

DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTITUMORAL DE BIOMOLÉCULAS OBTIDAS DE ACTINOMICETOS

ARIMATEA, Gustavo Guilherme Queiroz¹; LIMA, Daniella Vilela²; VIEIRA, José Daniel Gonçalves³.

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

Palavras-chave: Actinomicetos, Antineoplásicos, Antibióticos, Bioatividade

1. INTRODUÇÃO

O câncer é proporcionalmente importante na mortalidade global (4 milhões de pessoas no mundo, 90.000 no Brasil), porém, sua importância não tem sido avaliada em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, devido a seu relativo menor significado em termos de anos potenciais de vida perdidos, quando comparado com a mortalidade por doenças infecciosas e perinatais (Kowalski & Franco, 1991). Uma opinião grandemente equivocada no que se refere ao câncer como causa morte no Brasil, é considerar a sua incidência baixa em comparação com as doenças infecciosas. A mortalidade proporcional das neoplasias subiu de 2,7% em 1930 para 11,1% em 1980 (Kowalski & Franco, 1991).

Os antibióticos antitumorais em uso clínico são naturais da cultura de várias espécies de Actinomicetos. Estes antibióticos produzem efeitos tumoricidas e antimicrobianos pela inibição direta da síntese do DNA e/ou RNA. O potente efeito citotóxico destas drogas não permite o seu uso clínico como agentes antibacterianos. Possuem uma variedade de efeitos em fases diferentes do ciclo celular; cineticamente se comportam como agentes fase não específicos. A maioria dos efeitos colaterais deste grupo é similar aos agentes alquilantes, enquanto que outros, como a cardiotoxicidade das antraciclinas ou a toxicidade pulmonar e reações dermatológicas da bleomicina, são características de agentes individuais ou classes químicas (Schwartzmann *et al.*, 1991).

Os actinomicetos são bastonetes Gram positivos, saprófitas em sua maioria, e que apresentam a capacidade de produzir uma grande variedade de biomoléculas com enorme valor sócio-econômico, dentre elas antibióticos e antineoplásicos. O papel dos actinomicetos com fonte de antibióticos diminuiu consideravelmente a partir da década de 70. No entanto, essas bactérias continuam oferecendo uma grande variedade de moléculas com atividade biológica. É sugerido que ainda existam na natureza, bactérias não estudadas que possuam um amplo potencial de produção de antibióticos e antitumorais.

O descobrimento de produtos naturais desconhecidos ocorre quando novos sistemas de seleção são utilizados ou quando novos materiais de locais ainda não explorados são examinados (Nolan & Cross, 1988). Assim, um programa constante de isolamento, seleção, caracterização e determinação da produção de moléculas bioativas de actinomicetos, de solos tropicais, é de grande importância no combate à biopirataria.

2. METODOLOGIA

2.1. Isolamento de Actinomicetos

Amostras de solo foram coletadas em três áreas distintas (Cerrado-GO, Canavial Marataízes-ES e Costão do Santinho-SC). As amostras sofreram um pré-tratamento de

dessecação por 16 horas. Sub-amostras de 0,5g foram utilizadas para o isolamento pela metodologia de quimiotaquia para a Xilose (0,01mol/mL) e para o Cloreto de Potássio em tampão Fosfato (0,01mol/mL).

2.2. Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Isolados

As morfo-espécies obtidas foram testadas quanto a sua atividade antimicrobiana frente a 14 espécies de bactérias (6 Gram positivas e 8 Gram negativas). As colônias purificadas dos actinomicetos foram mantidas em ágar ACT e incubadas a 30°C por 14 dias, após este tempo, cilindros de 7 mm de diâmetro foram cortados e colocados sobre placas de Petri contendo ágar Müeller-Hinton, em cuja superfície foram previamente inoculados os microrganismos indicadores. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e os halos de inibição determinados.

2.3. Produção e extração da substância bioativa

Os isolados que apresentaram melhor atividade antimicrobiana foram inoculados em 15 mL de caldo amido-caseína de Waksman (ACT) e incubados a 30°C sob agitação constante (180 rpm) por três dias. Após este tempo, 50 mL do mesmo caldo foi adicionado ao crescimento e o volume total foi incubado por mais 15 dias nas mesmas condições. Após esse período, o caldo foi filtrado para a separação do micélio crescido. O micélio obtido foi macerado em gral e tratado com etanol absoluto numa proporção de 2,0 mL do solvente para cada grama de micélio bruto. Esse procedimento foi repetido três vezes, e o extrato etanólico obtido misturado, separado e conservado sob refrigeração (-20°C) para posterior utilização. O filtrado foi tratado por três vezes com acetato de etila, obteve-se uma bicamada na qual a fase orgânica foi separada e evaporada sob pressão (rotavapor) a 42°C. O resíduo obtido foi ressuspensão com o extrato etanólico produzido anteriormente, sendo novamente evaporado para se obter extrato seco. Esse também foi ressuspensão em 1 mL de etanol absoluto, obtendo-se assim o extrato etanólico bruto.

Em paralelo, as bactérias foram também crescidas a 30°C por 15 dias em meio Ágar ACT. Após este período o ágar foi triturado e uma extração foi realizada, tratando o material com 10 mL de etanol absoluto. Esse procedimento foi repetido três vezes, e o extrato etanólico obtido foi separado e evaporado sob pressão (rotavapor) a 42°C. O resíduo obtido foi ressuspensão em 1,0 mL de etanol absoluto e conservado sob refrigeração (-20°C) para posterior utilização.

