



**Universidade Federal do Ceará
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Instituto de Ciências do Mar – Labomar**

ELTHON GOIS FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE ALCALÓIDES GUANIDÍNICOS ISOLADOS DA
ESPONJA *Monanchora arbuscula* (Duchassaing & Michelotti, 1864) COLETADA NO PARQUE
ESTADUAL MARINHO PEDRA DA RISCA DO MEIO – CE.**

**FORTALEZA
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE ALCALÓIDES GUANIDÍNICOS ISOLADOS DA
ESPONJA *Monanchora arbuscula* (Duchassaing & Michelotti, 1864) COLETADA NO PARQUE
ESTADUAL MARINHO PEDRA DA RISCA DO MEIO – CE.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais.

Área de concentração:

Prospecção de compostos marinhos com atividade biológica.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Letícia Veras Costa Lotufo

**FORTALEZA
2009**

ELTHON GOIS FERREIRA

**AValiação DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE ALCALÓIDES GUANIDÍNICOS ISOLADOS DA
ESPONJA *Monanchora arbuscula* (Duchassaing & Michelotti, 1864) COLETADA NO PARQUE
ESTADUAL MARINHO PEDRA DA RISCA DO MEIO – CE.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração Prospecção de compostos marinhos com atividade biológica.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manuel Antônio Andrade Furtado Neto, PhD
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^a. Dr^a. Vânia Maria Maciel Melo
Departamento de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^a. Dr^a. Raquel Carvalho Montenegro
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal do Ceará - UFC

A minha avó por ser um exemplo de perseverança, aos meus pais e amigos que me proporcionaram sempre estar aprendendo o significado sobre o que é viver.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus** pelo dom da vida, pelos familiares e amigos proporcionados e por sempre me guiar de maneira digna pelos caminhos da vida.

A **Prof^a. Dr^a. Letícia Veras Costa Lotufo** primeiramente por ter aceitado me orientar, pela amizade, preocupação, carisma, apoio incondicional, pelo exemplo de pessoa e profissional a ser seguido, pelos ensinamentos passados durante esses anos trabalhando na pesquisa e por muitos outros fatores dos quais não consigo nomear.

A **Prof^a. Dr^a. Cláudia Pessoa** por ter permitido a minha entrada no laboratório, pelo apoio dado a realização deste trabalho e por proporcionar ao laboratório momentos de descontração permitindo assim um melhor entrosamento entre os integrantes do laboratório.

Ao **Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes** por permitir o desenvolvimento deste trabalho no Laboratório de Oncologia Experimental e pela dedicação a proporcionar melhores condições ao laboratório para realização do trabalho.

A **Dr^a. Raquel Montenegro** pela constante ajuda para realização deste trabalho, sua imensa disposição em ensinar, pelas sugestões, amizade, convívio e apoio.

A **Dr^a. Paula Christine Jimenez** por toda amizade, disponibilidade a me ajudar, pelas excelentes conversas e momentos de descontração, pelos ensinamentos acadêmicos e de vida, pelos conselhos dados e pelos muitos sambas os quais tive prazer em dividir o salão.

Ao professores **Dr. Edilberto Silveira Rocha** por ter cedido o laboratório para realização da parte química deste trabalho, pelos ensinamentos e broncas dadas durante a realização do trabalho.

A professora **Dr^a. Otília Deusdênia Loiola Pessoa**, por ter acreditado nos produtos naturais marinhos e permitido que este trabalho fosse realizado sob sua co-orientação, pelo carisma e alegria.

A **Julieta Rangel de Oliveira** pela ajuda de maneira decisiva na realização deste trabalho na parte da química, pela amizade, pelo aprendizado e histórias engraçadas compartilhadas.

Ao **Dr. Eduardo Hajdu** (Museu Nacional de Poríferos, UFRJ) pela participação na coleta e identificação da espécie utilizada neste trabalho.

Aos alunos **Eduardo Esteves** e **Sula Salani** (Museu Nacional de Poríferos, UFRJ) pela disposição, sempre que necessária, para esclarecer algumas dúvidas, pela constante ajuda com informações sobre a espécie e pela identificação da mesma.

Ao Amigo agora **Dr. Diego Veras Wilke** pela grande ajuda no meu início nos produtos naturais marinhos, pela confiança, pelas conversas, conselhos e por todos os ensinamentos passados.

Ao **Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo** pela ajuda na coleta do material, por ter me guiado a trabalhar com produtos naturais mrimhos no LOE, por ter permitido eu lecionar sua disciplina como estágio em Ciências marinhas e pelos vastos ensinamentos passados.

A professora **Dr^a. Vânia Melo** por todos os conselhos dados para a melhoria do trabalho, pela disponibilidade sempre que preciso para ajudar e pela vaga a mim concedida no curso de ecologia microbiana.

Ao professor **Dr. Manuel Furtado** por mais uma vez ter aceitado participar de uma avaliação minha, sendo esta de cunho muito importante para minha vida acadêmica, por todos os momentos de descontração promovidos e pelos conhecimentos passados durante a minha fase de graduação.

A **Silvana França** pelos vários momentos de descontração proporcionados no laboratório, por toda sua paciência comigo, pela amizade e pelo admirável trabalho realizado no laboratório.

Aos funcionários do LOE, **Erivanda França, Sheyla Prado e Adelânia** pela dedicação, pela prestatividade e o excelente trabalho desenvolvido.

A **Marne Vasconcelos** pelos momentos de descontração proporcionados, que atualmente estão fazendo falta, amizade e conselhos.

Aos meus amigos do LOE, **José Roberto, Arinice Costa, Cecília Carvalho, Krsitiana Mousinho, Kézia Lacerda, Ana Jérсия, Delano Marinho, Aline, Eveline Alves, Gabriela Cunha, Francisco Washington, Miller, Assuero, Rafael Sucupira, Vanessa Canamary, Hindeburgo, Paula IC, Dayse Jereissate**, pela convivência durante o dia a dia, amizade, momentos de descontração no laboratório, cumplicidade e aprendizado.

Em especial aos meus amigos do LOE **Bruno Cavalcanti, Danilo Rocha, Hemerson Iury, Felipe Rocha, Igor Cabral, Patrícia Marçal e Paulo Michel** por toda a força dada durante esses anos, companherismo, pela ajuda sempre que necessária, conselhos, broncas e o mais importante a amizade.

Ao **Paulo, Dona Rogéria e Dona Fátima** por sempre estarem trabalhando pela manutenção do laboratório, cuidando do material necessário e pela pronta ajuda quando precisa.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências do Mar e UNIFAC por sempre estarem trabalhando para dar condições para que este trabalho se realizasse.

As minhas amigas, **Gardênia Militão, Adriana Carvalho e Ivana Dantas**, pois são pessoas as quais eu tenho muita consideração e afeto, pelas várias noites de bohemia, além de vários momentos de descontração durante os churrascos e feijoadas da vida, pela amizade incondicional e muitas estórias para contar.

Aos amigos, **Igor Correira, Felipe Schmitt, Álisson Canafistula, Marquim, Cleiton Correia** por terem me proporcionado muitas farras com bastantes momentos de alegria neste ano que passou, pela amizade, pelos conselhos, pela força naqueles momentos difíceis e momentos de descontração durante nossos churrascos e feijoadas.

As minhas amigas **Carla Sombra, Marisa Sombra, Paula Sombra e Raquel Santiago** sem distinção são pessoas as quais eu tenho muito a agradecer, pelo carinho, conselhos, momentos de divertimento, muitas estórias, pois são pessoas ímpares que a cada dia que passa me cativam.

Aos meus amigos **Ghislain Favé, Gabriel Castro e João Paulo Cavalcante** pela amizade, companheirismo e momentos de muito divertimento.

Ao meu amigo **Ronaldo Igor** pela pessoa alegre, que sempre está me dando forças nos momentos difíceis, pelo companheirismo, pela amizade incondicional, prestatividade, incentivo e conselhos e por ser um exemplo de superação.

Aos meus amigos **Ricardo Albuquerque e Otávio Castro**, amigos de mestrado, por todos os conselhos dados, amizade absoluta, momentos de pura alegria e farras bastante descontraídas.

Ao meu mais que amigo, irmão, **José Fábio** por toda a força dada, incentivo, amizade indiscutível, carinho e por todos esses anos de convivência os quais nos fez amadurecer.

A minha mais que amiga, irmã, **Tereza Emanuelle** pela paciência comigo, conselhos, conversa, carinho, incentivo.

Aos meus eternos amigos **Francisco Jackson, Jackson Câmara, Elton Saraiva e Phillip Fernandes** pelo companheirismo, cumplicidade, apoio, conselhos, aprendizado.

Aos meus amigos de graduação **Aline Mendes, Bruno Átila, Darlyanne Gadelha, Douglas Pinheiro, Francisca Andréa, Giuseppe, Jonatas Bezerra, Leiliana Bezerra, Karoline Aguiar, José Fernandes, Nathalie Dias, Pedro Kolb, Rafael Rômulo, Thiago Vitor e Wander Godinho** por todos os anos de convivência, amizade, companheirismo, estórias de graduação e principalmente pelos momentos de descontração quando já não agüentava mais as aulas.

Aos meus amigos de mestrado, **Geórgia Barguil, Tallita Tavares, Leandro Fonseca, Ronaldo Ruy, Fernanda Rodrigues, Alvarenga “In memória”** e aos demais pelo convívio durante esse período, amizade, conversas e ajuda.

A minha avó materna que sempre esteve presente na minha educação, pelo exemplo de perseverança, carinho e coisas das quais não tenho palavras a agradecer.

Aos meus pais, que mesmo separados sempre estiveram unidos para me proporcionar uma boa educação, apoiando algumas de minhas decisões e proporcionando ser hoje a pessoa que sou.

A minha irmã, **Letícia Gois**, que apesar de todas as nossas brigas, amo esta pessoa incondicionalmente.

Aos meus tios **Regina Lúcia e Carlos Morais** pelo carinho, ajuda, conselhos, compreensão e incentivo.

A minhas primas **Priscila Karla e Patrícia Karla** por todo carinho, amor e afeto para com a minha pessoa.

A família Girão, meus vizinhos, por todo o carinho, confiança, bronca, amizade acima de tudo e apoio em momentos cruciais para minha vida, pois é para mim uma segunda família.

Aos demais familiares e amigos que sempre acreditaram em mim.

A **CAPES** pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho

“Fui um menino pequeno que, jogando na praia, encontrava de vez em quando um calhau mais fino ou uma concha mais bonita que o normal. O oceano da verdade se estendia, inexplorado, diante do meu.” Isaac Newton

POTENCIAL CITOTÓXICO DE ALCALÓIDES GUANIDÍNICOS ISOLADOS DA ESPONJA *Monanchora arbuscula* (Duchassaing & Michelotti, 1864) COLETADA NO PARQUE ESTADUAL MARINHO PEDRA DA RISCA DO MEIO – CE. Autor: Elthon Gois Ferreira. **Orientadora:** Dr^a. Leticia Veras Costa Lotufo. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR. Universidade Federal do Ceará. Janeiro, 2009.

Resumo

Os organismos marinhos têm sido destaque no tratamento de várias doenças. Alcalóides guanidínicos são comumente encontrados entre as esponjas da família Cambreidae e apresentaram uma ampla diversidade de atividades biológicas. O presente trabalho avaliou o potencial citotóxico dos alcalóides guanidínicos isolados da esponja marinha *Monanchora arbuscula* coletada no Parque Estadual Pedra da Risca do Meio e o mecanismo de ação envolvido na citotoxicidade observada em ptilocaulina. Cinco alcalóides guanidínicos foram isolados a partir do estrato hidroalcoólico: ptilocaulina (PT), 8b-hidroxiptilocaulina (8HPT), mirabilina B e a mistura de epímeros 1,8a;8b,3a-dideidro-8β-hidroxiptilocaulina e 1,8a;8b,3a-dideidro-8α-hidroxiptilocaulina. A atividade citotóxica dos compostos foi avaliada pelo método do MTT após 72 horas de incubação em linhagens tumorais humanas HL-60 (leucemia), MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (côlon) e SF-295 (Gioblastoma), e em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) pelo método do Alamar Blue. O efeito de PT em células HL-60 foi avaliado após exposição por 24h a 10, 15 e 20 μM considerando diversos parâmetros e utilizando os seguintes ensaios: exclusão de azul de tripan (viabilidade celular); incorporação de BrdU (proliferação celular); coloração como BE/LA e May-Grunwald-Giemsa (morfologia celular). Técnicas de citometria de fluxp foram utilizadas para avaliar integridade de membrana, fragmentação do DNA, progressão do ciclo celular e despolarização da mitocôndria. A citotoxicidade de PT e 8HPT provou ser relevante para linhagens tumorais humanas, sobremaneira para melanoma (CI₅₀ 7,58-11,34μM) e leucemia (5,77-7,89μM), contudo não foram ativos em células normais (PBMC). A presença da hidroxila no carbono “8b” torna o composto 8HPT menos ativo que PT. O composto PT inibiu o número de células viáveis para todas as concentrações testadas, porém o aumento no número de células não-viáveis foi afetada apenas pela maior concentração. Mais além, PT apresentou aumento nas células apoptóticas em todas as concentrações testadas e estes resultados foram reforçados pela condensação da cromatina e formação de blebs na membrana celular. Foi observado que o alcalóide induziu um ligeiro acréscimo no número de células concentradas na fase G1 do ciclo celular e aumentou a fragmentação de DNA para 22,29% e 22,97% para as concentrações de 20 e 15 μM, respectivamente. Além disso, o composto causou despolarização da mitocôndria, exceto na menor concentração testada. As evidências aqui arrecadadas sugerem que o composto PT causa induz apoptose às células HL-60 de modo concentração-dependente, ao mesmo tempo em que reforça a costa do Ceará como uma relevante fonte de moléculas com potencial biomédico.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Apoptose. alcalóides guanidínicos. esponja marinha.

CYTOTOXIC POTENTIAL OF GUANIDINE ALKALOIDS ISOLATED FROM *Monanchora arbuscula* (Duchassaing & Michelotti, 1864) COLLECTED PEDRA DA RISCA DO MEIO MARINE STATE PARK - CE. Author: Elthon Gois Ferreira. **Advisor:** Dr. Letícia Veras Costa Lotufo. Master Dissertation. Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR. Universidade Federal do Ceará. January, 2009.

Abstract

Marine organisms have been highlighted in the treatment of various diseases. Guanidine alkaloids are commonly found among the sponges of the Cambreidae family and have shown a wide range of biological activities. The present work evaluated the cytotoxic potential of guanidine alkaloids isolated from marine sponge *Monanchora arbuscula* collected at Pedra da Risca do Meio Marine State Park, Ceará, and the mechanism of action involved in the observed cytotoxicity of ptilocaulin. Five guanidine alkaloids were isolated from the hidroalcoholic extract: ptilocaulin (PT), 8b-hydroxyptilocaulin (8HPT), mirabilin B and an epimeres mixture of 1,8a;8b,3a-didehydro-8 β -hydroxyptilocaulin and 1,8a;8b,3a-didehydro-8 α -hydroxyptilocaulin. The cytotoxicity of the compounds was evaluated by the MTT method after 72 hours of incubation in human tumor lines HL-60 (leukaemia), MDA-MB-435 (breast), HCT-8 (Colon) and SF-295 (Giblastoma), and in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by the method of the Alamar Blue. The effect of PT on HL-60 cells was evaluated after 24h treatment at 10, 15 and 20 μ M using microscopic observation of various parameters by the following assays: Trypan blue exclusion (cell viability); incorporation of BrdU (cell proliferation); May-Grunwald-Giemsa and acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining (cell morphology). Flow cytometry was used to further access cell membrane integrity, DNA fragmentation, cell cycle progression and depolarization of mitochondria. The cytotoxic potential of alkaloids PT and 8HPT proved to be significant towards human tumor lines, mostly for melanoma (IC₅₀ 7.58-11.34 μ M) and leukemia (5.77-7.89 μ M) lines, however not toxic to normal cells (PBMC). The presence of hydroxyl in carbon “8b” seems to underpower the bioactivity of compound 8HPT. PT reduced the count of viable cells at all concentrations tested on the Trypan blue assay, however increase in the number of non-viable cells was affected by only at the highest concentration. Moreover, PT induced an increase in apoptotic cells in the BE/AO assay and these results were reinforced by the observation of condensed chromatin and membrane blebbing. The alkaloid further caused a slight increase of cells at G1 phase of the cell cycle and an boosted the number of cells with fragmented DNA, with 22.29% and 22.97% at concentrations 20 and 15 μ M, respectively. Thus, the compound caused significant depolarization of mitochondria membrane, except in the lowest concentration. The evidences collected herein suggests that PT induces apoptosis in HL-60 cells in a concentration-dependent manner. Furthermore, these data support the coast of Ceará State as a prosperous source of compounds with biomedical relevance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Figura esquemática do mapa mundi destacando os oceanos. http://www.jornalismob.files.wordpress.com/2009/10/mapa_mundi_politico.jpg . -----	1
Figura 2	Estruturas químicas dos arabinucleosídeos isolados da esponja marinha <i>Cryptotethya crypta</i> . (a) Espongouridina, (b) Espongotimidina, (c) Vidarabina e (d) Citarabina. -----	4
Figura 3	Estrutura química da trabectedina (ET-743). -----	5
Figura 4	Estrutura química do peptídeo Prialt (ziconotídeo).-----	5
Figura 5	Estrutura química do mesilato de eribulina (E7389) derivada da halichondrina B.-----	6
Figura 6	Estrutura química dos depsipeptídeo Aplidina B e Dideminina B.-----	7
Figura 7	Estruturas químicas da dolastatina 10 e seus derivados: soblidotina, cemadotina e sintadotina.-----	8
Figura 8	Estrutura química da briostatina 1.-----	9
Figura 9	Estruturas químicas de alcalóides guanidínicos. -----	15
Figura 10	Mapa do Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio - CE. Fonte: http://www.brasilmergulho.com.br/port/points/ce/images/mapa_gran.gif . ---	25
Figura 11	Fotografia da espécie <i>Monanchora arbuscula</i> , registrada no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará, em julho de 2004. Por Eduardo Hajdu.-----	26
Figura 12	Fluxograma da obtenção do extrato bruto de <i>Monanchora arbuscula</i> e respectivas partições líquido/líquido mostrando a obtenção das misturas e compostos puros das frações diclorometano e acetato de etila. -----	28
Figura 13	Estrutura química dos alcalóides guanidínicos isolados da esponja marinha <i>M. arbuscula</i> . -----	39
Figura 14	Efeito do alcalóide PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μM na viabilidade de células leucêmicas HL-60 determinado por Exclusão do Azul de Tripán após 24 horas de incubação. O controle negativo representa as células não tratadas. A Doxorrubicina (Dox) representa o controle positivo (0,55 μM). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de experimentos independentes (N=3). * $p < 0,001$ comparado ao controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls Test. -----	42
Figura 15	Efeito do alcalóide guanidínico PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μM sobre a inibição da síntese de DNA avaliado pela incorporação do BrDU (BrDU positivo) avaliados na linhagem tumoral de células leucêmicas HL-60 após 24 horas de incubação. Controle negativo (C-) representa as células não tratadas e Doxorrubicina (Dox) utilizado como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de experimentos independentes (N=3). * $p < 0,001$ comparado ao controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls Test. -----	43
Figura 16	Avaliação da atividade do composto PT nas concentrações de 10, 15 e 20	44

μM , sobre o padrão de morte celular em células leucêmicas HL-60 e analisada por brometo de etídio/laranja de acridina após 24 horas de incubação. O controle negativo representa as células não tratadas e a doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de experimentos independentes (N=3). * $p < 0,001$ comparado ao controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls Test. -----

- Figura 17** Microfotografias das células HL-60 controle (A) e tratadas com doxorrubicina (B) e com o composto ptilocaulina nas concentrações de $10\mu\text{M}$ (C), $15\mu\text{M}$ (D) e $20\mu\text{M}$ (E) por 24 horas de incubação. Coloração por May-Grunwald-Giemsa – setas cavadas e tracejadas indicam fragmentação nuclear e condensação de cromatina, as cavadas cheias indicam desestabilização da membrana plasmática (presença de blebs), as pretas retas apontam as células com vacuolização citoplasmática e diminuição do volume celular e as setas cavadas e pontilhadas, as picnóticas. Aumento 400X. ----- **46**
- Figura 18** Efeito do alcalóide guanidínico PT nas concentrações de 10, 15 e $20\mu\text{M}$ sobre a densidade celular de linhagem leucêmica (HL-60), analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorrubicina ($0,55\mu\text{M}$) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. ----- **47**
- Figura 19** Efeito do composto PT nas concentrações de 10, 15 e $20\mu\text{M}$ sobre a viabilidade (integridade de membrana) de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina ($0,55\mu\text{M}$) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. ----- **48**
- Figura 20** Ação do composto PT sobre as fases do ciclo celular em células de linhagem leucêmica (HL-60), após 24 horas de incubação, analisadas por citometria de fluxo. C: controle negativo; D: Doxorubicina ($0,55\mu\text{M}$) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. ----- **49**
- Figura 21** Efeito do composto PT nas concentrações 10, 15, $20\mu\text{M}$, após 24 horas de incubação, sobre a fragmentação de DNA de células de linhagem leucêmica (HL-60), analisado por citometria de fluxo. C: controle negativo; D: Doxorubicina ($0,55\mu\text{M}$) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. ----- **50**

- Figura 22** Efeito do alcalóide PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μM , após 24 horas de incubação, sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células de linhagem leucêmica (HL-60), analisado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55 μM) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentes independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.----- **51**
- Figura 23** Número de revisões acerca de alcalóides guanidínicos de ocorrência natural, síntese, biossíntese, atividade biológica, química (incluindo síntese e desenvolvimento de grupos protetores) e síntese bioativa de guanidinas em química medicinal.----- **55**
- Figura 24** Número de alcalóides guanidínicos que: (a) foram isolados; (b) tiveram sua via biossintética investigada ou; (c) foram sintetizados.----- **56**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Moléculas de diferentes classes químicas isoladas de esponjas marinhas com aplicação biomédica.-----	12
Tabela 2	Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> através do método do MTT.-----	30
Tabela 3	Citotoxicidade em linhagens de células tumorais pelo ensaio do MTT, em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) – teste do ALAMAR BLUE – e potencial de dano em membrana em eritrócitos de camundongos pelos alcalóides guanidínicos e misturas obtidos de <i>M. arbuscula</i> .-----	41

