temperatura ambiente, a placa permaneceu em repouso por um período de 1 h, onde o sobrenadante foi transferido para outra placa e a absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 540 nm. Amostras com valores de CE_{50} < 200 µg/mL são consideradas hemolíticas (modificado de COSTA-LOTUFO et al., 2002).

4.9. ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO EM CÉLULAS LEUCÊMICAS

4.9.1. Análise Morfológica - Coloração por May-Grunwald-Giemsa

As linhagens de células K-562 e MOLT-4 foram distribuídas em placas de 24 poços nas concentrações 0,3 x 10^6 e 10^6, respectivamente, e incubadas com valores da CI_{50}, metade da CI_{50} e duas vezes a CI_{50} da elaiofilina. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Após 24 h de incubação, alíquotas de 50 µL da suspensão de células tratadas e não tratadas com o composto foram adicionadas à centrifuga de lâminas (Cytospin). Após a adesão das células na lâmina, a fixação foi feita com metanol durante 1 min, seguida da coloração por May-Grunwald-Giemsa. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Leica DM500 para avaliar as características morfológicas das células e compará-las ao controle (grupo não tratado). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia em microscopia óptica.

4.9.2. Análise por Citometria de Fluxo

As linhagens de células K-562 e MOLT-4 foram distribuídas em placas de 24 poços nas concentrações 0,3x10^6 e 10^6, respectivamente, e incubadas com a elaifilina nas concentrações da CI_{50}, metade da CI_{50} e duas vezes a CI_{50}. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Após 24 h de incubação, as células foram incubadas com Triton

(0,1%) e iodeto de propídio (10 µg/mL) para a análise da fragmentação de DNA e ciclo celular, *Annexin Red Kit* para o ensaio da externalização da fofatidilserina, e solução de rodamina (1 µg/mL) para despolarização mitocondrial. Todas as análises de fluxo foram realizadas por citometria utilizando o Guava EasyCyteHT (Merck-Millipore) e software GuavaSoft 2.7. Cinco mil eventos foram avaliados por experimento.

4.10. TOXICIDADE AGUDA

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas procedentes do Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE, com faixa etária de 60 dias, pesando 25±5g, separados em quatro grupos de três animais por gaiola. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente 23 ± 2ºC sob o ciclo claro/escuro, com água e alimento a vontade durante o experimento. Os grupos testes receberam, por via oral, a fração EB1 na dose de 2000 mg/kg (grupo tratado), fração EB1 na dose de 300 mg/kg (grupo tratado), EMeOH-3405 na dose de 2000 mg/kg (grupo tratado) e solução fisiológica a 0,9 % (grupo controle). Após a administração, os animais foram observados nas primeiras horas e depois a cada 24 h diariamente (OECD, 2001). Em seguida utilizou-se o método de *screening* hipocrático, o qual examina aspectos importantes dos animais como: o estado de consciência, disposição, atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular, atividade do sistema nervoso central e autônomo. Também foi observado o consumo de água, ração e peso dos animais. No 14º dia, foi coletado sangue por punção cardíaca dos animais devidamente anestesiados. Para avaliação dos possíveis efeitos tóxicos sistêmicos, os órgãos (fígado, rins e baço) foram extirpados e seus índice calculado seguindo a fórmula: Índice = Peso do órgão (g) / Peso do animal (g). O protocolo utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº. 23076.023704/2014-86).

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A CE_{50} da atividade antioxidante foi calculada a partir de regressão não linear no programa *GraphPad Prism* 5.0, onde cada amostra foi testada em triplicata. A atividade antimicrobiana foi realizada em triplicata e o resultado expresso pela média ± desvio padrão. Os valores da CI_{50} e CE_{50} da citotoxicidade e atividade hemolítica, respectivamente, com seus intervalos de confiança de 95% foram calculados a partir da

regressão não linear, utilizando o software *GraphPad Prism* 5.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos usando ANOVA uma via seguido pelo teste de Tukey`s ou de Dunnett, onde cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes. Para toxicidade aguda, os valores foram expressos como média ± SEM ($n = 5$ para cada grupo). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos usando ANOVA uma via seguido pelo teste de Bonferroni.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS

Streptomyces sp. UFPEDA 3370 cresceu em meios suplementados arginina e extrato de levedura (ALA), triptona e extrato de levedura (ISP-1), extrato de malte e levedura (ISP-2), farinha de aveia (ISP-3), sais inorgânicos e amido (ISP-4). Observou-se uma formação abundante de micélio aéreo nestas condições. Não houve produção de pigmento melanóide nos meios de peptona e extrato de ferro (ISP-6) ou tirosina (ISP-7).

Na análise micromorfológica de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3370 foram observadas hifas com filamentos ramificados e espiralados com a superficie dos esporos ondeada (Figura 14) característica típica do gênero *Streptomyces*. A identificação da cepa foi confirmada pelo tipo de ácido diaminopimélico (DAP) presente na parede celular do micro-organismo, através da cromatografia em camada delgada, onde apresentou o isômero LL-DAP, característica do gênero *Streptomyces*.

A linhagem *Streptomyces* sp. UFPEDA 3370 foi capaz de utilizar como única fonte de carbono D-frutose, D-galactose, D-manose, D-xilose, lactose, L-arabinose, L-ramnose, maltose, manitol, raffinose e sacarose, não sendo capaz de consumir D-melezitose e trealose. As fontes de nitrogênio utilizadas foram cisteína, histidina, serina, treonina e valina, não sendo capaz de consumir fenilalanina e L-metionina. A linhagem foi capaz de crescer em concentrações de NaCl que variaram de 2 a 12%, sendo o crescimento diminuído em concentrações mais elevadas desse sal. Apresentou crescimento em temperaturas de 30 a 45 $^{\circ}$C, crescimento em pH de 5 a 9 e sensibilidade aos antibióticos amicacina, ciproploxacina, cloranfenicol, imipenem, estreptomicina, tetraciclina e vancomicina.

A análise da sequência quase completa do gene 16S do DNAr (1370 pb) mostrou que *Streptomyces* sp. UFPEDA 3370 está intimamente relacionado com *Streptomyces hygroscopicus* S75-5, apresentando 99% de similaridade (Figura 15).

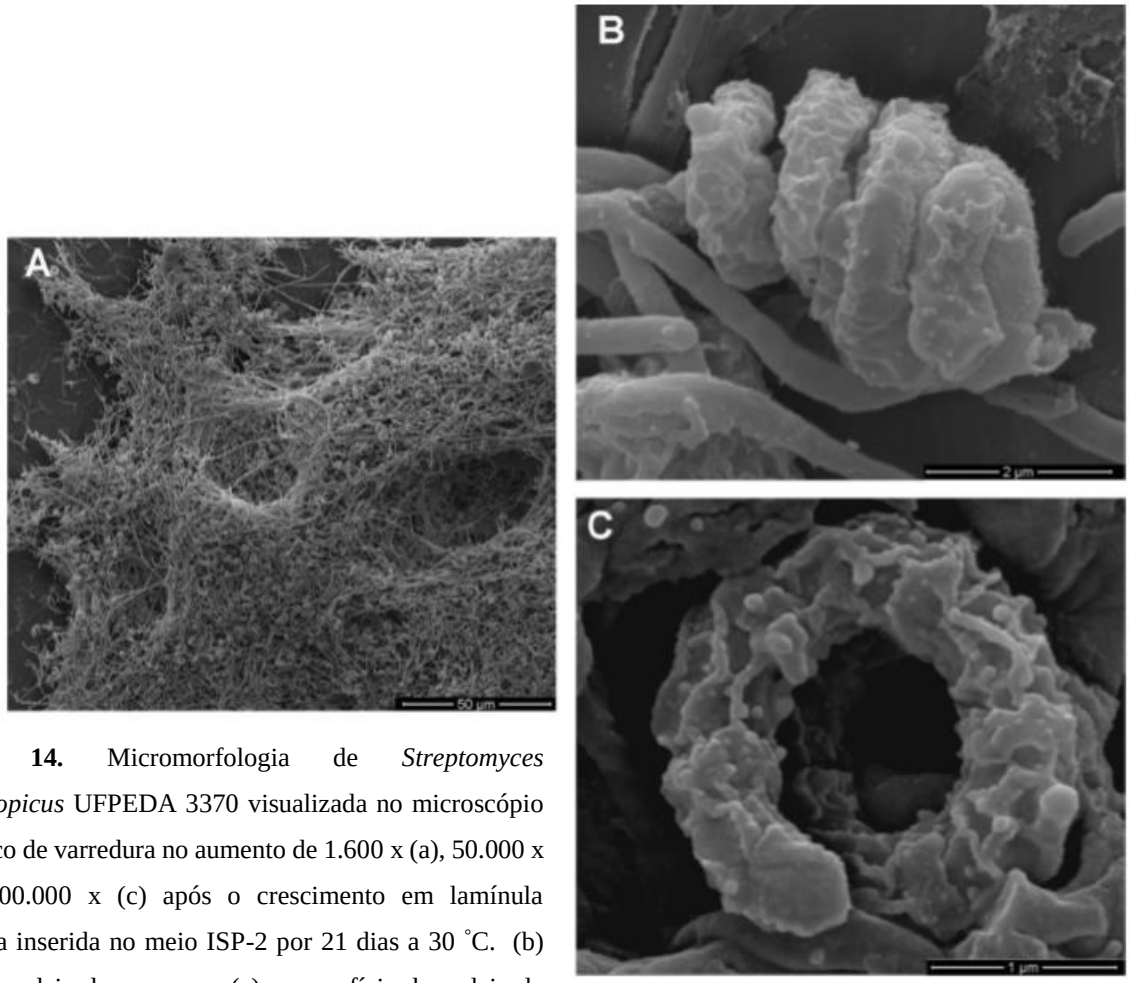


Figura 14. Micromorfologia de *Streptomyces hygroscopicus* UFPEDA 3370 visualizada no microscópio eletrônico de varredura no aumento de 1.600 x (a), 50.000 x (b) e 100.000 x (c) após o crescimento em lamínula inclinada inserida no meio ISP-2 por 21 dias a 30 ˚C. (b) indica a cadeia de esporos e (c) a superfície da cadeia de esporos.

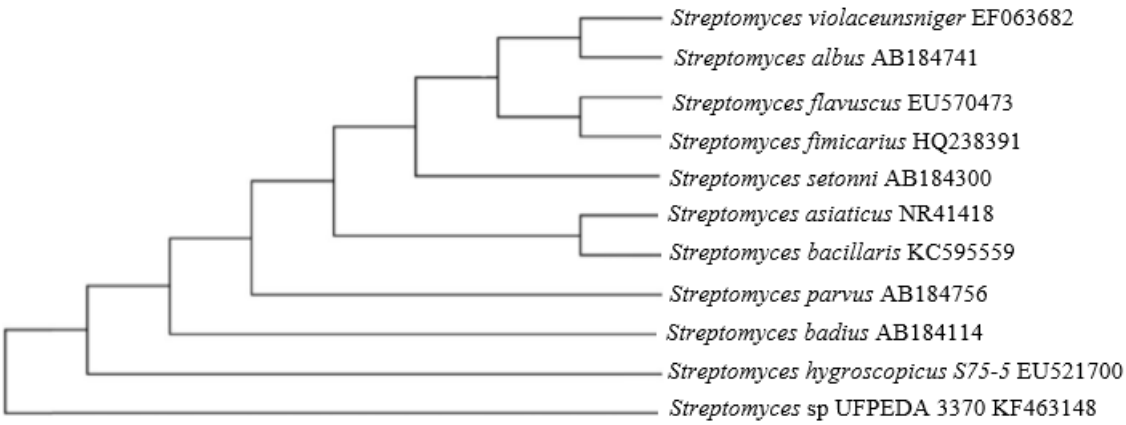


Figura 15. Árvore filogenética baseada em uma seqüência parcial do 16S DNAr, mostrando as relações entre *Streptomyces* sp. UFPEDA 3370 e outras espécies de *Streptomyces*. Divergência da sequência de barras de 0,2%.

A linhagem *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405 apresentou excelente crescimento no meio suplementado com farinha de aveia (ISP-3), sais inorgânicos e amido (ISP-4). *Streptomyces* sp. UFPEDA 3412 teve excelente crescimento no meio suplementado com extrato de malte e levedura (ISP-2), ISP-3, ISP-4, glicerol e asparagina (ISP-5), enquanto, *Streptomyces* sp. UFPEDA 3413 cresceu apenas no meio ISP-2 com formação de micélio aéreo abundante. Não houve produção de pigmentos melanóides nos meios peptona e extrato de ferro (ISP-6) e tirosina (ISP-7) (Tabela 3).

Na análise micromorfológica foram observadas hifas com filamentos ramificados e espiralados com a superfície dos esporos ondeada (Figura 16) característica típica do gênero *Streptomyces*.

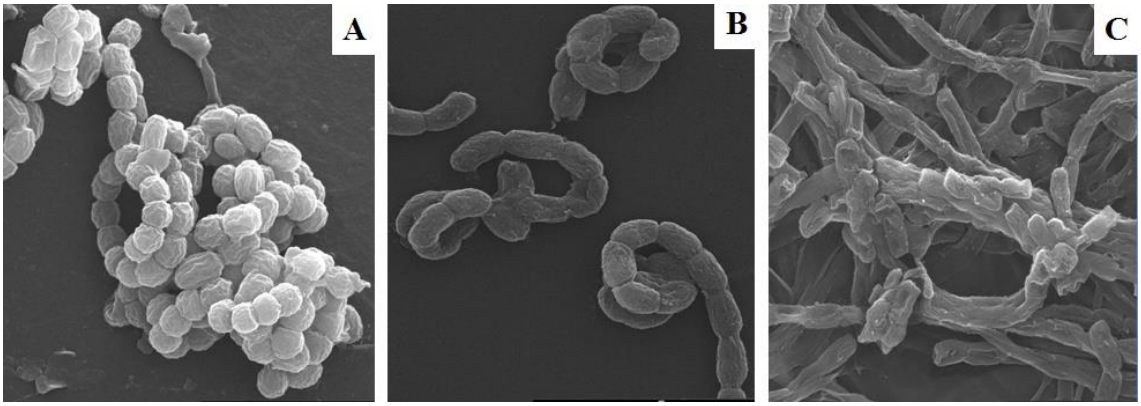


Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura dos esporos de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405 (A), *Streptomyces* sp. UFPEDA 3412 (B) e *Streptomyces* sp. UFPEDA 3413 (C), visualizadas no aumento de 20.000 x.

As linhagens foram capazes de utilizar todas as fontes de carbono (Tabela 4). *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405 foi capaz de utilizar como fonte de nitrogênio apenas histidina, cresceu em concentrações de NaCl que variaram de 2 a 12% e teve crescimento menor em concentrações mais elevadas desse sal. Esta cepa apresentou crescimento em temperaturas de 30 a 45 ˚C, não apresentando sensibilidade aos antibióticos ampicilina, amoxicilina, azitromicina, cefuroxina, norfloxacina, oxacilina e penicilina (Tabela 4).

Streptomyces sp. UFPEDA 3412 foi capaz de utilizar como fonte de nitrogênio arginina, histidina, treonina e valina, foi capaz de crescer em concentrações de NaCl que variaram de 2 a 12%, em temperaturas de 30 a 45 ˚C, e não apresentou sensibilidade aos antibióticos amoxicilina, cefuroxina, clidamicina, norfloxacina, oxacilina e penicilina, conforme tabela 4.

Tabela 3. Características culturais de *Streptomyces* spp. em diferentes meios ISP.

		***Streptomyces* sp. UFPEDA 3405**	***Streptomyces* sp. UFPEDA 3412**	***Streptomyces* sp. UFPEDA 3413**
Características culturais				
ISP-1	C	+	+	+
	MA	Branco	Amarelo claro	Amarelo claro
	MS	Amarelo claro	Amarelo claro	Amarelo claro
	DP	-	-	-
ISP-2	C	++	+++	+++
	MA	Branco	Cinza escuro	Cinza claro
	MS	Amarelo	Laranja	Cinza escuro
	DP	-	-	-
ISP-3	C	+++	+++	++
	MA	Marrom	Marrom	Cinza
	MS	Cinza	Cinza	Amarelo esverdeado
	DP	-	-	-
ISP-4	C	+++	+++	+
	MA	Marrom claro	Marrom	Amarelo
	MS	Marrom escuro	Marrom escuro	Cinza claro
	DP	-	-	-
ISP-5	C	++	+++	+
	MA	Branco	Marrom	Cinza
	MS	Amarelo	Laranja	Amarelo
	DP	-	-	-
ISP-6	C	+	+	+
	MA	Amarelo	Amarelo	Amarelo
	MS	Amarelo	Amarelo	Amarelo
	DP	-	-	-
ISP-7	C	+++	++	++
	MA	Cinza calro	Branco acinzentado	Marrom avermelhado
	MS	Marrom escuro	Marrom	Marrom
	DP	-	-	-

C: Crescimento; MA: Cor do micélio aéreo; MS: Cor do micélio no substrato;

DP: Difusão de pigmento no meio; + Positivo; ++ Bom; +++ Excelente; - Negativo

Streptomyces sp. UFPEDA 3413 foi capaz de utilizar como fonte de nitrogênio apenas L-metionina, sendo capaz de crescer em concentrações de NaCl que variaram de 2 a 12%, em temperaturas de 30 a 45 °C, não apresentando sensibilidade aos antibióticos norfloxacina, oxacilina, penicilina, rifampicina e tetraciclina (Tabela 4).

Com base na caracterização cultural, micromorfológica, bioquímica e resistência aos antibióticos, as linhagens isoladas do solo da rizosfera de *Paullinia cupana* (Kunth) var. sorbilis (Mart.) Ducke, Amazonas-Brasil, pertencem ao gênero *Streptomyces*. Essse gênero pertence à família Streptomycetaceae, subordem Streptomycineae, ordem Actinomicetales, subclasse Actinobacteridae, classe Actinobactéria, filo Actinobactéria, domínio Bactéria e apresenta o maior número de espécies descritas. *Streptomyces* foi descrito pela primeira vez por Ferdinand Conh em 1875 que observou na microscopia colônias com micélio em forma de cabelo enrolado denominando a espécie de *Streptotrix foersteri*. No solo, este gênero produz compostos voláteis como o geosmim que dá ao solo o cheiro característico de terra molhada (DREWS, 1999).

Assim como nesse estudo, Silva e colaboradores (2012) identificaram a presença do gênero *Streptomyces* em amostras do solo da região de Maués – Amazonas-Brasil ao estudarem o efeito da variação das condições de cultivo sobre a produção de antibióticos. *S. owasiensis* e *Streptomyces* sp. DPUA 1576 foram isolados de líquens do Amazonas com capacidade de produzir enzimas quitinase termoestável interessante para indútria farmacêutica e protease com atividade fibrinolítica (NASCIMENTO et al., 2014; SILVA et al., 2015). Apesar da região Amazônica ter uma biodiversidade imensa, grande parte de suas espécies e suas relações filogenéticas são desconhecidas, principalmente no que diz respeito a diversidade microbiológica e suas interações com outros seres (SOUZA et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2014).

Estudos anteriores demonstraram que *S. hygroscopicus* produz uma variedade de antibióticos pertencentes a diferentes classes com estrutura distinta e propriedades biológicas, tais como atividades antimicrobianas e antitumorais. Muitos desses antibióticos são compostos patenteados (ANZAI et al., 2008; GESHEVA, 2009). De acordo com um estudo de Rong e Huang (2012), aproximadamente 650 tipos de substâncias bioativos são produzidas por *S. hygroscopicus* e espécies a ela relacionada. Membros desse clado continuam sendo um dos principais objetos de triagem de novas substâncias bioativas para combater a propagação de patógenos resistentes aos antibióticos e para o desenvolvimento de novos pesticidas com resíduos não-tóxicos ou de baixa toxicidade.

Tabela 4. Características bioquímicas, fisiológicas e resistência aos antibióticos de *Streptomyces* spp.

	***Streptomyces* sp. UFPEDA 3405**	***Streptomyces* sp. UFPEDA 3412**	***Streptomyces* sp. UFPEDA 3413**
Características bioquímicas			
Fontes de carbono	+	+	+
Celobiose	+	+	+
D-melezitose	+	+	+
D-xilose	+	+	+
Lactose	+	+	+
L-arabinose	+	+	+
L-raminose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Manitol	+	+	+
Sacarose	+	+	+
Fontes de nitrogênio			
Arginina	-	+	-
Cisteina	-	-	-
Fenilalanina	-	-	-
Histidina	+	+	-
L-metionina	-	-	+
Serina	-	-	-
Treonina	-	+	-
Valina	-	+	-
Características fisiológicas			
NaCl%			
2%	+++	+	+
5%	+++	+	+
7%	+++	+	+
9%	++	+	+
12%	+	+	+
Temperatura			
30 °C	+	++	++

37 °C	+	++	++
45 °C	-	++	++
Resistência a antibióticos			
Amicacina	28,7 ± 1,2	25,3 ± 0,6	21,3 ± 2,1
Ampicilina	-	8,7 ± 0,6	15,5 ± 0,7
Amoxicilina	-	-	14,5 ± 0,7
Azitromicina	-	34,5 ± 0,7	31,5 ± 0,7
Cefalotina	10,0 ± 0,0	10,7 ± 0,6	22,0 ± 1,7
Cefuroxima	-	-	20,0 ± 0,0
Ciprofloxacina	20,3 ± 1,5	22,0 ± 1,0	20,0 ± 0,0
Clidamicina	9,5 ± 0,7	-	10,5 ± 0,7
Cloranfenicol	10,0 ± 0,0	44,7 ± 1,5	17,0 ± 1,4
Estreptomicina	35,3 ± 1,5	27,3 ± 0,6	21,0 ± 0,0
Gentamicina	35,7 ± 0,6	21,5 ± 1,5	14,5 ± 0,7
Imipenem	27,0 ± 0,0	25,0 ± 0,0	32,0 ± 1,7
Norfloxacina	-	-	-
Oxacilina	-	-	-
Penicilina	-	-	-
Rifampicina	13,7 ± 0,6	14,7 ± 0,6	-
Tetraciclina	15,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	-

+Positivo; ++ Bom; +++ Excelente; - Negativo

5.2. FERMENTAÇÃO, EXTRAÇÃO, PARTIÇÃO E FRACIONAMENTO DOS METABÓLITOS BIOATIVOS

Da fermentação submersa de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370, a biomassa foi separada do líquido fermentado e extraída com metanol para se obter o EMeOH-B 3370 (rendimento de 3,32%). Enquanto, apartir do líquido fermentado extraído com acetato de etila foi possivel obter o EMeOH-LM 3370 (rendimento de 0,05%) (Figura 12).

