



VIRIATO M'BANA

**COMPOSTOS BIOACTIVOS PROVENIENTES DE
SEDIMENTOS MARINHOS:
PRODIGOSINAS**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientadora: Doutora Susana P. Gaudêncio
Investigadora auxiliar, REQUIMTE CQFB – FCT/UNL

Co-orientadora: Professora Doutora Ana M. Lobo
Professora Catedrática, Dep. Química, REQUIMTE CQFB – FCT/UNL

Co-orientadora: Professora Doutora Ilda S. Sanches
Professora Associada, Dep. Ciências da Vida, CREM – FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2012

VIRIATO M'BANA

**COMPOSTOS BIOACTIVOS PROVENIENTES DE
SEDIMENTOS MARINHOS:
PRODIGIOSINAS**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientadora: Doutora Susana P. Gaudêncio
Investigadora auxiliar, REQUIMTE CQFB – FCT/UNL

Co-orientadora: Professora Doutora Ana M. Lobo
Professora Catedrática, Dep. Química, REQUIMTE CQFB – FCT/UNL

Co-orientadora: Professora Doutora Ilda S. Sanches
Professora Associada, Dep. Ciências da Vida, CREM – FCT/UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Copyright Viriato M' Bana, FCT/UNL, UNL

Aos meus Pais

Tabela da Matéria

<i>Agradecimentos</i>	i
<i>Resumo</i>	iii
<i>Abstract</i>	iv
<i>Lista de Tabelas</i>	vi
<i>Lista de Figuras</i>	vii
<i>Lista de Abreviaturas</i>	vii
<i>Glossário</i>	viii
<i>Capítulo 1. Introdução</i>	1
<i>Introdução Geral</i>	3
<i>Objectivo</i>	4
<i>Prodigiosinas</i>	5
1.2.1 Historial das Prodigiosinas	5
1.2.2 Estrutura Química das Prodigiosinas	7
1.2.3. Biossíntese da Prodigiosina.....	11
1.2.3.1 Biossíntese de MBC	11
1.2.3.2 Biossíntese de MAP	11
1.2.4 Considerações sobre a Regulação da Biossíntese	14
1.2.4.1. Estímulos Fisiológicos	14
1.2.4.2. Estímulos Ambientais	14
1.2.5. Potencialidades/Aplicações	15
1.2.5.1. Corantes Biológicos e Tecidos Antimicrobianos	15
1.2.5.2 Actividade Anticancerígena	15
1.2.5.3 Mecanismo de Acção das Prodigiosinas sobre Células Cancerígenas	16
1.2.5.3.1. Acidificação Intracelular	16
1.2.5.3.2 Fragmentação do DNA.....	16
1.2.5.3.3 Paragem do Ciclo Celular	16
1.2.5.4 Anti-metastática	17
1.2.5.5 Actividade Anti-malária	17
1.2.5.6 Actividade Imunossupressora.....	17
1.2.5.7 Actividade Antibiótica	17
1.2.5.8 Protecção contra Radiação Ultra violeta	17
1.2.5.9 Bio-controlo dos Agentes Fito-patogénicos (Bio-insecticida)	18
<i>Capitulo 2. Parte Experimental</i>	19
<i>2. Parte Experimental</i>	20
2.1. Colheita dos Sedimentos Oceânicos	20
2.2 Identificação Microbiológica e Avaliação de Actividade Biocida.....	20
2.2.1 Materiais e Métodos	21
2.2.2 Composição dos Meios de Cultura ^[50,51]	21
2.2.3 Equipamentos	22
2.2.4 Procedimento Experimental	22
2.2.4.1 Propagação de Culturas Bacterianas	22
2.2.4.1.1 Método de Isolamento	22
2.2.4.1.1.1 Método P1	23
2.2.4.1.1.2 Método P2	23
2.2.4.1.2. Extracção de Extratos ou Crudes.....	26
2.2.4.1.3 Determinação de Actividade Antibacteriana e Citotóxica	26
2.2.4.1.3.1 Bactérias Patogénicas Utilizados nos Ensaio Microbiológicos	26

2.2.4.1.3.2	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)	27
2.2.4.1.3.3	Protocolo do Ensaio para Determinação do MIC	27
2.2.4.1.3.4	Determinação da Actividade Bacteriostática/Bacteriolítica	28
2.2.4.1.3.5	Contagem das Unidades Formadoras de Colónias (CFU)	28
2.2.4.1.3.6	Ensaio Citotóxicos	29
2.3	Estudos Químicos	29
2.3.1	Materiais e Métodos	29
	Reagentes	29
2.3.2	Técnicas/Equipamentos	30
2.3.3	Identificação dos Compostos	30
2.3.3.1	Procedimento Experimental	31
2.3.3.1.1	Purificação das Fracções	31
2.3.3.1.1.1	Fracções CNX-874-9 e CNX-874-10	31
2.3.3.1.1.2	Fracção CNX-874-10-1 + CNX-874-9-2	33
	<i>Capítulo 3. Resultados e Discussão</i>	34
3.1	Estudos Microbiológicos	35
3.1.1	Ensaio Antimicrobianos	39
3.1.1.1	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)	39
3.1.1.2	Avaliação de actividade bacteriolítica/ bacteriostática	40
3.1.1.3	Ensaio por Macrodiluição	40
3.1.1.4	Contagem das Unidades Formadoras de Colónias	41
3.1.2	Ensaio Anticancerígenos	41
3.2	Elucidação Estrutural	42
3.2.1	Identificação	42
3.2.1.1	Composto/fracção CNX-874-9-1	42
3.2.1.2	Composto/fracção CNX-874-9-2+10-1-1-1	42
3.2.1.3	Composto /fracção CNX-874-9-2+10-1-1-2	43
3.2.1.4	Composto/fracção CNX-874-9-2+10-1-2-3	44
	<i>Capítulo 4: Conclusões</i>	46
	<i>4. Conclusões</i>	47
	<i>5. Bibliografia</i>	49
	<i>Anexo</i>	52

Agradecimentos

À Doutora Susana M. P. Gaudêncio, permita-me exprimir a gratidão pela sua simpatia, vontade e capacidade de me transmitir os seus conhecimentos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Ana M. Lobo, pela sua competência, simpatia e sentido de trabalho, sem esquecer os conselhos e apoio na organização dos trabalhos durante todo tempo em que realizei a parte dos estudos químicos desta dissertação.

À Professora Doutora Ilda Sanches, gostaria de reconhecer o apoio na realização dos trabalhos e a interpretação dos resultados dos estudos microbiológicos.

Ao Professor Doutor William Fenical do Scripps Institution of Oceanography e seus colaboradores, os meus agradecimentos pelo crescimento microbiano das estirpes e extracção dos respectivos metabolitos.

Ao projecto MARINAT (Projecto (PTDC/QUI-QUI/101813/2008 – Marinat Prod-XXI) que através do financiamento da Fundação para a Ciência e Tecnologia (Portugal) e cofinanciamento do FEDER permitiu a realização da investigação que conduziu a estes resultados.