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etila
BE	Brometo de etídeo
BrDU	5-bromo-2-deoxiuridina
CC	Coluna Cromatográfica
CCDC	Cromatografia de camada delgada comparativa
CE ₅₀	Concentração efetiva média
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E.P	Éter de Petróleo
EHA	Extrato hidroalcoólico bruto
EPM	Erro padrão da média
EtOH	Álcool etílico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Intervalo de confiança
LA	Laranja de acridina
MAAC	Fração acetato de etila
MADCM	Fração diclorometano
MeOH	Álcool metílico
MIC	Concentração inibitória mínima
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromida
PBMC	Células mononucleadas de sangue periférico
PBS	Phosphate buffer solution (Tampão fosfato)
PEMPRM	Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio
RNM ¹ H	Ressonância Nuclear Magnética de Prótons
SE	Solução de Eritrócitos
US-NCI	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO -----	1
1.1. Mares e oceanos e a diversidade biológica -----	1
1.2. Produtos naturais marinhos -----	3
1.3. Importância das esponjas marinhas como fonte de produtos naturais -----	10
1.4. Família Crambeidae e gênero <i>Monanchora</i> como fonte de compostos bioativos -----	13
1.5. Relevância do trabalho -----	15
2. OBJETIVOS -----	18
2.1. Objetivo geral -----	18
2.2. Objetivos específicos -----	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS -----	19
3.1. Materiais -----	19
3.1.1. Equipamentos -----	19
3.1.2. Soluções, reagentes e fármacos -----	20
3.1.3. Animais/Modelos biológicos experimentais -----	24
3.2. Coleta do material -----	25
3.3. Identificação da espécie -----	26
3.4. Obtenção/Isolamento dos compostos -----	27
3.5. Determinação da Atividade Citolóxica -----	29
3.5.1. Ensaio do MTT -----	29
3.5.2. Ensaio do Alamar Blue -----	30
3.5.3. Análise dos dados -----	31
3.6. Avaliação do dano à membrana plasmática – Teste Hemolítico -----	31
3.6.1. Análise dos dados -----	31
3.7. Estudos de Mecanismo de Ação -----	32
3.7.1. Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán -----	32
3.7.1.1. Análise dos dados -----	32
3.7.2. Inibição da síntese de DNA – Ensaio do BrdU -----	32
3.7.2.1. Análise dos dados -----	33
3.7.3. Coloração diferencial por BE/LA -----	33
3.7.3.1. Análise dos dados -----	34
3.7.4. Coloração por May-Grunwald-Giemsa -----	34
3.7.4.1. Análise dos dados -----	34
3.8. Citometria de fluxo -----	35
3.8.1. Determinação da Integridade de Membrana -----	35
3.8.1.1. Análise dos dados -----	35
3.8.2. Ciclo celular e fragmentação de DNA -----	36
3.8.2.1. Análise dos dados -----	36
3.8.3. Despolarização Mitocondrial -----	36
3.8.3.1. Análise dos dados -----	37
4. RESULTADOS -----	38
4.1. Compostos isolados -----	38
4.2. Atividade Citolóxica dos compostos -----	40
4.3. Avaliação quanto ao dano em membrana plasmática -----	40
4.4. Determinação do mecanismo de ação -----	42
4.4.1. Avaliação da viabilidade celular por exclusão do azul de Tripán -----	42
4.4.2. Inibição da síntese de DNA – Ensaio do BrdU -----	43

4.4.3. Coloração diferencial por BE/LA-----	44
4.4.4. Análise de alterações morfológicas-----	45
4.4.5. Citometria de fluxo-----	47
4.4.5.1. Densidade celular-----	47
4.4.5.2. Integridade de membrana-----	48
4.4.5.3. Análise de ciclo celular-----	49
4.4.5.4. Análise de fragmentação do DNA-----	50
4.4.5.5. Avaliação do Potencial transmembranico mitocondrial-----	51
5. DISCUSSÃO-----	52
6. CONCLUSÃO-----	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	65

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os oceanos e a diversidade química e biológica

Os mares e oceanos compreendem a maior porção da esfera terrestre, com 362.000.000 km² de extensão, o que responde por 71% da superfície do planeta. Este ambiente abriga representantes de 34 dos 36 filos existentes, habitando praticamente toda a sua vasta área, desde as regiões rasas até as maiores profundidades, reunindo cerca de 300.000 espécies descritas entre plantas e invertebrados, sem contar os milhões de microorganismos (Donia & Hamann, 2003; Soares-Gomes & Figueiredo, 2009).

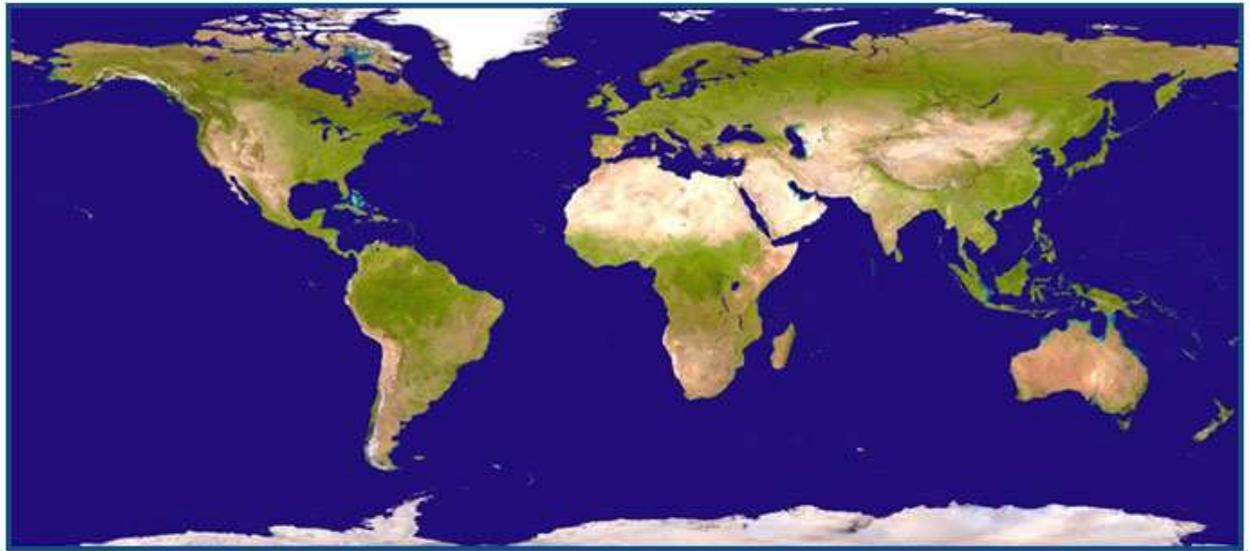


Figura 1 – Figura esquemática do mapa mundi destacando os oceanos. http://www.jornalismob.files.wordpress.com/2009/10/mapa_mundi_politico.jpg.

Essa grande diversidade biológica acarreta, naturalmente, uma larga diversidade química. Embora o ambiente marinho siga as leis químicas fundamentais, existem fatores intrínsecos que podem ser apontados como causa para a essa diversidade química e biológica: a mistura complexa de sais; a enorme variedade de organismos vivos expelindo seus metabólitos ao meio e a imensa vastidão, além de uma média de profundidade de 4000 m.

Num ambiente com tais características, a comunicação entre os organismos através de substâncias químicas com alta solubilidade em água assume fundamental importância ecológica (Hester & Harrison, 2000; Bakuni & Kawat, 2005).

Os organismos vivos realizam suas funções biológicas através de reações químicas, sendo que o conjunto de processos que envolvem síntese e degradação química é chamado metabolismo. Os produtos do metabolismo primário são aqueles essenciais à sobrevivência dos seres vivos, diretamente envolvidos no cumprimento de suas funções vitais básicas. Os metabólitos secundários, por outro lado, são produzidos em vias derivadas do metabolismo primário, e abrangem as moléculas tidas, aparentemente, como assistenciais ao desenvolvimento do organismo hospedeiro. Vale ressaltar, enquanto a ocorrência de metabólitos primários tem caráter universal entre os seres vivos, a produção de metabólitos secundários é privilégio de um limitado grupo de organismos. Do mesmo modo, a ocorrência de um metabólito secundário particular é, na maioria das vezes, restrita a uma, se não, poucas, espécies. No ambiente marinho, costumeiramente, são algas, invertebrados e microorganismos que compõem o rol dos grupos que produzem ou armazenam esse tipo de moléculas. E, dentre as classes abastadas por metabólitos secundários, acredita-se numa correlação entre a diversidade de espécies e a diversidade química no que se refere, principalmente, à heterogeneidade estrutural das moléculas (Hester & Harrison, 2000; Mcclintock & Baker, 2001).

Uma vez que os metabólitos primários participam dos processos antigos, que permaneceram praticamente inalterados durante a evolução das espécies, os secundários estão ligados a reações menos conservadas que vieram se transformando ao longo do tempo, tornando-se mais complexas e derivando produtos ainda mais diversificados. São essas moléculas – como feromônios, pigmentos acessórios para proteção dos raios solares ou empregados para fins de comunicação, e, sobremaneira, substâncias de defesa química, seja para deter predadores ou a colonização por microorganismos patogênicos –, justamente, que estão envolvidos nos processos de adaptação dos indivíduos ao ambiente, sendo determinantes ao sucesso evolutivo de uma espécie e de fundamental importância para o aumento da biodiversidade (Pereira & Soares-Gomes, 2009; Hester & Harrison, 2000).

Os metabólitos secundários medeiam interações entre o hospedeiro e o ambiente ou entre outros organismos do ecossistema. Entretanto, apenas uma noção genérica das funções ecológicas destas moléculas é conhecida. Atualmente, é na empregabilidade desses

produtos, seja como alimento, cosmético, inseticida e, principalmente, medicamento, onde se concentra a maior parte dos estudos que se desenvolve com os metabolitos secundários de origem marinha (Pereira & Soares-Gomes, 2009).

Com relação aos compostos que encontraram aplicação nas ciências biomédicas, a hipótese vigente preza que estes possuam, de fato, relevância nas funções de defesa química dos organismos hospedeiros. Tanto, que foram em animais sésseis ou com restringida capacidade de locomoção, de corpo mole e carentes de estruturas físicas de defesa onde foi encontrada grande parte dessas moléculas. Nesse cenário, as esponjas, juntamente com ascídias, moluscos, briozoários, cnidários, algas e, mais recentemente, os microorganismos, destacam-se entre os grupos mais estudados no panorama dos produtos naturais marinhos (Burkhard, 2003; Donia & Hamann, 2003; Nagle *et al.*, 2004; Thakur & Müller, 2004; Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

1.2. Produtos naturais marinhos

A busca por produtos marinhos com aplicação biomédica deriva da significância histórica das fontes terrestres, como plantas e microorganismos do solo, como fonte de medicamentos, ciência esta reconhecida desde a antiguidade e que segue vigorante até os dias atuais. Tanto que mais da metade dos compostos isolados e utilizados na terapêutica de doenças são provenientes de produtos naturais. A pesquisa por produtos naturais também é uma importante ferramenta para o conhecimento da constituição química das espécies, além de colaborar para o entendimento das relações ecológicas e taxonômicas dos seres vivos (Newman & Cragg, 2007).

O difícil acesso às profundidades do ambiente marinho foi o principal motivo pelo qual este ambiente foi evitado como fonte de interesse científico pelos pesquisadores de produtos naturais. Contudo este ecossistema tem se mostrado uma fonte bastante promissora para prospecção de compostos com potencial farmacológico, visto que este ambiente tem apresentado uma gama de compostos com estruturas complexas, peculiares e mecanismos de ação inusitados provenientes principalmente de organismos invertebrados (Proksch *et al.*, 2002; Jimeno *et al.*, 2004; Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

Os estudos com produtos naturais marinhos tiveram como marco inicial o trabalho realizado por Bergman e Feeney na década de 50 que demonstrou o isolamento da esponja marinha *Cryptotethya crypta* dois arabinucleosídeos, a espongouridina e espongotimidina (figura 2) que serviram de modelo para o desenvolvimento de uma nova classe de análogos – Ara-A (Vidarabina, Vidarabin Thilo[®]) e Ara-C (Citarabina, Alexan[®], Udacil[®]) (figura 2) utilizados atualmente na clínica para o tratamento de viroses e tumores respectivamente (Bergman & Feeney, 1969; Proksch *et al.*, 2002).

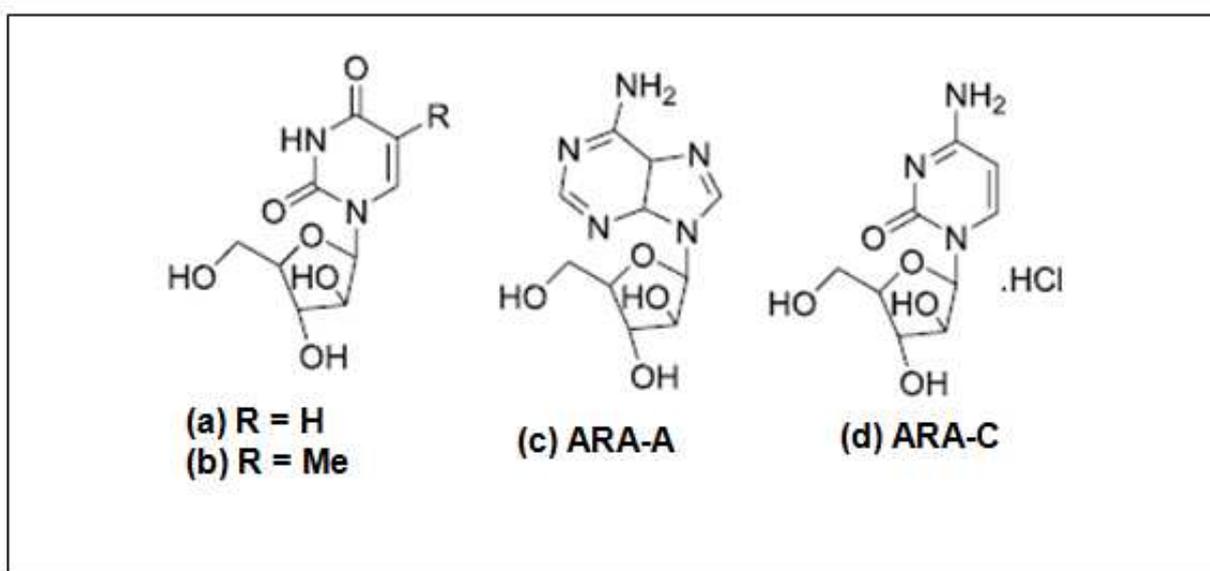


Figura 2 - Estruturas químicas dos compostos isolados da esponja marinha *Cryptotethya crypta*. (a) Espongouridina, (b) Espongotimidina, (c) Vidarabina e (d) Citarabina.

Desde o isolamento dos arabinonucleosídeos (1969) até o ano de 2006, cerca de 18.500 novos compostos foram isolados de organismos marinhos, representando uma fonte bastante promissora para prospecção de novos compostos, contudo vale ressaltar que menos de 3% do total estimado de organismos marinhos já tenha sido estudado. Além dos compostos Ara-A e Ara-C, atualmente o antitumoral, trabectedina (Yondelis[®]) e o analgésico neuropático ziconotídeo (Prialt[®]) encontram-se em uso clínico (Costa-Lotufu *et al.*, 2009).

O alcalóide trabectedina (Ecteinascidina-743, ET-743, Yondelis[®]) isolado da ascídia caribenha *Ecteinascidia turbinata* tem como peculiaridade o mecanismo de alquilação que difere da grande maioria dos outros agentes alquilantes, este composto promove um dobramento da fita de dupla hélice do DNA ao se ligar a guanidina em sequências específicas

de bases nas fendas menores da dupla hélice, causando desorganização do citoesqueleto, bloqueio da divisão celular e interferência no reconhecimento de fatores de transcrição ou proteínas ligantes ao DNA causando ativação ou a inibição de determinados genes. Este composto ingressou na clínica para o tratamento de sarcomas de tecido mole em setembro de 2007 e encontra-se em fase III para o tratamento de câncer de ovário e em fase II para o tratamento de tumores malignos de próstata e mama, osteossarcoma e tumores sólidos pediátricos (Newman & Cragg, 2004; 2006; Mayer e Gustafson, 2006; Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

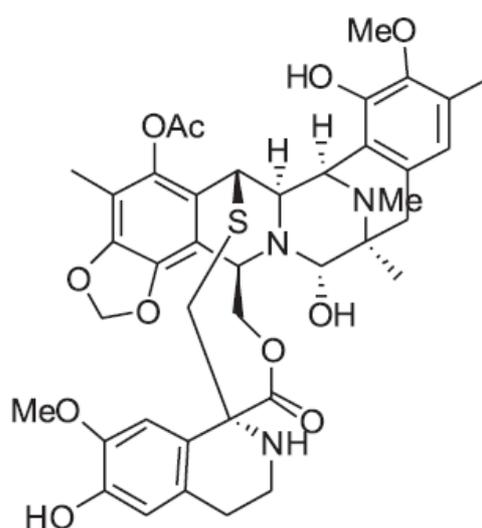


Figura 3 - Estrutura química da trabectedina (ET-743)

O analgésico neuropático Prialt[®] (ziconotídeo, ω -conotoxina MVIIA) é um peptídeo composto por 25 aminoácidos isolado do molusco *Conus magnus*, este tipo de composto bloqueia diversos subtipos de canais de cálcio. O potencial antinociceptivo do ziconotídeo é mil vezes mais potente que a morfina e o tratamento com este composto não gera dependência aos pacientes (Newman & Cragg, 2004; 2006; Mayer e Gustafson, 2006; Costa-Lotufo *et al.*, 2009).



Figura 4 - Estrutura química do peptídeo Prialt (ziconotídeo).

Além desses quatro compostos isolados de animais marinhos utilizados atualmente na clínica outros compostos encontram-se em estudos clínicos em fases bem avançadas. O mesilato de eribulina (E7389), por exemplo, é uma cetona macrocíclica derivada da halichondrina B isolada da esponja marinha *Halichondria okadai*. O mesilato de eribulina apresenta o mesmo mecanismo de ação da molécula a qual serviu de protótipo, inibindo a polimerização dos microtúbulos através da ligação com a tubulina. Este composto atualmente encontra-se em fase III para o tratamento de tumores malignos de mama, fase II para tumores de ovário, próstata, sarcoma, pulmão e pâncreas e em fase I para tumores sólidos (Newman & Cragg, 2004; 2006; Mayer e Gustafson, 2006; Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

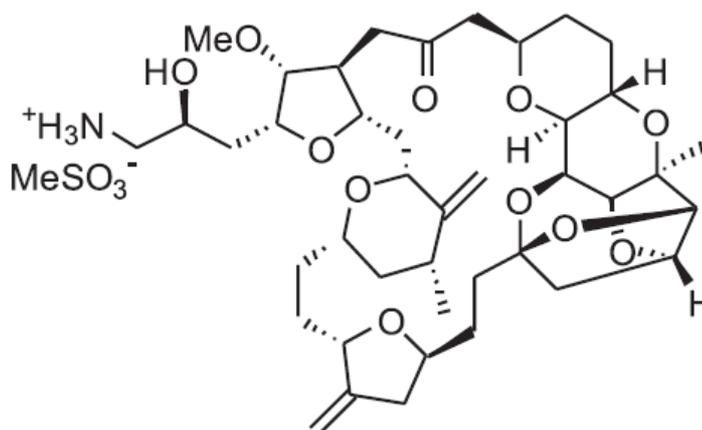


Figura 5 - Estrutura química do mesilato de eribulina (E7389) derivada da halichondrina B.

A aplidina é um depsipeptídeo isolado da ascídia *Aplidium albicans*, este composto apresenta uma grande semelhança estrutural com a didemnina B. A aplidina atualmente encontra-se em fase II para estudo tumores malignos de mieloma múltiplo, ALL, linfoma periférico de células T e linfoma não-Hodgkin e em fase I para tumores sólidos e leucemias pediátricas. Este composto tem como mecanismo de ação a inibição da síntese de DNA e proteínas, levando ao bloqueio da divisão celular e enfraquecimento da angiogênese tumoral pela diminuição da liberação de fatores de crescimento (VEGF), além de levar a morte celular por apoptose por diversas vias (Newman & Cragg, 2004; 2006; Mayer e Gustafson, 2006; Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

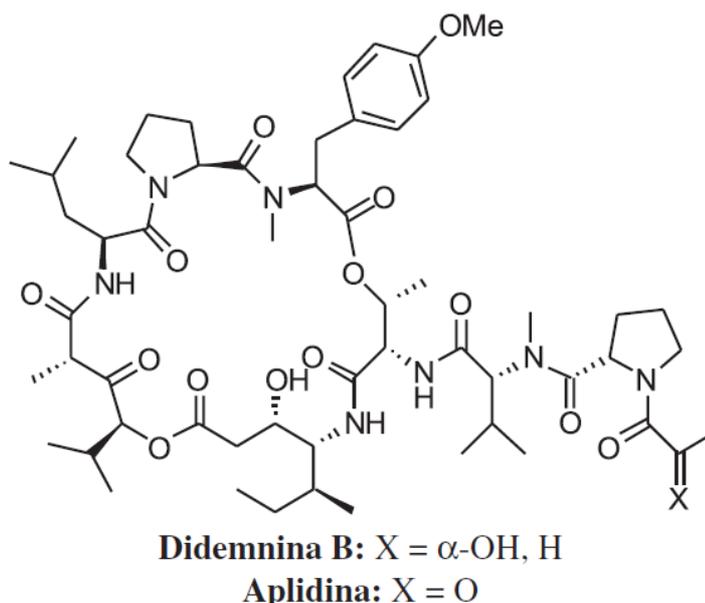


Figura 6 - Estrutura química dos depsipeptídeo Aplidina B e Dideminina B.