2.4. Teste de citotoxicidade em *Artemia salina*

Para a determinação da citotoxicidade, foi realizado o ensaio com *Artemia salina* para os extratos (crescimento em meio sólido e líquido) como descrito por Blizzard et al. (1989) e Takahashi et al. (1989) com modificações (Azevedo et al. 2004). 200 mL do extrato etanólico bruto foi solubilizado em 200 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), e o volume foi completado para 10 mL com solução salina a 3,5% de sal marinho (solução estoque – 20.000 ppm do extrato seco). A partir dessa solução foram preparadas outras soluções nas concentrações de 20.000 ppm até 625 ppm do extrato seco. Colocou-se 1,0 mL dessas soluções em tubos aos quais foram adicionados dez náuplios de *Artemia salina* obtidos por eclosão de ovos em solução salina a 3,5%. Os tubos contendo o extrato diluído e os náuplios foram mantidos a 30°C sob iluminação. Após 24 horas os náuplios sobreviventes foram contados. Fez-se um controle negativo utilizando etanol absoluto e DMSO nas mesmas concentrações do experimento, realizado em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 26 morfoespécies de actinomicetos, sendo que 18 (69,2%) foram obtidos quando foi utilizado a Xilose e 8 (30,8%) utilizando o Cloreto de Potássio. Estes resultados sugerem uma maior afinidade dos isolados para a xilose. Este fato pode ser devido ao fato dos vegetais excretarem este composto pelas raízes, atraindo estas bactérias que colonizariam sua rizosfera contribuindo através da excreção de metabolitos secundários para a fitosanidade. Dos isolados obtidos, 17 (65,4%) apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos indicadores, preferencialmente às bactérias Gram positivas. Sugerindo uma especificidade para este grupo de microrganismos.

Os resultados do teste de citotoxicidade com a *Artemia salina* demonstraram que os isolados apresentaram baixa atividade citotóxica para as concentrações testadas.

Como o modelo de citotoxicidade em *Artemia salina* também é utilizado como um sistema de seleção primária de atividade antineoplásica e antiparasitária sugere-se que estes microrganismos possuam a capacidade de síntese de moléculas bioativas contra bactérias gram-positivas e com baixa atividade citotóxica para células eucariotas.

4. CONCLUSÃO

Observou-se neste trabalho que os solos brasileiros são importantes reservatórios de actinomicetos com potencial para a produção de biomoléculas com amplo potencial biológico, sugerindo que novos nichos sejam explorados.

Foi constatada atividade antimicrobiana das morfoespécies isoladas frente a bactérias gram-positivas, o que de maneira preliminar sugere que sejam realizados estudos posteriores para extração das substâncias produzidas pelos actinomicetos isolados, com potencial interesse médico.

Para os extratos testados neste trabalho não foi encontrada atividade, pela metodologia utilizada, fortalecendo a sugestão de que as biomoléculas isoladas sejam antibióticos com atividade frente a bactérias gram-positivas e com pouca ou baixa citotoxicidade para células eucariotas.

O laboratório está atualmente identificando os isolados pelo sequenciamento do 16S DNA e testando outras metodologias de citotoxicidade para assegurar o potencial biotecnológico dos isolados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, R. C. L. S.; PIMENTA, F. C.; VIEIRA, J. D. G. Determinação da atividade antimicrobiana de Actinoplanes isolados do solo de cerrado goiano e o efeito citotóxico do extrato etanólico bruto dos isolados. *Revista de Patologia Tropical*, Goiânia, v. 33, n. 2, p.217-226, jul-set 2004

BLIZZARD, T. A.; RUBY, C. L.; MROZIK, H. PREISER, F. A.; FISHER, M. H. Brine Shrimp (*Artemia salina*) as a convenient bioassay for avermectin analogs. *The Journal of Antibiotics*, Tóquio, v. 62, p. 1304-1307, ago. 1989.

FURLAN, R. L. A. O antitumoral retamicina: produção e efeitos biológicos. Tese de Doutorado. ICB/USP. p. 102, 2002

KOWALSKI, L.P.; FRANCO, E.L. Epidemiologia do câncer no Brasil e no mundo. In: SCHWARTSMANN, Gilberto et al. *Oncologia Clínica: princípios e prática*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1991. P. 19-30.

NOLAN, R.D.; CROSS, T. Isolation and screening of Actinomycetes. In: GOODFELLOW, M., WILANS, S.T. MORDAESKI, M. *Actinomycetes in Biotechnology*. Londres: Academic Press, 1988. P. 1-32.

SCHWARTSMANN, G.; MORAES FILHO, M. A.; SILVER, R. Princípios da quimioterapia antineoplásica. In: SCHWARTSMANN, Gilberto et al. *Oncologia Clínica: princípios e prática*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1991. p. 106-132.

TAKAHASHI, A.; KURASAW, S.; IKEDA, D.; OKAMI, Y.; TAKEUCHI, T. Altemicidin, a new acaricidal and antitumor substance. *The Journal of Antibiotics*, Tóquio. v. 52, p. 1556-1561, nov. 1989.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FUNAPE/UFG e a CAPES pelo auxílio financeiro na forma de bolsa de iniciação científica do primeiro autor.

1. Bolsista de Iniciação Científica. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, Universidade Federal de Goiás. gustavo.arimatea@gmail.com
2. Aluna da pós-graduação em Microbiologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás.
3. Orientador. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil. Rua Delenda Rezende de Melo Esq/ 1ª Av. S/N Setor Universitário 74650 – 050 Goiânia, GO. jvieira@iptsp.ufg.br