Aproximadamente 0,5 g do extrato metanólico da biomassa (EMeOH-B 3370) de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 foi escolhido para ser particionado porque apresentou melhor atividade antimicrobiana e citotóxica (ver Tabelas 10 e 16). A partição líquido-líquido com *n*-hexano apresentou um rendimento de 4% para fase FHex, quando

particionado com acetato de etila, 2% FAcOEt e, 2-butanol, 66% FBuOH. A fase butanólica (FBuOH) apresentou bom rendimento e atividades antimicrobiana e citotóxica promissoras (ver Tabela 11 e 18), sendo selecionado para fracionamento em cromatografia em coluna *flash*. Cerca de 1,3 g desse extrato fracionado resultou em quatro frações: EB1, EB2A, EB2B e EB3M que representam respectivamente um rendimento de 22; 9,75; 0,09 e 24% (Figura 12).

Da fermentação semi-sólida com arroz parbolizado de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 foi obtido um extrato metanólico EMeOH-FS 3370 (rendimento de 6,6%) (Figura 12). As outras linhagens de *Streptomyces* cultivadas em meio semi-solido apresentaram os seguintes rendimentos para seus extratos metanólicos: *Streptomyces* UFPEDA 3405 (EMEOH-3405, rendimento de 18,74%), *Streptomyces* UFPEDA 3412 (EMEOH-3412, rendimento de 3,61%) e *Streptomyces* UFPEDA 3413 (EMEOH-3413, rendimento de 11,60%). EMeOH-3405 (0,5 g) foi escolhido para ser particionado porque apresentou o melhor rendimento e melhor atividade citotóxica (ver Tabela 20). A partição desse extrato com *n*-hexano apresentou um rendimento de 0,48% para a fase FHex, quando particionado com acetato de etila, 3,56% para FAcOEt, e 2-butanol, 56,88% para FBuOH (Figura 13).

S. hygroscopicus UFPEDA 3370 apresentou um extrato com rendimento de 6,6% quando cultivado em meio semi-sólido. Ao mesmo tempo que, os extratos EMeOH-3405 e EMeOH-3413 apresentaram percentual de rendimento acima de 10%. Confrontado os resultados obtidos com estudos anteriores, nossos extratos apresentaram boa eficiência produtiva. Um estudo realizado por Selvameenal e colaboradores (2009) utilizando farelo de trigo na fermentação semi-sólida obteve para cada 10 g de farelo de trigo 0,420 g de extrato bruto, isso significa um rendimento de 4,2%. O processo fermentativo semi-sólido costuma apresentar rendimentos melhores que a fermentação submersa, como relatado por Robinson e colaboradores (2001) ao comparar os prós e contras da fermentação semi-sólida com a fermentação submersa. É um método eficiente na obtenção de enzimas, antibióticos e outros produtos bioativos, tendo a vantagem de apresentar meios mais simples de fermentação, uso de menos água e energia quando comparada a fermentação submersa (NILADEVI et al., 2007).

5.3. OBTENÇÃO E ELUCIDAÇÃO DO COMPOSTO

O composto (Figura 17) foi obtido a partir de um preciptado branco do extrato metanólico da biomassa de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 depois de resfriado a 4 ˚C por 12 h, m. p. 179,5-183,5 °C, $[\alpha]^{20}_{D}$ -102 (c 0,1; MeOH). No espectro infravermelho (IR), observou-se uma banda de absorção em 3416 cm^{-1} indicando a presença de grupos hidroxila, bem como uma absorção em 1698 cm^{-1} característica do éster α, β, γ, δ conjugado C=O, em 1638 e 1495 cm^{-1} deformação axial característica de C=C e em 994 cm^{-1}uma flexão fora do plano típica de HC=CH com trans-estereoquímica. A fórmula molecular $C_{54}H_{88}O_{18}$ (11ª da insaturação) foi deduzida por HRMS-MALDI-TOF, que mostrou um pico aduto da molécula de sódio *m/z* 1047,587 [M + Na] + (calc.: 1047,557). O espectro do^{13}C-BB RMN (Tabela 5) exibiu apenas 27 linhas espectrais, metade do número de carbonos indicado na fórmula molecular, sugerindo um composto simétrico e a comparação com o espectro de ^{13}C-DEPT 135 RMN permitiu a identificação de 1 carbonil, 1 dioxi- não hidrogenado, 16 mono-hidrogenado (4 *sp*^{2}, 4 metinos, 7 oxi-metinos e 1 dioxi-metino), 3 metileno e 6 metil carbonos. Comparandoo RMN em 1D e 2D os dados de ^{1}H (1D^{1}H e 2D COSY), ^{13}C (CPD e DEPT), HSQC, HMBC (correlação heteronuclear de ligação múltipla envolvendo dois, ^{2}JCH, e três, ^{3}JCH, ligações, Tabela 5) são dados muito semelhantes a partir de derivados da elaiofilina , identificando o composto em estudo como elaiofilina, incluindo a mesma estereoquímica relativa (Figura 18, 19, 20, 21 22, 23 e 24) (WU et al., 2013).

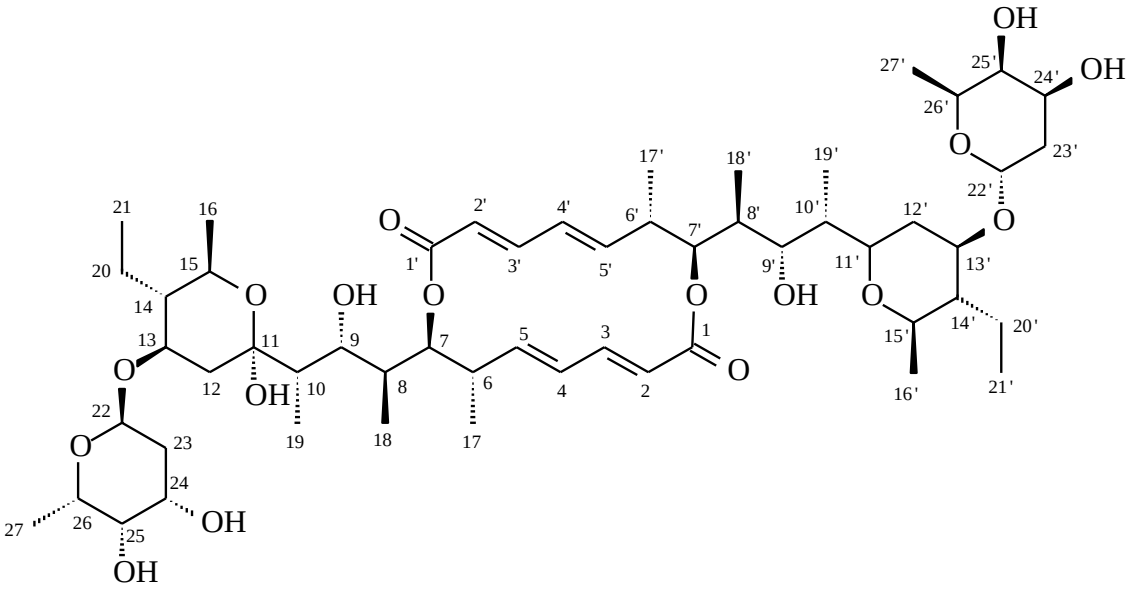


Figura 17. Estrutura molecular da elaiofilina.

Tabela 5. RMN 1D e 2D (DMSO-d_6) atribuições de dados para elaiofilina.

C	**HSQC**		**HMBC (500 Hz/125 Hz)**	
	δ_C (125 MHz)	δ_H (500 MHz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
1/1’	167.10	-	H-2	H-3; H-7’
11/11’	99.18	-	2H-12	H-9; 3H-19
CH				
2/2’	121.32	5.75 (d, 15.4)	H-3	H-4
3/3’	144.79	6.94 (dd, 15.4, 11.1)	H-4	
4/4’	130.56	6.18 (dd, 15.0, 11.1)	H-3	H-2
5/5’	144.79	5.68 (dd, 15.0, 9.8)		H-3; 3H-17
6/6’	40.34	2.59 (m)	H-5; 3H-17	H-4
7/7’	5.83	5.04 (d, 10.0)		H-9; 3H-17; 3H-19
8/8’	36.26	1.94	3H-18	
9/9’	69.43	4.02 (d, 9.4)		3H-18; 3H-19
10/10’	41.14	1.70 (m)	3H-19	
13/13’	68.49	3.96	H-12[a]	H-15; H-22
14/14’	47.98	1.17 (m)	H-15	H-12a; 3H-16; 3H-21
15/15’	65.85	3.95	3H-16	
22/22’	92.56	5.05 (sl)	2H-23	H-24
24/24’	64.93	3.92	2H-23	H-22; 3H-27
25/25’	70.29	3.54 (sl)		H-23b
26/26’	66.40	3.94	3H-27	
CH_2				
12/12’	36.60	2.35 (dd, 12.3, 4.4), 1.94(m)		
20/20’	18.47	1.67 (m), 1.48 (m)		
23/23’	32.67	1.94 (m),1.63 (dd, 12.7, 4.7)		
CH_3				
16/16’	19.15	1.13 (d, 6.1)	H-15	
17/17’	15.49	1.05 (d, 6.6)		H-5
18/18’	9.50	0.87 (d, 6.3)		H-7
19/19’	6.92	0.98 (d, 7.1)	H-10	H-9
21/21’	8.94	0.89 (d, 6.9)		
27/27’	17.06	1.21 (d, 6.5)	H-26	

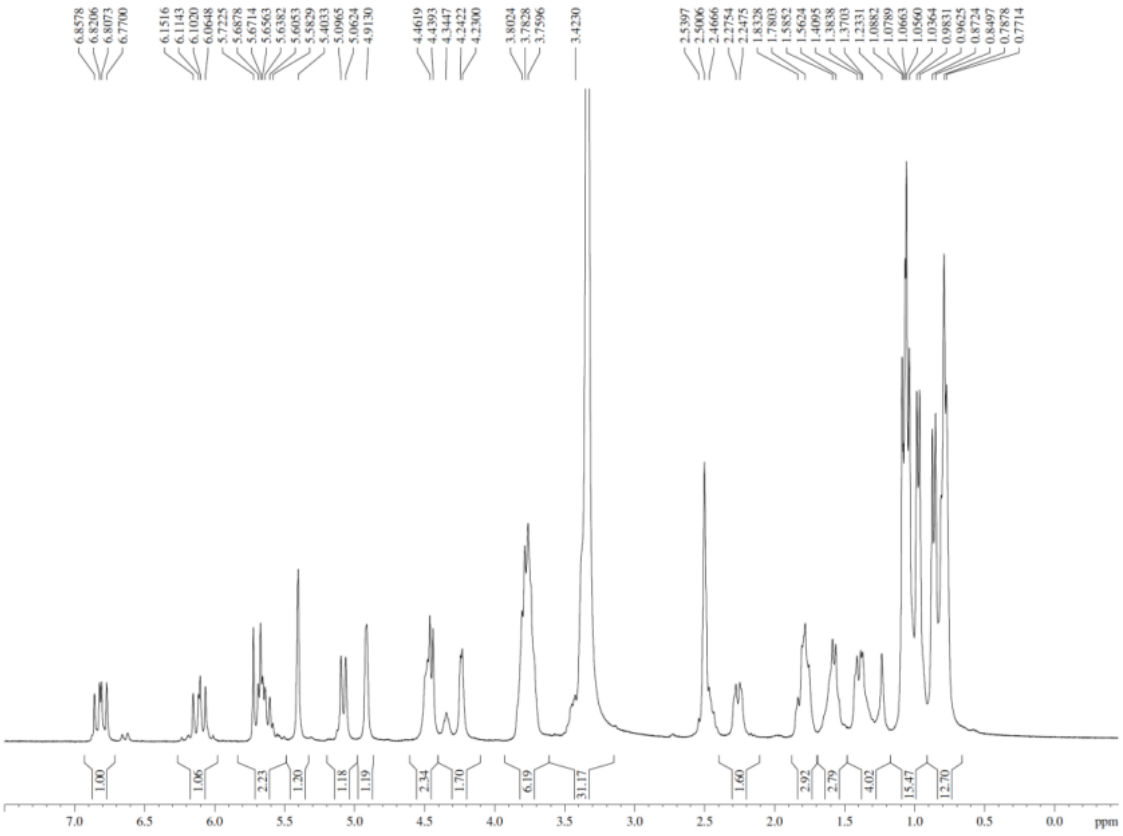


Figura 18. Espectro de ^{1}H NMR da elaiofilina em DMSO-d_6, 500 MHz.

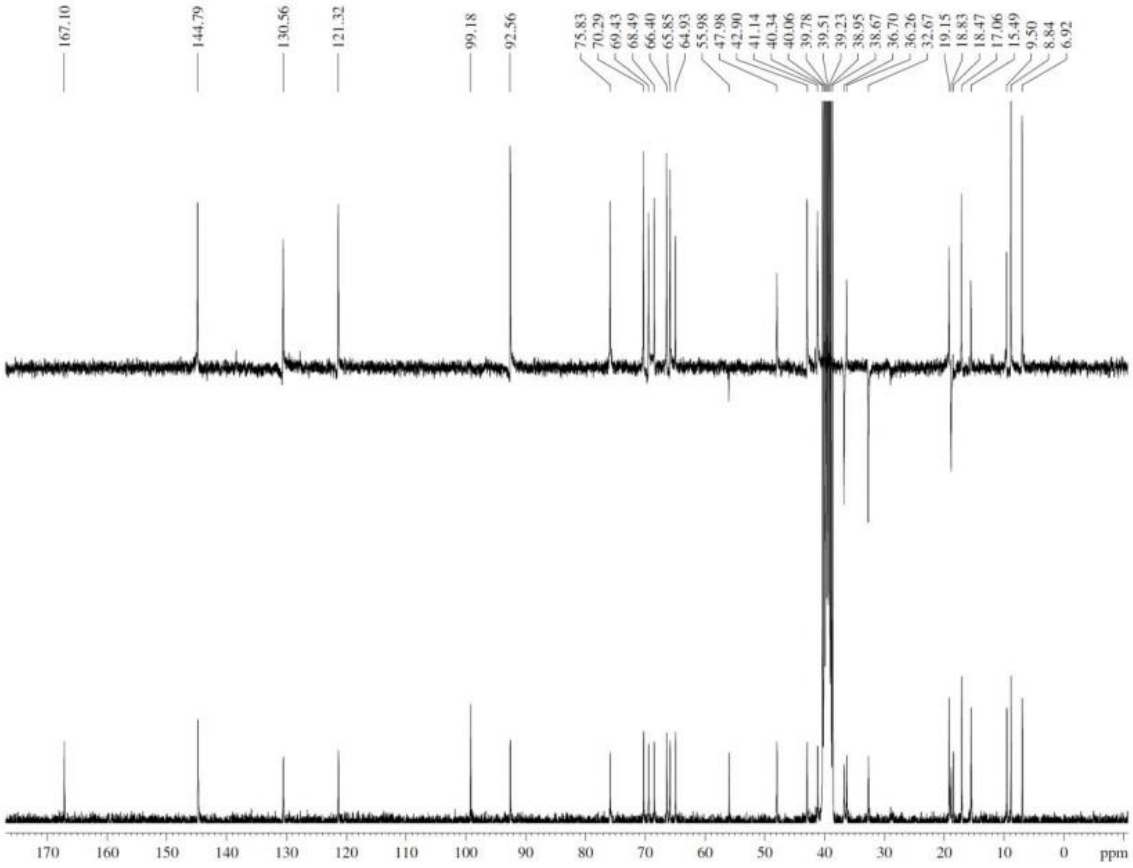


Figura 19. Espectro de ^{13}C-CPD-NMR da elaiofilina em DMSO-d_6, 125 MHz.

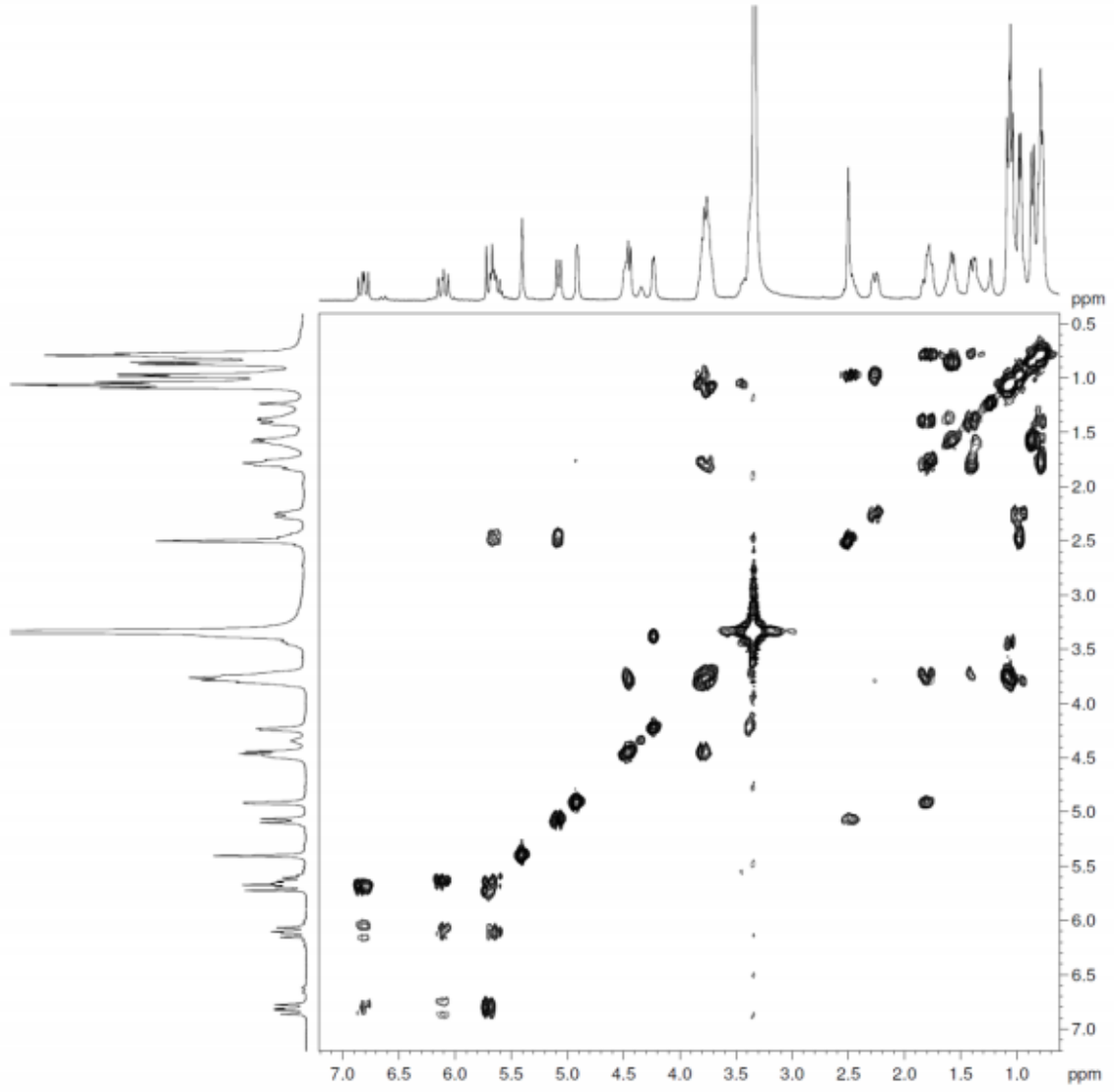


Figura 20. Espectro de COSY da elaiofilina em DMSO-d_6.

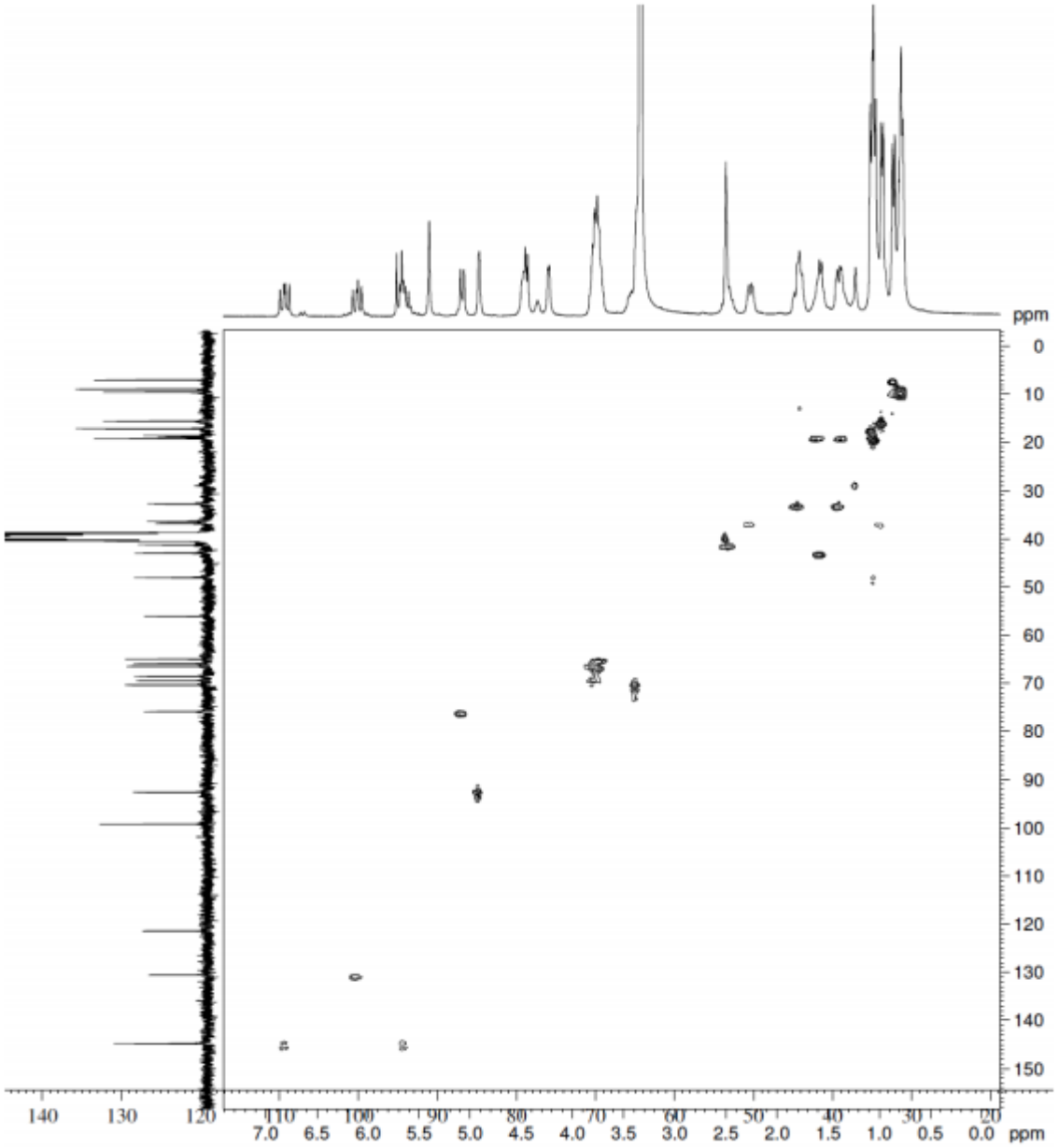


Figura 21. Espectro de HSQC da elaiofilina em DMSO-d_6.