As dolastatinas, isoladas do molusco *Dolabella auricularia*, possuem potente atividade citotóxica e, dentre elas, a dolastatina 10 foi o peptídeo mais ativo isolado deste organismo, agindo sobre a inibição da polimerização da tubulina, deste composto gerou-se três derivados sintéticos, soblidotina, cemadotina e sintadotina, que atualmente encontram-se em estudo clínicos. A soblidotina (TZT-1027) encontra-se em fase II para estudos em câncer de pulmão e sarcoma, enquanto que a cemadotina (LU-103793) por sua vez está em fase II para o tratamento de câncer de mama, melanoma e NSCLC, ambos os compostos citados estão em fase I de estudos para o tratamento de tumores sólidos. A sintadotina (ILX-651) encontra-se em fase II para o tratamento do câncer de próstata, melanoma e NSCLC. (Poncet, 1999; Rocha *et al.*, 2001; Newman & Cragg, 2004; 2006; Mayer e Gustafson, 2006; Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

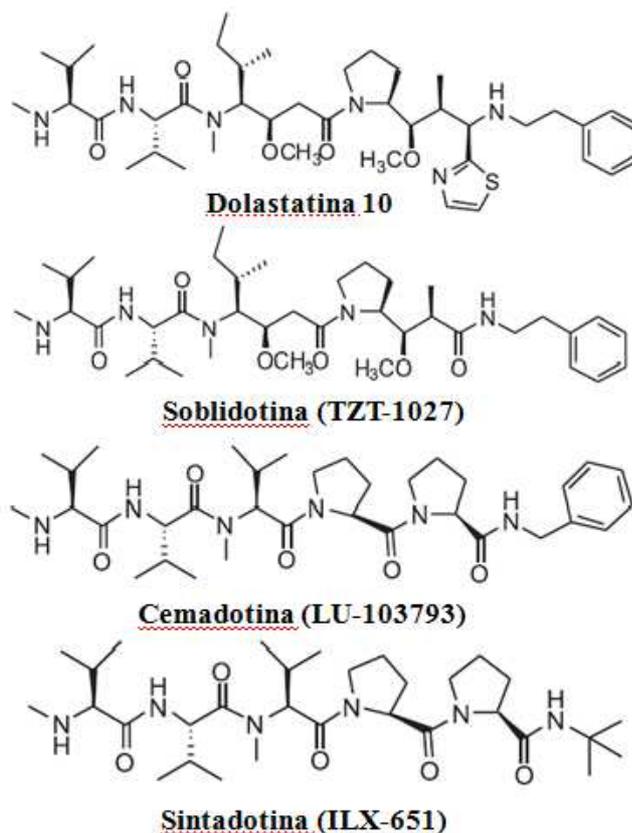


Figura 7 - Estruturas químicas da dolastatina 10 e seus derivados: soblidotina, cemadotina e sintadotina.

As briostatinas formam um grupo de lactonas macrocíclicas isoladas do briozoário *Bugula neritina*. A briostatina 1 tem como mecanismo de ação a modulação de proteínas quinase C e atuam em proteínas que contenham em sua estrutura o domínio C1. Atualmente este composto encontra-se em fase II de testes clínicos contra leucemias, linfomas, câncer do trato gastrointestinal, câncer de pâncreas, ovário, mama, próstata e cabeça e pescoço, além de estar em fase I para tumores de rim, esôfago e tumores sólidos (Rocha *et al.*, 2001; Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

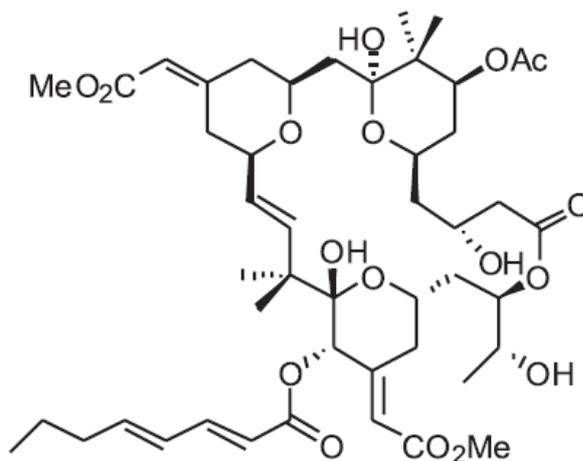


Figura 8 - Estrutura química da briostatina 1.

A busca por compostos com atividade citotóxica provenientes de invertebrados marinhos da costa do Ceará ainda é recente, porém já mostram resultados deveras promissores. Em 2003, Jimenez e colaboradores ao realizar um *screening* (triagem) para avaliar o potencial citotóxico do extrato hidroalcolico das 10 ascídias mais abundantes do litoral cearense, mostrou que seis das dez espécies estudadas mostraram-se fontes promissoras de compostos com atividade citotóxica. Recentemente, Jimenez (2009) isolou alcalóides inéditos, análogos das estaurosporinas, da ascídia *Eudistoma vanammei*, endêmica do Nordeste do Brasil, através de um fracionamento bioguiado. Estes compostos quando testados em células tumorais apresentaram atividade citotóxica da ordem de nanograma/mL, causando parada no ciclo celular destas células levando-as a morte por apoptose.

Ainda recentemente, Wilke e colaboradores (2009) realizaram um fracionamento bioguiado pela atividade citotóxica do extrato hidroalcolico do zoantídeo *Protopalythoa variabilis* coletado na costa cearense, onde isolaram α -aminoácidos lipídicos com potente atividade citotóxica nas quatro linhagens de células tumorais testadas.

O potencial citotóxico das esponjas marinhas da costa cearense tem como destaque dois trabalhos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa. O primeiro estudo foi realizado utilizando o extrato hidroalcolico de 8 espécies de esponjas mais abundantes encontradas na zona intertidal da praia de Flexeiras (Trairi), onde realizou-se um *screening* para avaliar o potencial citotóxico e antimicrobiano dos extratos obtidos. Dentre as oito espécies estudadas, sete apresentaram atividade em algum dos ensaios realizados. Um estudo publicado por Ferreira e colaboradores (2007) avaliou 22 extratos hidroalcolicos das esponjas marinhas coletadas no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará em

um *screening* quanto ao potencial citotóxico e antimitótico, dentre os extratos testados vale ressaltar que nove espécies apresentaram atividade citotóxica frente as linhagens de células tumorais e dezenove inibiram a divisão de ovos de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*.

1.3. Importância das esponjas marinhas como fonte de produtos naturais

As esponjas são os organismos que compõem o filo Porifera, que, por sua vez, é o grupo mais antigo dos metazoários, existindo a aproximadamente 700 – 800 milhões de anos. Estes organismos são multicelulares e apresentam uma organização corporea simples, sendo chamado de parazoários, devido a ausência de tecido verdadeiro e a presença de células totipotentes. A principal característica deste grupo é a presença de vários poros, denominados de óstios, revestindo a parte externa do seu corpo, o que deu origem ao nome Porifera (portador de poros), estes poros abrem-se e levam a água absorvida pela esponja através de canais que servem de sistema de alimentação e filtração do animal, a complexidade do sistema aquifero, composto pelos canais, permite classificá-las em três tipos diferentes, do mais simples ao mais complexo tem-se: asconóides, siconóides e leuconóides (Ruppert & Barnes, 1996; Hickman, Roberts e Larson, 2003). Atualmente estima-se que exista cerca de 8.000 espécies de esponjas descritas e estima-se que haja o dobro de espécies ainda não descritas. A grande maioria das esponjas habita o ambiente marinho podendo ser encontradas também em água doce e em águas salobras (Hickman, Roberts e Larson, 2003; Belarbi *et al.*, 2003; Thakur & Müller, 2004; Brusca & Brusca, 2006). Estes organismos possuem hábito filtrador, são sésseis e apresentam as mais variadas formas, dimensões e cores. Taxonomicamente o filo Porifera está dividido em três classes distinguidas pela natureza dos seus esqueletos internos: Calcarea, Hexactinellida e Demospongiae, sendo esta ultima classe a que apresenta o maior número de representantes vivendo atualmente (Hickman, Roberts e Larson, 2003).

A utilização das esponjas como ferramenta no tratamento de doenças é conhecida desde a antiguidade onde estes organismos, saturados com iodo, eram utilizados por médicos de Alexandria para induzir coagulação sanguínea ou com extratos vegetais bioativos para anestesiarem pacientes (Sipkema *et al.*, 2004).

As esponjas são uma excelente fonte de toxinas com variadas atividades biológicas que podem estar relacionadas a deter predadores, competição por espaço com outros organismos sésseis, a comunicação e proteção contra infecção, entretanto não está

claro que servem efetivamente como defesa desses organismos, já que vários outros exemplos de defesa de esponjas foram reportados. Assim estes organismos destacam-se dos outros organismos marinhos por conter uma maior diversidade de metabólitos secundários e são considerados promissoras fontes de composto com potencial medicinal, visto que a atividade citotóxica é encontrada em mais de 10% das espécies de esponjas já estudadas, além de serem vistas como potencialmente produtoras de agentes anti-incrustantes (*antifouling*) (Uriz *et al.* 1996; Becerro *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2003; Braekman & Dalozze, 2004).

As esponjas marinhas destacam-se como os principais detentores de compostos com atividade biológica apresentando uma grande diversidade de estruturas de carbono com mecanismos de ação inusitados, capazes de combater várias doenças, incluindo o câncer. Estes organismos são responsáveis por mais de 5.300 compostos descritos em diferentes classes químicas desde nucleosídeos, alcalóides, terpenos ativos, esteróis entre outros, podendo estes compostos servir de modelo para síntese de derivados e novas moléculas ainda mais potentes (Sipkema *et al.*, 2004).

As esponjas merecem ênfase por serem os principais detentores de compostos nitrogenados quando comparados aos outros filos que ocupam o ambiente marinho. Esses compostos são oriundos do metabolismo secundário e estão associados à atividade biológica, dentre elas merece destaque a atividade citotóxica (Urban *et al.*, 2000).

Tabela 1 - Moléculas de diferentes classes químicas isoladas de esponjas marinhas e suas respectivas aplicações.

COMPOSTO	ESPÉCIE	CLASSE QUÍMICA	MECANISMO DE AÇÃO	APLICAÇÃO
Aaptamina	<i>Aaptos suberitoides</i>	Alcalóide	Indução do gene p21 e parada no ciclo celular em G ₂ /M	Antitumoral
Agosterol A	<i>Spongia</i> sp.	Esteróide	Ativação de células NKT	Antitumoral
Halicondrina B	<i>Halichondria okadai</i>	Macrolídeo	Inibição da polimerização de tubulina	Antitumoral
Discodermolido	<i>Discodermia dissolute</i>	Lactona	Inibição da polimerização de tubulina	Antitumoral
Agelasphina (KRN7000)	<i>Agelas mauritianus</i>	Esteróide	Ativador de células NKT	Antitumoral
Monoalida	<i>Lufariella variabilis</i>	Sesterterpeno	Inibidor de phospholipase A ₂	Anti-inflamatório
Cacospongionolideo B	<i>Fasciospongia cavernosa</i>	Lactona Sesterterpeno	Inibidor de phospholipase A ₂	Anti-inflamatório
Variolina B	<i>Kirkpatrickia varialosa</i>	Alcalóide	Antiviral	Anti-infecciosa
Dragmacidina F	<i>Halicortex</i> sp.	Alcalóide	Antiviral	Anti-infecciosa
Haplosamatos A e B	<i>Xestospongia</i> sp.	Esteróide	Antiviral (HIV-1)	Anti-infecciosa
Discoderminas B, C e D	<i>Discodermia kiiensis</i>	Peptídeo cíclico	Antibacteriano	Antimicrobiano
Arenosclerinas A, B e C	<i>Arenosclera brasiliensis</i>	Alcalóide Alquilpiperidino	Antibacteriano	Antimicrobiano
Spongistatina	<i>Hyrtios erecta</i>	Lactona	Antifúngico	Antimicrobiano
Kalihineno X	<i>Acanthella cavernosa</i>	Isocianoterpenóide	-	Anti-incrustante
Kalihipirano B	<i>Acanthella cavernosa</i>	Isocianoterpenóide	-	Anti-incrustante

Fonte: Sipkema *et al.*, 2005; Mayer & Gustafson, 2008; Mayer *et al.*, 2009; Costa-Lotufo *et al.*, 2009.

1.4. Família Crambeidae e gênero *Monanchora* como fonte de compostos bioativos

As esponjas pertencentes a família Crambeidae estão enquadradas dentro da ordem Poecilosclerida e têm como características serem organismos incrustantes, com formato ramoso irregular ou tubulares, podendo ser encontradas em rochas, corais e mangues, principalmente em águas rasas. Alguns gêneros dessa família podem ocorrer em profundidades de até 180m. Uma característica bastante singular das espécies desta família é a presença de alcalóides guanidínicos cíclicos, tendo sido sugerido que estes compostos possam ser usados como marcadores taxonômicos para esses gêneros. Um aspecto bastante peculiar e interessante para estes compostos é a sua capacidade de perturbar interações proteína-proteína incluindo HIV-1 gp120-CD4, p56-CD4, HIV-1 Nef com p53, actina e p56. As interações desses compostos nas relações proteína-proteína fornece novas ferramentas biológicas e sugere um potencial terapêutico (Tavares *et al.*, 1994; Van Soest, 2002).

A busca pelos alcalóides guanidínicos teve como marco inicial o isolamento do composto pentacíclico ptilomicalina A, por Kashman e colaboradores em 1989, da esponja marinha *Ptilocaulis spiculifer* coletada no Caribe. Esta classe de compostos é isolada predominantemente de esponjas pertencentes às ordens Poecilosclerida e Axinellida e são conhecidos por exibirem uma vasta variedade de atividades biológicas dentre elas citotóxica, antiviral e antibacteriana. A ordem Poecilosclerida compreende os gêneros *Crambe*, *Monanchora* e *Batzella*, enquanto a ordem Axinellida tem como representante o gênero *Ptilocaulis*, sendo todos os gêneros fontes ricas em alcalóides guanidínicos (Kashman *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 2003; Hua, *et al.*, 2004).

Posteriormente ao isolamento inicial da ptilomicalina A (figura 9), este mesmo composto foi isolado da espécie *Hemimycale* sp. observando-se, nesse estudo, que este composto possuía atividade citotóxica potente em linhagens de células tumorais, e adicionalmente este mesmo composto apresentou atividade anti-fúngica contra *Candida albicans* e antiviral contra *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1), sendo este o único alcalóide guanidínico pentacíclico a apresentar esta atividade, desde então vários outros compostos foram isolados de esponjas marinhas dos gêneros acima citados (Heys *et al.*, 2000).

Em seguida foram reportado o isolamento de vários alcalóides guanidínicos como as crambescidinas 800, 816, 830, 844 e isocrambescidina 800 da esponja marinha do mediterrâneo *Crambe crambe*, muito comum em costões rochosos. Estes compostos

apresentam diversas atividades biológicas incluindo a atividade citotóxica, além de serem potentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirais e bloqueadores de canais de cálcio (Berlinck, Braekman e Dalozze, 1993; Chang, Whittaker e Bewley, 2003; Lazaro *et al*, 2006; Hua *et al*, 2007).

O gênero *Monanchora* foi descrito pela primeira vez por Carter (1983) e semelhante aos gêneros pertencentes a família Crambeidae é uma fonte bastante promissora de alcalóides guanidínicos como crambescidinas, ptilocaulinas e batzelladinas, com diversas atividades biológicas. O primeiro relato deste tipo de composto foi reportado por Tavares em 1994 quando este isolou da esponja marinha brasileira *Monanchora arbuscula* o alcalóide pentacíclico crambescidina 800 (figura 9), este composto também foi isolado posteriormente das espécies *Monanchora unguiculata* coletada na Indonésia por Suna (2007) que relatou uma potente atividade neuroprotetora, já Hua (2007) isolou o mesmo da espécie *Monanchora unguifera* coletada na costa do Caribe e destacou uma potente atividade citotóxica, anti-HIV e antimicrobiana.

O alcalóide 8b-hidroxiptilocaulina (figura 13) foi primeiramente descrito por Tavares (1995) para a espécie *M. arbuscula* coletada na costa brasileira, neste mesmo estudo foram isolados os alcalóides guanidínicos tricíclicos ptilocaulina (figura 13) e isoptilocaulina (figura 9), este por sua vez foi isolado recentemente da mesma espécie por Kossuga e colaboradores (2007). Hua (2004) descreveu o isolamento e a atividade anti-infecciosa dos alcalóides tricíclicos mirabilina B, e da mistura de epímeros composta por 1,8a,8b,3a-dideidro-8 β -hidroxiptilocaulina (figura 13) e 1,8a,8b,3a-dideidro-8 α -hidroxiptilocaulina (figura 13) isolados da espécie *Monanchora unguifera*. (Tavares *et al*, 1995; Laville *et al*, 2009).

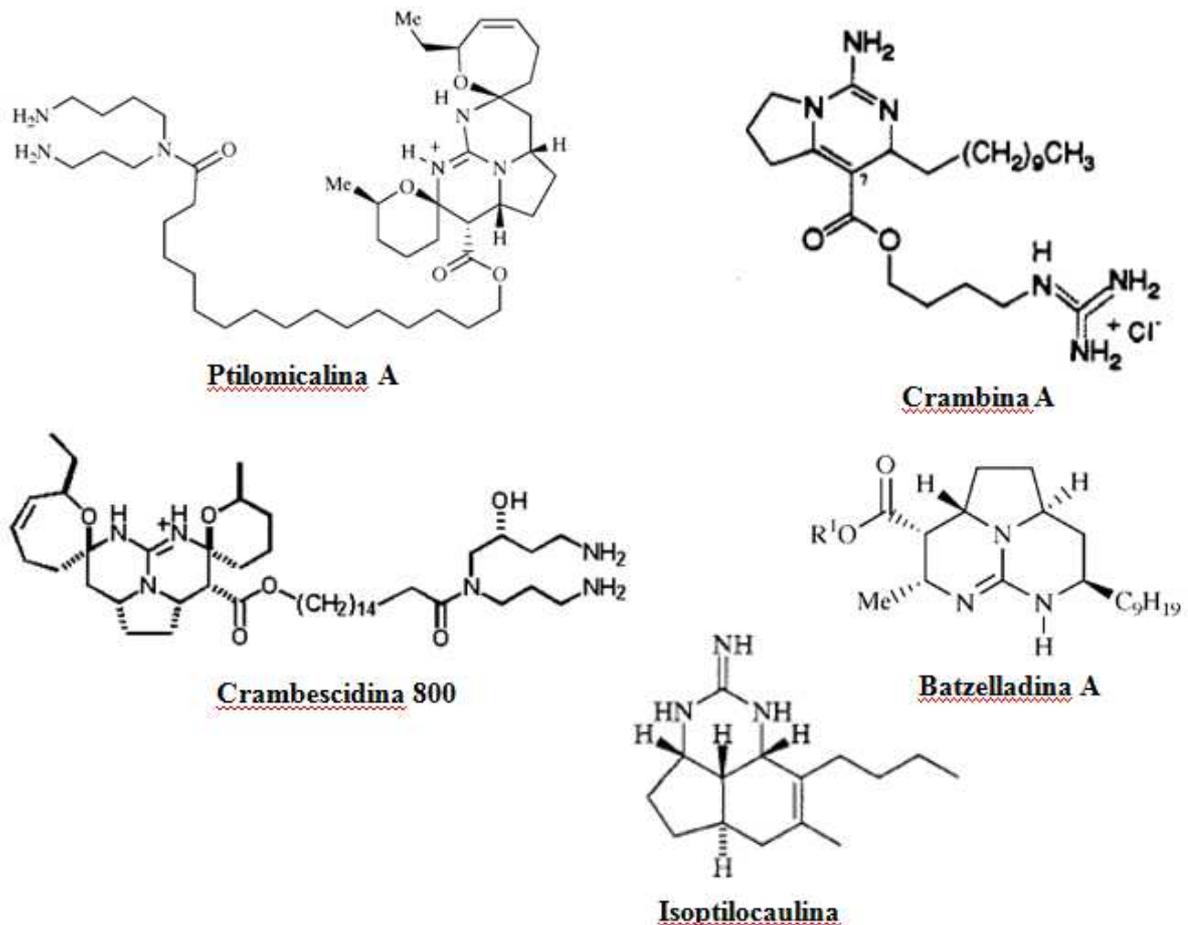


Figura 9 - Estruturas químicas de alcalóides guanidínicos.

1.5. Relevância do trabalho

O estudo do ambiente marinho como fonte de moléculas com atividade biológica tem se tornado cada vez mais promissor, visto que 70% da superfície do planeta corresponde ao ecossistema marinho, os quais representa 95% da biosfera terrestre, e ser detentor de uma grande biodiversidade. A vasta diversidade biológica encontrada no ambiente marinho correlaciona, intimamente, com uma larga diversidade química, que, por sua vez, tem se mostrado bastante promissora como fonte de produtos naturais com potencial biomédico. (Burkhard & Haefner, 2003).

No caso particular do câncer, mais de 60% de todos os quimioterápicos introduzidos na clínica entre 1940 e 2006 possuem, em algum instância, origem em fontes naturais (Newman & Cragg, 2007). Vale destacar, pois, que foram os tradicionais grupos de

plantas e microorganismos terrestres que forneceram quase a totalidade das moléculas que estão computadas nas estatísticas atuais. Entretanto, o câncer é a segunda causa de morte no mundo, representando 17% dos óbitos, e, no Brasil, estima-se que a ocorrência de novos casos de câncer será de 489.270 para os anos de 2010 – 2011. Apesar de haver uma grande quantidade de fármacos para o tratamento de neoplasias malignas e sucesso em diversas terapias, o número elevado de vítimas de câncer mostra o quanto a busca por medicamentos mais eficazes, seletivos, que apresentem menor resistência e efeitos colaterais se faz de extrema necessidade (INCA, 2010).

O ambiente marinho ocupa ainda a fatia menos explorada dentre as fontes de produtos naturais e, há até poucas décadas, permanecia praticamente inexplorado pelos grupos que pesquisam produtos naturais. Entretanto, os resultados obtidos durante os últimos 60 anos de estudos confirmam ser este uma fonte peculiar e relevante para a prospecção de recursos biomédicos, sobremaneira, devido ao ineditismo, tanto químico quanto biológico, das moléculas ali encontradas (Costa-Lotufo, 2009).