A realização da colheita e processamento das amostras no Arquipélago da Madeira foi conseguida graças ao financiamento do Programa Quadro da União Europeia (FP7/2007-2013) sob o acordo n°PCOFUND-GA-2009-246542 e da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal) (PTDC/QUI-QUI/119116/2011 – Tesouros Oceânicos).

À EMAM, gostaria de agradecer pelo fornecimento de uma parte das amostras de sedimentos sobre que decorreu este trabalho.

Ao Laboratório do Instituto de Investigação de Ciências Médicas e Farmacêuticas da Universidade de Lisboa, pela realização dos ensaios anticancerígenos.

Ao Doutor João Pedro Ferreira e à Professora Doutora Maria do Rosário Bronze, responsável pelo laboratório de Cromatografia Líquida e Espectroscopia de Massa da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, pela obtenção dos espectros da massa.

Ao Doutor Daniel Botelho da Silva, agradeço o apoio prestado nas interpretações dos espectros da massa e ajuda na análise estrutural dos compostos isolados de uma estirpe microbiana.

Ao Professor Doutor Pedro Macedo de Abreu pela ajuda na obtenção dos espectros de UV/VIS.

Ao Doutor Christopher Rocca pelo uso de um agitador de culturas e de um liofilizador.

À minha amiga e colega de trabalho Sara Margarida Pereira, gostaria de agradecer a amizade, simpatia e auxílio, que me tem prestado em todos momentos em que precisei da sua ajuda.

À Raquel Portela, pelos conselhos nas horas mais difíceis.

À Tânia e Nicole agradeço a preparação e esterilização dos materiais.

Aos meus Pais e Familiares,

As palavras parecem às vezes desprovidas de sentido, tornando difícil encontrar a expressão que traduz o mais profundo reconhecimento por vós. O vosso apoio durante todos estes anos, apesar da distância que nos separa, tem contribuído positivamente neste meu caminho de luta pela sabedoria.

Resumo

Os oceanos constituem presentemente o principal recurso para a descoberta de novos produtos naturais com aplicações industriais. Portugal com a sua enorme linha costeira possui um grande potencial para a descoberta de novas bactérias e de novos compostos bioactivos. Este trabalho incidiu num grupo particular de metabolitos secundários, as prodigiosinas, moléculas conhecidas pelas suas propriedades anticancerígena, antimalárica, antimicrobiana e imunossupressora. O isolamento e a identificação de dois membros da família das prodigiosinas foram feitos a partir de extractos de um microrganismo isolado de sedimentos marinhos (areias) recolhidos no arquipélago dos Açores (no âmbito do Projecto PTDC/QUI-QUI/101813/2008). Foram identificadas duas prodigiosinas usando a espectroscopia de massas, UV-vis e IV: undecilprodigiosina e outra prodigiosina cíclica, a que foi atribuída a estrutura de butil-ciclo-heptilprodigiosina. Em paralelo, foi avaliado o efeito antimicrobiano de fracções de crudes de bactérias isoladas também de amostras de sedimentos marinhos recolhidos a diferentes profundidades no arquipélago dos Açores (São Miguel e Santa Maria) e também da Madeira (no âmbito do Projecto PTDC/ QUI-QUI/ 119116/ 2010). Das 35 amostras analisadas, seis revelaram actividade citotóxica e cinco actividade antimicrobiana, uma revelou ambas as actividades, sendo deste modo seleccionadas para outros estudos com vista a futuras aplicações farmacêuticas.

Palavras-chave: anticancerígena, antimalárica, butil-ciclo-heptilprodigiosina, undecilprodigiosina, MRSA, prodigiosinas VRE.

Abstract

The oceans are currently the primary resource for the discovery of new natural products with industrial applications. Portugal with its huge coastline has a great potential for the discovery of new bacteria and new bioactive compounds.

This study has focused on a particular group of secondary metabolites, the Prodigiosins, molecules known for their anticancerous, antimalarial, antibacterial, and immunosuppressant properties. Isolation and identification of two family members of prodigiosinas were made from extracts of a microorganism isolated from marine sediments (sand) collected in the Azores sea (under the Project "PTDC/QUI-QUI/101813/2008). Two Prodigiosins were identified using mass spectroscopy, UV-Vis and IR, namely undecylprodigiosina and cyclic prodigiosin, which was assigned the structure of butylcyclo-heptylprodigiosin. In parallel, we evaluated the antimicrobial effect of fractions of crudes also isolated bacteria from marine sediment samples collected at different depths in the Azores (São Miguel and Santa Maria) and Madeira (under the project PTDC/CHI-CHI/119116/2010). Of the 35 fractions analyzed, six showed cytotoxic activity, five antimicrobial activities, and one, out of these 11 crudes had both activities and was selected for further studies for future pharmaceutical applications.

Keywords: anticancer, antimalarial, butylcyclo-heptylprodigiosin, MRSA, undecylprodigiosin, prodigiosin, VRE.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características do ambiente marinho e as potencialidades que podem representar.....	4
Tabela 2. Prodigiosinas conhecidas actualmente	9
Tabela 3. Comparação de actividade antimalárica entre cloroquina e metacicloprodigosina.....	17
Tabela 4. Diferentes prodigiosinas e as respectivas propriedades relatadas.....	18
Tabela 5. Sedimentos processados	24
Tabela 6. Concentrações do químico na placa de 96 poços [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$].....	28
Tabela 7. Descrição de estirpes de Actinomicetos	35
Tabela 8. Descrição de estirpes de unicelulares	37
Tabela 9. Crudes activos contra MRSA	39
Tabela 10. Crudes activos contra VRE.....	39
Tabela 11. Resultados dos extractos com a estirpe MRSA.....	40
Tabela 12. Resultados dos extractos com a estirpe VRE.....	40
Tabela 13. Contagem de CFU's- MRSA e VRE.....	41
Tabela 14. Resultados de ensaios cotóxicos.....	41
Tabela 15. Resultados espectrais da fracção CNX-874-9-1.....	42
Tabela 16. Resultados espectrais da fracção CNX_874-(9-2+10-1)-1-1.....	43
Tabela 17. Comparação dos resultados espectrais da fracção CNX_874-(9-2+10-1)-1-2.....	43
Tabela 18. Comparação de dados espectrais da fracção CNX_874-(9-2+10-1)-2-3 e butilciclo-heptilprodigosina.....	44