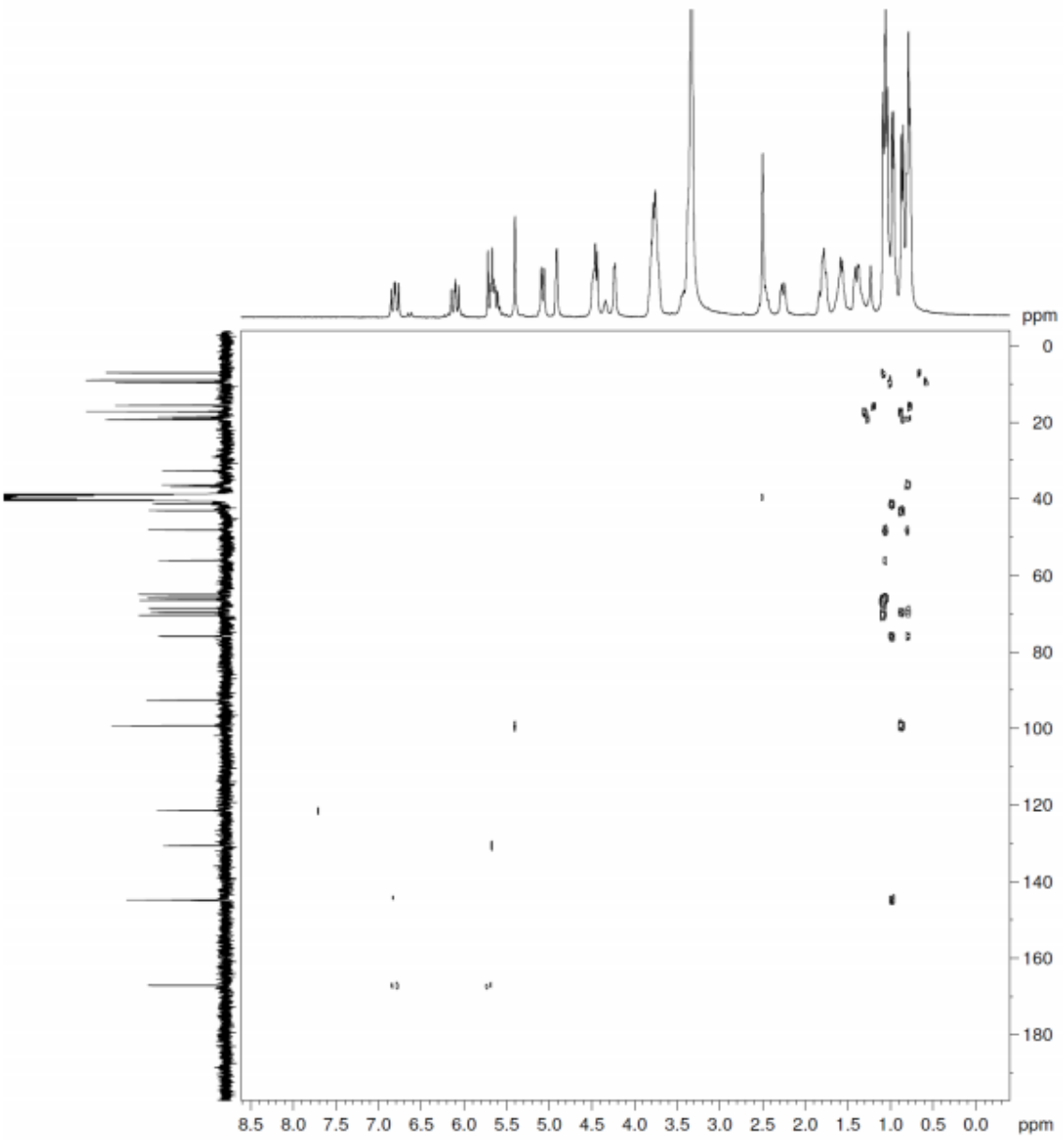


Figura 22. Espectro de HMBC da elaiofilina em DMSO-d_6.

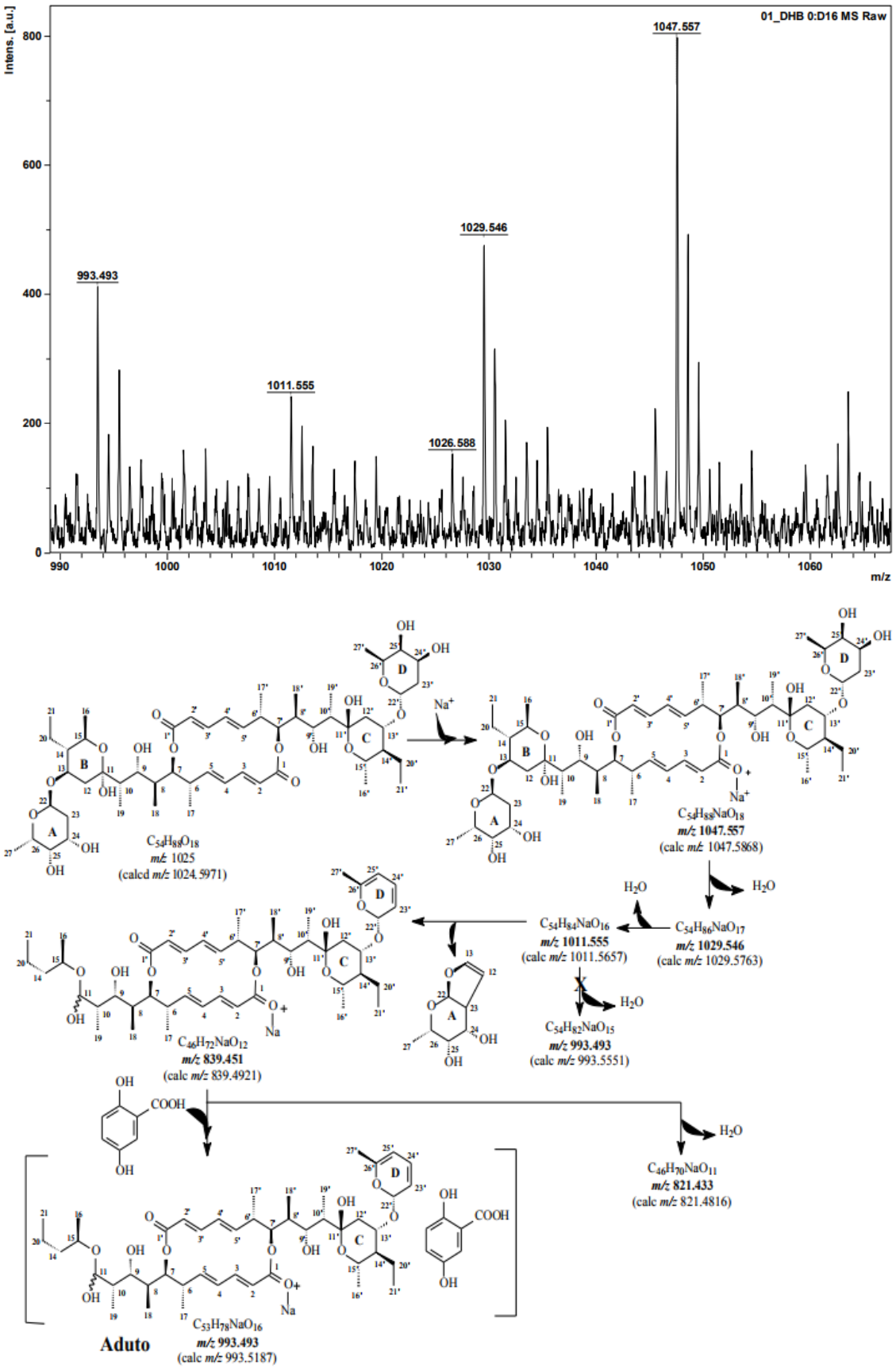


Figura 23. Espectro MALDI e proposição de mecanismos para fragmentação da elaiofilina. Apenas os picos classificados como principais são mostrados.

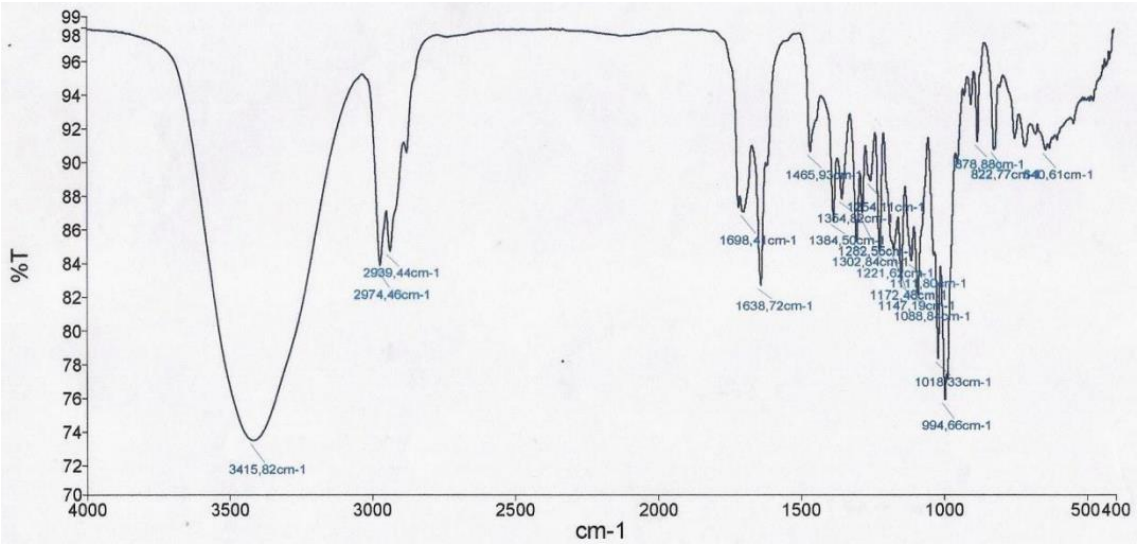


Figura 24. Espectro de FT-IR da elaiofilina.

A elaiofilina é um antibiótico macrolídeo de 16 membros com simetria no C_2. Originalmente foi isolada a partir de *S. melanosporus*, e mais tarde como azalomicina B de *S. hygroscopicus* var. *azalomyceticus* e *S. violaceoniger* (HAYDOCK et al., 2004). No nosso estudo, a elaiofilina foi isolada de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370. Na literatuta, muitos trabalhos descrevem suas diversas propriedades biológicas, incluindo atividades antibacterianas e antivirais (DOSEUNG et al., 2011; LI et al., 2011; WU et al., 2013); antitumorais e imunossupressoras (LEE et al., 1997, ZHAO et al., 2015). Segundo Fan e colaboradores (2000), a elaiofilina não é ativa contra bactérias Gram-negativas ou fungos, mas pode aumentar a atividade da rapamicina contra *C. albicans* quando os dois compostos são co-produzidos por *S. hygroscopicus* ATCC 29253.

5.4. PROSPECÇÃO QUÍMICA E TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

Os resultados da prospecção química do extrato metanólico da biomassa, fase butanólica, fase aquosa III e extrato acetoetílico do líquido metabólico de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 analisados por cromatografia em camada delgada para identificar as classes de metabólitos secundários indicaram a presença de alcalóides, açúcares redutores e saponinas nos extratos metanólicos da biomassa e butanólico; alcalóides e açúcares redutores no extrato aquoso III e alcalóides, açúcares redutores, compostos fenólicos, triterpenos e esteróides no extrato acetoetílico do líquido metabólico, conforme Tabela 6.

Tabela 6. Prospecção química por cromatografia em camada delgada dos metabólitos secundários produzidos por *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370.

Metabólitos	**EMeOH-B 3370**	**FBuOH**	**EH$_2$O III**	**EAcOEt-LM 3370**
Alcalóides	+	+	+	+
Açúcares redutores	+	+	+	+
Compostos fenólicos	-	-	-	+
Flavanóides	-	-	-	-
Taninos	-	-	-	-
Triterpenos e Esteróides	-	-	-	+
Saponinas	+	+	-	-

EMeOH-B 3370: Extrato metanólico da biomassa; FBuOH: Fase butanólica; FH$_2$O III: Fase aquosa III; EAcOEt: Extrato acetoetílico do líquido fermentado. Os sinais (+) e (-) indicam, respectivamente, presença ou ausência da classe dos compostos.

Um estudo realizado por Thomas e colaboradores (2011) detectaram a presença de alcalóides, carboidratos, compostos fenólicos, proteínas e aminoácidos no extrato metanólico de biomassa de uma bactéria conhecida como B-2. Também foi detectado a presença de alcalóide no líquido fermentado de *Streptomyces* CDRIL-312 (NAIK; HARINDRAN; VARDE, 2001). Esses resultados corroboram com nosso estudo, visto que, nos extratos e fases do fermentado de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 havia a presença de alcaloides.

Os resultados da prospecção química dos extratos EMeOH-3405, EMeOH-3412 e EMeOH-3413 indicaram a presença de monoterpenos/sesquiterpenos, triterpenos/esteroides, saponinas e açúcares redutores. Também foi detectado a presença de derivados cinâmicos no extrato EMeOH-3412 e flavanóides nos extratos EMeOH-3405 e EMeOH-3413 (Tabela 7). Em todas as fases foram detectadas a presença de triterpenos/esteroides. Na fase FHex também foi encontrado monoterpenos/sesquiterpenos; na fase FAcOEt, flavonoides; e na fase FBuOH, favanoides, saponinas e açúcares redutores (Tabela 7).

Tabela 7. Prospecção química por cromatografia em camada delgada dos metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces* spp.

Metabólitos	***Streptomyces* sp. UFPEDA 3405**				***Streptomyces* sp. UFPEDA 3412**	***Streptomyces* sp. UFPEDA 3413**
	EMeOH-3405	**FHex**	**FAcOEt**	**FBuOH**	**EMeOH-3412**	**EMeOH-3413**
Polifenóis						
Flavonóides	+++	-	+++	+++	-	+
Derivados cinâmicos	-	-	-	-	+++	-
Cumarinas	-	-	-	-	-	-
Taninos hidrolisáveis	-	-	-	-	-	-
Taninos condensados	-	-	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-
Alcalóides	-	-	-	-	-	-
Monoterpenos e sesquiterpenos	++	++	-	-	+	++
Triterpenos e esteróides	++	+	+	+	++	++
Saponinas	+	-	-	+	+	+
Açúcares redutores	+	-	-	+	+	+

EMeOH-3405: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405; EMeOH-3412: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3412;EMeOH-3413: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3413; FHex: Fase hexânica; FAcOEt: Fase acetoetílica; FBuOH: Fase butanólica; Presença dos metabólitos: (+) até duas bandas; (++) de duas a cinco bandas; (+++) de cinco a oito bandas; (-) Ausência.

Na prospecção química dos extratos e fases de *Streptomyces* spp., os resultados encontrados assemelham-se com estudos anteriores que identificaram a presença de flavanoide no extrato do fermentado de *Streptomyces* sp. (ERINLG-4) (BALACHANDRAN et al., 2014). Saponinas também foram detectadas no fermentado de *S. diastatochromogenes* MK800-62F1 (YOSHIMOTO et al., 2000) e em *Streptomyces* sp. L74 foi detectado açúcares redutores e triterpenos (LUO et al., 2013). A partir de *S. citreus* CBS 109.60, foram identificados 56 compostos voláteis diferentes onde a maioria eram terpenos do tipo monoterpenos (FRAUKE e RALF, 1996).

O teor de fenólicos totais nos extratos e fases de *Streptomyces* spp. variaram de 1,1 a 11,92 mg EAG/g, não sendo detectado compostos fenólicos totais nas frações FHex e FH_2O III (Tabela 8), confirmando o resultado da prospecção química (Tabela 7). Não foi determinado o teor de fenólicos totais para os extratos e fases de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370.

Tabela 8. Teor de fenólicos totais dos extratos e fases de *Streptomyces* spp.

Amostras	**Teor de Fenólicos Totais (mg EAG/g)**
EMeOH-3405	5,84 ± 0,53
FHex	n.d.
FAcOEt	2,35 ± 0,17
FBuOH	5,55 ± 0,40
FH_2O I	5,36 ± 0,55
FH_2O II	2,87 ± 0,20
FH_2O III	n.d.
EMeOH-3412	11,92 ± 0,66
EMeOH-3413	1,1 ± 0,10

EMeOH-3405: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405; EMeOH-3412: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3412; EMeOH-3413: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3413; FHex: Fase hexânica; FAcOEt: Fase acetoetílica; FBuOH: Fase butanólica; FH_2O I: Fase aquosa I; FH_2O II: Fase aquosa II; FH_2O III: Fase aquosa III; n.d.: não detectado.

5.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos extratos e fases de *Streptomyces* spp., pelo método DPPH, exibiram CE_{50} > 500 µg/mL (concentração da amostra necessária para sequestrar 50% do radical livre de DPPH), enquanto o ácido ascórbico a CE_{50} foi 4,82 ± 0,06 µg/mL. No método ABTS, o menor valor de CAET foi do extrato EMeOH-3413 (40,0 ± 0,01µM de Trolox/g do extrato) com porcentagem de inibição oxidativa de 10% na concentração de 20 µg/mL e o maior valor da fase FAcOEt (1161,7 ± 0,04µM de Trolox/g do extrato) com porcentagem de 50% na mesma concentração. Na fase FBuOH não foi detectada atividade pelo método ABTS. No método fosfomolibidênio, a melhor atividade foram dos extratos EMeOH-3405 e EMeOH-3412 que demonstraram, respectivamente, 5,0±0,3 e 5,1±0,2% da capacidade antioxidante total. No extrato EMeOH-3413 e fase FAcOEt não foram detectados atividade pelo método fosfomolibidênio (Tabela 9). Não foi determinada a atividade antioxidante para os extratos e fases de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370.

Vários métodos têm sido empregados para determinar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos e substâncias isoladas. Um dos mais utilizados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE_{50} e maior a sua atividade antioxidante. Uma vantagem desse método é o fato do radical ser estável e estar disponível comercialmente, evitando sua geração por formas diversas (como ocorre no ABTS), além de proporcionar de modo fácil e rápido a avaliação de vários produtos antioxidantes de uma só vez por espectrofotometria. Esse método tem sido muito empregado na análise do mecanismo de reação dos compostos polifenólicos com radicais livres (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; PISOSCHI; CIMPEANU; PREDOI, 2015).

Comparando os resultados obtidos no nosso trabalho com os descritos na literatura, pode-se constatar que Kumar e colaboradores (2014) avaliando a atividade antioxidante por DPPH do extrato acetoetílico de *S. lavendulae* SCA5 encontraram uma CE_{50} de 507,6 ± 0,6 µg/mL, onde o teor de compostos fenólicos foi 577,12 mg EAG/g. Lertcanawanichakul e colaboradores (2015) uma CE_{50} de 3400 µg/mL para o extrato acetoetilico de *S. lydicus* A2. Naine e colaboradores (2015) encontraram uma concentração acima de 500 µg/mL para sequetrar 50% do radical DPPH no extrato acetoetílico de *S. parvulus* VITJS11. Esses resultados corroboram com o encontrado no nosso estudo, onde os extratos e fases apresentaram baixa reatividade com o DPPH, por

isso a importância de investigar a atividade antioxidante por diversas metodologias (VILLAÑO et al., 2006).

A vantagem do método ABTS está na sua relativa simplicidade, permitindo sua aplicação em rotinas de qualquer laboratório (GUPTA, 2015; RE et al., 1999). Uma desvantagem desse método é não poder ser utilizado para amostras biológicas, como as proteínas que precipitam em meio alcoólico (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; PISOSCHI; CIMPEANU; PREDOI, 2015). Estudos realizados por Kekuda e Onkarappa (2014), avaliando a atividade antioxidante por ABTS do extrato butanólico de *S. variabilis* PO-17, encontraram uma porcentagem de inibição oxidativa de 50% na concentração de 225 µg/mL. Lee e colaboradores (2014) encontrararam no extrato acetoetílico de S*treptomyces* sp. MJM 10778 uma porcentagem de 50% na concentração de 135 µg/mL. Enquanto, Ser e colaboradores (2016) constataram no extrato metanólico de *S. malaysiense* sp. nov. uma porcentagem de 28% na concentração de 2000 µg/mL. Diferentemente desses achados da literatura, no nosso estudo a FAcOEt-12H exibiu uma porcentagem de inibição oxidativa de 50% na concentração de 20 µg/mL, com 1161,7 ± 0,04µM de Trolox/g do extrato, indicando uma expressiva reatividade com o radical ABTS.