A vasta costa brasileira abriga um potencial latente para a descoberta de substâncias de interesse médico e farmacológico e a região nordestina compreende a maior parte do litoral tropical do Brasil, com aproximadamente 3000 km de extensão. A proximidade do Brasil a linha do Equador permite ao país uma localização que favorece a prospecção de compostos bioativos visto que de maneira geral, os organismos que habitam as áreas tropicais exibem maior diversidade e concentração de metabólitos secundários do que os que vivem em latitudes mais baixas. O Brasil possui a segunda maior costa oceânica mundial com uma extensão de 8.500km, sendo a região nordeste detentora de mais da metade da costa litorânea brasileira. Os estudos realizados sobre o potencial farmacológico da fauna marinha da costa do estado do Ceará têm mostrado a importância da fauna bentônica desta região como fonte de novas moléculas bioativas. Estes, por sua vez têm ressaltado o potencial citotóxico resguardado em várias espécies de esponjas, ascídias, cnidários e microorganismos, e revelaram um alto grau de endemismo das espécies ali encontradas e algumas substâncias ainda inéditas e com acentuada atividade biológica, sendo uma importante ferramenta para estudos da atividade anticancer (Jimenez *et al.* 2004; Ferreira *et al.*, 2007; Jimenez *et al.*, 2008; Wilke *et al.*, 2009).

Além do potencial biomédico, os mares e oceanos são fontes ainda de compostos com importância para agroquímica, cosmética, alimentícia e como ferramentas científicas e

diagnósticas (European Borad Foundation Marine Board, 2001). Estes bioprodutos agregam relevante valor econômico aos recursos do mar. Visto a importância do ambiente marinho como fonte de novos compostos com potencial biomédico, podemos nos utilizar da biotecnologia como ferramenta. A indústria farmacêutica, particularmente, é a segunda mais próspera do mundo, movimentando hoje cerca de 0,65 trilhões de dólares por ano. Até o ano de 2020, este valor deve dobrar. Inclusive, algumas indústrias farmacêuticas já foram fundadas com o objetivo de desenvolver fármacos a partir de protótipos obtidos exclusivamente do ambiente marinho. É o caso da companhia espanhola PharmaMar que, só nos últimos 20 anos investiu mais de 420 milhões de euros na pesquisa em fármacos com potencial para a terapia do câncer. Atualmente 3 substâncias já se encontram em fase pré-clínica e outras 5 estão em fase clínica de testes. Essas moléculas são provenientes de uma coleção de mais de 65.000 organismos, de onde foram descritas cerca de 700 novas substâncias (Pharmamar, 2010) A Neuers Phamaceuticals é outra indústria especializada na prospecção de fármacos a partir de recursos marinhos. Com menos tempo de existência, já possui 2 novas moléculas cumprindo a primeira fase dos testes clínicos, ambas para o tratamento de câncer (Nereus Pharmaceuticals, 2010).

A espécie *Monanchora arbuscula* destacou-se entre as 22 esponjas coletadas do Parque Estadual Marinho Pedra da Riasca do Meio avaliadas quanto ao seu potencial citotóxico, assim observado por Ferreira e colaboradores (2007). Neste estudo, seu extrato hidroalcoólico apresentou potente cictotoxicidade frente a quatro linhagens de células tumorais, além de inibir em 100% de inibição do desenvolvimento embrionario dos ovos de ouriço-do-mar.

É importante mencionar que este estudo está inserido em um projeto mais largo, iniciado há cerca de 8 anos, que sugere o desbravamento do potencial farmacológico resguardado na costa do Ceará. Os estudos nesta área são considerados estratégicos por envolver o conhecimento da biodiversidade num sentido amplo e abre uma nova vertente para a prospecção recursos do mar e gestão costeira. Ainda que recentes e relativamente escassos, os achados nesse campo despertam grande interesse pelos grupos que estudam produtos naturais e abrem caminhos para se seguir explorando novas fontes naturais na busca de substâncias bioativas (Pereira & Soares-Gomes, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de alcalóides guanidínicos obtidos da esponja *Monanchora arbuscula* coletada no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar alcalóides guanidínicos da esponja *Monanchora arbuscula* coletada no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará.
- Avaliar a atividade citotóxica dos compostos isolados em várias linhagens de células tumorais em cultura
- Estabelecer uma relação entre estrutura e atividade dos compostos obtidos.
- Determinar o mecanismo de atividade citotóxica do composto ptilocaulina (PT) utilizando células leucêmicas HL-60 como modelo de estudo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1. Equipamentos

Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2®

Agitador de tubo, Donner AD 8850®

Banho-maria, DELLTA Modelo 105Di®

Centrífuga Centimicro, FANEN Modelo 212®

Centrífuga Excelsa Baby, I FANEN Modelo 206®

Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5403®

Centrífuga de lâminas, Shandon Southern Cytospin®

Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte mini®

Colunas analíticas para CLAE Shimadzu ODS

Colunas preparativas para CLAE Shimadzu ODS

Cromatógrafo líquido Shimadzu com bomba Modelo LC6A, Detector Ultra-Violeta com Integrador Modelo C-R6A e Injetor Manual Rheodyne Modelo 7125

Deonizador de água Milli-Q, Milipore®

Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter®

Fluxo laminar, VECO®

High Throughput Screening (HTS)/Laboratory Automation Workstation, Biomek 3000, Beckman Coulter®

Incubadora de células, (CO₂ Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow®

Máquina fotográfica digital, Olympus C-7070®

Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab®

Microscópio óptico de inversão, Nikon Diaphot®

Microscópio de fluorescência, Olympus®

pHmetro, Micronal B474®

Pipetas automáticas, Gilson®

RMN Bruker DPX-300

3.1.2. Soluções, Reagentes e Fármacos

Acetato de Etila	-	Vetec®
Ácido Clorídrico	-	Vetec®
Álcool Etílico	-	Vetec®
Álcool Metílico	-	Vetec®
Alamar Blue (Resazurina)	0,312 mg/mL	Sigma®
Anticorpo anti-BrdU	1 µL de anticorpo anti-BrdU	Sigma®

	BSA 5 % q.s.p. 500 µL de solução	Dako®
Anticorpo biotinilado anti-imunoglobulina de camundongo	1 µL de anticorpo anti-imunoglobulina BSA 5 % q.s.p. 100 µL de solução	Sigma®
Azul de tripan 10%	10 mg de azul de tripan PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma® -
5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) 10mM	-	Sigma®
Brometo de Etídio 100 µg/mL	1mg de brometo de etídeo PBS q.s.p 10 mL de solução	Sigma® -
Citrato de Sódio	-	Grupo Química®
Cloreto de Sódio (NaCl)	-	Labsynth®
	5 µL de DAB	Immunotech®
Diaminobenzidina (DAB)	1 mL de Tris-HCl (Tris 0,05M) pH= 7,6 2 µL de H ₂ O ₂	Proquímios® Proquímios®
Diclorometano	-	Vetec®
Dimetilsulfóxido (DMSO)	-	Vetec®
Doxorrubicina – fornecida pelo Instituto do Câncer do Ceará – ICC	-	Zodiac®

Estreptavidina – peroxidase	1 μ L de Estreptavidina – peroxidase	Sigma®
	BSA 5 % q.s.p. 100 μ L de solução	Dako®
Éter de Petróleo	-	Vetec®
Ficoll	-	Sigma®
Fitohemaglutinina	-	Sigma®
Iodeto de propídeo 50 μ g/mL	1 mg de iodeto de propídeo PBS q.s.p. 50 mL	Boehringer®
Laranja de Acridina	1 g de laranja de acridina (100 μ g/mL) H ₂ O q.s.p. 10 mL de solução	Fluka® -
Meio de cultura de células RPMI 1640	Diluído em água deionizada e esterelizada, filtrado em filtro millipore (0,22 μ m) e complementado com SBF 10 %, 1 % de glutamina, 1 % de antibióticos, 1 % de bicarbonato de sódio (0,75 %) e 25 mM de HEPES	Cultilab®
MTT	20 mg de MTT PBS q.s.p. 100 mL de solução	Sigma® -

Penicilina – estreptomicina	Penicilina 10.000 U.I./mL	Cultilab®
	Estreptomicina 10 mg/mL	Cultilab®
Sephadex LH-20	-	Pharmacia
Sílica gel 60 GF ₂₅₄	-	Merck
Solução desnaturante (para análise de incorporação de BrdU)	Formamida 70 % 2x SSC (pH entre 6,5 e 7,5 a 70 °C)	Vetec®
Soro fetal bovino	-	Cultilab®
Solução salina (para hemólise)	8,5 g de Cloreto de sódio (0,85 %)	Labsynth®
	1,11 g de Cloreto de cálcio (10 mM) H ₂ O q.s.p 1 L de solução	Reagen® -
SSC 10X	Cloreto de sódio 1,5 M	-
	Citrato de sódio 0,15 M H ₂ O	
Tampão fosfato (PBS)	8,766 g de Cloreto de sódio	Labsynth®

	2,14 g de NaHPO ₄ .7H ₂ O	Labsynth®
	0,276 g de NaHPO ₄ .H ₂ O	Labsynth®
	H ₂ O q.s.p. 1 L de solução (pH = 7,2)	-
Tampão Tris (TBS) 10X	Cloreto de sódio 1,5 M	Labsynth®
	Tris 0,5 M (pH= 7,6)	Proquímios®
	H ₂ O	-
	50 mL de Tripsina 2,5 %	Cultilab®
Tripsina 0,25%	0,125 g de EDTA	Proquímios®
	450 mL de PBS	-
Triton X -100	-	Isofar®

3.1.3. Animais/Modelos biológicos experimentais

Camundongos albinos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss

Linhagens celulares tumorais mantidas em cultura (tabela 2)

Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)

3.2. Coleta do Material

A espécie *Monanchora arbuscula* (figura 11) foi coletada no parque estadual marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará (figura 10), a 10 milhas náuticas (aproximadamente 18,52 Km) do Porto do Mucuripe, em Fortaleza. O parque marinho compreende uma área de 33,20 Km² e está delimitado pelas seguintes coordenadas geográficas: A: 3° 33'800"S e 38°26'000"W, B: 3°36'000"S e 38°26'000"W, C: 3°36'000"S e 38°21'600"W e D: 3°33'800"S e 38°21'600".

A coleta foi realizada em profundidades que variam de 17 a 30 metros através de mergulho autônomo. Após a coleta do espécime, foi realizada a limpeza da mesma para retirada dos contaminantes, em seguida o material foi imerso em etanol (1,5L) e estocado em freezer a -18°C até a preparação do extrato bruto.

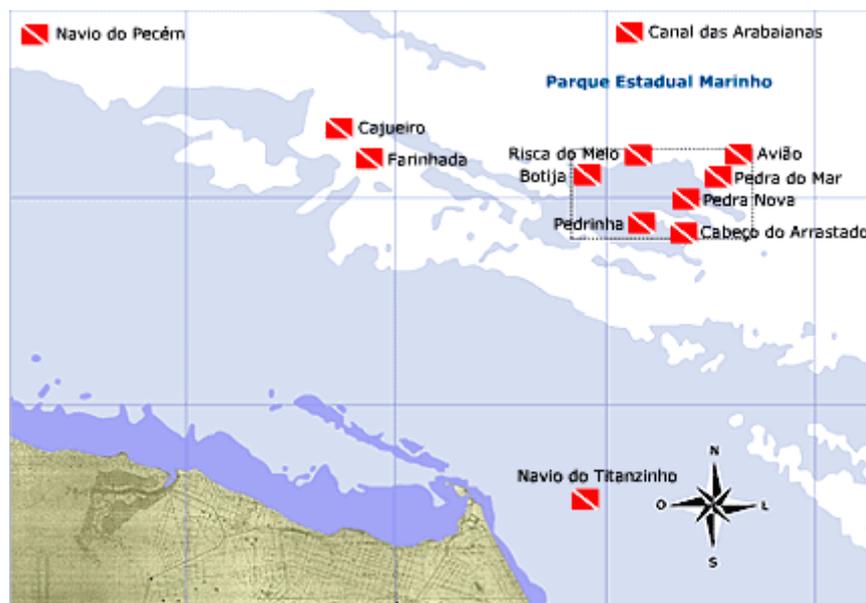


Figura 10 - Mapa do Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio - CE. **Fonte:** http://www.brasilmergulho.com.br/port/points/ce/images/mapa_gran.gif.

3.3. Identificação da espécie

O material coletado no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, em julho de 2004, foi separado e fixado em solução de etanol 70% (v/v) para a identificação da espécie realizada pelo Prof. Dr. Eduardo Hajdu e colaboradores do Museu Nacional de Poríferas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A espécie foi identificada como *Monanchora arbuscula* e armazenada no Museu Nacional de Poríferas sob o *voucher* MNRJ 8670 e MNRJ 8674.



Figura 11 - Fotografia da espécie *Monanchora arbuscula*, registrada no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará, em julho de 2004. Por Eduardo Hajdu.

3.4. Obtenção/Isolamento dos compostos

Esta etapa do trabalho foi realizada sob orientação do Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira, sob a co-orientação da Prof^a. Dr^a. Otília Deusdênia Loiola Pessoa e com participação da mestrande Julieta Rangel de Oliveira no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, onde o material coletado se manteve estocado.

As colônias de *Monanchora arbuscula* (1,5kg) foram homogeneizadas e em seguida extraído por 72 horas com a mistura de solventes composta por diclorometano e metanol (CH₂Cl₂/MeOH) na proporção de 1:1 (v/v), em seguida os solventes foram removidos em evaporador rotativo a vácuo, que após seco deu origem ao extrato bruto. O extrato bruto foi submetido a uma partição química líquido-líquido utilizando solventes de polaridades diferentes – éter de petróleo, diclorometano, Acetato de etíla e metanol – as frações obtidas foram bioguiadas pela atividade citotóxica utilizando o ensaio do MTT em quatro linhagens de células tumorais. Em seguida as frações mais ativas foram secas e separadas em colunas cromatográficas. As frações diclorometano (MADCM) e acetato de etíla (MAAC) foram submetidas a cromatografias em coluna de SEPHADEX LH-20 e em sílica gel respectivamente, em seguida suas frações foram submetidas à análise por cromatografia em camada delgada e reunidas por similaridade. Depois de reunidas as frações foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e em seguida analisadas por RMN ¹H. O processo de purificação e isolamento dos alcalóides guanidínicos esta esquematizado no fluxograma abaixo (Figura 12).

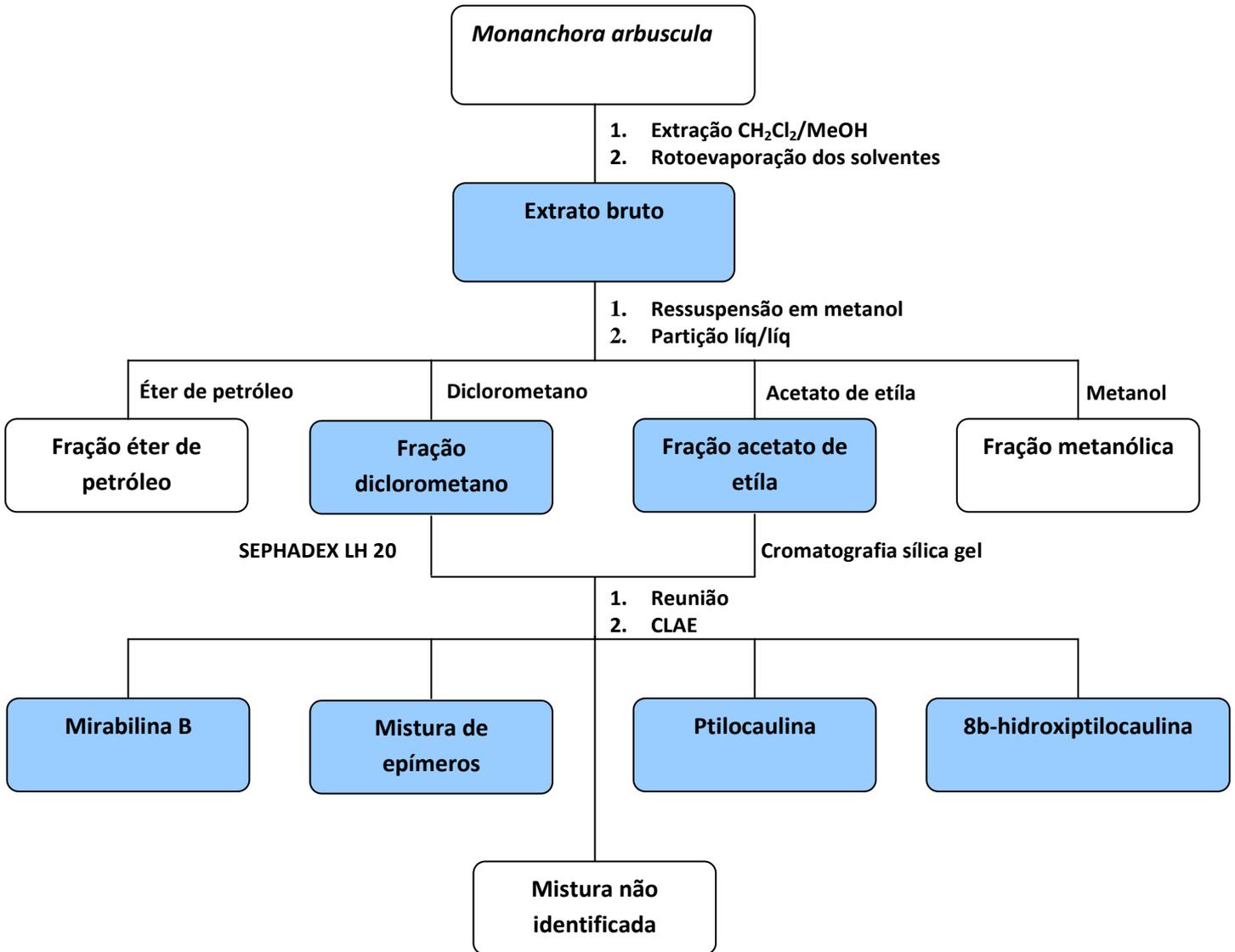


Figura 12 – Fluxograma da obtenção do extrato bruto de *Monanchora arbuscula* e respectivas partições líquido/líquido mostrando a obtenção das misturas e compostos puros das frações diclorometano e acetato de etila.

3.5. Determinação da Atividade Citotóxica

3.5.1. Ensaio MTT

Os alcalóides e as misturas de alcalóides foram investigados quanto a sua atividade antiproliferativa nas linhagens de células tumorais. A citotoxicidade foi avaliada através do método de MTT em quatro linhagens de células tumorais cedidas pelo 'National Cancer Institute - NCI' dos Estados Unidos. É um método quantitativo indireto, rápido, sensível que analisa a viabilidade e o estado metabólico da célula, baseado na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT) em um sal de coloração roxa (formazan), a partir da enzima succinil desidrogenase das mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Ou seja, a solução amarela do MTT é reduzida pela atividade mitocondrial nas células metabolicamente ativas em um cristal roxo (MOSMANN, 1983).

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm², volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm², volume de 250 mL para células em suspensão), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 complementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂ e 95 % de umidade, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 h, quando necessário as células foram repicadas em novo meio de cultura, em uma concentração de 0,5-1,0 x 10⁶ céls/mL.

As substâncias previamente diluídas em DMSO puro estéril para a concentração estoque de 1,0 mg/mL foram diluídas seriadamente em meio RPMI para obtenção das concentrações finais (0,009 - 5 µg/mL) e adicionadas em placa de 96 poços (100 µL/poço). O quimioterápico doxorrubicina foi usado como controle positivo. Após um período de incubação de 72 h, as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500 rpm/15 min. O sobrenadante foi aspirado e foi adicionado 200 µL de solução de MTT 10 % em RPMI 1640, sendo a placa colocada na estufa a 5 % de CO₂ por 3 h. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm/10 min, tendo o sobrenadante aspirado e seu precipitado ressuspenso em 150 µL de DMSO e agitado por cerca de 10 min, até completa dissolução dos cristais de formazan.. As placas foram lidas no espectrofotômetro de placas a um comprimento de onda de 595 nm.

Tabela 2: Linhagens celulares tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro* através do método do MTT.

Linhagem Celular	Tipo Histológico do Câncer/Origem	Concentração de Plaqueamento (células/mL)
HL-60	Leucemia promielocítica humana	$0,3 \times 10^6$
MDA-MB 435	Melanoma humano	$0,1 \times 10^6$
HCT-8	Carcinoma de cólon humano	$0,7 \times 10^5$
SF-295	Glioblastoma humano	$0,1 \times 10^6$
PBMC	Células mononucleadas de sangue periférico	$2,0 \times 10^4$

3.5.2. Ensaio do Alamar Blue

Para investigar atividade antiproliferativa dos compostos ativos, em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC), foi realizado o teste do Alamar Blue num período de 72 h de exposição com a amostra. As PBMC foram isoladas de voluntários sadios, sendo em seguida diluídas e plaqueadas em placa de 96 poços ($2,0 \times 10^4$ cél/poço em 100µl de meio). Depois de 24h, os compostos foram adicionados em cada poço (usando HTS - high-throughput screening - biomek 3000 - Beckman Coulter, Inc. Fullerton, Califórnia, EUA) e incubada por 72h. Doxorubicina (0,009 a 5 µg/mL) foi usada como controle positivo. Grupos controle receberam a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas antes do final da incubação, 10µL de solução estoque (0.312 mg/mL) de Alamar Blue (resazurin - Sigma Aldrich Co. - St. Louis, MO/USA) foi adicionada em cada poço. A absorbância foi medida usando leitor de multiplacas (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc. Fullerton, Califórnia, EUA). O efeito dos compostos foi quantificado como percentagem da absorbância do controle a 570nm e 595nm. A absorbância do meio sozinho foi subtraída da absorbância do meio com alamar Blue. Este valor é chamado de AO_{HW} . O fator de correção R_0 pode ser calculado de AO_{HW} e AO_{LW} , onde $R_0 = AO_{LW}/AO_{HW}$. A percentagem de alamar Blue reduzido é expressa como: % Reduzida = $A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$.

3.5.3. Análise dos dados

As drogas foram testadas em diluição seriada, em triplicata. Suas CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50 % do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95 %) foram calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 3.0 (GraphPad Software).

3.6. Avaliação do dano à membrana plasmática – Teste Hemolítico

O sangue foi coletado de três camundongos Swiss (*Mus musculus*) por via orbital, sendo diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85 % + CaCl₂ 10 mM). Os eritrócitos foram lavados três vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm/3 min) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos a 2 %. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2ª, os poços receberam 50 µL da solução salina e 50 µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10 %. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 100 µL de solução salina e 100 µL da substância teste. Da 4ª fileira em diante os poços receberam 100 µL da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de Triton X-100 1 % (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100 µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações foram sempre diluídas pela metade, variando de 1,56 a 200 µg/mL. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1 h, sob agitação constante à temperatura ambiente (26 ± 2 °C), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/3 min) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância no espectrofotômetro de placas a 540 nm.