Lista de Figuras

Figura 1. Colónias de <i>Serratia marcescens</i> em placa de agar.....	5
Figura 2. Cronologia da história das prodigiosinas.....	6
Figura 3. Estrutura base das prodigiosinas.....	7
Figura 4. prodigiosina, primeiro membro da família isolada.....	7
Figura 5. prodigiosina.....	7
Figura 6. Undecilprodigiosina.....	7
Figura 7. Nonilprodigiosina.....	7
Figura 8. Norprodigiosina.....	7
Figura 9. Metacicloprodigiosina.....	7
Figura 10. Cicloprodigiosina.....	7
Figura 11. Dimetilprodigiosina.....	8
Figura 12. Etil-metilprodigiosina.....	8
Figura 13. Etilciclononilprodigiosina.....	8
Figura 14. Cicloprodigiosina.....	8
Figura 15. Vias biossintéticas da prodigiosina, undecilprodigiosina, butil-ciclo-heptilprodigiosina.....	13
Figura 16. Prodigiosinas aplicadas a diferentes tipos de tecidos.....	15
Figura 17. Aparelho de recolha de sedimentos em altas profundidades.....	20
Figura 18. Placa de agar com cultura pelo método P1.....	23
Figura 19. Materiais utilizados para cultivo método P2 e placa de cultura.....	23
Figura 20. Cultura microbiana após fermentação em 25 ml de meio líquido.....	24
Figura 21. Cultura microbiana fermentada em 1L de meio.....	24
Figura 22. Cultura microbiana em extracção por solvente orgânico.....	26
Figura 23. Placa de 96 poços.....	27
Figura 24. Esquema de distribuição das concentrações na placa.....	28
Figura 25. Esquema de fraccionamento de amostra do crude CNX-874.....	30
Figura 26. Refraccionamento CNX-874-9.....	30
Figura 27. Refraccionamento da fracção CNX-874-10.....	32
Figura 28. Refraccionamento da fracção CNX-874 (9-2+10-1).....	32
Figura 29. Refraccionamento da fracção CNX-874 (9-2+10-1)-1.....	33
Figura 30. Refraccionamento da fracção CNX-874 (9-2+10-1)-2.....	33
Figura 31. Morfologia de algumas estirpes isoladas.....	35
Figura 32. Percentagem geral das estirpes de actinomicetos isolados/ influência do tempo de conservação.....	38
Figura 33. Percentagem geral das estirpes de unicelulares isolados/ influência do tempo de conservação.....	39
Figura 34. Estrutura química de undecilprodigiosina.....	44
Figura 35. Estrutura química de butilciclo-heptilprodigiosina.....	44

Lista de Abreviaturas

AcOEt- Acetato de Etilo
AZ- Açores
BHI- Brain Heart Infusion
C4-HSL- N-butanoil-L-homoserina-lactona
C6-HSL- N-hexanoil-L-homoserina-lactona
cc- Crescimento confluyente
CoA- Coenzima A
Cong- Congelamento
CREM- Centro de Recursos Microbiológicos
DMSO- Dimetilsulfóxido
Ext- Extracção
FC- Funchal
FG- Formigas
Fig.- Figura
HBC- Hidroxi-bipirrol-carbaldeído
IV- Infravermelho
L- Litro
MAP- metil-amil-pirrole
MBC- metoxi-bipirrol-5-carboxialdeído
MBH- Hidroxi-bipirrol-metanoil
MeOH- Metanol
MIC- Concentração mínima inibitória
MRP1- Proteína multirresistente 1
MRSA- *Staphalococcus aureus* resistente a Meticilina
Peso Mol.- Peso molecular
PS-Porto Santo
Rf- Factor de retenção (retention factor)
rpm- Rotação por minuto
SIO- Scripps Institution of Oceanography
SM- Santa Maria
S-PCP- peptidyl carrier protein
SS- Sesimbra
Tab- Tabela
TFA- Ácido trifluoracético
UV- Ultravioleta
VRE- *Enterococcus* resistente a vancomicina

Glossário

Simbiose é uma relação mútua, na qual, dois ou mais organismos diferentes são beneficiados por esta associação.

Epibiose é um tipo de associação em que apenas um dos participantes se beneficie, sem causar qualquer prejuízo ao outro. Nesse caso, a espécie beneficiada obtém abrigo ou, ainda, suporte no corpo da espécie hospedeira.

Apoptose morte programada de células, é um tipo de “autodestruição celular” que ocorre de forma ordenada. Está relacionada com a manutenção e a regulação fisiológica do tamanho dos tecidos, mas pode também ser causada por um estímulo patológico (como a lesão ao DNA celular).

Bio-hidrometalurgia pode ser considerado como a biolixiviação que, é o processo de extração de uma substância presente em componentes sólidos através da sua dissolução, utilizando agentes biológicos.

Nosocomiais infecção adquirida após a entrada do paciente num hospital ou após a sua alta quando essa infecção estiver diretamente relacionada com o internamento ou procedimentos hospitalares.

Quorum sensing conjunto de mecanismos reguladores que controlam a expressão coordenada de certos genes bacterianos no seio de uma mesma população.

Citocrome C é uma pequena proteína associada à membrana interna da mitocôndria.

BCL-2 refere-se a uma família de genes e as proteínas as quais estes genes dão origem. Estas regulam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria e são anti-apoptóticos.

Capítulo 1. Introdução

Introdução Geral

Os problemas de saúde representam uma constante ameaça para a humanidade conduzindo o Homem a uma incessante procura de soluções. Os produtos naturais são uma das principais fontes das quais derivam os fármacos.^[1] Têm uma longa história de utilização.^[2] As plantas e os seus extractos foram as primeiras fontes utilizadas para tratamentos de doenças há milhares de anos, tendo sido encontrada representada na mais antiga obra arqueológica as suas utilizações como agentes terapêuticos.^[3] A exploração sistemática dos microrganismos terrestres, produtores de metabolitos com actividade terapêutica, só começou no limiar do século XX, com a descoberta da penicilina.^[3,4]

A quantidade de produtos naturais bioactivos descobertos excede presentemente um milhão, 40% a 60% têm origem a partir das plantas terrestres entre os quais 20% a 25% têm actividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e anticancerígena.^[3,5]

É sabido que os agentes infecciosos desenvolvem rapidamente mecanismos de resistência aos antibióticos tradicionais (i.e. *Mycobacterium tuberculosis*), o mesmo se tratando no caso da malária, que é uma doença endémica em muitas regiões de África (África subsaariana), América Latina, Ásia e Oceânia, e afecta 5% da população mundial, provocando mais de 1 milhão de mortes por ano.^[6,7]

A malária é a causa de 30% a 50% da mortalidade infantil em África.^[8] Segundo uma campanha da Organização Mundial de Saúde, em cada segundo surgem 10 novos casos, e enquanto se diz a palavra *paludismo*, 10 crianças são infestadas.^[9]

O cancro é uma doença que atinge 13% da população mundial.^[10] Em Portugal, os dados datados de 2010, apontam que 24 mil pessoas morrem anualmente de cancro, com tendência para aumentar até ano 2030, ou seja haverá um aumento de 34,5% de casos, isto é 34 mil mortes por ano.^[10]

Devido a emergente resistência aos agentes terapêuticos, por parte dos agentes causadores das doenças infecciosas, a não selectividade, e efeitos secundários de fármacos, criam uma necessidade urgente de encontrar novos compostos com actividade farmacológica.^[11, 12]

Para esse fim é imperativo que novas fontes de compostos com potenciais aplicações terapêuticas sejam desenvolvidas. Assim o ambiente marinho emerge como uma nova fonte de exploração dos microrganismos produtores de metabolitos com actividades capazes de dar resposta a incessante procura dos novos fármacos.^[11]

Este ecossistema antes considerado como deserto, pobre em formas de vida, é actualmente o centro de atenção da indústria farmacêutica e de programas académicos, comparando-o às florestas tropicais, ricas em diversidade microbiológica, cuja concentração se estima ser a volta de 10^6 - 10^9 células/L.^[3,8]