O método de complexação pelo fosfomolibdênio é uma maneira simples e barata de avaliar a capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos, como é o caso de extratos obtidos de micro-organismos (ALAN et al., 2013; PIETRO et al., 1999).

Em nosso estudo, todos os extratos e fases apresentaram pouca atividade antioxidante e baixo teor de fenólicos totais. Segundo Leouifoudi e colaboradores (2015), existe uma relação direta entre o potencial antioxidante e a concentração de fenólicos, onde quanto menor a quantidade de fenólicos, menos intenso o potencial antioxidante. Para determinar o teor de fenólicos totais, o reativo de Folin-Ciocalteau é um dos métodos mais utilizados, que sofre mudança de coloração do amarelo para azul, sendo a intensidade da coloração azul maior quanto maior a quantidade de compostos fenólicos na solução (BLAINSKI; LOPES; MELLO, 2013; SINGLETON e ROSSI, 1965).

Tabela 9. Atividade antioxidante dos metabólitos secundários produzidos por *Streptomyces* spp.

Amostras	DPPH (CE_{50} µg/mL ± SD)	ABTS CAET (µM/g) / (% ± SD)	FOSFOMOLIBIDÊNIO (% ± SD)
EMeOH-3405	> 500	333,3 ± 0,02 / 22,5 ± 0,2	5,0 ± 0,3
Fhex	> 500	480,0 ± 0,02 / 23,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1
FAcOEt	> 500	1161,7 ± 0,05 / 52,8 ± 0,5	n.d.
FBuOH	> 500	n.d.	1,2 ± 0,0
FH_2O I	> 500	601,7 ± 0,02 / 31,7 ± 1,0	1,5 ± 0,1
FH_2O II	> 500	573,3 ± 0,01 / 32,4 ± 0,9	1,7 ± 0,0
FH_2O III	> 500	508,3 ± 0,02 / 26,7 ± 0,8	1,4 ± 0,0
EMeOH-3412	> 500	410,0 ± 0,03 / 25,6 ± 2,0	5,1 ± 0,2
EMeOH-3413	> 500	40,0 ± 0,01 / 10, 0 ± 1,0	n.d.
Ácido Ascórbico	4,8 ± 0,06	-	-

EMeOH-3405: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405; EMeOH-3412: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3412; EMeOH-3413: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3413; FHex: Fase hexânica; FAcOEt: Fase acetoetílica; FBuOH: Fase butanólica; FH_2O I: Fase aquosa I; FH_2O II: Fase aquosa II; FH_2O III: Fase aquosa III; n.d.: não detectado.

5.6. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os menores valores da CIM foram encontrados para o extrato metanólico da biomassa de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 (Tabela 10). Para determinar a CMI das fases e frações foram utilizados os micro-organismos teste que mostaram-se mais suspetíveis ao extrato metanólico da biomassa. Todas as partições e frações apresentaram atividade antimicrobiana com valores de CMI iguais ou abaixo de 62,5 µg/mL. A fase FAcOEt apresentou uma CIM de 3,9 µg/mL frente *S. aureus* ORSA UFPEDA 700, menor que o antibiótico padrão oxacilina (256 µg/mL). A fase FBuOH apresentou uma CIM de 3,9 µg/mL frente *C. albicans*, menor que o antibiótico padrão fluconazol (64 µg/mL) (Tabela 11). Dentre as frações, a EB1 se destacou com valores da CMI iguais ou abaixo de 3,9 µg/mL (Tabela 12). A fração EB2B não teve sua atividade antimicrobiana avaliada por conta da baixa quantidade obtida dessa fração 0,001 g.

A elaiofilina isolada de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 apresentou atividade antimicrobiana diante todos os micro-organismos utilizados, com menor CMI (0,01 µg/mL) frente *E. faecalis* (Tabela 13), menor que o antibiótico padrão teicoplanina (1 µg/mL). A CMI frente os isolado clínicos de *S. aureus* foi 62,5 µg/mL e *P. aeruginosa* 125 µg/mL.

Todos os extratos provenientes da fermentação de *Streptomyces* sp UFPEDA 3405, *Streptomyces* sp UFPEDA 3412 e *Streptomyces* sp UFPEDA 3413 apresentaram atividade frente às bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, álcool-ácido-resistente e levedura com CMI ≤ 7,5 mg/mL, sendo mais ativo o extrato EMeOH-3412 frente a *M. smegmatis* com CMI de 0,11 mg/mL e *C. albicans* com CMI de 0,46 mg/mL. O extrato EMeOH-3405 apresentou CMI de 0,23 mg/mL frente a *M. smegmatis* e o EMeOH-3413 apresentou CMI (0,94 mg/mL) frente a *S. aureus* (Tabela 14). O que difere um extrato do outro é a presença de derivados cinâmicos no extrato EMeOH-3412 e flavonoides no extrato EMeOH-3413. Todas as fases também apresentaram atividade antimicrobiana com CMI ≤ 3,75 mg/mL, apresentando CMI de 0,31 mg/mL frente a *P. aeruginosa*. A fase FHex não teve sua atividade antimicrobiana avaliada devido ao baixo rendimento desta fase (Tabela 15).

Tabela 10. Atividade antimicrobiana dos extratos obtidos a partir da fermentação submersa e semi-sólida de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 em µg/mL.

	EMeOH-B 3370		**EAcOEt-LM 3370**		**EMeOH-FS 3370**	
Micro-organismos	**CMI**	**CMB**	**CMI**	**CMB**	**CMI**	**CMB**
S. aureus UFPEDA 02	3,9	15,62	125	1000	15,62	62,5
S. aureus UFPEDA 663*	3,9	15,62	500	> 1000	250	1000
S. aureus ORSA UFPEDA 700*	15,62	62,5	31,25	62,5	250	1000
S. aureus UFPEDA 705*	62,5	250	7,81	31,25	62,5	125
S. aureus UFPEDA ORSA 709*	250	1000	15,62	62,5	31,25	62,5
S. aureus UFPEDA ORSA 718*	500	1000	3,9	15,62	125	500
B. subitilis UFPEDA 86	7,81	31,25	31,25	125	15,62	62,5
M. luteus UFPEDA 100	0,12	0,48	3,9	15,62	15,62	62,5
E. faecalis UFPEDA 138	500	1000	250	1000	62,5	125
E. coli UFPEDA 224	> 1000	> 1000	125	500	250	500
K. pneumoniae UFPEDA 396	250	1000	250	1000	250	1000
P. aeruginosa UFPEDA 416	> 1000	> 1000	250	500	250	500
M. smegmatis UFPEDA 71	3,9	7,81	7,81	31,25	31,25	62,5
		CMF		**CMF**		**CMF**
C. krusei UFPEDA 1002	15,62	31,25	62,5	500	125	500
C. albicans UFPEDA 1007	7,81	31,25	31,25	500	62,5	500
M. furfur UFPEDA 1320	125	250	250	500	62,5	125
A. niger UFPEDA 2003	31,25	62,5	62,5	500	125	250
Colletotrichum sp. UFPEDA 2561	3,9	7,81	31,25	250	62,5	250
Colletotrichum sp. UFPEDA 2562	1,95	7,81	15,62	125	62,5	250

EMeOH-B 3370: Extrato metanólico da biomassa; EAcOEt-LM 3370: Extrato acetoetílico do líquido fermentado; EMeOH-FS 3370: Extrato metanólico da fermentação semi-sólida. * Isolados Clínicos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco: *S. aureus* UFPEDA 663 (Ponta de cateter), *S. aureus* UFPEDA 700 (Secreção de úlcera), *S. aureus* UFPEDA 705 (Ferida operatória), *S. aureus* UFPEDA 709 (Exsudato purulento), *S. aureus* UFPEDA 718 (Secreção traqueal).Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

Tabela 11. Atividade antimicrobiana das fases obtidas a partir do extrato metanólico de biomassa, EMeOH 9H-B (μg/mL).

	FHex		**FAcOEt**		**FBuOH**		**FH_2O I**		**FH_2O II**		**FH_2O III**	
Micro-organismo	**CMI**	**CMB**	**CMI**	**CMB**	**CMI**	**CMB**	**CMI**	**CMB**	**CMI**	**CMB**	**CMI**	**CMB**
S. aureus UFPEDA 02	15,62	31,25	3,9	7,81	15,62	31,25	15,62	31,5	15,62	62,5	15,62	62,5
S. aureus UFPEDA 663*	15,25	31,25	3,9	15,62	15,62	62,5	15,62	62,5	15,62	62,5	15,62	62,5
S. aureus ORSA UFPEDA 700*	15,62	31,25	3,9	15,62	7,81	31,25	7,81	31,25	7,81	31,25	7,81	62,5
S. aureus UFPEDA 705*	15,62	62,5	3,9	15,62	15,62	62,5	15,62	62,5	15,62	31,25	15,62	62,5
B. subtilis UFPEDA 86	1,95	3,9	0,97	1,95	7,81	31,25	7,81	31,25	15,62	62,5	15,62	62,5
M. luteus UFPEDA 100	7,81	31,25	0,97	1,95	3,9	15,62	7,81	15,62	7,81	31,25	7,81	31,25
M. smegmatis UFPEDA 71	1,95	7,81	0,12	0,48	1,95	7,81	3,9	7,81	3,9	7,81	3,9	7,81
		CMF		**CMF**		**CMF**		**CMF**		**CMF**		**CMF**
C. krusei UFPEDA 1002	7,81	31,25	7,81	31,25	3,9	15,62	15,62	31,25	15,62	31,25	15,62	31,25
C. albicans UFPEDA 1007	3,9	7,81	3,9	7,81	3,9	15,62	15,62	31,25	15,62	31,25	15,62	31,25
A. niger UFPEDA 2003	3,9	7,81	3,9	7,81	1,95	7,81	1,95	3,9	3,9	7,81	7,81	31,25
Colletotrichum sp. UFPEDA 2561	31,25	62,5	31,25	125	7,81	31,25	15,62	62,5	31,25	125	31,25	62,5
Colletotrichum sp. UFPEDA 2562	31,25	125	15,62	62,5	7,81	31,25	15,62	125	62,5	250	62,5	250

FHex: Fase hexânica; FAcOEt: Fase acetoetílica; FBuOH: Fase butanólica; FH_2O I: Fase aquosa I; FH_2O II: Fase aquosa II; FH_2O III: Fase aquosa III; * Isolados Clínicos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco: *S. aureus* UFPEDA 663 (Ponta de cateter), *S. aureus* UFPEDA 700 (Secreção de úlcera), *S. aureus* UFPEDA 705 (Ferida operatória).Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

Tabela 12. Atividade antimicrobiana das frações obtidas a partir da fase butanólica (μg/mL).

Micro-organismo	EB1		EB2A		EB3M	
	CMI	**CMB**	**CMI**	**CMB**	**CMI**	**CMB**
S. aureus UFPEDA 02	1,95	7,81	15,62	31,25	15,62	31,25
S. aureus UFPEDA 663*	1,95	7,81	15,62	62,5	15,62	62,5
S. aureus ORSA UFPEDA 700*	1,95	7,81	15,62	62,5	15,62	62,5
S. aureus UFPEDA 705*	1,95	15,62	15,62	62,5	15,62	62,5
B. subtilis UFPEDA 86	0,48	1,95	15,62	62,5	7,81	31,25
M. luteus UFPEDA 100	1,95	7,81	7,81	31,25	7,81	31,25
M. smegmatis UFPEDA 71	0,48	0,97	3,9	15,62	3,9	15,62
		CMF		**CMF**		**CMF**
C. krusei UFPEDA 1002	3,9	15,62	7,81	31,25	7,81	31,25
C. albicans UFPEDA 1007	3,9	15,62	7,81	31,25	7,81	31,25
A. niger UFPEDA 2003	3,9	7,81	3,9	7,81	3,9	7,81
Colletotrichum sp. UFPEDA 2561	1,95	7,81	1,95	1,95	3,9	7,81
Colletotrichum sp. UFPEDA 2562	0,48	1,95	1,95	1,95	3,9	7,81

EB1, EB2A e EB3M: Frações provenientes da fase butanólica. * Isolados Clínicos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco: *S. aureus* UFPEDA 663 (Ponta de cateter), *S. aureus* UFPEDA 700 (Secreção de úlcera), *S. aureus* UFPEDA 705 (Ferida operatória).Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

Tabela 13. Atividade antimicrobiana da elaiofilina isolada de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 em µg/mL.

	Elaiofilina µg/mL	
Micro-organismos	**CMI**	**CMB**
S. aureus UFPEDA 02	31,25	500
S. aureus UFPEDA 700*	62,5	500
S. aureus UFPEDA 705*	62,5	500
S. aureus UFPEDA 707*	62,5	500
S. aureus UFPEDA 729*	62,5	500
B. subitilis UFPEDA 86	0,2	230
M. luteus UFPEDA 100	62,5	125
E. faecalis UFPEDA 138	0,01	0,97
E. coli UFPEDA 224	125	500
S. marcencens UFPEDA 352	125	500
P. aeruginosa UFPEDA 416	62,5	500
P. aeruginosa UFPEDA 64*	125	250
P. aeruginosa UFPEDA 261*	125	250
P. aeruginosa UFPEDA 264*	125	250
M. smegmatis UFPEDA 71	125	250
	CMI	**CMF**
C. albicans UFPEDA 1007	62,5	250

* Isolados Clínicos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco: *S. aureus* UFPEDA 700 (Secreção de úlcera), *S. aureus* UFPEDA 705 (Ferida operatória), *S. aureus* UFPEDA 707 (Secreção traqueal), *P. aeruginosa* UFPEDA 64 (Secreção peniana), *P. aeruginosa* UFPEDA 261 (Ferida operatória), *P. aeruginosa* UFPEDA 262 (Secreção de úlcera). Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

Tabela 14. Atividade antimicrobiana dos extratos de *Streptomyces* spp. em mg/mL.

Micro-organismos	**EMeOH-3405**		**EMeOH-3412**		**EMeOH-3413**	
	CMI	**CMB**	**CMI**	**CMB**	**CMI**	**CMB**
S. aureus UFPEDA 02	1,87	15	7,5	7,5	0,94	3,75
B. subitilis UFPEDA 86	1,87	7,5	7,5	15	1,87	7,5
M. luteus UFPEDA 100	1,87	7,5	1,87	7,5	1,87	15
E. faecalis UFPEDA 138	1,87	3,75	7,5	15	7,5	15
E. coli UFPEDA 224	3,75	15	3,75	15	3,75	7,5
S. marcencens UFPEDA 352	3,75	15	3,75	15	3,75	15
P. aeruginosa UFPEDA 416	3,75	3,75	3,75	7,5	3,75	7,5
M. smegmatis UFPEDA 71	0,23	0,93	0,11	0,47	0,94	1,87
		CMF		**CMF**		**CMF**
C. albicans UFPEDA 1007	1,87	1,87	0,46	7,5	0,46	1,87

EMeOH-3405: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405; EMeOH-3412: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3412; EMeOH-3413: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3413. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

Tabela 15. Atividade antimicrobiana das fases do extrato metanólico de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405 em mg/mL.

	FAcOEt		**FBuOH**		**FH_2O I**		**FH_2O II**		**FH_2O III**	
Micro-organismos	**CMI**	**CMB**	**CMI**	**CMB**	**CMI**	**CMB**	**CMI**	**CMB**	**CMI**	**CMB**
S. aureus UFPEDA 02	1,25	2,5	1,25	5,0	0,62	2,5	0,62	2,5	0,31	2,5
B. subitilis UFPEDA 86	1,25	2,5	1,25	5,0	0,62	1,25	0,31	2,5	0,31	5,0
M. luteus UFPEDA 100	1,25	5,0	2,5	5,0	0,62	1,25	0,62	1,25	1,25	1,25
E. faecalis UFPEDA 138	3,75	7,5	2,5	2,5	2,5	5,0	1,25	1,25	2,5	5,0
E. coli UFPEDA 224	1,25	1,25	2,5	5,0	0,62	1,25	0,62	1,25	0,62	0,625
S. marcencens UFPEDA 352	1,25	2,5	1,25	5,0	0,62	1,25	0,62	1,25	0,62	0,625
P. aeruginosa UFPEDA 416	0,31	2,5	0,31	2,5	0,31	2,5	0,31	2,5	0,31	2,5
M. smegmatis UFPEDA 71	2,5	5,0	2,5	5,0	0,62	2,5	0,31	1,25	0,62	1,25
		CMF		**CMF**		**CMF**		**CMF**		**CMF**
C. albicans UFPEDA 1007	1,25	5,0	1,25	2,5	0,31	2,5	0,31	3,75	0,31	3,75

FHex: Fase hexânica; FAcOEt: Fase acetoetílica; FBuOH: Fase butanólica; FH_2O I: Fase aquosa I; FH_2O II: Fase aquosa II; FH_2O III: Fase aquosa III. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

Um estudo realizado por He e colaboradores (2002) isolou de *S. hygroscopicus* LL-AC98 uma série de novos antibióticos glicopeptídeos (manopeptimicinas) com atividade frente MRSA. Esses novos antibióticos também exibiram atividade frente *B. subtilis* e *M. luteus*, porém foi observada baixa atividade frente bactérias Gram-negativas. A cletramicina isolada do líquido metabólico de *S. Hygroscopicus* TP-A0623 mostou atividade antifúngica frente a levedura *C. albicans* (FURUMAI et al., 2003). Zhang e colaboradores (2011) isolaram quatro compostos do líquido metabólico de *S. hygroscopicus* BS-112 com atividade frente *A. flavus*. Prapagdee e colaboradores (2008) encontraram nos metabólitos extracelulares de *S. hygroscopicus* atividade antifúngica frente ao *C. gloeosporioides*. O fungo *Colletotrichum* sp. é um patógeno típico de plantas que costuma ser responsável pela doença conhecida como antracnose que originam prejuízos em várias culturas, por exemplo, na cultura do guaraná (*Paullinia cupana* Kunth). Esses resultados corroboram com o encontrando nesse estudo sobre a atividade antimicrobiana dos metabólitos de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370.

Recentemente, Sheng e colaboradores (2015) caracterizaram quatro novos macrolídeos de elaiofilina, juntamente com cinco elaiofilinas conhecidas, a partir de *Streptomyces* sp. ICBB 9297 com atividade antibacteriana frente *S. aureus*. Fang e colaboradores (2000) isolaram elaiofilina de *S. hygroscopicus* ATCC 29253 que não apresentou atividade frente *C. albicans*, mas quando co-produzido com rapamicina apresentava atividade antifúngica. Wu e colaboradores (2013) identificaram derivados de elaiofilina a partir de *Streptomyces* sp. 7-145, onde por PCR identificaram linhagens que produziam compostos de classe desejada, como antibióticos glicosilados (glicopeptídeos e macrolídeos). Esses derivados mostraram boa atividade antibacteriana frente *S. aureus* resistente à meticilina e *Enterococcus* resistentes à vancomicina. *E. faecalis* é colonizador do intestino humano, apresentando relação simbiótica em indivíduos saudáveis. No entanto, em pacientes imunocomprometidos pode causar infecções fatais. *E. faecalis* é um patógeno oportunista, comumente isolados em hospitais, causando bacteremia, infecções do trato urinário, endocardite, infecções de feridas, meningite, infecções intra-abdominais e pélvicas, infecções nosocomiais e iatrogênicas. Esta bactéria obtém facilmente resistência aos medicamentos, tornando-a difícil de ser controlada em ambientes clínicos (ZHANG et al., 2013). No nosso estudo, elaiofilina apresentou CMI de 0,01 µg/mL frente *E. facecalis*. Esses resultados corroboram com os nossos resultados sobre atividade antimicrobiana da elaiofilina isolada de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370.

Neste estudo, as fases FAcOEt e FBuOH apresentaram CMI de 0,31 mg/mL frente a *P. aeruginosa*, sendo nestas fases detectadas a presença de flavonoides, triterpenos e esteroides. Valores superiores de CMI foram relatos por Taechowisan e colaboradores (2014) ao isolarem cinco flavanoides do extrato acetatoetílico de *Streptomyces* sp. BT01. *P. aeruginosa* é um dos patógenos mais problemáticos, com uma taxa de resistência aos antibióticos, carbapênemicos (imipenem e meropenem), alarmante (BALACHANDRAN et al., 2016), por isso encontrar novos antibióticos contra essa bactéria Gram-negativa faz-se necessário. Choi e colaboradores (2012) encontraram no extrato acetatoetílico de *Streptomyces* sp. BCNU 1001 CMI de 0,25 mg/mL frente a *P. aeruginosuma*. Sosovele e colaboradores (2012) obtiveram extratos acetoetílicos de *Streptomyces* spp. com CMI de 5 mg/mL frente a *P. aeruginosa*. Taechowisan e colaboradores (2014), encontraram no extrato acetatoetílico de *Streptomyces* sp. BT01 uma CMI de 0,256 mg/mL frente a *P. aeruginosa*. Esses resultados corroboram com o encontrando nesse estudo sobre a atividade antimicrobiana dos metabólitos de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405, *Streptomyces*sp UFPEDA 3412 e *Streptomyces* sp. UFPEDA 3413.

5.7. ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS TUMORAIS

O extrato metanólico da biomassa e o extrato acetoetílico do líquido fermentado provenientes da fermentação submersa de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370, na concentração de 50 µg/mL, apresentaram alta atividade citotóxica, onde a inibição do crescimento celular variou entre 75 a 95% nas linhagens testadas. Ao passo que, o extrato metanólico proveniente da fermentação semi-sólida apresentou moderada atividade, onde a inibição do crescimento celular variou entre 68 a 71%. Todas as fases, frações e elaiofilina apresentaram uma inibição do crescimento celular acima de 80% (Tabela 16 e Tabela 17), por isso foram submetidas ao ensaio de determinação da CI_{50} (FOUCHE et al., 2008). A fase butanólica apresentou uma CI_{50} de 0,11 µg/mL frente a HL-60 (Tabela 18). Dentre as frações, a EB1 se destacou com valores da CI_{50} menores ou iguais a doxorrubicina, utilizada como padrão. Essa fração mostrou maior seletividade pela HL-60, K-562 e MOLT-4. Enquanto, a elaiofilina apresentou maior seletividade pela HEp-2, HL-60 e MOLT-4 (Tabela 19).