3.6.1. Análise dos dados

A concentração efetiva média (CE_{50}) foi determinada de maneira relativa aos controles positivo e negativo utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

3.7. Estudos de Mecanismo de Ação

3.7.1 Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripan

O teste de exclusão por azul de tripan permite quantificar separadamente as células viáveis das células mortas pela substância testada. O corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível observar uma coloração azulada nas células mortas.

Células da linhagem HL-60, na concentração de $0,3 \times 10^6$ céls/mL, foram incubadas por 24 h com a amostra, nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular. Foram retirados 90 μ L da suspensão de células e adicionado a 10 μ L do azul de tripan. As células viáveis e as células não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer. A doxorrubicina (0,3 μ g/mL) foi usada como controle positivo.

3.7.1.1. Análise dos dados

Os dados foram expressos como da média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de experimentos independentes ($n = 3$). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls, usando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA) com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

3.7.2. Inibição da síntese de DNA – Ensaio do BrdU

Células da linhagem HL-60, na concentração de $0,3 \times 10^6$ céls/mL, foram incubadas por 24 h com o alcalóide ptilocaulina e examinadas ao microscópio de inversão, nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M. Três horas antes do final do período de incubação adicionou-se o 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) na cultura de células. As lâminas para cada amostra foram preparadas e postas para secar por 2 h. Após o período de secagem foram fixadas em metanol por 1 min. As células foram lavadas com tampão Tris (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 min a 70 °C e pH 7,4. Após uma segunda lavagem com TBS, a região da lâmina onde se encontram as células foram circuladas com caneta hidrofóbica e em seguida incubadas com anticorpo primário aplicado imediatamente depois de circulado e deixada durante a em estufa de CO₂ por 2 horas em câmara úmida. As células foram

incubadas com anticorpo secundário biotinado por 20 min e, em seguida, com a solução de estreptavidina-fluoresceína por mais 20 min. Foi adicionado o cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 20 – 30 segundos e, em seguida, removido com água destilada. Para corar as células não marcadas pelo cromógeno, utiliza-se hematoxilina (0,1 %). Consideram-se positivas para proliferação, as células de núcleo corado pelo DAB (cor marrom) e, negativas, as células de núcleo corado com hematoxilina (cor azul).

3.7.2.1. Análise dos dados

Duzentas células foram contadas, diferenciando-as entre núcleo marrom (incorporaram o BrdU) e não-marrom (não incorporam o BrdU). Os dados foram expressos como da média \pm E.P.M. de experimentos independentes ($n = 2$). A proporção de células marcadas em marrom e não-marcadas entre os diferentes grupos foi comparada pelo teste χ^2 com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$) usando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

3.7.3. Coloração diferencial por BE/LA

O método de coloração por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina (BE/LA) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose através da revelação por fluorescência com base em alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas (McGAHON *et al.*, 1995).

A laranja de acridina intercala-se ao DNA, conferindo aparência verde ao núcleo celular, sendo capaz de atravessar membranas intactas. O brometo de etídio é incorporado majoritariamente por células não viáveis (com instabilidade de membrana), intercalando-se ao DNA. As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA. O BE marca muito fracamente ou muitas vezes não marca, pois não atravessa membranas não lisadas. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas por BE. Morfologicamente, observam-se alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células que estão em apoptose tardia têm aparência alaranjada devido a algum dano causado pelo composto a membrana plasmática permitindo a entrada de pequena quantidade de BE. Já as células necróticas, por apresentarem intenso dano à membrana plasmática, coram-se de vermelho intenso.

Células da linhagem HL-60, plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ céls/mL, foram incubadas por 24 h com ptilocaulina nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M. A suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e centrifugada por 5 min em baixa rotação (10 x g/5 min. correspondente a 1000 rpm/5 min.). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 μ L de solução de PBS. Em seguida, 1 μ L da solução de BE/LA foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células transferido para uma lâmina e montado com lamínula e em seguida levadas ao microscópio de fluorescência para observação dos eventos celulares. A Doxorubicina (0,3 μ g/mL) foi usada como controle positivo (Geng *et al.*, 2003).

3.7.3.1. Análise dos dados

Para a quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas), foram contadas 300 células de cada amostra e montadas em lâminas que foram fotografadas para o registro visual de possíveis alterações. Os dados foram expressos como da média \pm E.P.M. de experimentos independentes ($n = 3$). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls ($p < 0,05$), usando o programa GraphPad (Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

3.7.4. Coloração por May-Grunwald-Giemsa

A coloração por May-Grunwald-Giemsa se baseia em interações eletrostáticas entre os corantes e moléculas-alvo. Essa coloração possui azul de metileno (corante básico), eosina (corante ácido), entre outros componentes básicos que permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. Após o término de incubação (24h) lâminas foram preparadas, com 50 μ L da suspensão de células, em citocentrífuga (cytospin) e fixadas com metanol 100% por 1 minuto. Em seguida as laminas foram coradas com May-Grunwald, por 10 seg, e em seguida com Giemsa por 10 seg.

3.7.4.1. Análise dos dados

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratado). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia.

3.8. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método rápido e preciso, que se baseia no desvio da luz incidida sobre a célula para frente e para o lado, sendo uma importante ferramenta para acessar a potência e a especificidade de drogas anti-câncer. A capacidade de um agente se intercalar a uma célula e emitir fluorescência nos permite identificar alterações quer sejam morfológicas, bioquímicas e moleculares que ocorrem durante a apoptose (Ramanathan, 1997).

3.8.1. Determinação da Integridade de Membrana

Este método consiste na capacidade do iodeto de propídeo (PI) se ligar ao DNA de células cuja membrana plasmática esteja rompida, como nos casos de apoptose tardia e necrose, emitindo uma alta fluorescência quando excitado pelo laser de argônio (488nm). Nas células cuja membrana permanece íntegra (células viáveis), o PI não consegue penetrar e, portanto emite uma fluorescência mais baixa, com isso as células com membrana íntegra podem ser diferenciadas daquelas com membrana rompida.

Células de HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 24 h com os derivados nas concentrações de 1 e 2 μ M. A doxorrubicina (0,3 μ g/mL) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação uma alíquota de 50 μ L da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por mais 5 minutos com 100 μ L de PI (50 μ g/mL). Em seguida as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies).

3.8.1.1. Análise de dados

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes ($n = 3$). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos, os dados serão comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.8.2. Ciclo celular e fragmentação de DNA

O método consiste na capacidade do iodeto de propídeo se ligar ao DNA das células, para tanto a membrana plasmática foi primeiramente lisada utilizando um Triton, permitindo assim a entrada do corante no núcleo. A intensidade de fluorescência do Iodeto de propídeo ligado ao DNA permitiu diferenciar as fases do ciclo em que as células se encontravam, sendo elas G₀/G₁, S e G₂/M. O sub-G₁, representa o DNA fragmentado e que, portanto emite baixa fluorescência, sendo indicativo de apoptose.

Células de HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 24 h com o composto nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M, sendo a doxorubicina (0,5 μ M) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação uma alíquota de 50 μ L da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por mais 30 minutos com 100 μ L de uma solução de lise contendo PI (50 μ g/mL), Triton X-100 (0,1%) e citrato de sódio (0,1%). Em seguida as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies), onde foram obtidas histogramas representando a quantidade de células em cada fase do ciclo celular (G₁, S e G₂/M) e a quantidade de células com DNA fragmentado.

3.8.2.1. Análise de dados

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes ($n = 3$). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados serão comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.8.3. Despolarização Mitocondrial

Esse teste baseia-se na capacidade da mitocôndria sequestrar a rodamina 123, um corante fluorescente nucleofílico, quando esta apresenta potencial transmembrânico inalterado. Dessa forma, células contendo rodamina emitem alta fluorescência quando excitadas pelo laser. No entanto, ao entrar em apoptose, a célula sofre um influxo de íons H⁺ através da membrana mitocondrial interna, induzindo uma alteração de seu potencial transmembrânico. Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levam ao efluxo da

rodamina, gerando eventos que emitirão menor fluorescência quando comparada com as células que possuem mitocôndrias normais.

Células de HL-60 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 24 h com o alcalóide guanidínico nas concentrações de 10, 15 e 20 μM . A doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo. Após o período de incubação uma alíquota de 50 μL da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorf e incubada por mais 15 minutos com 200 μL de uma solução de rodamina 123 (1 $\mu\text{g/mL}$ em PBS), na ausência de luz e a 37 °C. Após o período de incubação as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuscitado em PBS e reincubado por mais 30 minutos e analisadas por citometria de fluxo (EasyCyte da Guava Technologies).

3.8.3.1. Análise dos dados

Em cada experimento foram contados 5000 eventos. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes ($n = 3$). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Compostos isolados

As frações extraídas com solventes de polaridade intermediária, diclorometano (MADCM) e acetato de etila (MAAC), obtidas do extrato bruto da esponja marinha *Monanchora arbuscula* destacaram-se quanto ao potencial citotóxico com CI_{50} variando de 1,17 a 3,05 $\mu\text{g/mL}$ e 1,13 a 2,08 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Destas frações foram isolados três alcalóides guanidínicos puros e uma mistura de epímeros. Os alcalóides tiveram suas estruturas determinadas por espectro de RMN ^1H . Os compostos identificados foram denominados mirabilina (1), 8b-hidroxiptilocalina (2), ptilocalina (3) e a mistura de epímeros composta por 1,8a,8b,3a-dideidro-8 β -hidroxiptilocalina (4) e 1,8a,8b,3a-dideidro-8 α -hidroxiptilocalina (5) (figura 13).

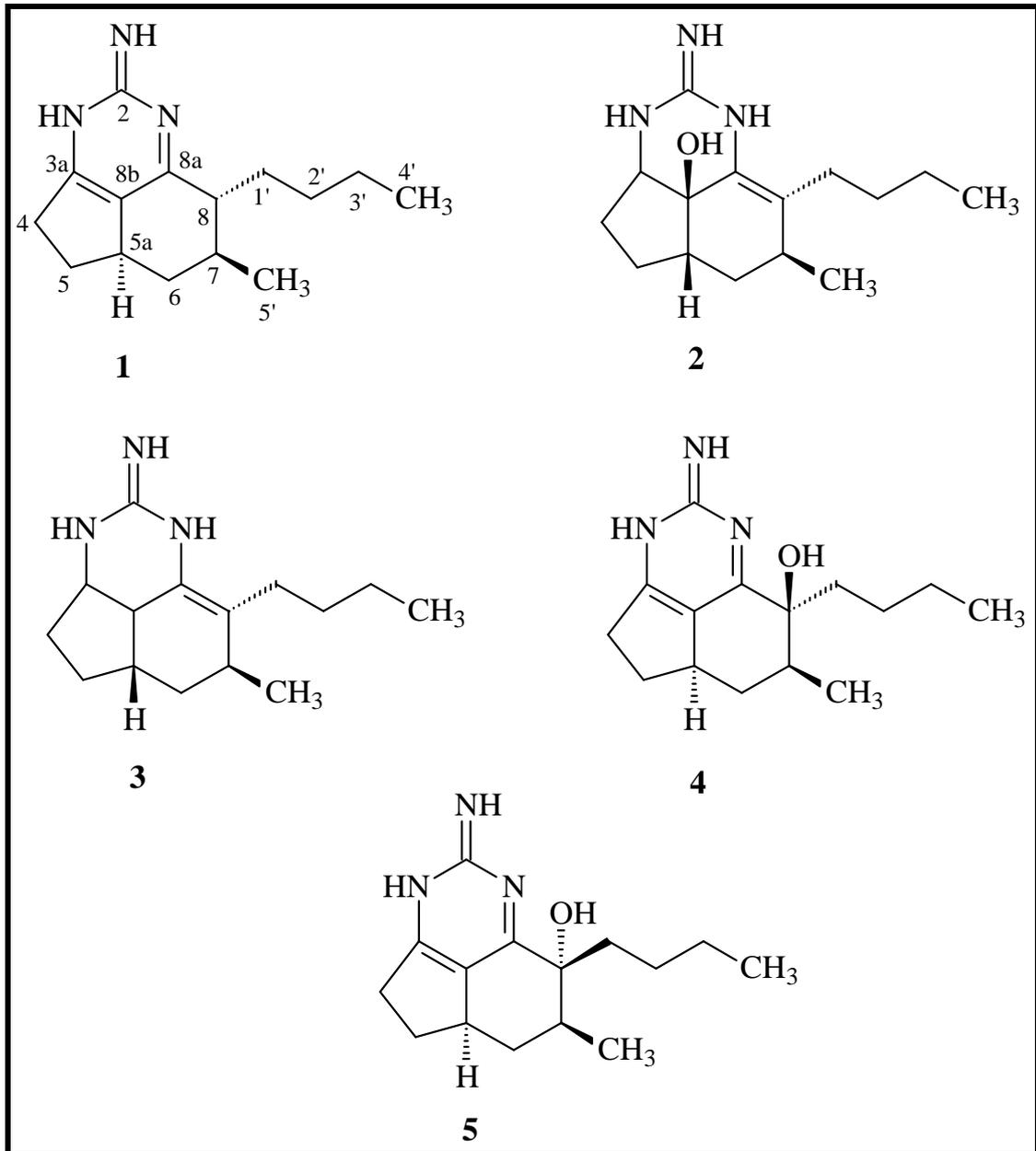


Figura 13 - Estrutura química dos alcalóides guanidínicos isolados da esponja marinha *Monanchora arbuscula*, Mirabilina B (1), 8b-hidroxiptilocaulina (2), ptilocaulina (3), 1,8a,8b,3a-didehidro-8β-hidroxiptilocaulina (4) e 1,8a,8b,3a-didehidro-8α-hidroxiptilocaulina (5).

4.2. Atividade Citotóxica dos compostos

Os compostos e misturas foram avaliados quanto ao seu potencial citotóxico em quatro linhagens de células tumorais (tabela 3) pelo ensaio do MTT após o período de 72 horas de incubação, ensaio que permite quantificar a proliferação celular e permitiu determinar a concentração inibitória média (CI₅₀). Os Resultados obtidos demonstraram que os compostos ptilocaulina (PT) e 8b-hidroxiptilocaulina (8HPT) apresentaram uma atividade citotóxica contra as linhagens de células tumorais, mostrando, inclusive, uma relativa seletividade para as linhagens de melanoma (MDA-MB-435) e leucemia (HL-60), sendo a ptilocaulina mais ativa que o alcalóide 8b-hidroxiptilocaulina (Tabela 3). Os compostos PT e 8HPT apresentaram maior citotoxicidade para as linhagens tumorais em comparação a PMBC (tabela 3).

4.3. Avaliação quanto ao dano em membrana plasmática

Os compostos PT e 8HPT foram incubados por 1 hora em solução de eritrócitos de camundongos *Mus musculus* para avaliar o dano à membrana plasmática. Ambos os compostos apresentaram potencial em causar dano à membrana plasmática, sendo o composto PT mais hemolítico que o composto 8HPT (Tabela 3).

Tabela 3 – Citotoxicidade em linhagens de células tumorais pelo ensaio do MTT, em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) – teste do ALAMAR BLUE – e potencial de dano em membrana em eritrócitos de camundongos pelos alcalóides guanidínicos obtidos de *M. arbuscula*.

AMOSTRAS	MTT CI ₅₀ µG/ML (µM) IC 95%				ALAMAR BLUE™ CI ₅₀ µM IC 95%	HEMÓLISE CE ₅₀ µM IC 95%
	HL-60	HCT-8	MDA-MB-435	SF-295	PBMC	
Mirabilina B	> 20,4	> 20,4	> 20,4	> 20,4	N.T.	N.T.
8b-hidroxiptilocalina	7,9	> 19,0	11,3	> 19,0	> 19,0	577,9
Ptilocalina	5,8	17,7	7,5	> 20,3	> 20,3	352,9
Mistura de epímeros	> 25,0 (µg/mL)	> 25,0 (µg/mL)	> 25,0 (µg/mL)	> 25,0 (µg/mL)	N.T.	N.T.
Doxorrubicina	0,03	0,02	0,8	0,4	1,7	N.T.

4.4. Determinação do mecanismo de ação

Para determinação dos mecanismos de ação envolvidos na morte celular, o composto mais ativo PT foi testado na linhagem tumoral HL-60 (leucemia) nas concentrações de 10, 15 e 20 μM , sendo esta linhagem a mais sensível ao composto como demonstrado no ensaio do MTT.

4.4.1. Avaliação da viabilidade celular por exclusão do azul de Tripán

Este ensaio permite diferenciar células em viáveis e não-viáveis pela incorporação do azul de tripan pelas células não viáveis e permitiu quantificar a redução da viabilidade em células tratadas. O composto PT reduziu significativamente o número de células viáveis em todas as concentrações testadas ($p < 0,01$). Apenas a concentração de 20 μM aumentou o número de células não viáveis quando comparados com a doxorrubicina, usada como controle positivo na concentração de 0,55 μM .

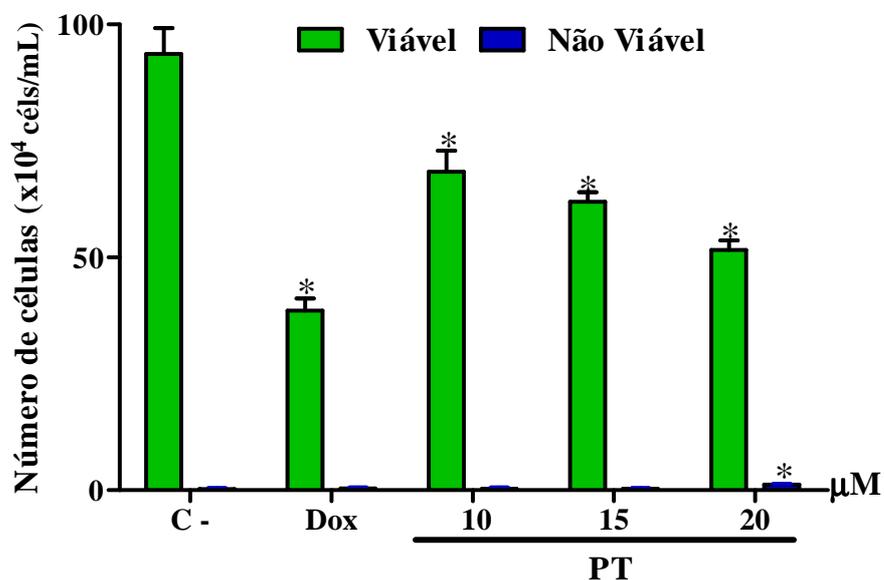


Figura 14 - Efeito do alcalóide PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μM na viabilidade de células leucêmicas HL-60 determinado por Exclusão do Azul de Tripán após 24 horas de incubação. O controle negativo representa as células não tratadas. A Doxorrubicina (Dox) representa o controle positivo (0,55 μM). Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de experimentos independentes (N=3). * $p < 0,001$ comparado ao controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls Test.

4.4.2. Inibição da síntese de DNA – Ensaio do BrdU

O ensaio de incorporação do 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU) permite avaliar a proliferação celular pela capacidade do composto em diminuir o número de células capazes de incorporar o BrdU, um análogo da timidina, a síntese do DNA. A taxa de inibição é representada pela razão entre as células capazes de incorporar o BrdU (BrdU positivo) do grupo tratado e pelas BrdU positivo do controle.

O alcalóide PT diminuiu a incorporação do BrdU em todas as concentrações testadas, sendo a maior concentração (20 μ M) com inibição de incorporação de BRDU bastante semelhante a doxorrubicina, controle positivo utilizado.

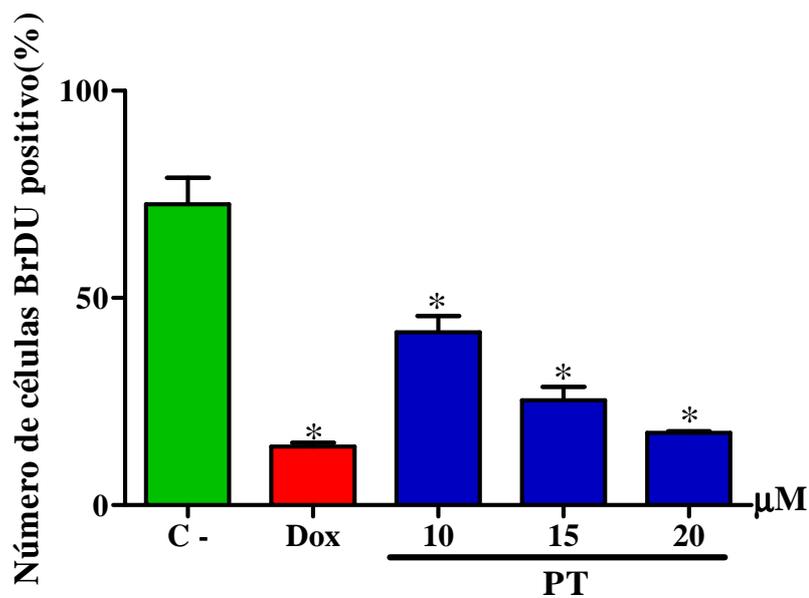


Figura 15 - Efeito do alcalóide guanidínico PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M sobre a inibição da síntese de DNA avaliado pela incorporação do BrdU (BrdU positivo) avaliados na linhagem tumoral de células leucêmicas HL-60 após 24 horas de incubação. Contorle negativo (C-) representa as células não tratadas e Doxorrubicina (Dox) utilizado como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de experimentos independentes (N=2), comparado pelo teste do χ^2 com nível de significância de 5% (* $p < 0,005$).

4.4.3. Coloração diferencial por BE/LA

A coloração por brometo de etídeo (BE) e laranja de acridina (LA) permite diferenciar os tipos de morte celular causado pelas moléculas, pois durante o processo de morte celular as células apresentam alterações morfológicas típicas e mudanças nas suas estruturas intracelular. O corante, laranja de acridina é permeável a todas as células, sendo as células viáveis marcadas apenas por este corante, as células que se encontram em processo de apoptose a membrana celular permanece íntegra, porém já permite a entrada do brometo de etídeo a elas permitindo assim diferenciá-la. Enquanto na necrose a característica básica é a perda da integridade da membrana plasmática da célula.