Os oceanos cobrem mais de 70% da superfície terrestre, 60% da qual é coberta por água a mais de 2000 m de profundidade. Paradoxalmente, têm sido pouco explorados pela sua microbiologia. ^[13]

O ambiente marinho é massivamente complexo. Nele se encontram diversas formas de vida que se produzem em condições extremas de altas e baixas temperaturas, salinidade e pressão. Os microrganismos que habitam este ambiente produzem uma variedade de compostos que lhes permitem não só uma adaptação a esse meio, assim como desempenham um papel importante na fisiologia do próprio. ^[11]

Pensa-se que esta diversidade microbiológica se traduz numa diversidade metabólica, rica em novos compostos bioactivos a serem descobertos. ^[3] Do aumento de interesse, nas últimas décadas, resultou num crescente aumento de produtos naturais bioactivos originários dessa nova fonte, uns com a comercialização já aprovada na Europa, outros em diferentes fases de ensaios clínicos. ^[11,14]

Em modo geral, o ambiente marinho é pleno de oportunidades e potencialidades, em termos de descoberta de novos fármacos assim como fonte de novos conhecimentos (ver Tabela 1).

Tabela1. Características do ambiente marinho e as potencialidades que pode representar. ^[13]

Habitat	Características	Potencialidade
Fossas Oceânicas	Alta Pressão, ausência de luz	Descoberta de novos biocatalisadores
Mares polares	Baixas temperaturas	Biocatalisadores activos a baixas Temperaturas, bio-anticongelante
Fontes hidrotermais	Elevadas temperaturas, metal	Biocatalisador termo-estável, Bio-hidrometalurgia
Sedimentos, simbiose, Epibiose	Elevada concentração de nutrientes	Novos compostos bioactivos, Biossensores e defesa química
Água salgada	Mecanismo de defesa	
Infiltrações	Alta salinidade	Biocatalisador halo-tolerante,
Sedimentos profundos	Hidrocarbonetos	Biorremediação, biotransformação
	Anaerobiose	Biotransformação anaeróbica

Objectivo

Esta dissertação intitulada *Produtos bioactivos provenientes de sedimentos marinhos*, focou-se no isolamento/identificação a partir de amostras de sedimentos de areia colhidas nas profundezas do mar dos Açores de um grupo particular de metabolitos secundários, as prodigiosinas conhecidas pelas suas actividades anticancerígena, antimalárica, antimicrobiana, imunossupressora e protectora de radiação ultravioletas. ^[15,16,17,18]

Prodigiosinas

1.2.1 Historial das Prodigiosinas

Os alcaloides da família das prodigiosinas constituem um caso particular na história da química dos produtos naturais.^[18] São pigmentos naturais de cor vermelha produzidos por um grupo restrito de microrganismos.^[12,13] Devido à essa cor, as colónias dos microrganismos produtores destes compostos, nomeadamente *Serratia marcescens* (*S. marcescens*) podem apresentar características semelhantes às gotas de sangue.^[18] Ver Fig. 1.

Estão envolvidos em muitos acontecimentos, cujo mais popular é o fenómeno de sangramento de pão eucarístico, “bleeding bread”^[19]. Fig. 2.

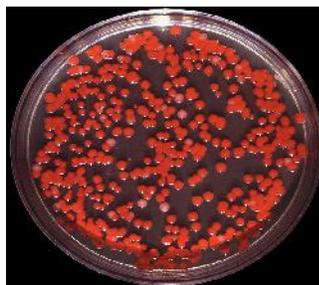


Figura 1. Colónias de *Serratia marcescens* em placa de Agarose.^[19]

A palavra prodigiosina provém de “prodigiosus” (*Bacillus prodigiosus*), microrganismo do qual foi isolada a primeira prodigiosina com estrutura química conhecida, e que deu nome a esta família de compostos.^[19] É de notar que a bactéria *Bacillus prodigiosus* é actualmente conhecida por *S. marcescens*, nome que lhe foi dado em honra do físico italiano Serafino Serrati.^[19] Ver Fig. 2.

Foi assim designado (*Bacillus prodigiosus*), devido aos acontecimentos que envolviam os seus metabolitos antes de estes serem quimicamente conhecidos. Trata-se de um microrganismo pertencente à família das *Enterobacteriaceae*. Também fazem parte desta, família outros microrganismos como: *S. entomophila*, *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. grimesii*, *S. liquefaciens*, *S. odorifera*, *S. plymuthica*, *S. proteamaculans*, *S. quinivorans*, *S. rubidaea* e *S. ureilytica*.^[20] *S. marcescens* e *S. rubidaea* são os únicos membros desta família até agora descritas como produtores de prodigiosinas^[17].

S. marcescens conhecida até a data como sendo a principal produtora, é descrita como uma patogénica oportunista e uma das responsáveis por infecções nosocomiais.^[21] O resultado de um estudo feito sobre a biossíntese das prodigiosinas por parte de estirpes clínicas de *S. marcescens* isolada de pacientes conclui que estas não têm capacidade autónoma de biossíntese, mas possuem enzimas de condensação dos precursores: Metil-Amil-pirrol e Metoxi-Bipirrol-Carboxialdeído (MAP e MBC).^[18]