Dentre os extratos EMeOH-3405, EMeOH-3412 e EMeOH-3413, apenas o EMeOH-3405, na concentração de 50 µg/mL, apresentou alta atividade citotóxica frente as linhagens NCI-H292, HL-60 e MOLT-4. Com exceção da fase FHex, todas as demais

fases apresentaram alta atividade frente a MOLT-4, merecendo destaque a fase FBuOH que também exibiu atividade frente a HEp-2, HT-29, HL-60 (Tabela 20). A CI_{50} foi determinada para os extratos e fases que apresentaram uma inibição do crescimento celular acima de 75% na dose de 50 µg/mL (FOUCHE et al., 2008). O extrato EMeOH-3405 foi mais citotóxico para as linhagens HL-60 e MOLT-4, com CI_{50} de 5,4 µg/mL e 4,1 µg/mL, respectivamente. Dentre as fases, a FBuOH se destacou por apresentar atividade frente a quatro das sete linhagens testadas, sendo mais ativas frente as linhagens HL-60 (IC_{50} = 1,4 µg/mL) e MOLT-4 (IC_{50} = 1,1 µg/mL) (Tabela 21).

Tabela 16. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos extratos e fases de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 em linhagens tumorais testados na concentração de 50 µg/mL pelo método do MTT após 72 h de incubação.

Amostras	**Linhagens Celulares (IC%)**		
	HEp-2	**HT-29**	**NCI-H292**
EMeOH-B 3370	75 ± 4,2	97,1 ± 1	94,7 ± 0,5
EAcOEt-LM 3370	83,7 ± 1	92,7 ± 0,8	87,3 ± 0,5
EMeOH-FS 3370	67,9 ± 1	71,4 ± 0,4	69,3 ± 0,2
EHex	95,1 ± 0,8	80,2 ± 0,2	81,7 ± 0,5
EAcOEt	100 ± 0,2	100 ± 0,7	99,3 ± 0,3
EBuOH	96,8 ± 1,4	96,4 ± 1,1	95,8 ± 1
EH_2O I	98,7 ± 1,8	99,4 ± 1,2	99,6 ± 0,8
EH_2O II	96,7 ± 0,7	96,1 ± 0,6	96,6 ± 0,8
EH_2O III	90,5 ± 0,1	80,4 ± 0,1	93 ± 0,2
Doxorrubicina	79,4 ± 2,6	75,3 ± 1,3	94,2 ± 1,9

EMeOH-B 3370: Extrato metanólico da biomassa; EAcOEt-LM 3370: Extrato acetoetílico do líquido fermentado; EMeOH-FS 3370: Extrato metanólico da fermentação semi-sólida; FHex: Fase hexânica; FAcOEt: Fase acetoetílica; FBuOH: Fase butanólica; FH_2O I: Fase aquosa I; FH_2O II: Fase aquosa II; FH_2O III: Fase aquosa III.Pouca atividade: 1 ≥ 50%; moderada atividade: 50 ≥ 75%; alta atividade: 75 ≥ 100%.

Tabela 17. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das frações e elaiofilina de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 em linhagens tumorais testadas na concentração de 50 μg/mL pelo método do MTT após 72 h de incubação.

Amostras	Linhagens Celulares (IC%)							
	HEp-2	**HT-29**	**NCI-H292**	**K-562**	**K-562 LUCENA**	**MOLT-4**	**SKBR-3**	**MCF-7**
EB1	97,6 ± 2,4	100 ± 0,3	93 ± 0,2	100 ± 0,3	100 ± 0,8	96,8 ± 0,4	96,3 ± 1,9	93,0 ± 2,5
EB2A	89,8 ± 0,2	91,1 ± 5,7	80,1 ± 0,9	100 ± 0,6	98,6 ± 1,4	95,9 ± 0,5	55,9 ± 1,7	57,6 ± 2,8
EB2B	SA	SA	SA	SA	AS	SA	SA	SA
EB3M	90,9 ± 0,4	94,5 ± 0,3	91,5 ± 0,7	100 ± 0,1	100 ± 0,5	95,5 ± 1,2	94,8 ± 1,4	96,3 ± 0,3
Elaiofilina	97,8 ± 0,6	100 ± 0,8	99,9 ± 0,5	100 ± 0,4	100 ± 0,8	92,0 ± 1,7	97,2 ± 1,2	96,7 ± 0,7
Doxorrubicina	79,4 ± 2,6	75,3 ± 1,3	94,2 ± 1,9	79,0 ± 0,1	n.t.	96,6 ± 0,9	75,0 ± 0,4	74,8 ± 2,1

EB1, EB2A e EB3M: Frações provenientes da fase butanólica. Pouca atividade: 1 ≥ 50%; moderada atividade: 50 ≥ 75%; alta atividade: 75 ≥ 100%.

Tabela 18. Valores da concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}) e o intervalo de confiança (IC 95%) das fases em linhagens tumorais testadas pelo método do MTT após 72 h de incubação.

Amostras	IC_{50} (µg/mL) e IC 95%			
	HEp-2	**HT-29**	**NCI-H292**	**HL-60**
FHex	1,3 (1,02 - 1,68)	3,62 (2,36 - 5,54)	5,11 (3,97 - 6,58)	3,92 (3,0 - 5,14)
FAcOEt	0,13 (0,08 - 0,19)	0,09 (0,04 - 0,23)	0,19 (0,13 - 0,3)	0,16 (0,12 - 0,2)
FBuOH	0,21 (0,12 - 0,36)	0,4 (0,11 - 1,52)	0,62 (0,32 - 1,21)	0,11 (0,03 - 0,4)
FH_2O I	0,69 (0,45 - 1,04)	0,69 (0,28 - 1,7)	1,55 (1,18 - 2, 04)	0,14 (0,06 - 0,3)
FH_2O II	0,7 (0,52 - 0,96)	3,31 (1,78 - 6,17)	5,22 (3,64 - 7,48)	3,23 (2,56 - 4,06)
FH_2O III	0,19 (0,07 - 0,53)	1,18 (0,73 - 1,9)	1,38 (1,15 - 1,66)	0,98 (0,83 - 1,17)
Doxorrubicina	0,7 (0,3 - 1,4)	0,4 (0,3 - 0,5)	0,01 (0,004 - 0,3)	0,02 (0,01 - 0,02)

FHex: Fase hexânica; FAcOEt: Fase acetoetílica; FBuOH: Fase butanólica; FH_2O I: Fase aquosa I; FH_2O II: Fase aquosa II; FH_2O III: Fase aquosa III.

Tabela 19. Valores da concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}) e o intervalo de confiança (IC 95%) das frações e elaiofilina de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 em linhagens tumorais testadas pelo método do MTT após 72 h de incubação.

Amostras	CI_{50} (µg/mL) e IC 95%								
	HEp-2	**HT-29**	**NCI-H292**	**HL-60**	**K-562**	**K-562 LUCENA**	**MOLT-4**	**SKBR-3**	**MCF-7**
EB1	0,02 (0,01 - 0,03)	0,08 (0,06 - 0,12)	0,01 (0,003 - 0,07)	0,009 (0,004 - 0,01)	0,002 (0,001- 0,003)	0,17 (0,12 - 0,22)	0,006 (0,004 - 0,008)	0,57 (0,48 - 0,68)	2,2 (1,64 - 3,03)
EB2A	0,69 (0,58 - 0,82)	2,9 (1,85 - 4,52)	6,76 (5,06 - 9,04)	6,74 (5,45 - 8,34)	0,76 (0,56 - 1,03)	2,65 (2,14 - 3,28)	1,15 (0,87 - 1,51)	n.t	n.t.
EB3M	2,92 (2,11 - 4,04)	14,73 (11,31 - 19,18)	25,7 (18,09 - 36, 49)	10,22 (5,46 - 19,12)	5,48 (4,65 - 6,47)	9,53 (8,34 - 10,85)	4,55 (3,44 - 6,01)	11,22 (9,92 - 12,70)	12,85 (10,01 - 16,51)
Elaiofilina	0,1 (0,11 - 0,13)	0,5 (0,37 - 0,74)	0,5 (0,4 - 0,6)	0,1 (0,10 - 0,14)	0,37 (0,33 - 0,41)	0,44 (0,34 - 0,53)	0,14 (0,09 - 0,21)	0,22 (0,20 - 0,24)	0,65 (0,52 - 0,81)
Doxorrubicina	0,7 (0,3 - 1,4)	0,4 (0,3 - 0,5)	0,01 (0,004 - 0,3)	0,02 (0,01 - 0,02)	0,14 (0,009 - 0,23)	n.t.	0,04 (0,04 - 0,05)	0,81 (0,66 - 1,00)	0,11 (0,08 - 0,15)

EB1, EB2A e EB3M: Frações provenientes da fase butanólica.

Tabela 20. Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos extratos e fases *Streptomyces* spp., em linhagens tumorais na concentração de 50 μg/mL pelo método do MTT após 72 h de incubação.

Amostras	Linhagens Celulares (IC%)						
	HEp-2	**HT-29**	**MCF-7**	**NCI-H292**	**HL-60**	**K-562**	**MOLT-4**
EMeOH-3405	50,7 ± 3,3	54,2 ± 1,8	52,9 ± 1,1	97,5 ± 0,6	83,2 ± 5,2	56,5 ± 0,8	95,9 ± 1,4
FHex	57,2 ± 5,1	45,3 ± 2,8	50,3 ± 4,1	68,0 ± 0,2	84,2 ± 0,5	61,9 ± 0,8	54,2 ± 4,6
FAcOEt	73,4 ± 3,4	44,7 ± 3,4	42,4 ± 2,8	58,0 ± 0,7	61,5 ± 4,2	29,6 ± 2,4	86,2 ± 1,6
FBuOH	77,6 ± 2,4	89,9 ± 0,7	57,6 ± 1,4	64,8 ± 0,9	81,5 ± 0,2	71,5 ± 1,9	91,8 ± 1,7
FH_2O I	45,6 ± 4,0	64,2 ± 1,7	30,4 ± 0,8	50,0 ± 1,2	16,4 ± 0,3	50,2 ± 2,9	92,2 ± 1,5
FH_2O II	78,3 ± 1,8	61,9 ± 2,9	51,3 ± 2,8	43,8 ± 1,4	69,9 ± 0,5	72,4 ± 1,6	90,0 ± 1,5
FH_2O III	71,5 ± 1,9	52,9 ± 1,8	38,6 ± 1,2	58,9 ± 1,3	33,3 ± 0,7	33,2 ± 2,0	91,6 ± 2,7
EMeOH-3412	21,7 ± 0,4	15,5 ± 0,1	21,7 ± 1,4	54,2 ± 0,8	22,3 ± 0,6	37,8 ± 0,7	64,7 ± 3,0
EMeOH-3413	34,3 ± 0,1	24,7 ± 0,2	42,2 ± 1,3	65,7 ± 1,4	15,5 ± 0,0	23,6 ± 1,8	11,3 ± 2,7
Doxorrubicina	79,4 ± 2,6	75,3 ± 1,3	74,8 ± 2,1	94,2 ± 1,9	92,9 ± 0,6	79,0 ± 0,1	96,6 ± 0,9

EMeOH-3405: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405; EMeOH-3412: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3412; EMeOH-3413: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3413. FHex: Fase hexânica; FAcOEt: Fase acetoetílica; FBuOH: Fase butanólica; FH_2O I: Fase aquosa I; FH_2O II: Fase aquosa II; FH_2O III: Fase aquosa III. Pouca atividade: $1 \geq 50\%$; moderada atividade: $50 \geq 75\%$; alta atividade: $75 \geq 100\%$.

Tabela 21. Valores da concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}) e o intervalo de confiança (IC 95%) dos extratos e fases de *Streptomyces* spp. em linhagens tumorais testadas pelo método do MTT após 72 h de incubação.

Amostras	IC_{50} e IC 95%				
	Hep-2	**HT-29**	**NCI-H292**	**HL-60**	**MOLT-4**
EMeOH-12H	n.t.	n.t.	15 (12,9 - 17,6)	5,4 (4.2 - 6,8)	4,1 (3,6 - 4,6)
FHex-12H	n.t.	n.t.	n.t.	7,6 (6,4 - 9,1)	n.t.
FAcOEt-12H	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	13,4 (10,7 - 16,7)
FBuOH-12H	10,6 (8,2 - 13,7)	6,2 (5,2 - 7,4)	n.t.	1,4 (1,2 - 1,5)	1,1 (0,9 - 1,4)
FH_2O I-12H	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	7,3 (6,2 - 8,6)
FH_2O II-12H	26,5 (17,9 - 39,3)	n.t.	n.t.	n.t.	4,3 (3,3 - 5,6)
FH_2O III-12H	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	14,5 (10,6 - 19,9)
Doxorubicina	0,7 (0,3 - 1,4)	0,4 (0,3 - 0,5)	0,01 (0,004 - 0,3)	0,06 (0,05 - 0,08)	0,04 (0,04 - 0,05)

EMeOH-3405: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405; EMeOH-3412: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3412; EMeOH-3413: Extrato metanólico dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3413. FHex: Fase hexânica; FAcOEt: Fase acetoetílica; FBuOH: Fase butanólica; FH_2O I: Fase aquosa I; FH_2O II: Fase aquosa II; FH_2O III: Fase aquosa III. n.t.: não testado.

A análise da citotoxicidade pelo teste do MTT é um método rápido e sensível que apresenta a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. Esse método vem sendo utilizado no programa de screenning do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (CRAGG e NEWMAN, 2000), considerando promissor para purificação posterior um extrato bruto que apresenta uma CI_{50} inferior a 30 µg/mL, e quando o produto for puro, uma CI_{50} inferior a 4 µg/mL (SUFFNESS e PEZZUTO, 1990).

Neste estudo, a fração EB1 proveniente do fermentado de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370, teve uma potente atividade citotóxica que pode ser atribuída à presença de elaiofilina e alcalóides. A elaiofilina é um antibiótico macrolídeo que também já foi isolado de *S. hygroscopicus* e apresenta diversas propriedades biológicas (WU etal., 2013). Um estudo recente realizado por Zhao e colaboradores (2015) demonstraram que a elaiofilina diminui a viabilidade celular e apresenta atividade antitumoral em células de câncer do ovário, como OVCAR-3, A2780 e SKOV3. Esses resultados corroboram com nosso estudo. Entretanto, os alcalóides são compostos heterocíclicos contendo nitrogênio e biologimamente ativos, que costumam apresentar atividades anticâncer e ao longo dos últimos anos têm sido isolados de plantas, animais e micro-organismos (BALLAV; DASTAGER; KERKAR, 2012; KUMAR; RAWAT, 2011). Puder e colaboradores (2000) isolaram novos alcalóides do líquido fermentado de *Streptomyces* sp. FORM5e A1, com potente atividade citotóxica frente MCF7, HMO2 (adenocarcinoma do estômago), Hep G2 (carcinomahepatocelular), Kato III (carcinoma do cólon). Igarashi e colaboradores (2006) isolaram um composto citotóxico de *S. hygroscopicus* TP-A0451 com atividade frente NCI-H522 (câncer de pulmão), OVCAR-3 (carcinoma de ovário), SF539 (glioblastoma) e LOX-IMVI (melanoma). Enquanto, cletramicina isolada de *S. hygroscopicus* TP-A0623 exibiu citotoxicidade moderada frente HeLa (carcinomado colo do útero) (FURUMAI et al., 2003).Um novo análogo de geldanamicina isolado da fermentação de *S. hygroscopicus* A070101, tem atividade citotóxica contra MCF-7, SK-MEL-2 (melanoma) e CR-L23 (carcinoma pulmonar) (ZHANG et al., 2010). Esses resultados corroboram com nosso estudo.

Dentre os extratos provenientes da fermentação de *Streptomyces* sp UFPEDA 3405, *Streptomyces* sp UFPEDA 3412 e *Streptomyces* sp UFPEDA 3413, o único com atividade citotóxica foi o extrato EMEOH-3405, que juntamente com a fase FBuOH apresentou valores de CI_{50} abaixo do valor determinado pelo NCI. A promissora atividade citotótica da fase FBuOH pode ser atribuída a presença de saponinas, que são glicosídeos,

divididos em duas classes principais, triterpenoides ou esteroides, de alto peso molecular produzidos, predominantemente, pelas plantas, mas também por micro-organismos, com grande variedade de atividades biológicas e aplicações farmacêuticas. Na literatura poucos trabalhos relatam o isolamento de saponinas do gênero *Streptomyces*, bem como sua atividade citotóxica. Um estudo realizado por Yoshimoto e colaboradores (2010) isolou um compostode *S. diastatochromogenes* MK800-62F com estrutura química semelhante a saponina, que exibiu atividade anticancerígena frente a pequenas células de carcinoma de pulmão humano (Ms-1). Esses resultados corroboram com nosso estudo.

5.8. ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO HUMANO (PBMCs)

Para avaliação da atividade citotóxica em PBMCs das frações derivadas do metabolismo de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370, apenas a fração EB2A exibiu uma CI_{50} > 50 µg/mL. As frações, EB1 e EB3M apresentaram CI_{50} de 3,2 e 31,1 µg/mL, respectivamente, enquanto, a elaiofilina teve uma CI_{50} de 1 µg/mL (Tabela 22). O objetivo deste teste é avaliar a seletividade do composto. Em resumo, a elaiofilina e todas as frações foram mais seletivas para as células tumorais que as células mononucleares do sangue periférico humano.

Dentre os extratos provenientes da fermentação de *Streptomyces* sp UFPEDA 3405, *Streptomyces* sp UFPEDA 3412 e *Streptomyces* sp UFPEDA 3413 foram selecionados os extratos e fases que apresentaram atividade citotóxica em pelo menos uma linhagem tumoral, por isso os extratos EMeOH-3412 e EMeOH-3413 não tiveram sua atividade avaliada. O extrato EMeOH-3405 e suas fases apresentaram CI_{50} > 50 µg/mL.

O teste de citotoxicidade em linfócitos humanos é um passo importante na descoberta de novos fármacos, uma vez que o objetivo em lançar novas drogas anticâncer no mercado é aumentar o efeito antitumoral do composto e diminuir seus efeitos adversos, como mieolossupressão. (VASIEVICH e HUANG, 2011). Diversas classes de moléculas vêm sendo estudadas visando a atividade antitumoral. Os antibióticos macrolídeos, dentre eles a elaiofilina, vêm recebendo especial interesse (ZHAO et al., 2015). Trabalhos realizados por Anibou e colaboradores (2008) mostraram que dois compostos ativos contra células tumorais, isolados dos extratos aquosos de *Streptomyces* sp. T5 e *Streptomyces* sp. AS8 foram inativos em PBMC. Prashanthi e colaboradores (2015)

demonstraram que o pigmento amarelo de *S. griseoaurantiacus* JUACT 01 não exibia efeitos tóxicos sobre PBMC e também apresentava potencial citotóxico e anti-proliferativo em células tumorais, corroborando com os resultados encontrados no nosso estudo, onde os extratos e fases provenientes da fermentação de *Streptomyces* sp UFPEDA 3405, *Streptomyces* sp UFPEDA 3412 e *Streptomyces* sp UFPEDA 3413 apresentaram baixa citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico.

Tabela 22. Atividade hemolítica e citotóxica em células mononucleares do sangue periférico das frações e elaiofilina isolada de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370.

Amostras	**PBMCs**	**Eritrócitos**
	CI_{50} e IC 95%	**CE_{50} (µg/mL) e IC 95%**
EB1	3,16 (2,40 - 4,14)	12,53 (10,80 - 14,52)
EB2A	> 50	> 200
EB3M	31,13 (15,99 - 60,60)	112,4 (107,50 - 117,50)
Elaiofilina	1,05 (0,87 - 1,26)	1,58 (1,17 - 2,14)
Doxorubicina	n.t.	n.t.

EB1, EB2A e EB3M: Frações provenientes da fase butanólica. n.t.: não testado.

5.9. ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Para avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos das frações derivadas do metabolismo de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370, apenas a fração EB2A exibiu uma CE_{50} > 200 µg/mL. As frações EB1 e EB3M apresentaram CE_{50} de 12,5 e 112,4 µg/mL, respectivamente. A elaiofilina apresentou CE_{50} de 1,6 µg/mL (Tabela 22).

Dentre os extratos provenientes da fermentação de *Streptomyces* sp UFPEDA 3405, *Streptomyces* sp UFPEDA 3412 e *Streptomyces* sp UFPEDA 3413 foram selecionados os extratos e fases que demonstraram atividade citotóxica em pelo menos

uma linhagem tumoral, por isso os extratos EMeOH-3412 e EMeOH-3413 não tiveram sua atividade avaliada. O extrato EMeOH-3405 e suas fases exibiram CE_{50} > 200 µg/mL.

Uma substância é considerada hemolítica quando apresenta uma CE_{50} < 200 µg/mL (COSTA-LOTUFO et al., 2002). Este ensaio é realizado para determinar o potencial que a substância teste apresenta em causar lesões na membrana plasmática dos eritrócitos, uma estrutura dinâmica que responde diretamente a interações com fármacos (SAURAV e KANNABIRAN, 2012). A hemólise passa então a ser um critério para determinar a toxicidade dos agentes anticancerígenos, antimicrobianos e antioxidantes. Quando comparamos os valores da CE_{50} da elaiofilina de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 (EB1 e EB3M) em eritrócitos humanos com os valores da CI_{50} em células tumorais, observamos que esses produtos são muito mais seletivos as linhagens cancerígenas, visto que os valores da CI_{50} são bem menores. Neste ensaio, produtos que apresentam CE_{50} < 200 µg/mL (concentração efetiva capaz de causar hemólise em 50% dos eritrócitos humanos) são considerados potencialmente hemolíticos. Um estudo realizado por Anzai e colaboradores (2008) demonstrou que espécies provalvelmente distribuídas no "cluster" incluindo *S. hygroscopicus*, *S. abikoensis* e *S. lavendula* apresentam metabólitos com atividade hemolítica. O EMeOH-3405 e suas fases não apresentam atividade de danos à membrana, sua citotoxicidade em linhagens tumorais parece não estar relacionada ao mecanismos de morte por necrose, mesmo a atividade citotóxica da fase FBuOH sendo atribuída a saponinas e, essa estar associada a hemólise em eritrócitos (ABOUTALEBI e MONFARED, 2016). Esses resultados corroboram com nosso estudo.