O alcalóide guanidínico PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μM foi capaz de reduzir o número de células viáveis em todas as concentrações testadas. De mesmo modo o composto promoveu um aumento de células em apoptose para todas as concentrações testadas, não havendo diferença significativa entre as concentrações 15 e 20 μM e o controle positivo. Não ocorreu alteração no número de células com características de necrose em nenhuma das amostras.

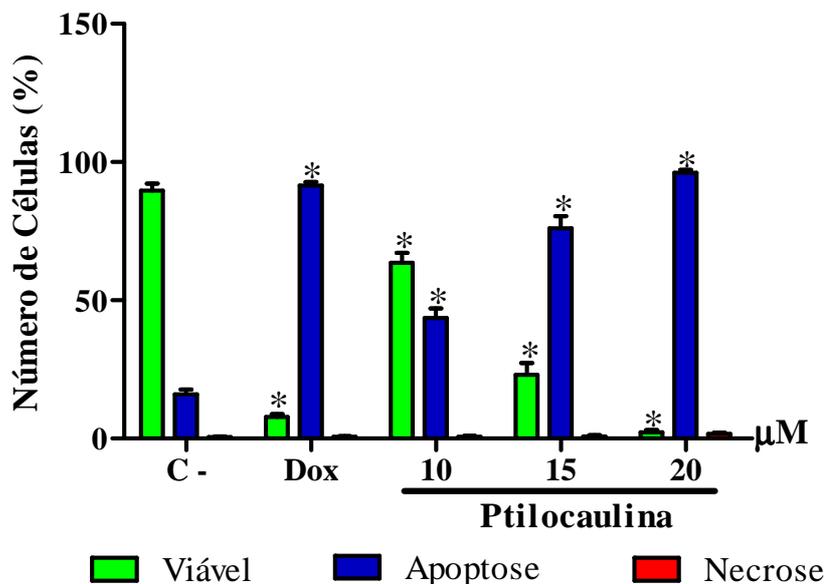


Figura 16 - Avaliação da atividade do composto PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μM , sobre o padrão de morte celular em células leucêmicas HL-60 e analisada por brometo de etídeo/laranja de acridina após 24 horas de incubação. O controle negativo representa as células não tratadas e a doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de experimentos independentes (N=3). * $p < 0,001$ comparado ao controle por ANOVA seguido por Student Newman-Keuls Test.

4.4.4. Análise de alterações morfológicas

A figura 13 mostra os efeitos causados às células HL-60 tratadas com doxorubicina, utilizada como controle positivo, e com alcalóide PT nas concentrações 10, 15 e 20 μ M, onde se podem encontrar algumas alterações na morfologia celular quando comparadas as células não tratadas representadas pelo controle negativo, que apresentam morfologia normal.

Foi observado que as células tratadas com PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M apresentaram alterações morfológicas e estruturais evidenciando a morte por apoptose quando visto a presença de prolongamentos da membrana plasmática (blebs), vacuolização citoplasmática, picnose nuclear e fragmentação de DNA, além de diminuição do volume celular principalmente nas maiores concentrações testadas (figura 17).

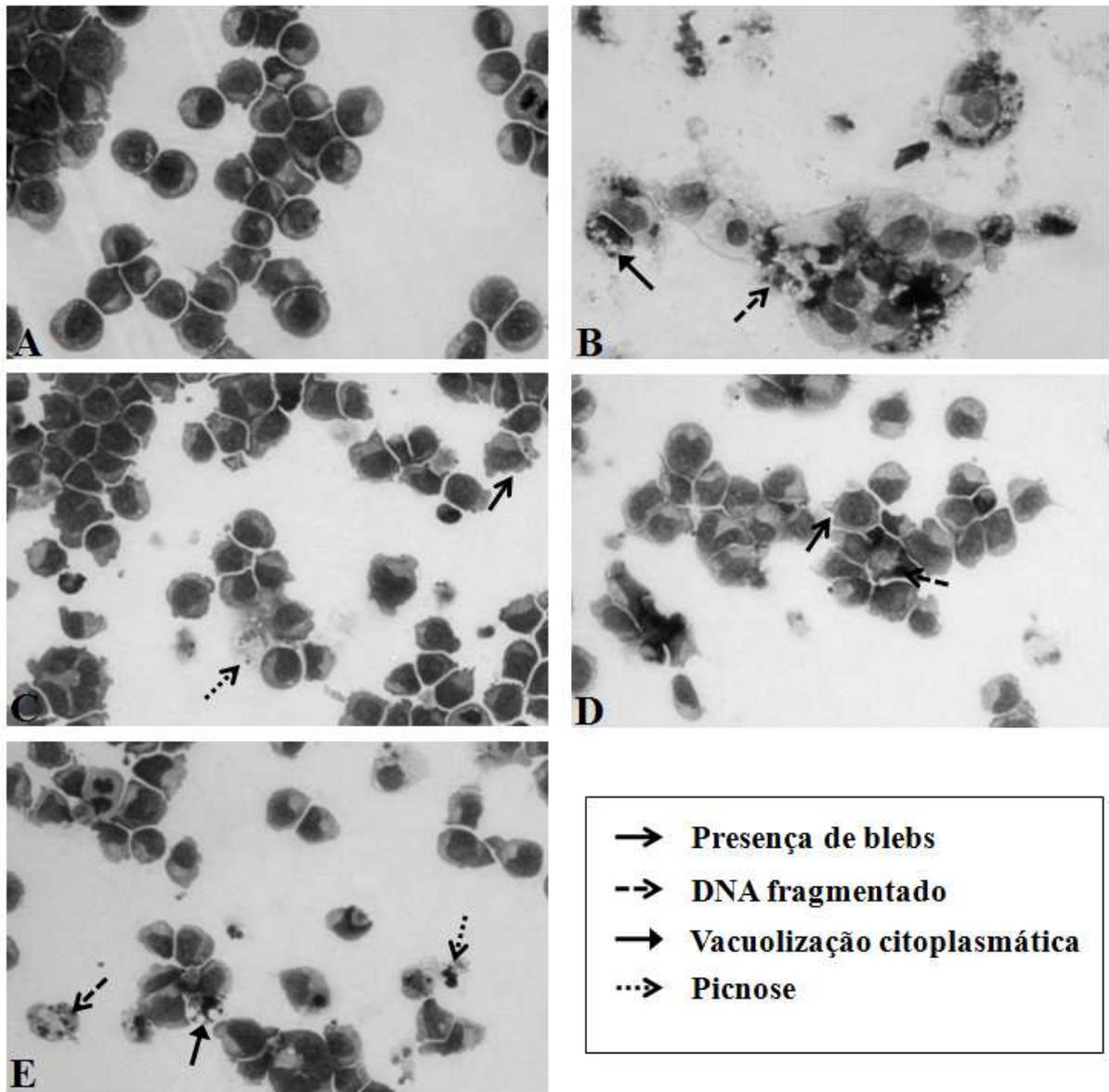


Figura 17 - Microfotografias das células HL-60 controle (A) e tratadas com doxorubicina (B) e com o composto ptilocaulina nas concentrações de 10 μ M (C), 15 μ M (D) e 20 μ M (E) por 24 horas de incubação. Coloração por May-Grunwald-Giemsa – setas cavadas e tracejadas indicam fragmentação nuclear e condensação de cromatina, as cavadas cheias indicam desestabilização da membrana plasmática (presença de blebs), as pretas retas apontam as células com vacuolização citoplasmática e diminuição do volume celular e as setas cavadas e pontilhadas, as picnóticas. Aumento 400X.

4.4.5. Citometria de fluxo

4.4.5.1. Densidade celular

O composto PT diminuiu a concentração de células em todas as concentrações testadas não havendo diferenças significativas entre as diferentes concentrações do alcalóide guanidínico.

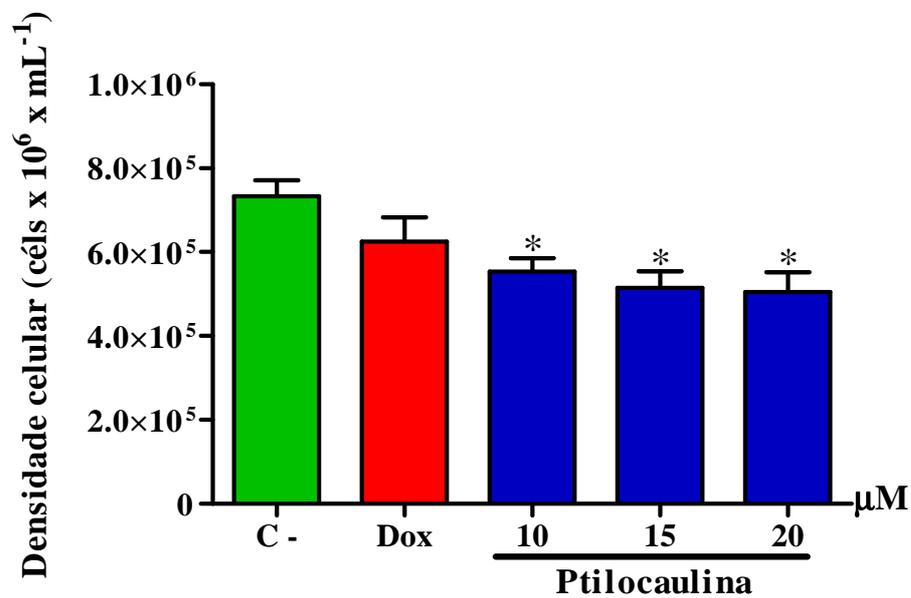


Figura 18 - Efeito do alcalóide guanidínico PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μM sobre a densidade celular de linhagem leucêmica (HL-60), analisado por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55μM) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média ± E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, p < 0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.4.5.2. Integridade de membrana

O composto PT quando incubado por 24 horas em células da linhagem leucêmica HL-60 nas concentrações 10, 15 e 20 μ M mostrou uma diminuição significativa da integridade da membrana plasmática das células apenas na maior concentração testada.

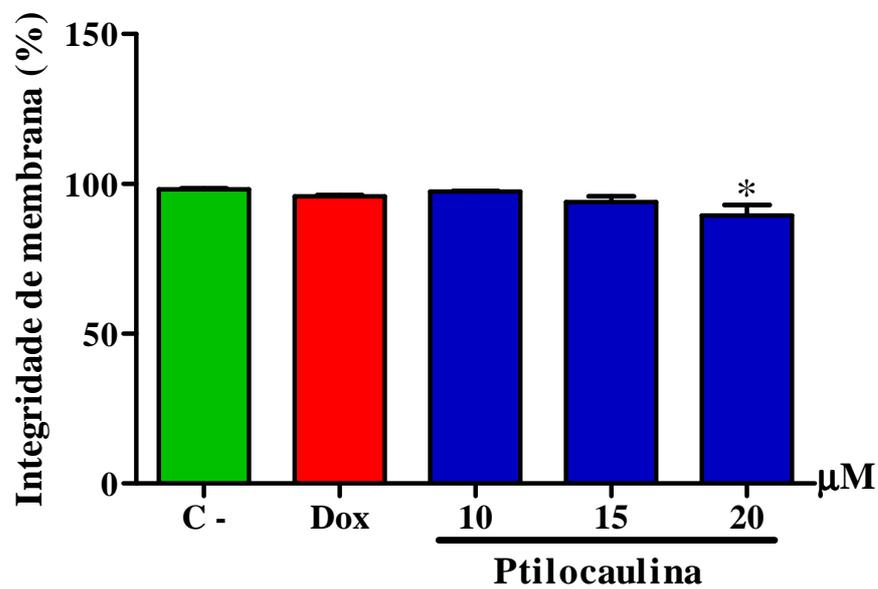


Figura 19 - Efeito do composto PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M sobre a viabilidade (integridade de membrana) de células leucêmicas de HL-60, analisado por citometria de fluxo, após 24 horas de incubação. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.4.5.3. Análise de ciclo celular

O alcalóide guanidínico PT alterou as fases do ciclo celular da linhagem HL-60 quando incubado por 24 horas. O composto nas concentrações 15 e 20 μ M gerou um significativo aumento do número de células em fase G₀/G₁ e nas mesmas concentrações causaram uma significativa diminuição da fase S do ciclo celular das células tratadas. No entanto não foi observado alterações na fase G₂/M do ciclo celular pelo composto em nenhuma das concentrações testadas.

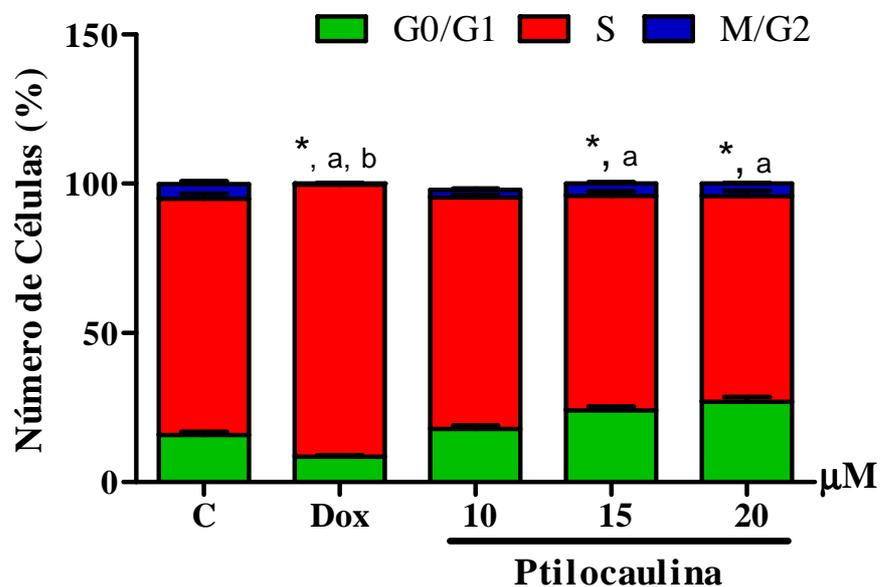


Figura 20 – Ação do composto PT sobre as fases do ciclo celular em células de linhagem leucêmica (HL-60), após 24 horas de incubação, analisadas por citometria de fluxo. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. * - significância para G₀/G₁, a – significância para S e b – significância para M/G₂, p < 0,05 comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.4.5.4. Análise de fragmentação do DNA

O alcalóide guanidínico PT aumentou o percentual de células com DNA fragmentado nas concentrações de 15 e 20 μM de forma semelhante.

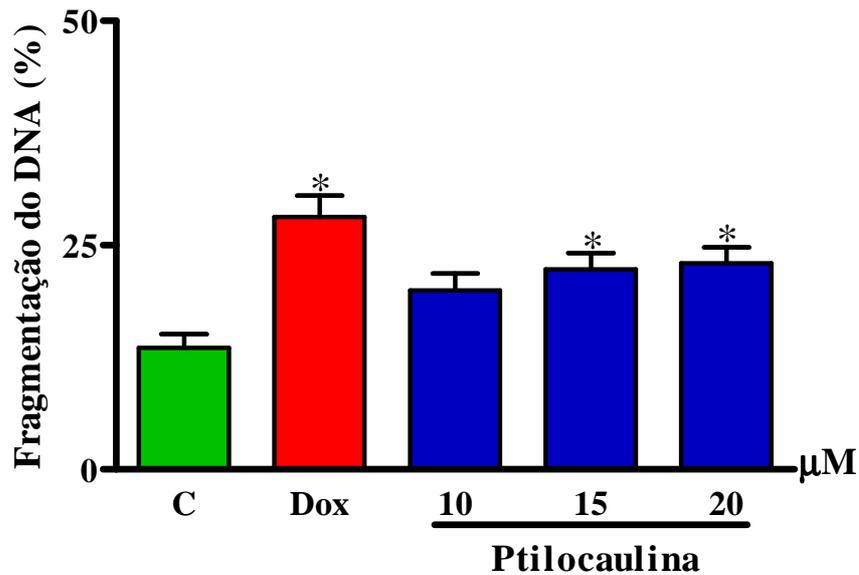


Figura 21 - Efeito do composto PT nas concentrações 10, 15, 20 μM , após 24 horas de incubação, sobre a fragmentação de DNA de células de linhagem leucêmica (HL-60), analisado por citometria de fluxo. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55 μM) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

4.4.5.5. Avaliação do Potencial transmembrânico mitocondrial

A avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial pela despolarização da mitocôndria nos permite determinar a participação do composto na via intrínseca mitocondrial, visto que alterações no potencial determinam a liberação de componentes internos da organela responsáveis por uma cadeia de reações que levam a célula à morte por apoptose.

O alcalóide PT nas concentrações de 15 e 20 μ M quando incubado com células da linhagem leucêmica (HL-60) por 24 horas promoveu a despolarização das mitocôndrias.

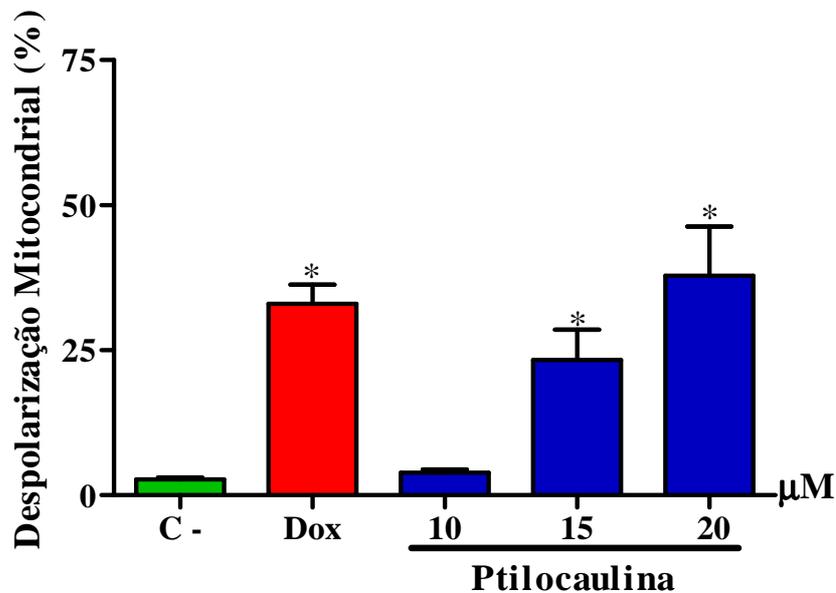


Figura 22 - Efeito do alcalóide PT nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M, após 24 horas de incubação, sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células de linhagem leucêmica (HL-60), analisado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123. C: controle negativo; D: Doxorubicina (0,55 μ M) foi usada como controle positivo. Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de três experimentos independentes. Cinco mil eventos foram contados em cada experimento. *, $p < 0,05$ comparado com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett.

5. DISCUSSÃO

A prospecção de compostos bioativos com aplicação terapêutica no ambiente marinho é uma área de pesquisa relativamente recente, contudo já tem mostrado resultados bastante promissores. Os estudos com organismos marinhos coletados no litoral cearense visando à prospecção de substâncias bioativas são ainda incipientes, mas já ressaltam o potencial anticâncer de esponjas, cnidários e ascídias, além de revelar o alto grau de endemismo desses grupos de invertebrados da região (Jimeno *et al.*, 2004; Jimenez *et al.*, 2008; Wilke, 2009; Costa-Lotufo *et al.*, 2009)

Num cenário mais amplo, as esponjas ocupam lugar de destaque entre os invertebrados marinhos estudados como fonte de novas moléculas com atividade biológica, constituindo o grupo mais promissor juntamente aos briozoários, moluscos e tunicados.

O primeiro registro de bioatividade em extratos de esponjas marinhas da costa do Ceará foi um estudo realizado por Jimenez e colaboradores (2004) que avaliou o potencial citotóxico, antimetabólico e antimicrobiano de extratos hidro-metanólicos obtidos de 8 espécies de esponja coletadas na zona intertidal da praia de fleixeiras, Ceará (Trairi), onde destacou que das 8 espécies estudadas 7 apresentavam algum tipo de atividade biológica, sendo a inibição do desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço-do-mar e a atividade antiproliferativa de células tumorais mais frequentemente observadas. O extrato obtido da esponja *Amphimedon* sp. apresentou-se como o sendo mais ativo inibindo o crescimento bacteriano com mínima concentração inibitória (MIC) de 0,15mg/mL, o desenvolvimento embrionário de ovos de ouriço-do-mar, e a proliferação de células tumorais com CI_{50} variando de 2,8 a 31,9 μ g/mL (Jimenez *et al.*, 2004).

Num estudo posterior, Ferreira e colaboradores (2007) realizaram um *screening* dos extratos hidroalcoólicos obtidos de 22 esponjas marinhas, coletadas no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, na costa cearense, avaliando o potencial citotóxico em células tumorais, hemolítico em eritrócitos de camundongos e antimetabólico em ovos de ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*). Os extratos obtidos de seis espécies mostraram-se promissores quanto ao seu potencial citotóxico inibindo a proliferação de quatro linhagens de células tumorais testadas (HL-60, MDA-MB-435, HCT-8, SF-295), onde se destacaram as

esponjas *Monanchora arbuscula*, *Amphimedon compressa* e *Geodia corticostylifera*, apresentando potente capacidade inibitória do crescimento celular tumoral com CI_{50} variando entre 1,601 a 2,032 $\mu\text{g/mL}$ para a espécie *M. arbuscula*, 1,596 a 2,962 $\mu\text{g/mL}$ para a esponja *Amphimedon compressa* e menor que 1,56 $\mu\text{g/mL}$ para a espécie *Geodia corticostylifera*. Além disso, os extratos obtidos das espécies *Agelas clathrodes*, *Agelas sp.*, *Dictyonella sp.* e *Hyattella intestinalis* apresentaram uma moderada atividade citotóxica nas linhagens celulares testadas. Dos extratos testados quanto à capacidade de causar dano em membrana plasmática de eritrócitos murinos, destacaram-se as espécies *M. arbuscula* e *G. corticostylifera* com concentrações efetivas médias (CE_{50}) de 37,54 $\mu\text{g/mL}$ e 55,10 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, contudo estas concentrações apresentam-se bastante superior as encontradas para a atividade citotóxica (Ferreira *et al.*, 2007).