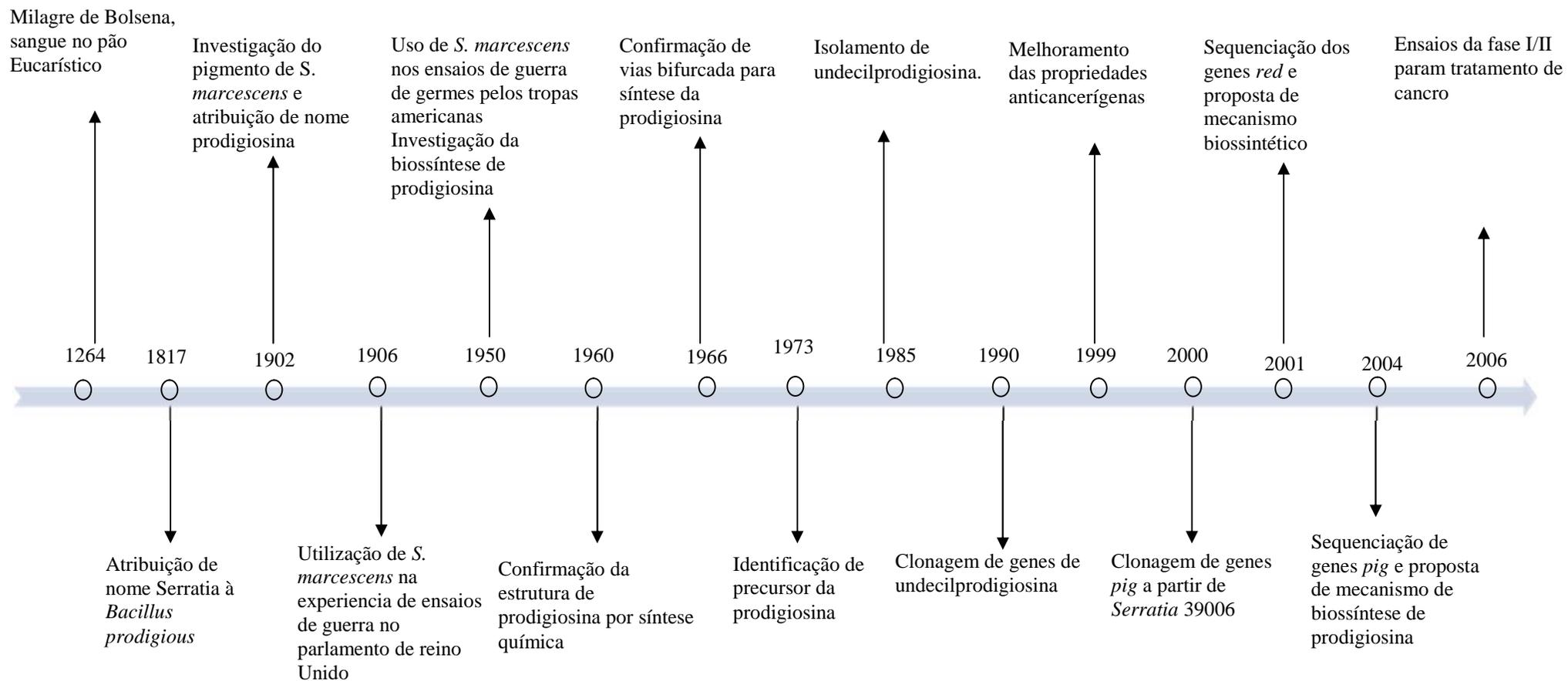


Figura 2. Cronologia da história das prodigiosinas. ^[19]

1.2.2 Estrutura Química das Prodigiosinas

São compostos com três anéis pirrólicos (pirrolildipirometano), que constituem a estrutura base e cujo primeiro membro da família foi isolado por N.Gerber e denominada de prodigiosina. ^[15,18] Fig. 3 e Fig. 4.

Devido às dificuldades que podem surgir em chamar o nome tradicional destes compostos, é fortemente recomendada a nomenclatura prodigiosina unicamente no sentido genérico da palavra. ^[18,19]

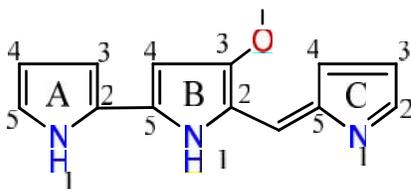


Figura 3. Estrutura base das Prodigiosinas.

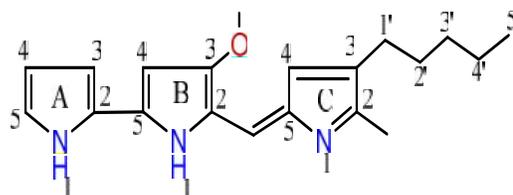


Figura 4. Prodigiosina, primeiro membro da família isolada

Actualmente são conhecidos 20 membros desta família, agrupados em quatro classes. ^[19] Tab 2.

➤ 1ª Classe reúne derivados da prodigiosina com uma cadeia alifática linear nas posições 2 ou 3 do anel C. Nesta classe encontram-se:

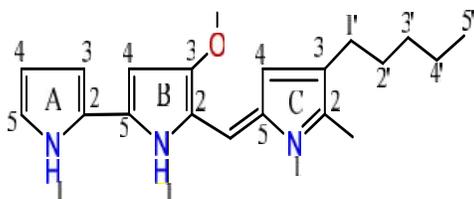


Figura 5. Prodigiosina

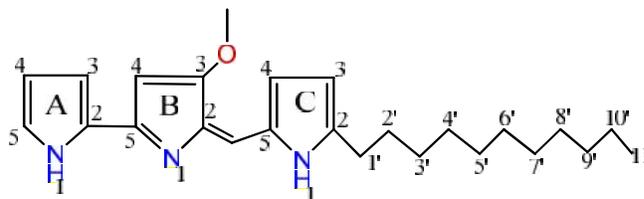


Figura 6. Undecilprodigiosina

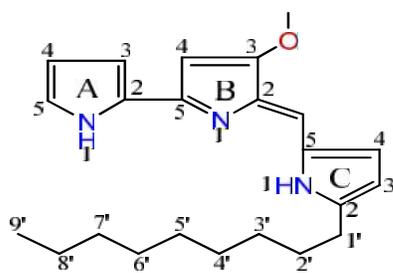


Figura 7. Nonylprodigiosina

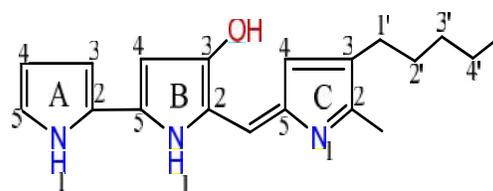


Figura 8. Norprodigiosina

➤ 2ª Classe: Fazem parte deste grupo prodigiosinas cujo cadeia alifática forma um ciclo adicional.

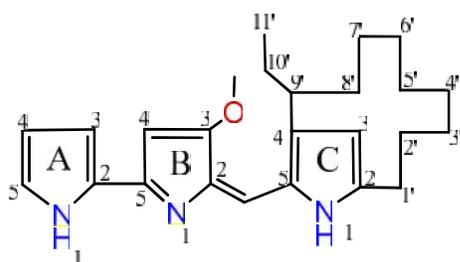


Figura 9. Metacicloprodigiosina.

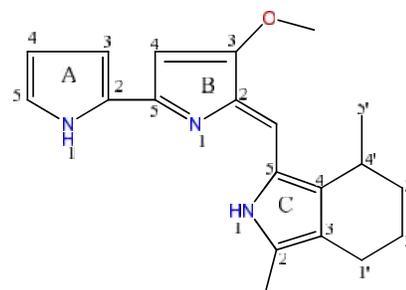


Figura 10. Cicloprodigiosina.

➤ 3ª Classe: Reagrupa prodigiosinas cujo anel C contém substituintes nas posições 2 e 4 sem formação de ciclo adicional.

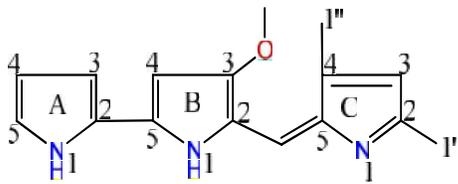


Figura 11. Dimetilprodiginina.

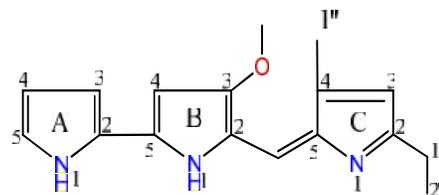


Figura 12. Etil-metilprodiginina.

➤ 4ª Classe reagrupa as prodigiosinas cuja cadeia alifática está ligada aos anéis pirrólicos terminais A e C pelos carbonos 2 do anel C e 5 do anel A.