5.10. ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO EM CÉLULAS LEUCÊMICAS

Análise Morfológica - Coloração por May-Grunwald-Giemsa

Dentre os metabólitos de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370, apenas a elaiofilina foi selecionada para um estudo sobre seu possível mecanismo de ação em células leucêmicas. Inicialmente foi realizada uma análise do comportamento citotóxico, em relação ao tempo, dessa substância após 24 e 48 h de tratamento em K-562 e MOLT-4. Os valores das CI_{50} estão apresentados na Tabela 23. A morfologia das células K-562 (Figura 25) e MOLT-4 (Figura 26) tratadas com valores próximos da CI_{50} (0,6 µg/mL) e metade da CI_{50} (0,3 µg/mL), após 24 h de incubação com a elaiofilina apresentaram características

morfológicas de morte por apoptose, incluindo redução do volume celular, vacuolização, condensação de cromatina e fragmentação dos núcleos.

Dentre os metabólitos de *Streptomyces* sp UFPEDA 3405, *Streptomyces* sp UFPEDA 3412 e *Streptomyces* sp UFPEDA 3413, apenas a fase FBuOH do extrato EMeOH-3405 foi selecionada para um estudo sobre seu possível mecanismo de ação em células MOLT-4 com valores aproximados da CI_{50} (18 µg/mL), metade da CI_{50} (9 µg/mL) e duas vezes a CI_{50} (36 µg/mL) após 24 h de incubação com o produto (Tabela 24). Essa fase foi selecionada para um breve estudo sobre seu possível mecanismo de ação, por apresentar atividade citotóxica em linhagens tumorais, e não exibir citotoxicidade em PBMC e atividade hemolítica em eritrócitos humanos. A análise por microscopia óptica revelou diversas alterações morfológicas induzidas pela fase FBuOH. As células do grupo controle negativo (não tratadas) exibiram uma morfologia típica de células não aderidas, tais como: membrana íntegra, células pleomórficas e nítida visualização das membranas plasmática e nuclear. Nos grupos tratados com 9, 18 e 36 µg/mL da fase FBuOH, as células apresentaram morfologia consistente com células em processo de apoptose, incluindo, redução do volume celular, e condensação da cromatina. Na maior concentração foi observado perda da integridade da membrana, uma característica de necrose (Figura 27).

Tabela 23. Valores da concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}) e o intervalo de confiança (IC 95%) em K-562 e MOLT-4 da elaiofilina após 24 e 48 h de incubação.

	K-562		**MOLT-4**	
Amostras	**24 h**	**48 h**	**24 h**	**48 h**
Elaiofilina	0,63	0,21	0,68	0,43
	(0,51 - 0,79)	(0,18 - 0,24)	(0,57 - 0,81)	(0,37 - 0,49)
Doxorubicina	2,03	0,22	3,28	0,09
	(1,66 - 2,49)	(0,17 - 0,28)	(2,35 - 4,57)	(0,08 - 0,11)

IC_{50} com seus intervalos de confiança de 95% foram calculados a partir da regressão não linear, utilizandoo programa *GraphPad Prism* 5.0.

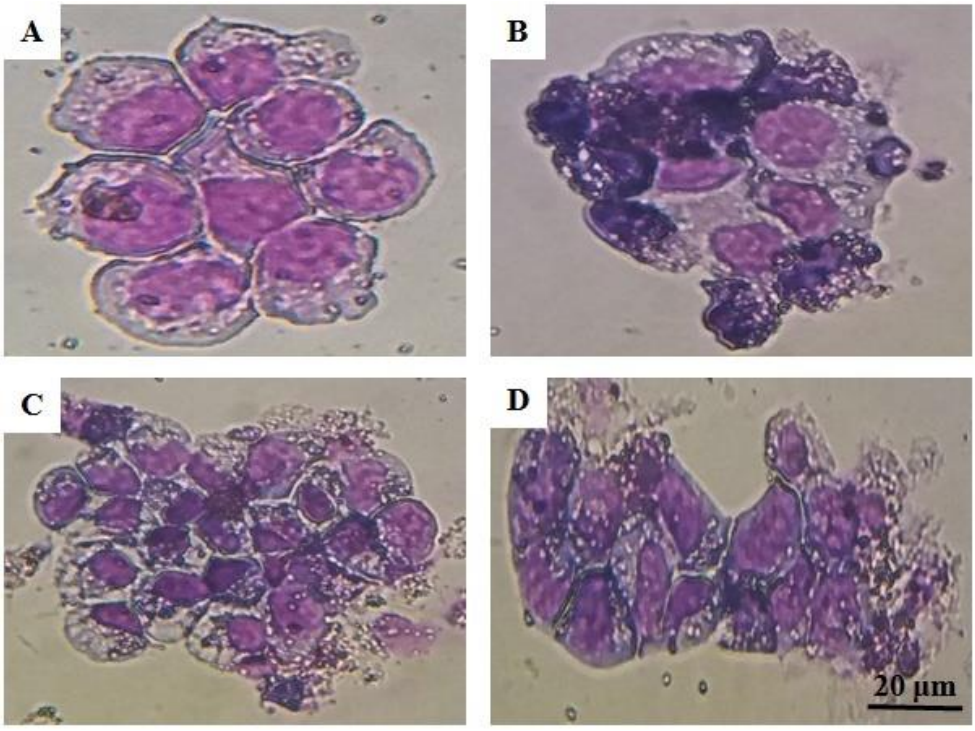


Figura 25. Análise morfológica das células K-562 pela coloração May-Grunwald-Giemsa após 24 h de incubação com elaiofilina. A: Controle negativo (DMSO); B: Controle positivo (Doxorrubicina 2 µg/mL); C: elaiofina (0,3 µg/mL), D: elaiofina (0,6 µg/mL).

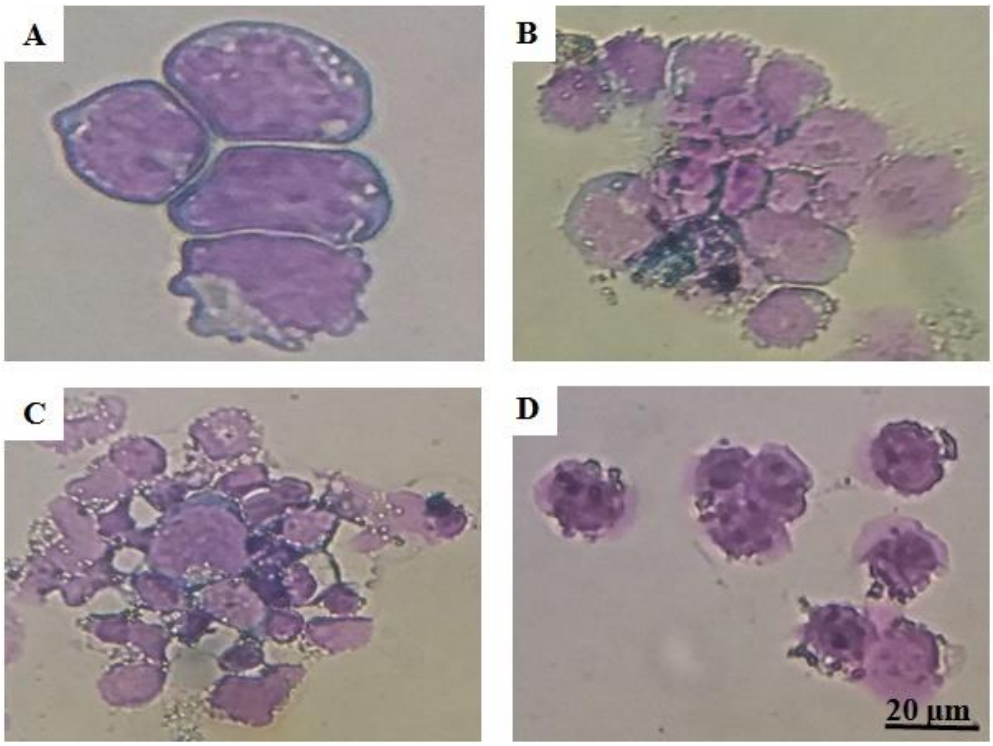


Figura 26. Análise morfológica das células MOLT-4 pela coloração May-Grunwald-Giemsa após 24 h de incubação com elaiofilina. A: Controle negativo (DMSO); B: Controle positivo (Doxorrubicina 3 µg/mL); C: elaiofina (0,3 µg/mL), D: Elaiofina (0,6 µg/mL).

Tabela 24. Valores da concentração que inibe 50% do crescimento celular (CI_{50}) e o intervalo de confiança (IC 95%) em MOLT-4 da partição com butanol após 24 e 48 h de incubação.

	MOLT-4	
Amostras	**24 h**	**48 h**
FBuOH	17,56	5,56
	(14,33 - 21,52)	(4,53 - 6,81)
Doxorubicina	3,28	0,09
	(2,35 - 4,57)	(0,08 - 0,11)

CI_{50} com seus intervalos de confiança de 95% foram calculados a partir da regressão não linear, utilizando o programa *GraphPad Prism* 5.0. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

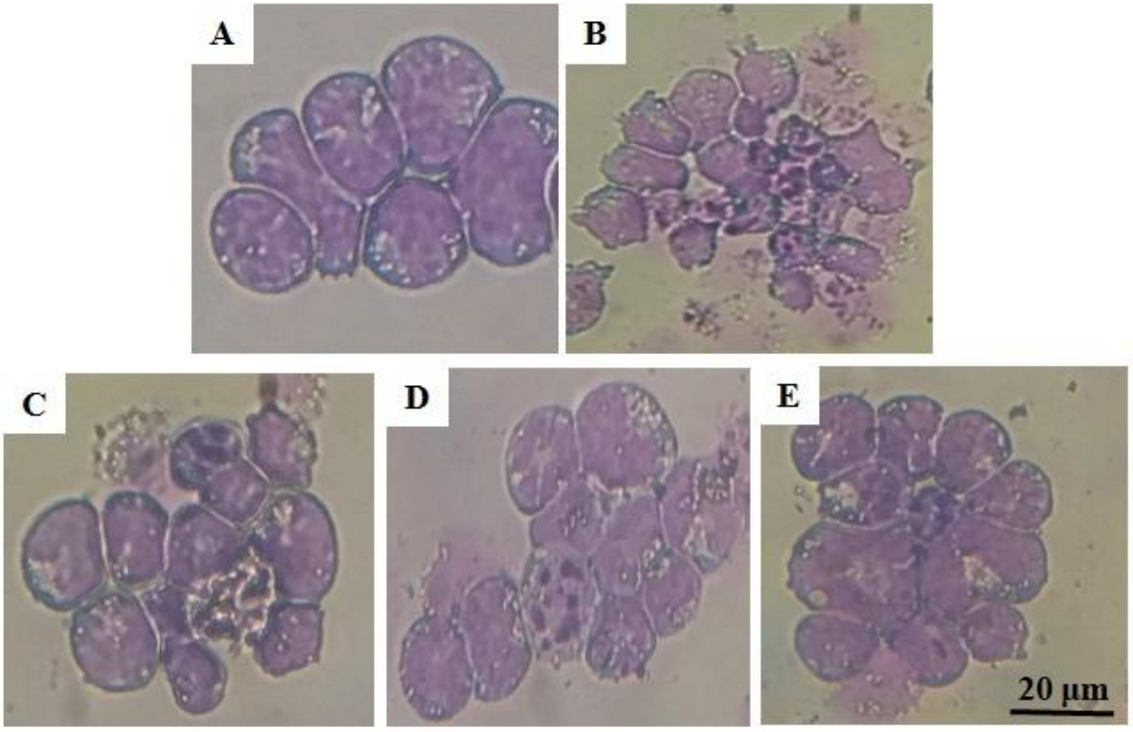


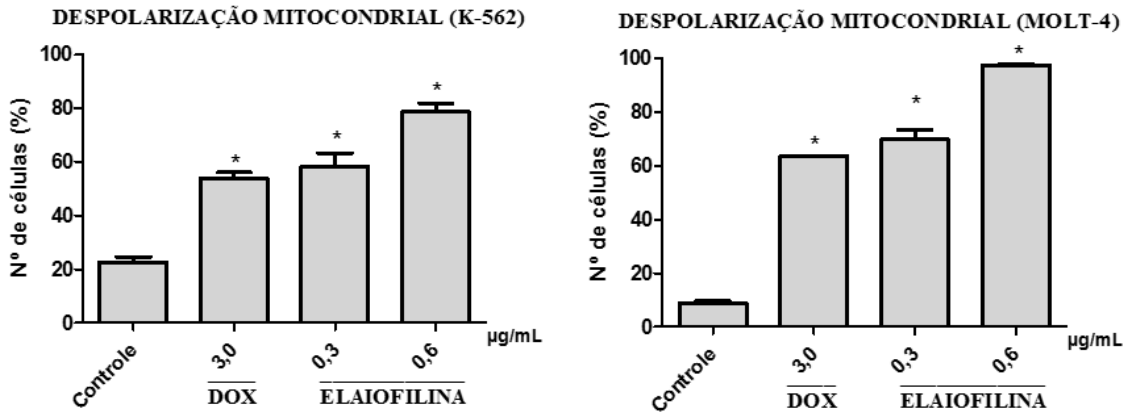
Figura 27. Análise morfológica pela coloração May-Grunwald-Giemsa após 24 h de incubação com a partição FBuOH. A: Controle negativo (DMSO); B: Controle positivo (Doxorrubicina 3 µg/mL); C: FBuOH (9 µg/mL), D: FBuOH (18 µg/mL); E: FBuOH (36 µg/mL).

A inibição da proliferação das células é essencial para a morte celular induzida por drogas e, isso é facilitado pela indução de processos apoptóticos, dado que a apoptose é uma deleção celular controlada sem inflamação. Mais de 400 estudos têm relatado a

capacidade das saponinas para tratar câncer ou induzir apoptose (THAKUR et al., 2011). Os principais mecanismos envolvidos na morte das células tratadas com saponinas são: intervenção direta do núcleo celular; aumento do sistema imunológico; e efeitos quelantes por oxidantes ou metal. Na indução da apoptose por saponinas pode ocorrer a regulação de algumas moléculas como ciclina A; pode ocorrer o bloqueio do ciclo celular na fase S, afetando a proliferação de células cancerosas no nível transcricional de proteína; e pode ocorrer a modulação do sistema de caspase, extremamente importante na morte celular programada, ativando dois membros-chaves desta cadeia, caspase 3/caspase 9 e a enzima poli (ADP-ribose) polimerase (ABOUTALEBI e MONFARED, 2016). No nosso estudo, as células MOLT-4 tratadas com FBuOH apresentaram diminuição do número de células viáveis, com morfologia celular típica do processo de apoptose (redução do volume celular e condensação da cromatina). Esse tipo de morte celular é comum em células cancerígenas tratadas com metabólitos de *Streptomyces* spp. Um estudo realizado por Naine e colaboradores (2015) mostrou uma maior percentagem de células HepG2 mortas por apoptose quando tratadas com extrato acetoetílico de *S. parvulus* VITJS11, onde os compostos presentes nesse extrato interferiam na mitose, induzindo a apoptose dentro de um curto período de tempo.

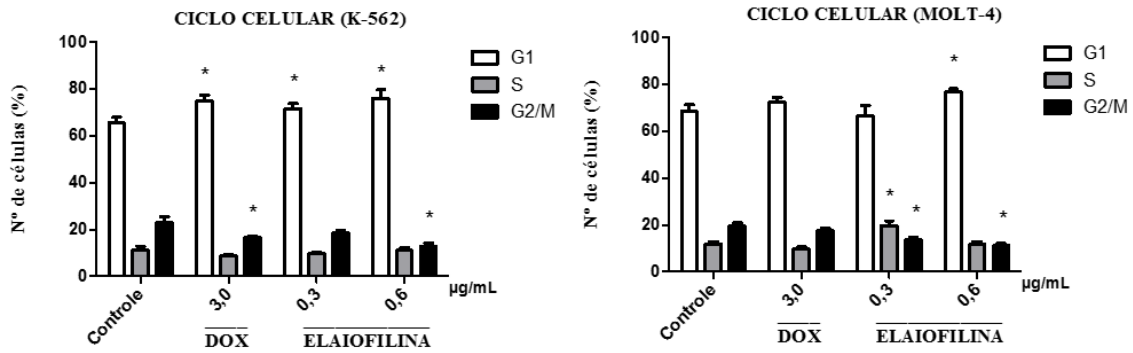
Despolarização Mitocondrial, Análise do Ciclo Celular e Fragmentação de DNA e por Citometria de Fluxo

A elaiofilina causou danos na membrana mitocondrial promovendo sua despolarização, em ambas as linhaguens testadas, apresentando em K-562 percentuais de 58 e 79% (0,3 e 0,6 µg/mL) de células despolarizadas e em MOLT-4, 70 e 98% (0,3 e 0,6 µg/mL) (Figura 28). Durante análise do ciclo celular, a elaiofilina causou parada de ciclo na fase G1 em ambas as linhagens, na K-562 apresentou percentuais de parada em G1 de 72 e 76% (0,3 e 0,6 µg/mL) e na MOLT-4, 67 e 77% (0,3 e 0,6 µg/mL) (Figura 29). A elaiofilina também promoveu um aumento no processo de fragmentação do DNA, sendo os resultados mais proeminentes na linhagem K-562 quando comparada com a linhagem MOLT-4, tendo em K-562 percentuais de 42 e 64% (0,3 e 0,6 µg/mL) de células com fragmentação do DNA e em MOLT-4, 24 e 26% (0,3 e 0,6 µg/mL) (Figura 30). Esses resultados mostram um efeito dose dependente para o composto.



	% Celular	
Despolarização	**K-562**	**MOLT-4**
Controle	22,7 ± 2,0	8,9 ± 0,8
Doxorrubicina	53,9 ± 2,1*	63,5 ± 0,1*
Elaiofilina 0,3 µg/mL	58,3 ± 5,1*	69,8 ± 3,6*
Elaiofilina 0,6 µg/mL	78,6 ± 3,3*	97,5 ± 0,2*

Figura 28. Despolarização mitocondrial determinada pela retenção do corante rodamina 123. Os resultados foram expressos pela média ± desvio padrão de dois experimentos independentes. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. * Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos usando ANOVA seguido pelo teste de Tukey`s.



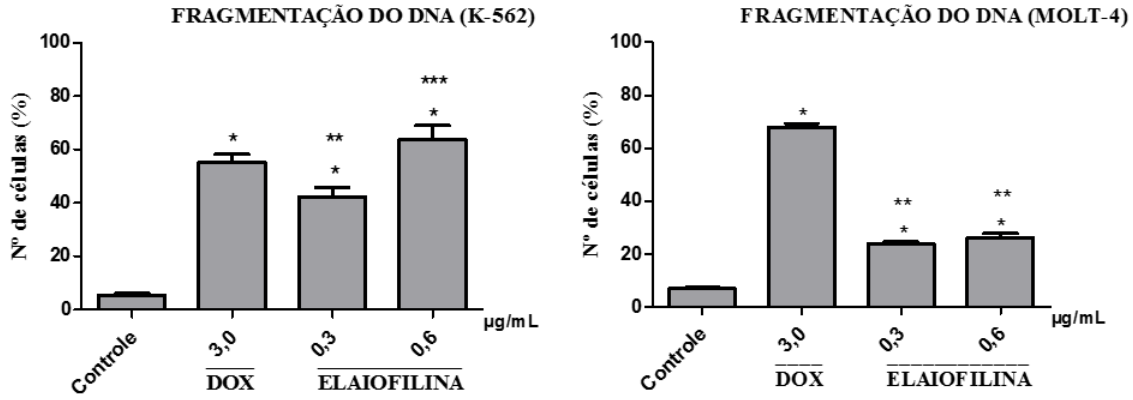
Fase do Ciclo Celular	% Celular	
CONTROLE	**K-562**	**MOLT-4**
G1	65,6 ± 2,4	68,5 ± 2,9
S	11,3 ± 1,8	11,6 ± 1,0
G2/M	23,1 ± 2,03	19,6 ± 1,3

Fase do Ciclo Celular	% Celular	
DOXORRUBICINA	**K-562**	**MOLT-4**
G1	74,8 ± 2,7*	72,5 ± 2,1
S	8,7 ± 0,6	9,9 ± 0,7
G2/M	16,5 ± 0,6*	17,6 ± 1,0

Fase do Ciclo Celular	% Celular	
ELAIOFILINA 0,3 µg/mL	**K-562**	**MOLT-4**
G1	71,6 ± 2,1*	66,6 ± 4,4
S	9,8 ± 0,6	19,7 ± 2,1*
G2/M	18,6 ± 0,9	13,6 ± 1,1*

Fase do Ciclo Celular	% Celular	
ELAIOFILINA 0,6 µg/mL	**K-562**	**MOLT-4**
G1	76,0 ± 3,6*	76,9 ± 1,1*
S	11,0 ± 1,2	11,7 ± 1,2
G2/M	12,9 ± 1,1*	11,3 ± 0,8*

Figura 29. Citometria de fluxo do ciclo celular. Os resultados foram expressos pela média ± desvio padrão de dois experimentos independentes. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos usando ANOVA seguido pelo teste de Dunnett`s. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.



	% Celular	
Fragmentação	**K-562**	**MOLT-4**
Controle	5,4 ± 0,6	6,8 ± 0,5
Doxorrubicina	55,2 ± 3,1*	68,1 ± 3,1*
Elaiofilina 0,3 µg/mL	42,3 ± 3,5*/**	23,9 ± 1,4*/**
Elaiofilina 0,6 µg/mL	63,7 ± 5,3*/***	26,2 ± 1,6*/**

Figura 30. Citometria de fluxo da fragmentação do DNA. Os resultados foram expressos pela média ± desvio padrão de dois experimentos independentes. Cinco mil eventos foram analisados em cada experimento. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos usando ANOVA seguido pelo teste de Dunnett`s. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle; ** Diferença estatisticamente significativa em relação ao padrão doxorrubicina; *** Diferença estatisticamente significativa em relação ao tratado elaiofilina 0,3 µg/mL.