A inibição do desenvolvimento embrionário em ovos de ouriço-do-mar foi mais pronunciada para os extratos obtidos das espécies *M. arbuscula*, *A. compressa*, *Agelas dispar*, *A. clathrodes*, *Agelas sp.*, *Aplysina sp.*, *Aiolochoiria crassa*, *Ircinia strobilina* e *Hyattella intestinalis* apresentando maior efeito inibitório da divisão celular na concentração de $\mu\text{g/mL}$. Enquanto que os extratos das espécies *Niphates sp.*, *Pseudosuberites sp.n.* e *Dracmacidon reticulatus* apresentaram pouca ou nenhuma atividade quando testados na mesma concentração (Ferreira *et al.*, 2007).

Tendo em vista os resultados promissores encontrados para o extrato hidroalcoólico da espécie *M. arbuscula* coletada no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, Ceará, decidiu-se investigar a composição química dos compostos obtidos do extrato em ensaios bioguiados para avaliação da atividade citotóxica em quatro linhagens de células tumorais.

Das frações oriundas da partição do extrato bruto com solventes orgânicos, as frações com polaridades intermediárias, diclorometano e acetato de etila, se destacaram quanto à capacidade de inibir o crescimento celular em linhagens tumorais. Estas frações quando comparadas por CCD, mostraram-se semelhantes quimicamente. Vale destacar que, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa têm mostrado que as frações de polaridade intermediária obtidos de extratos hidroalcoólicos de invertebrados marinhos guiados pela atividade citotóxica são freqüentemente as mais promissoras (Wilke, 2009; Jimenez *et al.*, 2008).

As esponjas merecem ênfase por serem os principais detentores de compostos nitrogenados quando comparados aos outros filos que ocupam o ambiente marinho. Esses compostos são oriundos do metabolismo secundário e estão associados à atividade biológica, dentre elas merece destaque a atividade citotóxica. Os estudos de determinação de citotoxicidade *in vitro* é uma eficiente ferramenta para a descoberta de novas moléculas com potencial antitumoral (Cragg & Newman, 2000; Urban *et al.*, 2000).

Outros estudos já foram realizados para obtenção de compostos que apresentasse algum tipo de atividade biológica da espécie *M. arbuscula*, e comprovaram ser esta espécie uma fonte em alcalóides guanidínicos biologicamente ativos. Pesquisas feitas por Muricy e colaboradores (1993), avaliaram a atividade antimicrobiana e antifúngica do extrato metanólico de 21 espécies de esponjas do sudoeste do atlântico e observaram que o extrato da espécie *M. arbuscula*, coletada na costa do Rio de Janeiro, apresentou potente atividade antibacteriana e antifúngica, tendo sido este o primeiro relato de atividade antimicrobiana da espécie.

Recentemente, Kossuga e colaboradores (2007), realizaram estudos de investigação química e farmacológica, do extrato metanólico da esponja *Monanchora* aff. *arbuscula*. A partir desse extrato foram realizados ensaios objetivando avaliar o potencial citotóxico, antibacteriano e antimicobacteriano, tendo este se mostrado potencialmente ativo em todas as atividades investigadas. Posteriormente, o grupo de Kossuga (2007) conseguiu isolar e caracterizar o alcalóide guanidínico isoptilocaulina, a partir do extrato, onde a referida substância apresentou potente atividade antibacteriana em cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*, sendo este o primeiro relato de atividade antibacteriana deste composto.

Os alcalóides guanidínicos são alcalóides que possuem em sua estrutura o grupamento guanidina (NH₂-NH-NH₂), sendo os alcalóides, por sua vez, caracterizados pela presença de pelo menos um átomo de nitrogênio (N) no seu anel heterocíclico e derivados, geralmente, a partir de aminoácidos. Assim, os alcalóides guanidínicos, por sua espantosa diversidade estrutural, não individualizam, concretamente, um grupo químico particular. Isso porque o grupamento guanidina pode ser incorporado como o grupo funcional principal de um determinado alcalóide ou compondo uma molécula de estruturalmente complexa.

Não obstante, o interesse pelos alcalóides guanidínicos segue crescente desde os anos 50 até a atualidade, assim ilustrado pela figura 23 abaixo, que apresenta o número de trabalhos de revisão versado sob o tema “alcalóides guanidínicos”.

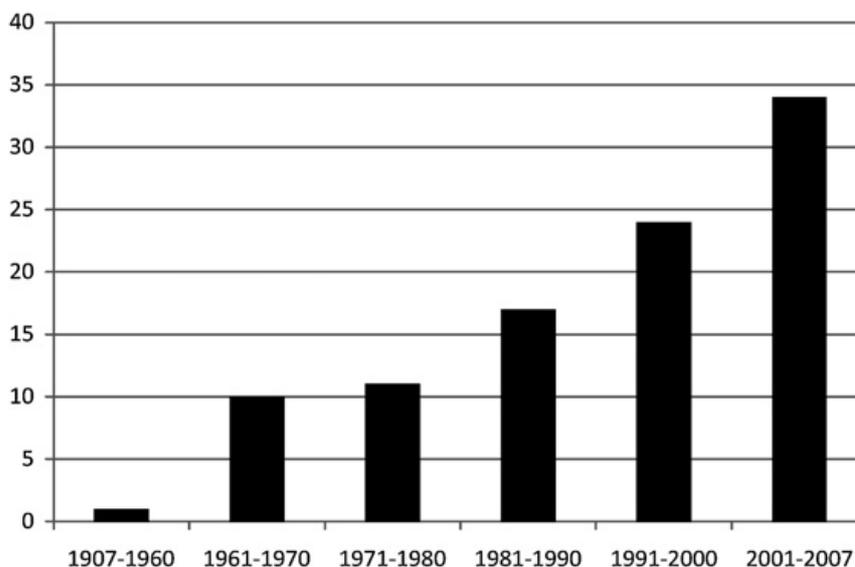


Figura 23 – Número de revisões acerca de alcalóides guanidínicos de ocorrência natural, síntese, biossíntese, atividade biológica, química (incluindo síntese e desenvolvimento de grupos protetores) e síntese bioativa de guanidinas em química medicinal. Fonte: Berlinck, Burtoloso e Kossuga, 2008.

Os estudos experimentais envolvendo o isolamento e elucidação estrutural, a determinação da via biossintética e a síntese de alcalóides guanidínicos naturais possuem uma dinâmica bastante peculiar. Ao passo que os trabalhos relatando o isolamento desses alcalóides aparece relativamente constante desde cerca-1994, sendo que em número muito mais baixo, os estudos envolvendo biossíntese e síntese do composto natural mostram um discreto, porém simbólico, incremento ao longo dos anos (figura 24). Novas tecnologias e ferramentas investigativas certamente respondem por uma parcela deste aumento, visto que alguns alcalóides guanidínicos possuem estruturas bastante complexas e de síntese difícil. Mais além, técnicas de biologia molecular tem dado enorme contribuição para acessar genes e enzimas relevantes para a biossíntese deste composto.

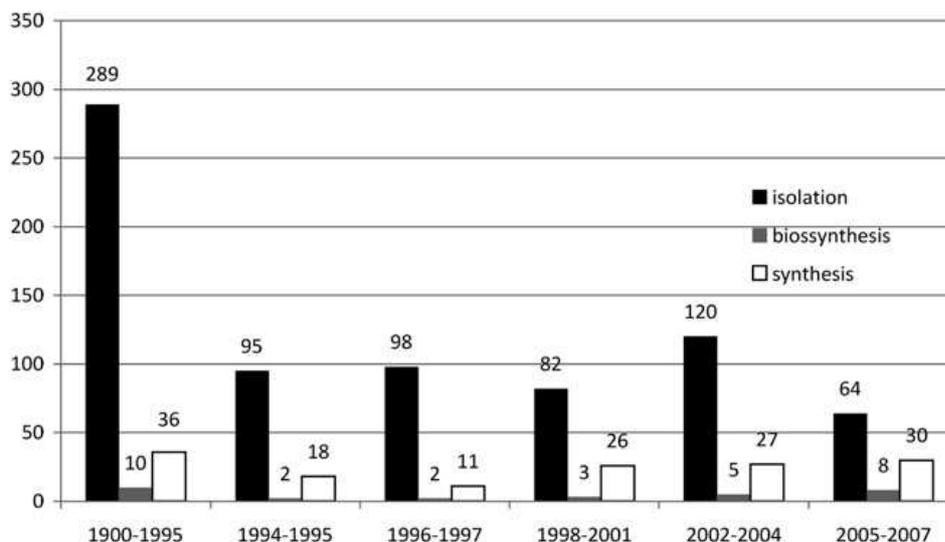


Figura 24 – Número de alcalóides guanidínicos que: (a) foram isolados; (b) tiveram sua via biossintética investigada ou; (c) foram sintetizados. Fonte: Berlinck, Burtoloso e Kossuga, 2008.

Os alcalóides guanidínicos de um modo geral, pela sua heterogeneidade estrutural, possuem um largo espectro de atividade biológica. Citotoxicidade, antimicrobiana, antiviral, antifúngico, antimalárico, antiprotozoários, bloqueador de canais de Na^+/K^+ e Ca^{2+} são algumas das atividades biológicas já registradas para moléculas dessa classe (Maragelman, McKee & McMahon, 2004). Em revisão recente elaborada por Nakao & Fusetani (2007) sobre inibidores enzimáticos obtidos de organismos marinhos, metabólitos secundários guanidínicos foram efetivos contra diversos tipos enzimáticos, a saber, geranilgeraniltransferase tipo I, receptor epidermal de fatores de crescimento, checkpoint quinases, quinases dependentes de ciclinas, fosfatases protéicas 1 e 2A, fosfolipase A2, fosfodiesterases, quitinases e serina e cisteína proteases.

Cilindrospermopsina é um alcalóide guanidínico cíclico produzido por diversas cianobactérias que habitam águas doces ou salgadas de regiões tropicais e sub-tropicais. Esta potente hepatotoxina age inibindo a síntese protéica, de modo a surtir efeito progressivo em outros órgãos vitais, não só o fígado (Ohtani et al., 1992). Carcasanamida e carcasandiamida são dois agentes hipotensores isolados do extrato aquoso das folhas de *Verbesina caracasana*, uma planta da família Compositae. Quando carcasandiamida foi administrada intravenoso em ratos, foi observado um estímulo na respiração, no inotropismo cardíaco e na resistência vascular periférica. Em doses maiores, essa substância deprime o reflexo da respiração e

promove hipotensão arterial (Delle Monache *et al.*, 1996). De *Pterogyne nitens*, uma árvore da família Fabaceae, foram isolados os alcalóides guanidínicos nitensidinas D e E, além de pteroginina, pteroginidina e galegina. A pteroginina, por sua vez, não se mostrou citotóxica, mas apresentou potencial antiangiogênico (Lopes *et al.*, 2009). O composto nitensidina D mostrou-se citotóxica contra células tumorais em cultura (Regasini *et al.*, 2009). Argiotoxina, um alcalóide guanidínico de cadeia lateral longa, foi isolado do veneno da aranha *Argiope lobata*. Essa substância foi utilizada como ferramenta para o estudo dos canais voltagem-dependente expressos nos oócitos de sapo (Raditsch *et al.*, 1996).

Como visto, os alcalóides guanidínicos possuem uma ampla ocorrência entre os organismos, já tendo sido isolados a partir de microrganismos terrestres, marinhos ou de água doce, plantas, invertebrados terrestres e invertebrados marinhos, com especial destaque para as esponjas marinhas.

A família Crambeidae, a que pertencem às espécies de esponjas do gênero *Monanchora*, é rica em alcalóides guanidínicos cíclicos, que são isolados, predominantemente, de esponjas pertencentes às ordens Poecilosclerida e Axinellida. Estes compostos são conhecidos por exibirem uma ampla variedade de atividades biológicas, dentre elas citotóxica, antiviral e antibacteriana, sendo freqüentemente isolados do gênero *Monanchora*, *Crambe*, *Ptilocaulis* e *Batzella*. Van Soest e colaboradores (1996) preferem reunir esses quatro gêneros de esponjas, e mais enfaticamente os três primeiros em um único gênero (Crambe), por razões de prioridade, pela similaridade de caracteres morfológicos e a presença de metabolitos secundários idênticos. No entanto alguns autores acreditam que a presença de alcalóides guanidínicos em espécies taxonomicamente diferentes possa estar relacionada com a presença de microrganismos simbioses comuns a estas espécies (Heys; Moore; Murphy, 1999; Braekman *et al.*, 2000; Hua *et al.*, 2004; Hua *et al.*, 2007). Inclusive, foram isolados das estrelas do mar *Celerina heffernani* e *Fromia monilis* coletadas na costa da Nova Caledônia, dois alcalóides guanidínicos identificados como celeromycalina e fromiamicalina, respectivamente. Além destes compostos foram também encontrados crambescidinas e ptilomicalina A, levando ao questionamento se estes compostos estariam relacionados a produção por microrganismos associados ou se eram oriundos da predação das esponjas pelas estrelas do mar (Berlinck, Braekman e Dalozze, 1993; Palagiano *et al.*, 1995; Chang, Whittaker e Bewley, 2003; Lazaro *et al.*, 2006; Hua *et al.*, 2007). Mais além, a

fromicalina foi posteriormente isolada de uma espécie de *M. arbuscula* coletada nos mares do Caribe, juntamente a outras moléculas estruturalmente relacionadas (Laville *et al.*, 2009).

A avaliação da citotoxicidade dos alcalóides isolados da esponja marinha *M. arbuscula* aqui estudada foi realizada através do ensaio do MTT, em quatro linhagens tumorais humanas: leucemia (HL-60), melanoma (MDA-MB-435), carcinoma de cólon (HCT-8) e glioblastoma. (SF-295). Vale salientar que o ensaio do MTT é uma ferramenta muito importante no estudo de bioprospecção de compostos citotóxicos, a fim de revelar compostos que tenham, em alguma instância, efeito antiproliferativo (Fornelli *et al.*, 2004).

Dos alcalóides isolados e testados para bioatividade, os compostos 8HPT e PT mostraram-se citotóxicos às células tumorais com IC₅₀ variando de 5,77 a 11,34 µM, como mostra a tabela 3. Em todas as linhagens, PT apresentou-se ligeiramente mais ativa que 8HPT. Estes compostos apresentam cadeia carbônica bastante semelhante. Os compostos ativos apresentam insaturação entre os carbonos 8 e 8a, contudo o composto 8HPT diferencia-se de PT por apresentar uma hidroxila no carbono 8b, sugerindo menor atividade citotóxica ao composto (figura 13). Os compostos mirabilina B, e a mistura de epímeros composta por 1,8a,8b,3a-didehidro-8β-hidroxiptilocaulina e 1,8a,8b,3a-didehidro-8α-hidroxiptilocaulina não possuem a insaturação apresentada pelos compostos 8HPT e PT entre os carbonos 8 e 8a, além disso, a presença da dupla ligação entre os carbonos, 1 e 8a e 3a e 8b, pode estar relacionada a ausência de citotoxicidade dos compostos para as linhagens testadas.

As netaminas C e D são alcalóides guanidínicos isolados da esponja *Biemna laboutei* e apresentam estruturas químicas bastante semelhantes aos compostos isolados da esponja *M. arbuscula* neste estudo, valendo ressaltar que as netaminas C e D possuem potente atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais variando entre 2,6 e 6,6µM, estes valores quando comparados aos resultados encontrados para os alcalóides PT e 8HPT mostram-se bastante semelhantes (Sorek *et al.*, 2006).

A ausência de atividade citotóxica do composto mirabilina B isolado neste trabalho corrobora com os resultados encontrados em um estudo feito por Hua e colaboradores em 2004, relatando que a molécula mirabilina B isolada da espécie *M. unguifera* foi avaliada quanto a sua atividade citotóxica frente a 14 linhagens de células tumorais, antimicrobiana, anti-HIV e antituberculose, contudo exibiu potente atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* com IC₅₀ de 7,0 µg/mL e uma pronunciada

atividade antiprozoária contra *Leishmania donovani* com IC₅₀ igual a 17,0 µg/mL (Hua *et al.*, 2004).

Neste mesmo estudo Hua e colaboradores (2004) avaliou a mistura de epímeros composta por 1,8a,8b,3a-didehidro-8β-hidroxiptilocaulina e o seu isômero 1,8a,8b,3a-didehidro-8α-hidroxiptilocaulina, o qual apresentou atividade contra o protozoário causador de malária, *Plasmodium falciparum*, com IC₅₀ de 3,8 µg/mL. Os resultados obtidos neste estudo corroboram com aqueles encontrados no presente trabalho, mostrando que esta mistura de epímeros não apresenta atividade citotóxica em linhagens celulares tumorais (Hua *et al.*, 2004).

Ruben e colaboradores (1989) realizaram um estudo para avaliar o potencial citotóxico de uma ptilocaulina sintética racêmica em 14 linhagens de células tumorais humanas e murinas, onde se observou maior atividade citotóxica frente a linhagens leucêmicas e de melanoma, e efeito citotóxico menos pronunciado para células linfóides e de adenocarcinoma de colo humano na avaliação pelo método do MTT. No presente estudo, os compostos 8HPT e PT mostraram-se também mais ativos em linhagens de HL-60 (leucemia) e MDA-MB-435 (melanoma) e menos pronunciada nas linhagens de HCT-8 (carcinoma de cólon) e SF-295 (glioblastoma; tabela 3).

Vale ressaltar que estudos realizados pelos grupos de Harbour e colaboradores (1981) e Rinehart e colaboradores (1981), demonstraram que o alcalóide ptilocaulina de origem natural apresentou em média IC₅₀ de 0,39 e 0,17 µg/mL, respectivamente, para a linhagem leucêmica murina L1210. Para esta mesma linhagem, Ruben e colaboradores (1989), em estudo com uma ptilocaulina sintética racêmica obteve IC₅₀ média de 0,13 µg/mL, onde os dados obtidos sugerem que o composto tanto natural quanto sintético apresentam semelhança quanto ao potencial citotóxico. Os dados obtidos no presente trabalho, apesar de apresentar resultados de IC₅₀ (1,1 µg/mL) superiores aos encontrados em pesquisas anteriores, entretanto nosso estudo mostrou o perfil de citotoxicidade da ptilocaulina natural em linhagens de células humanas, enquanto estudos anteriores descreveram atividade do mesmo composto em linhagem celular murina (Harbour *et al.*, 1981; Rinehart *et al.*, 1981; Ruben *et al.*, 1989).

A atividade antiproliferativa dos alcalóides 8HPT e PT em células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) também foi investigada através do teste Alamar Blue após 72h

de incubação. Neste ensaio, os compostos não causaram inibição da proliferação destas células sugerindo, ou seletividade destas moléculas por células tumorais ou por células com taxa de proliferação mais elevada (tabela 3).

Outro ensaio para avaliação a atividade dos compostos 8HPT e PT foi o teste de atividade hemolítica, para avaliar dano à membrana plasmática de eritrócitos isolados de comundongos *Mus musculus* (Swiss), que segundo Costa-Lotufo *et al.* (2002) atribui a capacidade das substâncias em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total. Os compostos exibiram concentrações efetivas (CE_{50}) de 577.9 e 352.9 μ M, respectivamente. É importante ressaltar que o efeito hemolítico observado foi em concentrações bastante superiores às determinadas pelo ensaio do MTT.

A avaliação dos possíveis mecanismos de ação do composto PT foi realizada utilizando como modelo a linhagem leucêmica promielocítica humana (HL-60), que se mostrou a mais sensível aos efeitos antiproliferativos deste composto.

Para avaliar o efeito sobre a viabilidade celular, o composto PT, foi submetido ao ensaio de exclusão pelo azul de Tripán. O composto reduziu significativamente o número de células viáveis em todas as concentrações testadas, sendo observado aumento no número de células não viáveis apenas na maior concentração testada (20 μ M) (figura 14), indicando uma reduzida incidência de morte celular por necrose nas menores concentrações. De forma semelhante, Ruben e colaboradores (1989) ressaltaram uma diminuição da viabilidade das células tumorais MCF-7 e B16F10, utilizando o mesmo ensaio, após um período de 72 horas de incubação com a ptilocaulina sintética racêmica, entretanto, os resultados encontrados em nosso estudo com uma ptilocaulina natural observou-se uma diminuição na linhagem tumoral humana HL-60 já com 24 horas de exposição ao composto (Ruben *et al.*, 1989).

Afim de se determinar o mecanismo envolvido na atividade antiproliferativa observada no ensaio do MTT pelo alcalóide PT sob as células tumorais, foi realizado o ensaio de inibição da síntese de DNA. A redução do número das células HL-60 marcadas positivo para BrDU foi significativa em todas as concentrações testadas de PT, sendo que a incorporação de BrDU no núcleo das células está relacionada a síntese de DNA e, conseqüentemente, à proliferação celular. A redução da proliferação celular induzida por PT foi de maneira concentração dependente, e, ao tratamento com 20 μ M, a incorporação de

BrDU foi reduzida à aproximadamente 1/3 daquela das células não tratadas, semelhantemente ao efeito observado para o controle positivo, doxorrubicina (0,55 μ M).

Variolina B, um alcalóide guanidínico obtido da esponja marinha *Kirkpatrickia variolosa*, coletada na Antártica, causou diminuição na proliferação celular de células K562 e, mais evidentemente, em Jurkat, duas células de linhagem leucêmica. As concentrações de 0,1, 0,25 e 0,5 μ M foram efetivas para Jurkat, ao passo que K562 foi sensível apenas à concentração mais alta. Para Jurkat, a concentração de 0,5 μ M reduziu a proliferação celular para 40% daquela do controle (Simone *et al.*, 2005).

A variolina B foi testada quanto ao seu efeito na divisão celular de células LoVo. Para as células na fase G1, o tratamento com variolina B preveniu a entrada na fase S, quando é realizada a síntese de DNA, de modo que, após 8h de tratamento com 0,9 μ M, 79% das células ainda encontravam-se em G1. Contudo, 15h após o início do tratamento, 70% destas células já estavam na fase S. As células que se encontravam na fase S no início do tratamento com variolina B apresentaram um atraso na progressão para a fase seguinte, efeito este que já se fazia evidente com 4h de exposição a 0,9 μ M do composto. Entretanto, após 15h de tratamento, poucas células ainda estavam na fase S (10%) ou G2/M (18%), e a grande maioria delas (os 72% restantes) encontrava-se na fase G1 (Simone *et al.*, 2005).