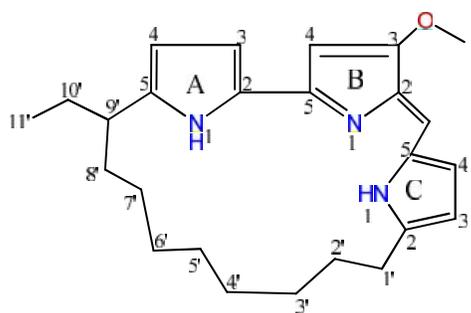


Figura 13. Etilciclononilprodiginina

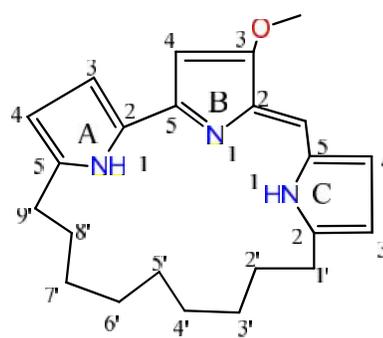
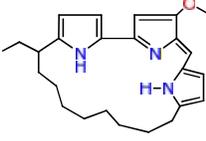
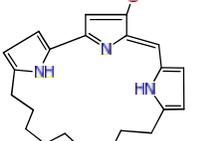
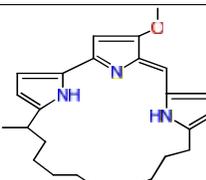
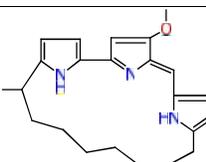
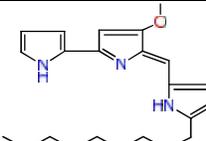
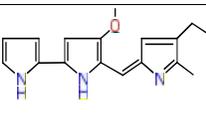
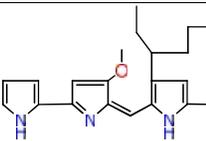
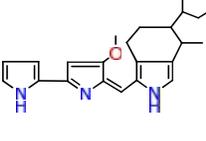
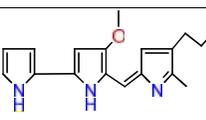
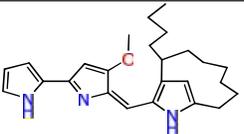
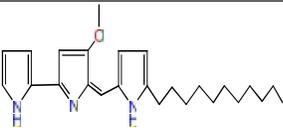
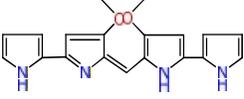
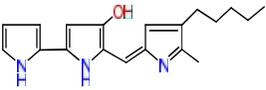
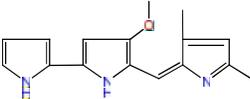
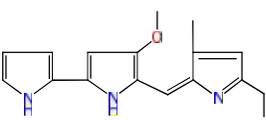
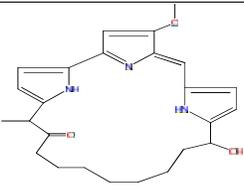
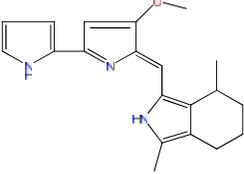
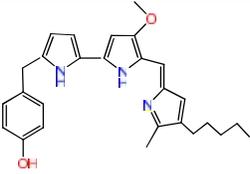
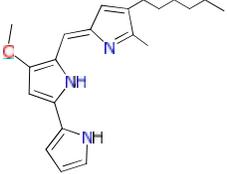
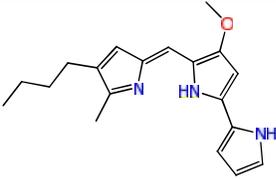


Figura 14. Ciclononilprodiginina

Tabela 2. Prodigiosinas actualmente conhecidas

	Nome do composto	Espécie Produtora	Fórmula Química	Fórmula Molecular	Peso Mol.	Ref.
1	Etilciclononilprodigiosina	<i>Actinomadura pelletieri</i>		$C_{25}H_{33}N_3O$	391	23
2	Ciclononilprodigiosina	<i>Actinomadura madurae</i>		$C_{23}H_{29}N_3O$	363	23
3	Metilciclodecilprodigiosina	<i>Actinomadura pelletieri</i> , <i>Nocardia pelletieri</i>		$C_{25}H_{33}N_3O$	391	23
4	Metilciclooctilprodigiosina	<i>Actinomadura madurae</i>		$C_{23}H_{29}N_3O$	363	23
5	Nonilprodigiosina	<i>Actinomadura madurae</i> , <i>Nocardia madurae</i>		$C_{23}H_{31}N_3O$	365	24
6	Prodigiosina	<i>Rugamonas rubra</i> ; <i>S.marcescens</i> , <i>Actinomadura pelletieri</i> , <i>marine Pseudomona</i>		$C_{20}H_{25}N_3O$	323	25
7	Metacicloprodigiosina	<i>Mycale plumosa</i>		$C_{25}H_{33}N_3O$	391	26
8	Vitamicina A	<i>Actinomadura aureoverticillatus</i>		$C_{25}H_{33}N_3O$	391	27
9	Heptilprodiginina	<i>Rugamonas rubra</i>		$C_{22}H_{29}N_3O$	351	28

10	Butilcicloheptilprodiginina	<i>Streptoverticillium</i>		$C_{25}H_{33}N_3O$	391	29
11	Undecilprodigosina	<i>Streptomyces ruber</i> <i>Actinomadura pelletieri</i> ;		$C_{25}H_{35}N_3O$	393	30
12	Dipirrolil-dipirrometano-Prodigosina	<i>S. marcescens</i> ; <i>Streptomyces coelicolor</i>		$C_{19}H_{18}N_4O_2$	334	31
13	Norprodigosina	<i>S. marcescens</i>		$C_{19}H_{23}N_3O$	309	32
14	Dimetilprodiginina	<i>Actinomadura madurae</i> , <i>Actinomadura</i>		$C_{16}H_{17}N_3O$	267	23
15	Etil-metilprodiginina	<i>Actinomadura madurae</i> , <i>Actinomadura</i>		$C_{17}H_{19}N_3O$	281	23
16	Prodiginina	<i>Actinomadura madurae</i> , <i>Actinomadura</i>		$C_{25}H_{31}N_3O_3$	421	23
17	Cicloprodigosina	<i>Beneckeia gazogenes</i> <i>marine Alteromonas rubra</i>		$C_{20}H_{23}N_3O$	321	33
18	2-(p-hidroxibenzil) prodigosina	<i>Pseudoalteromonas rubra</i>		$C_{27}H_{31}N_3O_2$	429	34
19	4-(n-Hexil) prodigosina	<i>Pseudoalteromonas rubra</i>		$C_{21}H_{27}N_3O$	337	34

20	(n-butil) prodigiosina	<i>Pseudoalteromonas rubra</i>		C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O	323	34
----	------------------------	--------------------------------	--	--	-----	----

1.2.3. Biossíntese da Prodigiosina

Como foi anteriormente referido, as prodigiosinas são produzidas por diferentes classes e géneros de microrganismos, sendo o produtor mais estudada *S. marcescens*. Deste modo relatar-se-á a produção de composto prodigiosina por parte deste microrganismo. [25] É um metabolito secundário de tipo III, [35] produto não associado ao crescimento, uma vez que a produção começa na fase estacionária. [18]