Uma característica importante no processo de indução de morte celular por apoptose é o envolvimento da mitocôndria. Nosssos resultados demostram que a elaiofilina isolada de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 causou danos na membrana mitocondrial promovendo sua despolarização. Agentes candidatos a fármacos antitumorais precisam atuar no bloqueio da proliferação das células tumorais, sendo por isso, importante avaliar a fase específica do ciclo celular que a substância atua. Segundo Hwang e colaboradores (2012), o desenvolvimento do câncer tem sido associado a defeitos no controle do ciclo celular, e depende boa parte da ação mitocondrial, onde os elevados níveis de ROS significam alto risco para o DNA e dano celular, então a resposta celular é a supressão da replicação do DNA, interrompendo o ciclo celular e após uma pausa prolongada, desencadeia a morte. No nosso estudo a elaiofilina promoveu a fragmentação do DNA, ou seja, ativou caspases efetoras que ativam endonucleases causando a quebra das fitas do DNA.

5.11. TOXICIDADE AGUDA

Para dar continuidade a investigação de toxicidade foi escolhida a fração EB1 por apresentar maior teor de elaiofilina. Durante o período de observação de 14 dias, dois animais morreram do grupo que recebeu, por via oral, a fração na dose de 2000 mg/kg. Seguindo o protocolo da OECD (2001), quando ocorre a morte de dois a três animais do grupo tratado, é necessário repetir o experimento diminuindo a dose para 300 mg/kg. Nesse grupo tratado com a dose de 300 mg/kg não foram registrados óbitos e nenhum comportamento anômalo que pudesse ser atribuído à administração da fração. O consumo de água e ração dos animais tratados não diferiu significativamente dos animais do grupo controle (Tabela 25). A média de peso corporal dos animais no final do experimento se mostrou semelhante ao grupo controle, não apresentando diferença significativa entre eles, também não se observou ganho de peso em nenhum dos animais durante período experimental (Tabela 25). Os órgãos (baço, fígado e rim) não apresentaram alterações macromorfológicas importantes quanto ao aspecto ou cor, assim como os valores de peso relativo não diferiram estatisticamente entre os animais tratados com a fração e os animais controle (Tabela 25). A fração não apresentou toxicidade frente a células sanguíneas de camundongos, pois, não houve diferença significativa entre os parâmetros hematológicos analisados dos animais tratados com a fração quando comparados aos animais controle (Tabela 26). Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a fração EB1 apresenta uma toxicidade mediana com DL_{50} de 1000 mg/kg, se enquadrando na categoria 4 de toxicidade da *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (GHS) (OECD, 2001).

Dentre os metabólitos de *Streptomyces* sp UFPEDA 3405, *Streptomyces* sp UFPEDA 3412 e *Streptomyces* sp UFPEDA 3413, apenas o extrato EMeOH-3405 foi escolhido para dar continuidade a investigação de toxicidade por apresentar atividade citotóxica em linhagens tumorais. Não foi avaliada a toxicidade aguda da fase FBuOH devido ao baixo redimento desta fase. Durante o período de observação de 14 dias, não foram registrados óbitos e nenhum comportamento anômalo que pudesse ser atribuído à administração do extrato. O consumo de água e ração dos animais tratados com extrato EMeOH-3405 não diferiu significativamente dos animais do grupo controle (Tabela 27). A média de peso corporal dos animais do grupo tratado no final do experimento não apresentou diferença significativa em relação ao controle (Tabela 27). Os órgãos (baço, fígado e rim) não apresentaram alterações macromorfológicas importantes quanto ao

aspecto ou cor, assim como os valores de peso relativo não diferiram estatisticamente entre os animais tratados com extrato EMeOH-3405 e os animais controle (Tabela 27). O extrato EMeOH-3405 na dose de 2000 mg/kg não apresentou toxicidade frente a células sanguíneas de camundongos, pois, não houve diferença significativa entre os parâmetros hematológicos analisados dos animais tratado com o extrato quando comparados aos animais controle (Tabela 28). Com base na DL_{50}, o extrato EMeOH-3405 se enquadra na categoria 5 de toxicidade da *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (GHS), onde são agrupadas substâncias que apresentam baixa periculosidade aguda, mas que sob certas circunstâncias, podem apresentar perigo a populações mais susceptíveis, estando nessa categoria substâncias com DL_{50} de 2000 – 5000 mg/kg (OECD, 2001).

A toxicidade de uma substância por via oral pode ser classificada como extremamente tóxica ($DL_{50} \leq 25$ mg/kg), altamente tóxica (DL_{50} 100 - 500 mg/kg), mediamente tóxica (DL_{50} 500 – 2000mg/kg) e pouco tóxica ($DL_{50} > 2000$ mg/kg) (ZANETTI et al., 2003). No nosso estudo, não houve redução de peso nos animais, o que indica não ter havido grandes efeitos colaterais sobre o peso corpóreo. Este é um parâmetro usado para avaliar a resposta terapêutica de fármacos e também indicar efeitos adversos relacionados ao seu uso. Suganthi e Ravikumar (2012), ao investigar o potencial tóxico agudo dos extratos acetoetílicos de *Streptomyces* sp. RSAUT 20 e *Streptomyces scabiei* RSAUK 49 em ratos, não observaram diferenças significativas entre os grupos tratados e controle com relação ao peso corporal, parâmetros hematológicos, aspecto e peso de órgãos extirpados. Estes autores encontraram uma DL_{50} de 2000 mg/kg, concluindo que os extratos não apresentam letalidade ou sintomas tóxicos, corroborando com os nossos resultados.

Tabela 25. Consumo de água, ração, evolução ponderal e peso relativo dos órgãos de camundongos tratados com fração dos metabólitos secundários de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370.

Grupos	**Consumo de água**	**Consumo de ração**	**Peso dos animais (g)**	**Peso relativo dos órgãos**		
	(mL/dia)	**(g/dia)**	**Inicial/Final**	**Baço**	**Fígado**	**Rim**
Controle	6,56 ± 0,5	4,71 ± 0,3	24,6 ± 0,3 - 26,7 ± 0,5	0,06 ± 0,0	0,53 ± 0,05	0,06 ± 0,0
EB1	6,30 ± 0,5	4,17 ± 0,3	23,2 ± 1,0 - 25,9 ± 0,9	0,06 ± 0,0	0,49 ± 0,04	0,06 ± 0,0

Os valores são expressos como média ± SEM (n = 5 para cada grupo). O peso relativo de órgãos foi calculado como (peso do órgão / peso do corpo).

Tabela 26. Efeito da fração EB1 do extrato metanólico da biomassa de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 sobre os parâmetros hematológicos de camundongos na toxicidade oral aguda.

Parâmetros	**Controle**	**EB1**
Hemácias (10^6/mm^3)	8,5 ± 0,4	8,1 ± 0,4
Hemoglobina(g/dL)	13,4 ± 0,7	13,6 ± 0,5
Hematócrito (%)	44,2 ± 1,9	42,9 ± 2,3
VCM (µg)	52,2 ± 0,3	53,2 ± 1,4
HCM (pg)	15,8 ± 0,6	16,8 ± 0,3
CHCM (%)	30,3 ± 0,9	31,7 ± 0,7
Leucócitos (10^3/mm^3)	7,1 ± 0,7	6,8 ± 0,6

Os valores são expressos como média ± SEM (n = 5 para cada grupo).

Tabela 27. Consumo de água, ração, evolução ponderal e peso relativo dos órgãos de camundongos tratados com metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405.

Grupos	**Consumo de água (mL/dia/animal)**	**Consumo de ração (g/dia/animal)**	**Peso dos animais (g) Inicial/Final**	**Peso relativo dos órgãos**		
				Baço	**Fígado**	**Rim**
Controle	7,7 ± 0,6	5,6 ± 0,5	24,9 ± 0,5 - 30,9 ± 1,0	0,08 ± 0,0	0,73 ± 0,05	0,06 ± 0,0
EMeOH-3405	6,9 ± 0,7	6,4 ± 0,4	25,0 ± 0,9 - 30,2 ± 1,2	0,08 ± 0,0	0,71 ± 0,04	0,06 ± 0,0

Os valores são expressos como média ± SEM (n = 5 para cada grupo). O peso relativo de órgãos foi calculado como (peso do órgão / peso do corpo).

Tabela 28. Efeito dos metabólitos secundários de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405 sobre os parâmetros hematológicos de camundongos na toxicidade oral aguda.

Parâmetros	Controle	EMeOH-3405
Hemácias (10^6/mm^3)	7,8 ± 0,3	7,5 ± 0,4
Hemoglobina(g/dL)	11,6 ± 0,6	10,9 ± 0,5
Hematócrito (%)	38,9 ± 1,7	36,5 ± 2,2
VCM (μg)	50,0 ± 1,4	48,4 ± 1,4
HCM (pg)	14,9 ± 0,3	14,5 ± 0,3
CHCM (%)	29,9 ± 0,4	30,0 ± 0,8
Leucócitos (10^3/mm^3)	10,6 ± 1,2	8,9 ± 0,7

Os valores são expressos como média ± SEM (n = 5 para cada grupo).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo permitiram concluir que:

- *Streptomyces* sp UFPEDA 3370 foi identificada como *S. hygroscopicus*;
- O extrato metanólico da biomassa proveniente da fermentação submersa de *S. hygroscopicus* apresentou melhor atividade antimicrobiana e citotóxica. A fase butanólica desse extrato exibiu os menores valores da CMI e CI_{50}, por isso foi fracionado. Dentre as frações (EB1, EB2A, EB2B e EB3M), a fração EB1 mostrou CMI $\leq$ 3,9 µg/mL frente a bactérias Gram-positivas, bactéria álcool ácido-resistente, leveduras e fungos filamentosos; e CI_{50} frente às linhagens tumorais humanas em estudo, menores ou iguais a doxorrubicina, utilizada como padrão, expondo maior seletividade para células leucêmicas. No estudo preliminar de toxicidade *in vivo* essa fração apresentou DL_{50} de 1000 mg/kg, sendo detectada na CCD a presença de alcalóides;
- A partir do extrato metanólico da biomassa de *S. hygroscopicus* UFPEDA 3370 foi obtido um composto identificado através de métodos espectroscópicos por elaiofilina, que apresentou CMI de 0,01 µg/mL frente *E. faecalis* e CI_{50} de 0,1 µg/mL frente HL-60 e MOLT-4. Nos testes de mecanismos de ação, a elaiofilina apresentou indícios de morte celular por apoptose durante a análise morfológica, despolarização mitocondrial, ciclo celular e fragmentação do DNA;
- Os extratos de *Streptomyces* sp. UFPEDA 3405, *Streptomyces* sp. UFPEDA 3412 e *Streptomyces* sp. UFPEDA 3413 apresentaram baixa atividade antioxidante. O extrato EMeOH-3405 apresentou melhor atividade citotóxica, por isso foi particionado. Dentre as fases, a FAcOEt apresentou melhor atividade antimicrobiana (CMI de 0,31 mg/mL frente a *P. aeruginosa*), sendo nessa fase detectada a presença de flavanóides. Enquanto, a FBuOH apresentou melhor atividade citotóxica (CI_{50} de 1,1 µg/mL frente a MOLT-4), não causou citotoxicidade em PBMC e em eritrócitos humanos, com indícios de morte celular por apoptose, sendo detectada a presença de saponinas. O EMeOH-3405 apresentou $DL_{50} \geq 5000$ mg/kg.

REFERÊNCIAS

ABOUTALEBI, R.; MONFARED, A. Saponins terpenoids; a brief review of mechanisms of actions and anti-cancerous effects. **American Chemical Science Journal**, v.12, p. 1-8, 2016.

AHMED, S. A.; GOGAL JR, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, p. 143-152, 2013.

ALENZI, F. Q.; LOTFY, M.; WYSE, R. KH. Swords of cell death: caspase activation and regulation. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 11, p. 271-280, 2010.

ALLEY, M. C.; SCUDIERE, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R.. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculturetetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, p. 589-601, 1998.

ALMAGRO, M. C.; VUCIC, D. Necroptosis: pathway diversity and characteristics. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 39, p. 56-62, 2015.

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 260-271, 2010.

ANIBOU, M.; CHAIT, A.; ZYAD, A.; TAOURIT, M.; OUHDOUCH, Y.; BENHERREF, A. Actinomycetes from Moroccan habitats: isolation and screening for cytotoxic activities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2019-2025, 2008.

ANTUNES, T. C.; SALAMONI, S. P.; FRAZZON, A. P. G.; GERMANI, J. C.; SAND, S. T. V. D. Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, p. 131-138, 2013.

ANZAI, K.; OHNO, M.; NAKASHIMA, T.; KUWAHARA, N.; SUZUKI, R.; TAMURA, T.; KOMAKI, H.; MIYADOH, S.; HARAYAMA, S.; ANDO, K. Taxonomic distribution of *Streptomyces* species capable of producing bioactive compounds among strains preserved at NITE/NBRC. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 287-295, 2008.

APRAIZ, A.; BOYANO, M. D.; ASUMENDI, A. Cell-centric view of apoptosis and apoptotic cell death-inducing antitumoral strategies. **Cancers**, v. 3, p. 1042-1080, 2011.

BADARINATH, A. V.; MALLIKARJUNA RAO, K.; CHETTY, C. M. S.; RAMKANTH, S.; RAJAN, T. V. S.; GNANAPRAKASH, K. A Review on in-vitro antioxidant methods: comparisions, correlations and considerations. **International Journal of Pharmaceutical Technology and Research**, v. 2, p. 1276-1285, 2010.

BALACHANDRAN, C.; SANGEETHA, B.; DURAIPANDIYAN, V.; RAJ, M. K.; IGNACIMUTHU, S.; AL-DHABI, N. A.; BALAKRISHNA, K.; PARTHASARATHY, K.; ARULMOZHI, N. M.; ARASU, M. V. A flavonoid isolated from *Streptomyces* sp. (ERINLG-4) induces apoptosis in human lung cancer A549 cells through p53 and cytochrome c release caspasedependant pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 24-35, 2014.

BALLAV, S.; DASTAGER, S. G.; KERKAR, S. Biotechnological significance of actinobacterial research in India. **Recent Research in Science and Technology**, v. 4, n. 4, p. 31-39, 2012.

BASKAR, R.; LEE, K. A.; YEO, R.; YEOH, K. W. Cancer and radiation therapy: currentadvances and future directions. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, p. 193-199, 2012.

BAUMANN, K. Cell death: multitasking p53 promotes necrosis.**Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.13, p. 480-481, 2012.

BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. **Molecules**, v.18 p. 6852-6865, 2013.

BEGG, A.C.; STEWART, F. A.; VENS, C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, p. 239-253, 2011.

BERGHE, T. V.; LINKERMANN, A.; JOUAN- LANHOUET, S.; WALCZAK, H.; VANDENABEELE, P. Regulated necrosis: the expanding net work of non-apoptotic cell death pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.15, p. 135-147, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel – Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRUIN, E. C.; MEDEMA, J. P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. **Cancer Treatment**, v. 34, p. 737–749, 2008.

BRUNELLE, J. K.; ZHANG, B. Apoptosis assays for quantifying the bioactivity of anticancer drug product. **Drug Resistance Updates**, v. 13, p. 172-179, 2010.

BURG, R. W.; MILLER, B. M.; BAKER, E. E.; BIRNBAUM, J.; CURRIE, S. A.; HARTMAN, R.; KONG, Y. L.; MONAGHAN, R. L.; OLSON, G.; PUTTER, I.; TUNAC, J. B.; WALLICK, H.; STAPLEY, E. O.; OIWA, R.; OMURA, S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, p. 361-367, 1979.

CHATER, K. F. Differentiation in Streptomyces: the properties and programming of diverse cell-types. In: DYSON, P., editor. *Streptomyces*: Molecular Biology and Biotechnology. Caister Academic Press; Norfolk, UK. p. 43-86, 2011.

CHIPUK, J. E.; MOLDOVEANU, T.; LLAMBI, F.; PARSONS, M. J.; GREEN, D. R. The Bcl-2 family reunion. **Molecular Cell**, v. 37, p. 299-310, 2010.

CHOI A. L.; SUN, G.; ZHANG, Y.; GRANDJEAN, P. Developmental fluoride neurotoxicity: a systematic review and meta-analysis. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, p. 1362-1368, 2012.

CHOKEKIJCHAI, S.; KOJIMA, E.; ANDERSON, S.; NOMIZO, M.; TANAKA, M.; MACHIDA, M.; DATE, T.; TOYOTA, K.; ISHIDA, S.; WATANABE, K.; YOSHIOKA, H.; ROLLER, P. P.; MURAKAMI, K.; MITSUYA, H. NP-06: a novel anti-human immunodeficiency virus polypeptide produced by a *Streptomyces* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2345-2347, 1995.

CLSI (2008) Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts and Filamentous Fungi. Approved standard: M27-A3 e M38-A2. Wayne (PA): CLSI, 2008

CLSI (2010) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twentieth Informational Supplement: M100-S20 e M100-S20-U. Wayne (PA): CLSI, 2010

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, p. 1-15, 2000.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

CONTI, R.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiontes como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência e Cultura**, v. 64, p. 43-47, 2012.

COSTA-LOTUFO, L. V.; CUNHA, G. M.; FARIAS, P. A.; VIANA, G. S.; CUNHA, K. M.; PESSOA C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. The cytotoxic and embriotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffi* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231-1234, 2002.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **Journal of Antibiotics**, v. 62, p. 5-16, 2009.

DIETER, A.; HAMM, A.; FIEDLER, H. P.; GOODFELLOW, M.; MÜLLER, W. E. G.; BRUN, R.; BEIL, W.; BRINGMANN, G. Pyrocoll, an antibiotic, antiparasitic and antitumor compound produced by a novel alkaliphilic *Streptomyces* strain. **The Journal of Antibiotics**, v. 56, p. 639-646, 2003.

DOSEUNG, L.; WOO, J. K.; KIM, D.; KIM, M.; CHO, S. K.; KIM, J. H.; PARK, S. P.; LEE, H. Y.; RIU, K. Z.; LEE, D. S. Antiviral activity of methylelaiophylin, an α-glucosidase inhibitor. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p 263-266, 2011.

DREWS, G. Ferdinand Cohn: a promoter of modern microbiology. **Nova Acta Leopoldina**, v. 80, p. 13-43, 1999.

FANG, P. ; WANG, Z. ; SACHS, M. S. Evolutionarily conserved features of the arginine attenuator peptide provide the necessary requirements for its function in translational regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 1-44, 2000.

FLARDH, K.; BUTTNER, M. J. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nature Review Microbiology**, v. 7, p. 36-49, 2009.

FOUCHE, G.; CRAGG, G. M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V. J.; SENABE, J. *In vitro* anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 455-461, 2008.

FRAUKE, C. P.; RALF, G. B. Geosmin and related volatiles in bioreactor-cultured *Streptomyces citreus* CBS 109.60. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1295-1299, 1996.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, p. 329-344, 2015.

FURUMAI, T.; YAMAKAWA, T.; YOSHIDA, R.; IGARASHI, Y.Clethramycin, a new inhibitor of pollen tube growth with antifungalactivity from *Streptomyceshygroscopicus* TP-A0623. **Journal of Antibiotics**, v. 56, p.700-704, 2003.

GALES, D.; CLARK, C.; MANNE, U.; SAMUEL, T. The chemokine CXCL8 in carcinogenesis and drug response. **Oncology**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

GAUTHAM, S. A.; ONKARAPPA, R. *In vitro* Antioxidant activity of Metabolite from *Streptomyces fradiae* strain GOS1. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 5, p. 235-244, 2013.

GESHEVA, V. Distribution of psychrophilic microorganisms in soils of Terra Nova Bay and Edmonson Point, Victoria land and their biosynthetic capabilities. **Polar Biology**, v. 32, p. 1287-1291, 2009.

GUPTA, D. Methods for determination of antioxidant capacity: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, p. 546-566, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of câncer: the nextgeneration. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HARASHIMA, H.; DISSMEYER, N.; SCHNITTGER, A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. **Trends in Cell Biology**, v. 23, p. 345-356, 2013.

HARBORNE, J. B. In: Harbone, JB, Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis. Nova York: Chapman and Hall, 1998.

HARVEY, A. L. ; EDRADA-EBEL, R. ; QUINN, R. J. The re-emergence of naturalproducts for drugdiscovery in the genomicsera. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, p. 111-129, 2015.

HASSAN, M.; WATARI, H.; ABUALMAATY, A.; OHBA, Y.; SAKURAGI, N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, p.1-23, 2014.

HAYDOCK, S. F.; MIRONENKO, T.; GHOORAHOO, H. I.; LEADLAY, P. F. The putative elaiophylin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. DSM4137 is adjacent to genes encoding adenosylcobalamin-dependent methylmalonyl CoA mutase and to genes for synthesis of cobalamin. **Journal of Biotechnology**, v. 113, p. 55-68, 2004.

HE, H.; WILLIAMSON, T.; SHEN, B.; GRAZIANI, E. I.; YANG, H. Y.; SAKYA, S. M.; PETERSEN, P. J.; CARTER, G. T. Mannopeptimycins, novel antibacterial glycopeptides from Streptomyces hygroscopicus, LL-AC98. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 9729-9736, 2002.

HUANG, C.; FRETER, C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 924-949, 2015.

HWANG, J. H.; HWANG, I. S.; LIU, Q. H.; WOO, E. R.; LEE, D. G. Medioresinol leads to intracellular ROS accumulation and mitochondria-mediated apoptotic cell death in Candida albicans. **Biochimie**, v. 94, p. 1784–1793, 2012.

HWANG, K. S.; KIN, H. U.; CHARUSANTI, P.; PALSSON, B. Ø.; LEE, S. Y. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 255-268, 2014.

IGARASHI, Y.; MIURA, S. S.; FUJITA, T.; FURUMAI, T. Pterocidin, a cytotoxic compound from the endophytic *Streptomyces hygroscopicus*. **JournalofAntibiotics**, v. 59, n. 3, p. 193-195, 2006.

INCA - Instituto Nacional do Câncer (Brasil): Estimativas 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>. Acesso em: 04 dez. 2015.

JAFARNEJAD, S. M; LI, G. Regulation of p53 by ING family members in suppression of tumor initiation and progression. **Cancer Metastasis Review**, v.31, p. 55-73, 2012.

JEMAL, A.; CENTER, M. M.; DESANTIS, C.; WARD, E. M. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**. v. 19, p. 1893-1907, 2010.