No presente estudo, o tratamento de células HL-60 com 15 ou 20 μ M de PT induziu um ligeiro, mas significativo aumento do número de células na fase G1 após 24h de exposição, e um decréscimo das células em S, o que pode ser relacionado com o retardo dessas células para entrar na fase S devido ao bloqueio de uma enzima relevante, ao desequilíbrio bioquímico intercelular ou ao processo de morte celular já iniciado a esta altura do tratamento. A redução das células na fase de síntese de DNA também foi observado pelo ensaio do BrDU, onde foi, igualmente observado diminuição das células que incorporaram o marcador.

Alterações morfológicas celulares avaliadas pela coloração em May-Grunwald-Giemsa e BE/LA foram investigadas com o intuito de determinar qual mecanismo de morte celular envolvido com o potencial citotóxico da ptilocaulina. A análise morfológica utilizando a coloração May-Grunwald-Giemsa (figura 17) mostrou que as células tratadas com o alcalóide nas concentrações de 10, 15 e 20 μ M apresentaram alterações morfológicas nas células incluindo a presença de prolongamentos da membrana plasmática (blebs),

vacuolização citoplasmática, picnose nuclear e fragmentação de DNA, além de diminuição do volume celular principalmente nas maiores concentrações testadas (15 e 20 μM). Tais eventos são características estruturais relacionados à morte celular por apoptose. A avaliação pelo ensaio de Brometo de etídio/ Laranja de acridina (BE/LA) (figura 16) mostrou que a ptilocaulina induziu o aumento do número de células em apoptose seguido de uma diminuição das células viáveis para todas as concentrações testadas e de modo concentração dependente, sem promover o aumento no número de células em necrose, reforçando as observações anteriores.

Nesse contexto, mudanças morfológicas nas células, como a condensação e fragmentação nucleares, conseqüentemente, do próprio DNA, sugerem mecanismos de indução de morte por apoptose. Com a finalidade de verificar o potencial do alcalóide PT em causar morte por apoptose nas células tumorais foram utilizadas técnicas de citometria de fluxo.

O alcalóide ptilocaulina induziu a perda da integridade de membrana celular apenas na concentração de 20 μM (figura 18), além disso, evidenciou-se diminuição no número de células em todas as concentrações testadas, estes resultados ressaltam o que foi observado nos ensaios de exclusão de tripan e BE/LA. O aumento de células não viáveis observados pelo ensaio de exclusão do azul de tripan seguido da perda da integridade de membrana para o composto na maior concentração testada reforça a idéia de morte por apoptose, um processo que provavelmente é acelerado quando se aumenta a concentração de PT no meio, indicando um ponto onde o processo de apoptose é visto num ponto mais tardio do seu desenvolvimento, evidenciado pela perda da integridade de membrana.

Além disso, nas mesmas concentrações, pôde-se verificar a despolarização da mitocôndria (figura 22). Os eventos observados pelos ensaios em citometria de fluxo como a fragmentação do DNA e despolarização mitocondrial, sem causar dano à membrana plasmática são característicos de morte celular por apoptose.

O alcalóide guanidínico pteroginidina isolado das folhas de *Alchornea glandulosa* quando incubado por 24 horas com células da linhagem HUVEC (células endoteliais de cordão umbilical humano) promoveu uma redução de 63% da viabilidade celular observado pelo ensaio do MTT para concentração de 8 μM , nesta mesma concentração o composto quando avaliado através do método do BrDU quanto ao seu potencial antiproliferativo

apresentou uma significativa diminuição da proliferação celular, seguido por um acréscimo do percentual de células em apoptose visto pelo ensaio do tunel (Lopes *et al.*, 2009).

A variolina B também foi capaz de induzir apoptose em células leucêmicas das linhagens Jurkat e K526, sendo que esta última é, freqüentemente, resistente a apoptose. Nas células Jurkat tratadas com 0,1 a 0,5 μM , sinais de apoptose já apareciam logo nas primeiras horas de tratamento. Células apoptóticas surgiram após 4h de tratamento e aumentaram em número com o tempo de exposição, avaliadas em citômetro de fluxo pelo método de Anexina-V. (Em tempo, a anexina-V é uma sonda fluorescente que se liga a fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana que, à entrada da célula em apoptose, é externalizada). Mais além, alterações morfológicas relacionadas a apoptose, tais que condensação da cromatina e surgimento de corpos apoptóticos foram observadas para células Jurkat tratada com variolina B (Simone *et al.*, 2005).

O presente trabalho mostra que a esponja *M. arbuscula* coletada na costa do Ceará, é uma rica fonte de alcalóides guanidínicos com atividade biológica. Além disso, está demonstrado a atividade citotóxica dos compostos 8b-hidroxiptilocaulina e ptilocaulina e reforça a seletividade dessa substância para células tumorais, ao passo que esclarece um pouco do mecanismo de ação, tendo como fundamentação as evidências de indução de apoptose em células HL-60 tratadas com PT.

6. CONCLUSÃO

O litoral cearense, em especial o Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, é um relevante reservatório de compostos bioativos. O presente estudo isolou, identificou e caracterizou por seu potencial citotóxico 5 alcalóides guanidínicos a partir do extrato alcoólico da esponja marinha *Monanchora arbuscula*, revelando o composto ptilocaulina com significativa citotóxicidade contra células tumorais em cultura, atuando como indutor de apoptose celular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, R.J. & WILLIAMS, D.E. Pharmaceuticals from the sea In. HESTER, R.E. & HARRISON, R.M. **Chemistry in the Marine Environment**. 13.ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000, cap. 4, p. 55-80.

BECERRO, M.A.; TURON, X.; URIZ, M.J. Multiple functions for secondary metabolites in encrusting marine invertebrates. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, p. 1527-1547, 1997.

BELARBI, E.H.; GÓMEZ, A.C., CHISTI, Y.; CAMACHO, F.G.; GRIMA, E.M. Producing drugs from marine sponges. **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 585-598, 2003.

BERGMAN, W. & FEENEY, R.J. Nucleosides of sponges. **Journal of Organic Chemistry**, v.16, p.981-987, 1951.

BERLINCK, R.G.S.; BRAEKMAN, J.C.; DALOZE, D. Polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Crambe crambe* and Ca⁺⁺ channel blocker activity of crambescidin 816. **Journal of Natural Products**, v. 56 (7), p. 1007- 1015, 2003.

BERLINCK, R.G.S.; BURTOLOSO, A.C.B.; KOSSUGA, M.H. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. **Natural Products Report**, v. 25, p. 919–954, 2008.

BHAKUNI, D.S. & RAWAT, D.S. **Bioactive Marine Natural Products**. Nova Dehli: Anamaya Publishers, 2005. pp. 397.

BRAEKMAN, J.C. & DALOZE, D. Chemical and biological aspects of sponge secondary metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p. 275-283, 2004.

BRUSCA, R.C. & BRUSCA, G.J. Filo Porífera: As esponjas. In. BRUSCA, R.C. & BRUSCA, G.J. **Invertebrados**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2005. cap. 6 , p. 185-216.

BURKHARD, H. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discovery Today**, V.8, p.536-544, 2003.

CHANG, L.C.; WHITTAKER, N.F.; BEWLEY, C.A.; Crambescidin 826 and Dehydrocrambine A: New polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora* sp. that inhibit HIV-1 fusion. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1490-1494, 2003.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R.E. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v.32, p.703-716, 2009.

Cury-Boaventura, M.F.; Pompeia, C.; Curi, R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. **Clinical Nutrition** , v. 23, p. 721–732, 2004.

DELLE MONACHE, G.; BOTTA, B.; DELLE MONACHE, F.; ESPINAL, R.; DE BONNEVAUX, S.C.; DE LUCA, C.; BOTTA, M.; DEI, F.C.D.; GACS-BAITZ, E.; CARMIGNANI, M. Caracasandiamide, a truxinic hypotensive agent from *Verbesina caracasana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, p. 233-238, 1996.

DONIA, M. & HAMANN, M. T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. **The Lancet Infectious Diseases**, v.3, p.338-348, 2003.

FERREIRA, E.G.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C.; PORTELA, T.A.; HAJDU, E.; PESSOA, C.O.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Cytotoxic activity of hydroethanolic extracts of sponges (Porifera) collected at Pedra da Risca do Meio State Park, Ceará State, Brazil. **Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability**, v.2, p.313-318, 2007.

FORNELLI, F., MINERVINI, F., LOGRIECO, A., A Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 74-79, 2004.

GENG, C.X.; ZENG, Z.C.; WANG, J.Y. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, p. 696 – 700, 2003.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, p.57-70, 2000.

Harbour, G.C.; Tymiak, A.A.; Rinehart, Jr. K.L.; Shaw, P.D.; Hughes, Jr. R.G.; Mizensak, S.A.; Coats, J.H.; Zurenko, G.E.; Li, L.H.; Kuentzel, S.L. Ptilocaulin and isoptilocaulin,

antimicrobial and cytotoxic cyclic guanidines from the Caribbean sponge *Ptilocaulis* aff. *P. spiculifer* (Lamarck, 1814). **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, p. 5604-5606, 1981.

HEYS, I.; MOORE, C.G.; MURPHY, P.J. The guanidine metabolites of *Ptilocaulis spiculifer* and related compounds; isolation and synthesis. **Chemical Society Reviews**. v. 29, p. 57-67, 2000.

HUA, HUI-MING, PENG, J., FRONCZEC, F.R., KELLY, M. HAMANN, M.T. Crystallographic and NMR studies of antiinfective tricyclic guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora unguifera*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.12, p.6461-6464, 2004.

HUA, HUI-MING; PENG, J.; DUNBAR, D.C.; SCHINAZI, R.F.; ANDREWS, A.G.C.; CUEVAS, C.; GARCIA-FERNANDEZ, L.F.; KELLY, M.; HAMANN, M.T. Batzelladine alkaloids from the caribbean sponge *Monanchora unguifera* and the significant activities against HIV-1 and AIDS opportunistic infectious pathogens . **Tetrahedron**, v. 63, p. 11179-11188, 2007.

JIMENEZ, P. C.; TEIXEIRA, G. L. S.; WILKE, D.V; NOGUEIRA, N. A. P.; HAJDU, E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Cytotoxic and antimicrobial activities of hydro-methanolic extracts of sponges (porifera) from Ceará state, Brazil. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.37, p.85-91, 2004.

JIMENEZ, P. C.; WILKE, D.V; TAKEARA, R.; LOTUFO, T. M. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; PEPORINE, N. P.; COSTA-LOTUFO, L.V. Cytotoxic activity of a dichloromethane extract and fractions obtained from *Eudistoma vannamei* (Tunicata: Ascidiacea). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.151, p.391-398, 2008.

JIMENEZ, P.C. **Estaurosporinas de *Eudistoma vanamnei*: Química e bioatividade**. 2009. 150f. Tese (Doutorado em farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Ceará.

JIMENO, J, FAIRCLOTH, G., SOUSA-FARO, J.M.F., SCHEUER, P., RINEHART, K. New marine derived anticancer therapeutics – A journey from the sea to clinical trials. **Marine Drugs**, v.2, p.14-19, 2004.

KASHMAN, Y.; HIRSH, S.; McCONNELL, O.; OHTANI, I.; KUSUMI, T.; KAKISAWA, H. Ptilomycalin A: a novel polycyclic guanidine alkaloid of marine origin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, p. 8925-8926, 1989.

KOSSUGA, M.H.; LIRA, S.P.; NASCIMENTO, A.M.; GAMBARDELLA, M.T.P.; BERLINCK, R.G.S.; TORRES, Y.R.; NASCIMENTO, G.G.F.; PIMENTA, E.F.; SILVA, M.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; TEMPONE, A.G.; MELHEM, M.S.C.; SOUZA, A.O.; GALETTI, F.C.S.; SILVA, C.L.; CAVALCANTI, B.; PESSOA, C.O.; MORAES, M.O.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; ROCHA, R.M. Isolamento e atividades biológicas de produtos naturais das esponjas *Monanchora arbuscula*, *Aplysina* sp., *Petromica ciocalyptoides* e *Topsentia ophiraphidites*, da ascídia *Didemnum ligulum* e do octocoral *Carijoa riisei*. **Química Nova**, v.30 (5), p.1194-1202, 2007.

LAVILLE, R.; THOMAS, O.P.; BERRUÉ, F.; MARQUEZ, D.; VACELET, J.; AMADE, P. Bioactive guanidine alkaloids from tow Caribbean marine sponges. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1589-1594, 2009.

LAZARO, J.E.H.; NIRCHEU, J.; MAHMOUDI, N.; IBANA, J.A.; MANGALINDAN, G.C.; BLACK, G.P.; HOWARD-JONES, A.G.; MOORE, C.G.; THOMAS, D.A.; MAZIER, D.; IRELAND, C.M.; CONCEPCION, G.P.; MURPHY, P.J.; DIQUET, B. Antimalarial activity of crambescidin 800 and synthetic analogues against liver and blood stage of *Plasmodium* sp. *The Journal of Antibiotics*, v. 59 (9), p. 583-590, 2006.

LOPES, F.C.M.; ROCHA, A.; PIRRACO, A.; REGASINI, L.O.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; AZEVEDO, I.; CARLOS, I.Z.; SOARES, R. Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from *Alchornea gladulosa*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9 (15), p. 1-11, 2009.

MARAGELMAN, K.M.; McKEE, T.C.; McMAHON, J.B. Monanchorin, a bicyclic alkaloid from the sponge *Monanchora unguiculata*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1165-1167, 2004.

MAYER, A. M. S. & GUSTAFSON, K. R. Marine pharmacology in 2005-2006: Antitumour and cytotoxic compounds. **European Journal of Câncer**, v. 44 (16), p. 2357-2387, 2008.

MAYER, A.M.S.; RODRÍGUEZ, A.D.; BERLINCK, R.G.S.; HAMANN, M.T. Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.5, p. 283-308, 2009.

McCLINTOCK, J.B. & BAKER, B.J. **Marine Chemical Ecology**. Nova York: Marine Science Series, 2001, pp. 610.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.16, p.55–63, 1983.

MURICY, G.; HAJDU, E.; ARAUJO, F.V.; HAGLER, A.N. Antimicrobial activity of Southwestern Atlantic shallow-water marine sponges (Porifera). **Scientia Marina**, v. 57 (4), p. 427-432, 1993.

NAGLE, D.G.; ZHOU, Y-D. ; MORA, F.D.; MOHAMMED, K.A.; KIM, Y-P. Mechanism targeted discovery of antitumor marine natural products. **Current Medicinal Chemistry**. V. 11, p. 1725-1756, 2004.

NEREUS PHARMACEUTICALS - <http://www.nereuspharm.com>, acessada em janeiro de 2010.

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

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products from marine invertebrates and microbes as modulators of antitumor targets. **Current Drug Targets**, v. 7(3), p. 279-304, 2006.

NEWMANN, D.J. & CRAGG, G.M. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1216-1238, 2004.

OHTANI, I.; MOORE, R.E.; RUNNEGAR, M.T.C. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. **Journal American Chemical Society**, v. 114, p. 7941– 7942, 1992.

PERA, F.; MATTIAS, P.; DETZER, K. Methods for determining the proliferation kinetics of cells by means of 5-bromodeoxyuridine. **Cell Tissue Kinetics**, v. 10, p. 255–264, 1977.

PHARMAMAR - <http://www.pharmamar.com>, acessada em Janeiro de 2010

PONCET, J. The dolastatins, a family of promising antineoplastic agents. **Current pharmaceutical design**, v. 5:p. 139-162, 1999.

PROKSCH, P.; EDRADA, R. A.; EBEL, R. Drugs from the seas – current status and microbiological implications. **Applied microbiology and biotechnology**, v.59, p.125-134, 2002.

RADITSCH, M.; GEYER, M.; **KALBITZER, H. R.**; JAHN, W.; RUPPERSBERG, P.; WITZEMANN, V. (1996) Polyamine Spider Toxins and Mammalian N-methyl-D-aspartate Receptors. Structural Basis for Channel Blocking and Binding of Argiotoxin 636 . **European Journal of Biochemistry**, v. 240, p. 416-426, 1996 .

REGASINI, L.O.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D.H.; FURLAN, M.; BARREIRO, E.J.; FERREIRA, P.M.; PESSOA, C.; LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; YOUNG, M.C.; BOLZANI, V.D. Cytotoxic Guanidine Alkaloids from *Pterogyne niten*. **Journal of Natural Products**, v. 72 (3), p. 473-476, 2009.

RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FOSTER, R. The evaluation of a multiendpoint cytotoxicity assay system. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 21, p. 89–96, 1993.

RINEHART, K.L.J.; SHAW, P.D.; SHIELD L.S.; GLOER J.B.; HARBOUR G.C.; KOKER, M. S.; SAMAIN, D.; SCHWARTZ, R.E.; TYMIK, A.A.; WELLER, D.L.; CARTER, G.T.; MUNRO, M. H.G.; HUGHES, JR. R.G.; RENIS, H.E.; SWYNENBERG, E.B.; STRINGFELLOW, D.A.; VARVA J. J.; COATS, J.H.; ZURENKO, G.E.; KUENTZEI, S.L.; LI, L.H.; BAKUS, G.J.; BRUSCA, R.C.; CRAFT, L.L.; YOUNG, D.N.; COUNOR, J.L. Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial and antineoplastic agents. **Pure and Applied Chemistry**, v. 53, p. 795-817, 1981.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v.1, p. 364-369, 2001.

ROVERA, G.; SANTOLI, D.; DAMSKY C. Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76 (6) p. 2779-2783, 1979.

RUBEN, R.L.; SNIDER, B.B.; HOBBS Jr. F.W.; CONFALONE, P.N. Cytotoxicity of synthetic racemic ptilocaulin: A novel cyclic guanidine. **Investigational New Drugs**, v.7, p.147-154, 1989.

RUPPERT, E.E. & BARNES, R.B. Esponjas e Placozoários. In. RUPPERT, E.E. & BARNES, R.B. **Zoologia dos Invertebrados**. 7. ed. São Paulo: Roca LTDA, 1996. cap. 3, p. 67-94.

SIMONE, M.; ERBA, E.; DAMIA, G.; VIKHANSKAYA, F.; FRANCESCO, A.M.D.; RICCARDI, R.; BAILY, C.; CUEVAS, C.; SOUSA-FARO, J.M.F.; D'INCALCI, M. Variolin B and its derivative deoxy-variolin B: New marine natural compounds with cyclin-dependent kinase inhibitor activity. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 2366-2377, 2005.

SIPKEMA, D.; FRASSEN, M. C. R.; OSINGA, R., TRAMPER, J.; WIJFFELS, R. H. Marine sponge as pharmacy. **Marine Biotechnology**, v. 7, p. 142-162, 2005.

SOARES-GOMES, A. & FIGUEIREDO, A.G. O ambiente marinho. In.PEREIRA, R.C. & SOARES-GOMES, A. **Biologia Marinha**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2009. cap. 1, p.1-34.

SOEST, R. W. M. VAN; BRAEKMAN, J. C.; FAULKNER, D. J.; HAJDU, E.; HARPER, M. K.; VACELET, J. The genus *Batzella*: a chemosystematic problem. **Bulletin de L'Institut Royal des Science Naturelles de Belgique**, v.66 suppl., p.89-101, 1996.

SOREK, H.; RUDI, A.; GUETA, S.; REYES, F.; MARTIN, M.J.; AKININ, M.; GAYDOU, E.; VACELET, J.; KASHMAN, Y. Netamines A-G: seven new tricyclic guanidine alkaloids from marine sponge *Biemna laboutei*. **Tetrahedron**, v. 62, p. 8838-8843, 2006.

SPRINGER, J.E.; AZBILL, R.D.; CARLSON, S.L. A rapid and sensitive assay for measuring mitochondrial metabolic activity in isolated neural tissue. **Brain Research Protocols**, v. 2, p. 259-263, 1998.

TAVARES, R.; DALOZE, D.; BRAEKMAN, J.C.; HAJDU, E.; MURICY, G.; VAN SOEST, R.W.M. Isolation of Crambescidin 800 from *Monanchora arbuscula* (Porifera). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22 (6), p. 645-646, 1994.

TAVARES, R.; DALOZE, D.; BRAEKMAN, J.C.; HAJDU, E.; VAN SOEST, R. W. M. 8b-Hydroxyptilocaulin, a New Guanidine Alkaloid from the Sponge *Monanchora arbuscula*. **Journal of Natural Products**, v.58, issue 7, p.1139-1142, 1995.

THAKUR, N.L. & MÜLLER, W.E. Biotechnological potential of marine sponges. **Current Science**, v. 86 (11), p. 1506-1512, 2004.

URBAN, S.; HICKFORD, S.J.H.; BLUNT, J.W.; MUNRO, M.H.G. Bioactive marine alkaloids. **Current Organic Chemistry**, v. 4, p. 765-807, 2000.

URIZ, M.J.; TURON, X.; BECERRO, M.A.; GALERA, J. Feeding deterrence in sponges. The role of toxicity, physical defenses, energetic contents, and life-history stage. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 205, p. 187-204, 1996a.

VAN SOEST, R.W.M. Family Cambreidae Lévi, 1963. In Hooper, j.; Soest, R.W.M. **Systema Porifera. A guide to the classification of sponges**, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, v. 1, p. 547 – 555, pp 1101, 2002.

WILKE, D. V. ; JIMENEZ, PAULA CHRISTINE ; PESSOA, C. ; MORAES, M. O.; ARAUJO, R. M. ; SILVA, W. M. B. ; SILVEIRA, EDILBERTO R ; PESSOA, O. D. L. ; BRAZFILHO, R. ; LOPES, N. P. ; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic lipiidic alpha-amino acids from the zoanthid *Protopalythoa variabilis* from the northeastern coast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n°. 8, p.1455-1459, 2009.

Y. NAKAO, Y. & FUSEYANI, N. Enzyme Inhibitors from Marine Invertebrates. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 689–710, 2007.

ZHANG, W.; ZHANG, X.; CAO, X.; XU, J.; ZHAO, Q. ; YU, X. Optimizing the formation of in vitro sponge primmorphs from the Chinese sponge *Stylotella agminata* (Ridley). **Journal of Biotechnology**, v. 100, p. 161-168, 2003.

ZHI-JUN Y.; SRIRANGANATHAN, N.; VAUGHT, T.; ARASTU, S.K.; ANSAR AHMED, S. A dye-based lymphocyte proliferation assay that permits multiple immunological analyses:

mRNA, cytogenetic, apoptosis, and immunophenotyping studies. **Journal of Immunological Methods**, v. 210, p. 25-39, 1997.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)