A sua biossíntese baseia-se na condensação de dois precursores, que apresentam vias de biossíntese diferentes, o metoxi-2,2'-bipirrol-5-carboxialdeído (MBC) e o 2-metil-3-amilpirrol (MAP), tratando-se de um processo bifurcado. [19]

1.2.3.1 Biossíntese de MBC

O primeiro passo para a biossíntese de MBC, consiste na incorporação da prolina para formar pirrol-2-carboxil-S-PCP (peptidyl carrier protein (PCP)). [18,25] Esta reacção é catalisada nas primeiras etapas pelo PigL, que transforma L-prolina em L-pirrolil (forma activa), em seguida, sob acção de PigG, L-pirrolil é transferida para o grupo tiol de peptidyl carrier protein (PCP) dando origem a L-pirrolil-S-PCP. [18] O mecanismo da incorporação da prolina é ainda desconhecido. A oxidação de L-pirrolil-S-PCP por PigA conduzirá a formação de pirrol-2-carboxil-S-PCP. As últimas etapas para a biossíntese de MBC, envolve uma condensação decarboxilativa entre pirrol-2-carboxil-S-PCP e Malonil Co-enzima-A (Malonil CoA), o produto da reacção sofre uma nova decarboxilação dando origem a HBM. A desidrogenação deste último conduzirá a formação de HBC. A metilação de HBC por parte de PigF-PigN, culminará com a biossíntese de MBC [18], ver Fig. 15.

Este é o processo em que os genes envolvidos são comuns para maioria dos organismos que produzem as prodigiosinas. [19]

1.2.3.2 Biossíntese de MAP

Em contraste com a biossíntese de MBC cujo mecanismo é partilhada por maioria parte dos microrganismos produtores de prodigiosina, a biossíntese de MAP difere de um microrganismo para outro. [36]

O precursor inicial, neste caso 2-octenal pode ter origem a partir de biossíntese de enzimas de ácidos gordos ou da auto-oxidação dos ácidos gordos insaturados. [19] A biossíntese do primeiro intermediário desta via, parte da reacção entre o 2-octenal com dois fragmentos de carbono transferidos

do piruvato por Tiamina Pirofosfato (TPP), com a perda de uma molécula de CO_2 formando 3-acetiloctenal. De seguida o grupo aldeído de 3-ocetloctenal sofre uma transaminação para formar H_2MAP . O passo final consiste na deshidrogenação deste último intermediário, culminado desta forma com a formação MAP, e a biossíntese da prodigiosina resulta da condensação de MAP e MBC.^[18] Vide Fig. 15.

A biossíntese de alguns membros da família destes compostos pode ocorrer da condensação entre os intermediários, é o caso de norprodigiosina que é o subproduto resultante da condensação entre HBC e MAP, o dipirrolil-dipirrometanopridgiosina tem origem a partir da reacção entre duas moléculas de MBC. [18, 36]

A biossíntese das prodigiosinas com um anel adicional resulta da oxidação cíclica das prodigiosinas com cadeia linear no interior da célula. A butil-ciclo-heptilprodigiosina por exemplo, resulta da acção RedG sobre a undecilprodigiosina [25], (ver Fig. 15).

1.2.4 Considerações sobre a Regulação da Biossíntese

A biossíntese da prodigiosina como muitos outros metabolitos secundários, de tipo III, depende do crescimento das células, atingindo uma concentração máxima quando da privação de nutriente limitante ou na presença de outro factor de stress. [25] A regulação da sua biossíntese está fortemente dependente de estímulos fisiológicos e ambientais. [19]

1.2.4.1. Estímulos Fisiológicos

Quorum sensing constitui o principal estímulo fisiológico da regulação. Este é desencadeado por dois activadores, *smaI* e *smaR*. [19,25] Activação ou repressão da biossíntese da prodigiosina depende de acumulação de duas moléculas sinalizadoras: N-butanoil-L-homoserina-lactona (C4-HSL) e N-hexanoil-L-homoserina-lactona (C6-HSL), ambas induzidas por *smaI*. [18,37] Em baixas densidades celulares, os clusters são reprimidos em consequência da repressão dos reguladores do pigmento *pigR*, *Rap* e *pigQ*, por parte de *smaR*. Em situação contrária, isto é na presença de elevadas densidades celulares e consequentemente de uma elevada concentração no meio de C4-HSL e C6-HSL, a ligação de *smaR* ao DNA é inibida, resultando assim na produção de *pigR*, *Rap* e *pigQ* e a consequente activação da biossíntese. [18] A *Serratia* contém 14 clusters agrupados de *pigA* a *pigN* semelhantes aos de *Streptomyces coelicolor*. Destes genes, 5 (*pigF* - *pigN*) estão envolvidos na via biosintética de MBC e 4 (*pigB* - *pigE*) na síntese de MAP, o resto é responsável pela regulação pós-transcrição. [18,19,37]

1.2.4.2. Estímulos Ambientais

O fosfato pode agir como um inibidor ou activador da biossíntese, dependendo do membro da família das prodigiosinas. [37] Uma baixa concentração de amino-ácidos pode limitar a biossíntese do composto, uma vez que se trata de um metabolismo secundário. [18] Apesar de não ser claramente demonstrado a forma como a temperatura, de incubação pode influenciar a biossíntese da prodigiosina por parte da *S. marcescens*, este microrganismo pode suportar uma temperatura até aos 40°C. Contudo a

produção máxima do composto ocorre à uma temperatura de 27°C.^[38] Um estudo sobre o efeito de NaCl na produção deste metabolito sugere que uma elevada concentração de NaCl iniba a biossíntese da prodigiosina, bloqueando a actividade enzimática de condensação dos seus precursores.^[39]

1.2.5. Potencialidades/Aplicações

As prodigiosinas têm um largo espectro de actividade, exibindo propriedades imunossupressoras, anti-tumorais, antimalárica, antimicrobiana e protecção contra radiação ultravioleta.^[13,26]

1.2.5.1. Corantes Biológicos e Tecidos Antimicrobianos

Muitos são os produtos, que diariamente utilizamos, alguns contêm os corantes sintéticos. Alguns destes corantes são conhecidos pelos seus efeitos adversos para a saúde humana, daí o aumento, nestes últimos anos, da procura de fontes para obtenção de corantes naturais.^[40] As plantas e os microrganismos representam os principais recursos onde se pode obter as matérias-primas para esse fim.^[19]

No entanto, o uso das plantas para a produção de biocorantes apresenta muitas condicionantes, como por exemplo, a disponibilidade segundo a estação do ano. Por outra razão a operação não é ambientalmente sustentável devido à quantidade de biomassa necessária.^[19,21] Entre outras vantagens comparativamente aos corantes extraídos das plantas, os derivados dos microrganismos apresentam um crescimento fácil em meios simples e uma disponibilidade durante todo o período do ano, elevada pureza e produzem menos resíduos.^[19] As prodigiosinas podem servir de biocorantes aplicáveis numa vasta gama de tecidos.^[18], Fig. 16.