KAVITHA, A.; PRABHAKAR, P.; VIJAYALAKSHMI, M.; VENKATESWARLU, Y. Purification and biological evaluation of the metabolites produced by *Streptomyces* sp. TK-VL_333. **Research Microbiology**, v. 161, p. 335-345, 2010.

KEKUDA, P.; ONKARAPPA, P. Antioxidant, anthelmintc and enzyme inhibitory potencial of *Streptomyces variabilis* strain PO-178 isolated from Western Ghats soil of Agumbe, Karnataka, India. **Journal of Biological and Scientific Opinion**, v. 2, p. 170-176, 2014.

KELLY, P.N.; STRASSER, A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. **Cell Death & Differentiation**, v 18, p. 1414-1424, 2011.

KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J. ; KROEMER, G. Cell death assays for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 221-237, 2011.

KIM, J.; KUNDU, M.; VIOLLET, B.; GUAN, K.L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nature Cell Biology**, v.13, p. 132-141, 2011.

KOFF, J. L.; RAMACHANDIRAN, S.; BERNAL-MIZRACHI, L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 2942-2955, 2015.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 423-435, 2010.

KUMAR, D.; RAWAT, D. S. Marine natural alkaloids as anticancer agents. **Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry**, p. 213-268, 2011.

KUMAR, P. S.; AL-DHABI, N. A.; DURAIPANDIYAN, V.; BALACHANDRAN, C.; KUMAR, P. P.; IGNACIMUTHU, S. *In vitro* antimicrobial, antioxidant and cytotoxic properties of *Streptomyces lavendulae* strain SCA5. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 1-12, 2014.

LEE, D. R.; LEE, S. K.; CHOI, B. K.; CHENG, J.; LEE, Y. S.; YANG, S. H.; SUH, J. W. Antioxidant activity and free radical scavenging activities of *Streptomyces* sp. strain MJM 10778. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, p. 962-967, 2014.

LEE, H. B.; KIM, C. J.; KIM, J. S.; HONG, K. S.; CHO, K. Y. A bleaching herbicidal activity of methoxyhygromycin (MHM) produced by na actinomycete strain *Streptomyces* sp. 8E-12. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 387-391, 2003.

LEE, J. G.; YOO, I. D.; KIM, W. G. Differential anntiviral activity of benzastatin c and its dechlorinated derivative from *Streptomyces nitrosporeus*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 795-797, 2007.

LEE, J. W.; PARK, S.; TAKAHASHI, Y.; WANG, H.G. The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. **PloS ONE**, v. 5, p. 153-194, 2010.

LEE, S. J.; KIM, H. P.; PARK, B. K.; AHN, S. C.; LEE, H. S.; AHN, J. S. Topical antiinflammatory activity of dianemycin isolated from *Streptomyces* sp. MT 2705-4. **Archives of Pharmacal Research**, v. 20, n. 4, p. 372-374, 1997.

LEOUIFOUDI, I.; HARNAFI, H.; ZYAD, A. Olive mill waste extracts: polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities. **Advances in Pharmacological Sciences**, 2015.

LERTCANAWANICHAKUL, M.; PONDET, K.; AND KWANTEP, J. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of bioactive compounds (secondary metabolite) extracted from *Streptomyces lydicus* A2. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, p. 17-21, 2015.

LI, S.; WU, L.; CHEN, F.; WANG, H.; SUN, G.; WANG, Y. Rapid identification of elaiophylin from Streptomyces hygroscopicus 17997, a geldanamycin producer. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.15, p. 80-84, 2011.

LIU, C. P.; TSAI, W. J.; LIN, Y. L.; LIAO, J. F.; CHEN, C. F.; KUO, Y. C. The extracts from *Nelumbonucifera* suppress cell cycle progression, cytokine genes expression, and cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. Life **Sciences**, v. 75, p. 699-716, 2004.

LIU, J. J.; LIN, M.; YU, J. Y.; LIU, B.; BAO, J. K. Targeting apoptotic and autophagic pathways for câncer therapeutics. **Cancer letters**, v. 300, p. 105-114, 2011.

LOMBÓ, F.; BLANCO, G.; FERNÁNDEZ, E.; MÉDEZ, C.; SALAS, J. A. Characterization of *Streptomices argillaceus* gene encoding a polyketide synthase involved in the biosynthesis of the antitumor mithramycin. **Elsevier Science**, v. 172, p. 87-91, 1996.

LOPEZ, J.; TAIT, S. W. G. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. **British Journal of Cancer**, v. 112, p. 957-962, 2015.

LUO, J.; WANG, Y.; TANG, S.; LIANG, J.; LIN, W.; LUO, L. Isolation and identification of algicidal compound from *Streptomyces* and algicidal mechanism to *Microcystis aeruginosa*. **PlosOne**, v. 8, p. 1-14, 2013.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Brock: Biologia de los microrganismos. 10 ed. Pearson: Prentice Hall. p. 1011, 2004.

MARIÑO, G.; NISSO-SANTANO, M.; BAEHRECKE, E. H.; KROEMER, G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 81-94, 2014.

MASKEY, R. P.; HELMKE, E.; KAYSER, O.; FIEBIG, H. H.; MAIER, A.; BUSCHE, A.; LAATSCH, H. Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with high antimalaria activity from a marine *Streptomyces* and their absolute stereo chemistry. **Journal of Antibiotics**, v. 57, p. 17-23, 2004.

MATTOS, L.M.; MORETTI, C.L.; MUNIZ L.B.; SILVA, E.Y.Y. da. Protocolo de análise para determinação da atividade antioxidante total em hortaliças no sistema Beta-caroteno/ácido linoléico. Embrapa -ComunicadoTécnico, p.1-2, 2009.

MOHAMMAD, R. M.; MUQBIL, I.; LOWE, L.; YEDJOU, C.;, HSU, H. Y.; LIN, L. T.; SIEGELIN, M. D.; FIMOGNARI, C.; KUMAR, N. B.; DOU, Q. P.; YANG, H.; SAMADI, A. K.; RUSSO, G. L.; SPAGNUOLO, C.; RAY, S. K.; CHAKRABARTI, M.; MORRE, J. D.; COLEY, H. M.; HONOKI, K.; FUJII, H.; GEORGAKILAS, A. G.; AMEDEI, A.; NICCOLAI, E.; AMIN, A.; ASHRAF, S. S.; HELFERICH, W. G.; YANG, X.; BOOSANI, C. S.; GUHA, G.; BHAKTA, D.; CIRIOLO, M. R.; AQUILANO, K.; CHEN, S.; MOHAMMED, S. I.; KEITH, W. N.; BILSLAND, A.; HALICKA, D.; NOWSHEEN, S.; AZMI, A. S. Broad targeting of resistance to apoptosis in câncer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. 78-103, 2015.

NAGELKERKE, A.; SWEEP, F. C. G. J.; GEURTS-MOESPOT, A.; BUSSINK, J.; SPAN, P. N. Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part I: Molecular pathways control ling autophagy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 31, p. 89-98, 2015.

NAIKI, T.; KAWAI, N.; OKAMURA, T.; NAGATA, D.; KOJIMA, Y.; AKITA, H.; YASUI, T.; TOZAWA, K.; KOHRI, K. Neoadjuvant hormonal therapyis a feasible option in laparoscopic radical prostatectomy. **BMC Urology**, v. 12, p. 1-6., 2012.

NAIK, S. R.; HARINDRAN, J.; VARDE, A. B. Pimprinine, an extracellular alkaloid produced by *Streptomyces* CDRIL-312: fermentation, isolation and pharmacological activity.**Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 1-10, 2001.

NAINE, S. J.; DEVI, C. S.; MOHANASRINIVASAN, V.; VAISHNAVI, B. Antimicrobial, antioxidante and cytotoxic activity of marine *Streptomyces parvulus* VITJS11 crude extract. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 58, p. 198-207, 2015.

NASCIMENTO, T. C. E. S.; GOMES, J. E. G.; NASCIMENTO, P. L. A.; SILVA, A. C.; MEDEIROS, E. V.; FALCÃO, R. E.; TEIXEIRA, M. F. S.; LIMA, G. M. S.; PORTO, L. F.; MOREIRA, K. L. Partial biochemical characterization of a thermostablechitinase produced by *Streptomyces owaasiensis* isolated from lichens of the amazonian region. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 2830-2834, 2014.

NETT, M.; IKEDA, H.; MOORE, B. S. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. **Natural Product Reports**. v. 26, p. 1362-1384, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Nature Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NILADEVI, K. N.; SUKUMARAN, R. K.; PREMA, P. Utilization of rice straw for laccase production by *Streptomyces psammoticus* in solid-state hermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 665-674, 2007.

NOOMNUAL, S.; THASANA, N.; SUNGKEEREE, P.; MONGKOLSUK, S.; LOPRASERT, S.Streptanoate, a new anticancer butanoate from *Streptomyces* sp. DC3. **The Journal of Antibiotics**, v. 69, p. 124-127, 2016.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. Guideline for the Testing of Chemicals, p. 1-14, dezembro, 2001.

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

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista de Medicina**, v. 89, p. 21-31, 2010.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F.T.; ZHOU, T.T.; LIU, B.; BAO, J.K. Programmed cell death pathwas in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, p. 487-498, 2012.

PALUMBO, M. O.; KAVAN, P.; MILLER JR, W. H.; PANASCI, L.; ASSOULINE, S.; JOHNSON, N.; COHEN, V.; PATENAUDE, F.; POLLAR, M.; JAGOE, R. T.; BATIST, G. Systemic câncer therapy: achievements and challenges that lie ahead. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 1-9, 2013.

PANDA, P. K.; MUKHOPADHYAY, S.; DAS, D. N.; SINHA, N.; NAIK, P. P.; BHUTIA, S. K. Mechanism of autophagic regulation in carcinogenesis and cancer therapeutics. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 39, p 43-55, 2015.

PAPATRIANTAFYLLOU, M. Celldeath: Programmed necrosis: putting the pieces together. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 135-138, 2012.

PETERS, C.; BROWN, S. Antibody–drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. **Bioscience Reports**, v. 35, p. 1-20, 2015.

PISOSCHI, A. M.; CIMPEANU, C.; PREDOI, G. (2015). Eletrochemical methods for total antioxidante capacity and its main contributors determination: a review. **Open Chemistry Journal**, v.13, p. 824-856, 2015.

PRABAVATHY, V. R.; MATHIVANAN, N.; MURUGESAN, K. Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* sp. PM5. **Biological Control**, v. 39, p. 313-319, 2006.

PRAPAGDEE, B.; KUEKULVONG, C.; MONGKOLSUK, S. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. **International Journal of Biological Sciences**, v.4, p. 330-337, 2008.

PRASHANTHI, K.; SURYAN, S.; VARALAKSHMI, K. N. In vitro anticancer property of yellow pigment from Streptomyces griseoaurantiacus JUACT 01, v. 58, p. 869-876, 2015.

PRIETO, P., PINEDA, M., AND AGUILAR, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PROCÓPIO, R. E. L.; SILVA, I. R.; MARTINS, M. K.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, J. M. Antibioticos produced by *Streptomyces*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, p. 466-471, 2012.

PUDER, C.; KRASTEL, P.; ZEECK, A. Streptazones A, B1, B2, C, and D: new piperidine alkaloids from *Streptomycetes*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n.9, p. 1258-1260, 2000.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cátion decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 284-289, 2001.

RONG, X.; HUANG, Y.Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygroscopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, p. 7-18, 2012.

SANCHEZ, L. M.; WONG,, W. R.; RIENER, R. M.; SCHULZE, C. J.; LININGTON, R. G. Examining the fish microbiome: vertebrate-derived bacteria as an environmental niche for the discovery of unique marine natural products. Plos One, v. 7, p. 1-10, 2012.

SAURAV, K.; KANNABIRAN, K. Cytotoxicity and antioxidant activity of 5-(2, 4dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one extracted from marine Streptomyces VITSVK5 spp. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, p. 81-86, 2012.

SELVAMEENAL, L.; RADHAKRISHNAN, M.; BALAGURUNATHAN, R. Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 5, p. 499-504, 2009.

SER, H. L.; PALANISAMY, U. D.; YIN, W. F.; CHAN, K. G.; GOH, B. H.; LEE, L. H. A novel Malaysian mangrove soil actinobacteria with antioxidative activity na cytotoxic potential against human câncer cell lines. **Scientific Reports**, 2016.

SHENG, Y.; LAM, P. W.; SHAHAB, S.; SANTOSA, D. A.; PROTEAU, P. J.; ZABRISKIE, T. M.; MAHMUD, T. (2015). Identification of elaiophylin skeletal variants from the Indonesian *Streptomyces* sp. ICBB 9297. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 2768-2775, 2015.

SHEN, H. LAIRD, P.W. Interplay between the cancer genome and epigenome. **Cell**, v. 153, p. 38 -55, 2013.

SHIRLING, E. B.; GOTTILEB, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 6, p. 313-340, 1966.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. CA: a cancer Journal for Clinicians, v. 65, p. 5-29, 2015.

SILVA, G. M. M.; BEZERRA, R. P.; TEIXEIRA, J. A.; PORTO, T. S.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.Fibrinolyticprotease production by new *Streptomyces* sp. DPUA 1576 from Amazon lichens. **Electronic Journal of Biotechnology**,v. 18, p. 16–19, 2015.

SILVA, I. R.; MARTINS, M. K.; CARVALHO, C. M.; AZEVEDO, J. L.; PROCÓPIO, R. E. L. The effect of varying culture conditions on the production of antibiotics by *Streptomyces* spp., isolated from the Amazonian soil. **Fermentation Technology**, v. 1, p. 1-5, 2012.

SILVA, J. M. **Isolamento de actinobactérias do solo da região Maués/AM e avaliação do potencial antimicrobiano**. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia) - Faculdade de Formação de Professores de Nazaré da Mata, Universidade de Pernambuco, Recife, 2010.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A.Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1995.

SKRBO, N.; TENSTAD, E.; MAELANDSMO, G. M.; SøRLIE, T.; ANDERSEN, K. From autonomy to community: new perspectives on tumorigenicity and therapy resistance. **Cancer Treatment Reviews**, v. 41, p. 809-813, 2015.

SMITH, L. A.; CORNELIUS, V. R.; PLUMMER, C. J.; LEVITT, G.; VERRILL, M.; CANNEY, P.; JONES, A. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **BMC Cancer**, v. 10, p. 337, 2010.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI-FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from Amazzonian toxic plants: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich and *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v. 34, p. 185-195, 2004.

STANECK, J.; ROBERTS, G. D. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. **Applied Microbiology**, v. 28, p. 226-231, 1974.

STEGEHUIS, J. H.; WILT, L. H.; VRIES, E. G.; GROEN, H. J.; JONG, S.; KRUYT, F. A. TRIAL receptor targeting for non-small cell lung cancer: current status and perspectives. **Drug Resistance Updates**, v. 13, p. 2-15, 2010.

SUGANTHI, P.; RAVIKUMAR, S. Toxicity studies of crude extracts from marine Streptomyces sp. With potential antibacterial sensitivity against antibiotic resistant human pathogens. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 1070-1076, 2012

SUN, L.; WANG, X. A new kind of cell suicide: mechanisms and functions of programmed necrosis. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, p. 587-593, 2014.

SOSOVELE, M. E.; HOSEA, K. M.; LYIMO, T. J. *In vitro* antimicrobial activity of crude extracts from marine *Streptomyces* isolated from mangrove sediments of Tanzania. **Journal of Biochemical Technology**, v. 3, p. 431-435, 2012.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed.). Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity. Academic Press, London 6, p. 71–133, 1990.

TAECHOWISAN, T.; LU, C.; SHEN, T.; LUMYONG, S. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc 130 and their antifungal activity. *Microbiology*, v. 151, p. 1691-1695, 2005.

TAIT, W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond Stephen. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, p. 621-632, 2010.

THAKUR, M.; MELZIG, M. F.; FUCHS, H.; WENG, A. Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxiv properties.**Botanics: Targets and Therapy**, v. 1, p. 19-29, 2011.

THARIAT, J.; HANNOUN-LEVI, J. M.; SUN, M. A.; VUONG, T.; GERARD, J. P. Past, present, and future of radiotherapy for the benefit of patients. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, p. 52-60, 2013.

THOMAS, A. T.; RAO, J. V.; SUBRAHMANYAM, V. M.; CHANDRASHEKHAR, H. R.; MALIYAKKAL, N.; KISAN, T. K.; JOSEPH, A.; UDUPA, N. I*n vitro* anticancer activity of microbial isolates from diverse habitats. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 2, p. 279-287, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 2 ed. Artmed. p. 934, 2012.

TOUCHEFEU, Y.; HARRINGTON, K.J.; GALMICHE, J.P.; VASSAUX, G. Review article: gene therapy, recente developments and future prospects in gastrointestinal oncology. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 32, p. 953-968, 2010.

TRISTÃO, V. R.; GONÇALVES, P. F.; DALBONI, M. A.; BATISTA, M. C.; DURÃO, M. S. JR.; MONTE J. C. Nec-1 protects against nonapoptotic cell death in cisplatin-induced kidney injury. **Renal Failure**, v. 34, p. 373-377, 2012.

UTKU, N. New approaches to treat cancer - What they can and cannot do. **Biotechnology Healthcare**, v. 8, n. 4, p. 25, 2011.

VASEVA, A. V.; MARCHENKO, N. D,; KYUNGMIN, J.; TSIRKA, S. E.; HOLZMANN, S.; MOLL, U. M. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis Angelina V. **Cell**, v. 149, p. 1536-1548, 2012.

VASIEVICH, E. A.; HUANG, L. The suppressive tumor microenvironment: a challenge in cancer immunotherapy. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, p. 635-641, 2011.

VERBRUGGE, I.; JOHNSTONE, R. W.; SMYTH, M. J. SnapShot: extrinsicapoptosispathways. **Cell**, v. 143, p. 1192, 1192.e1-2, 2010.

VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. **Food Chemistry**, v. 95, p. 394-404, 2006.

VINO, S.; LOKESH, K. R. Borrelidin: A promising anticancer agent from *Streptomyces* species. **Advanced Biotech**, v. 6, p. 22-26, 2008.

VOLKOVA, M.; RUSSELL, R. Anthracyclinecardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. **Current Cardiology Reviews**, v. 7, p. 214-220, 2011.

WALSH, C. T.; FISCHBACH, M. A. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, p. 2469-2493, 2010.

WANG, L.; XING, M.; DI, R.; LUO, Y. Isolation, identification and antifungal activities of *Streptomyces aureoverticillatus* HN6. **Plant Pathology & Microbiology**, v. 6, p. 1-5, 2015.

WANG, Z.; GLEICHMANN, H. GLUT2 in pancreaticislets: crucial targetmolecule in diabetesinducedwith multiple low doses of streptozotocin in mice. **Diabetes**, v. 47, p. 50-56, 1998.

WANG, Z.; SUN, Y. Targeting p53 for novel anticancer therapy. **Translational Oncology**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2010.

WAYTECK et al, 2013

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; GENE-TRAK, D. J. L. 16s ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.

WEI, Y.;FANG, W.; WAN, Z.; WANG, K.; YANG, Q.; CAI, X.; SHI, L.; YANG, Z. Antiviral effects against EV71 of pimprinine and its derivatives isolated from *Streptomyces* sp. **Virology Journal**, v. 11, p. 1-14, 2014.

WILLIAMS, S. T.; SHARP, M. E.; HOLT, J. G. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, v. 4, p. 2492–2504, 1989.

WU, C.; TAN, Y.; GAN, M.; WANG, Y.; GUAN, Y.; HU, X.; ZHOU, H.; SHANG, X.; YOU, X.; YANG, Z.; XIAO, C. Identification of Elaiophylin derivatives from the marine-derived actinomycete*Streptomyces* sp. 7-145 using PCR-based screening.**Journal of Natural Products**, v.11, p. 2153-2157, 2013.

WYLD, L.; AUDISIO, R. A.; POSTON, G. J. The evolution of cancer surgery and future perspectives. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, p. 115–124, 2015.

YAO, J. Y.; YIN, W. L.; LI, X. C.; LI, G.; XU, Y.; AI, W. M.; SHEN, J. Y. Anti-parasitic activities of specific bacterial extracellular products of *Streptomyces griseus* SDX-4 against *Ichthyophthirius multifiliis*. **Parasitology Research**, v. 113, p. 3111-3117, 2014.

YOSHIMOTO, Y.; SAWA, T.; KINOSHITA, N.; HOMMA, Y.; HAMADA, M.; TAKEUCHI, T.; IMOTO M. (2000). MK800-62F1, a new inhibitor of apoptotic cell deah, from *Streptomyces diastatochromogenes* MK800-62F1. **Journal of Antibiotics**, v. 53, p. 569-574, 2000.

ZANETTI, G. D.; MANFRON, M. P.; HOELZEL, S. C. S. M.; PAGLIARIN, V. P.; MOREL, A. F. Toxicidade aguda e atividade antibacteriana dos extratos de *Tropaeolummajus* L. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 22, n. 2, p. 159-162, 2003.

ZHANG, H.; SUN, G. Z.; LI, X.; PAN, H. Y.; ZHANG, Y. S. A new geldanamycin analogue from *Streptomyces hygroscopicus*. **Molecules**, v. 15, p. 1161-1167, 2010.

ZHANG, N.; SUN, C.; SONG, Z.; GUO, H.; ZHANG, B.; QIU, N.; LIU, X. Isolation, purification and characterization of antifungal substances from *Streptomyces hygroscopicus* BS-112. **Acta Microbiologica Sinica**, v. 51, p. 224-232, 2011.

ZHANG, W.; MI, Z.; YIN, X.; FAN, H.; AN, X.; ZHANG, Z.; CHEN, J.; TONG, Y. Characterization of *Enterococcus faecalis* phage IME-EF1 and its endolysin. **Plos One**, v. 8, p. 1-14, 2013.

ZHAO, X.; FANG, Y.; YANG, Y.; QIN, Y.; WU, P.; WANG, T.; LAI, H.; MENG, L.; WANG, D.; ZHENG, Z.; LU, X.; ZHANG, H.; GAO, Q.; ZHOU, J.; MA, D. Elaiophylin, a novel autophagy inhibitor, exerts antitumor activity as a single agent in ovarian cancer cells. **Autophagy**, v. 11, p. 1849-1863, 2015.