Tendo propriedades antimicrobianas, o seu uso como corantes para têxteis, as prodigiosinas podem ser utilizadas para a produção de tecidos antimicrobianos.^[41]

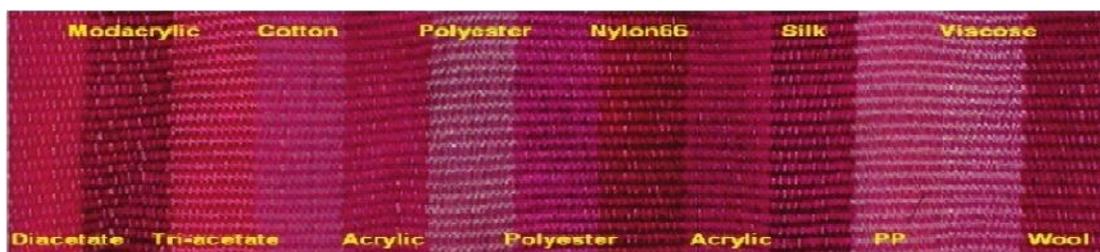


Figura 16. Prodigiosinas aplicadas a diferentes tipos de tecidos.

1.2.5.2 Actividade Anticancerígena

A actividade anticancerígena das prodigiosinas foi primeiramente descrita como substância activa da toxina de Coley, que a caracterizou como factor de necrose tumoral.^[42] As prodigiosinas foram testadas contra células de cancro do pulmão, cérebro, rim, ovário, cólon, melanoma, leucemia, mostrando uma

actividade mais forte do que a Doxorrubicina, contra qual há resistência por parte células do carcinoma do pulmão, que também expressam a proteína multirresistente a fármacos (Multidrug Resistent Protein-1, MRP1).^[36]

1.2.5.3 Mecanismo de Acção das Prodigiosinas sobre Células Cancerígenas

As prodigiosinas podem agir sob várias formas contra as células cancerosas, induzindo apoptose. Esta pode resultar de acidificação intracelular, fragmentação de DNA ou paragem do ciclo celular.

1.2.5.3.1. Acidificação Intracelular

As prodigiosinas podem perturbar de forma reversível o gradiente de pH entre vários compartimentos da célula.^[18] Baixam o pH intracelular facilitando o simporte de H^+/Cl^- através da membrana celular para o citosol e provocando acidificação do citoplasma.^[37]

As proteínas de família BCL-2 têm um papel primordial no processo de apoptose celular. São os reguladores da permeabilidade externa da membrana das mitocôndrias. Uma diminuição do pH intracelular conduz a um aumento de BCL-2, o que como consequência elevará a permeabilidade externa da membrana e a libertação de Citocromo C.^[18] Este último é conhecido como um potente activador da caspase-9 cuja acção conduzirá à apoptose.^[44]

A indução de apoptose celular por parte das prodigiosinas é independente da proteína p53. Isto constitui uma vantagem destes compostos comparativamente aos outros agentes anticancerígenas, que requerem esta proteína no seu estado funcional, e que no entanto está alterada na maioria parte dos tipos de cancro.^[18,44]

1.2.5.3.2 Fragmentação do DNA

As prodigiosinas podem intercalar-se no DNA, e ligarem-se ao cobre, (Cu^{+2}) facilitando a fragmentação oxidativa do mesmo.^[18] Pensa-se, que este processo se dá através da formação de um radical catiónico devido a interacção entre o cromóforo pirrolilpriometano e o Cu^{2+} dando origem a Cu^{1+} . Este por sua vez favorece a formação de um anião superóxido O_2^- e consequente formação de peróxido de hidrogénio H_2O_2 . A interacção peróxido-prodigiosina ligada ao cobre fragmenta o DNA.^[18,44]

1.2.5.3.3 Paragem do Ciclo Celular

A paragem do ciclo celular é feita a uma concentração não tóxica para célula, tendo como alvo, as células de Jurkat na fase de transição G1-S. É nessa concentração que estes compostos agem como imunossuppressores reduzindo o número dos linfócitos CDK4 e CDK2.^[19]

1.2.5.4 Anti-metastática

A actividade anti-metastática das prodigiosinas está associada à redução de expressão da proteína RhoA envolvida na migração celular, e de metaloprotease da matriz implicada na aderência sobre a matriz extracelular, isto é dizer, que as prodigiosinas inibem a migração das células cancerosas e a adesão das mesmas á matriz. ^[19]

1.2.5.5 Actividade Anti-malária

Apesar de não ter sido evidenciado o mecanismo de acção das prodigiosinas sobre as parasitas do paludismo, certo é que estes compostos têm mostrado uma elevada actividade contra essa que é a principal causa da mortalidade infantil em muitos países.

Um estudo comparativo entre a metacicloprodigiosina e o fármaco de referência para tratamento do paludismo (cloroquina), revelou uma actividade mais elevada do que a cloroquina. ^[45] Ver Tab.3.

Tabela 3. Comparação de actividade antimalária entre cloroquina e metacicloprodigiosina.

Composto	Actividade IC50 (µg/mL)
Metacicloprodigiosina	0,0050 ± 0,0010
Cloroquina	0,16

1.2.5.6 Actividade Imunossupressora

As prodigiosinas são conhecidas por terem uma acção imunossupressora específica sobre os linfócitos T. ^[46] Esta acção começa por inibição da concavanalina A. Não inibem interleukina-2 (IL-2) mas pelo contrário bloqueiam o seu receptor, originando assim um disfuncionamento da via de sinalização da qual depende grande parte de processo regulador de activação destas células. ^[46]

1.2.5.7 Actividade Antibiótica

Apesar de ser um metabolito secundário, a razão da sua biossíntese pelos microrganismos produtores é ainda algo de discussão. Desde a descoberta do primeiro membro da família destes compostos, que as prodigiosinas começaram a ser focos de atenção por muitos investigadores desta área não só devido as suas propriedades anticancerígenas, mas também antibióticas. ^[47]

1.2.5.8 Protecção contra Radiação Ultra violeta

O papel fisiológico das prodigiosinas nos microrganismos produtores é ainda assunto de discussão. ^[18] No entanto alguns investigadores (M. Boric, T. Danevcic e D. Stopar), sugerem que no *Vibrio* sp. DSM 14379, o pigmento tem uma acção protectora contra a radiação ultravioleta. ^[48] Desta

forma, a prodigiosina poderá vir a ser integrada num novo produto cosmético para protecção contra raios ultravioleta.

1.2.5.9 Bio-controlo dos Agentes Fito-patogénicos (Bio-insecticida)

Sendo dotadas de propriedades antifúngicas, as prodigiosinas demonstraram actividade contra *Colletotrichum gloeosporioides*, causador de antracnose, inibindo o crescimento do micélio e a germinação dos conídios.^[49] Com esta actividade, as prodigiosinas têm potencialidade para integrarem futuros bio-pesticidas.

Tabela 4. Diferentes prodigiosinas e as respectivas relatadas

Nome do composto	Nome da espécie produtora	Actividade relatada	Ref.
Etilciclononilprodigiosina	<i>Actinomadura pelletieri</i>	NR	23
Ciclononilprodigiosina	<i>Actinomadura madurae</i>	Antimicrobiana	23
Cicloprodigiosina	<i>Marine Alteromonas rubra, Beneckea gazogenes</i>	NR	33
Metilciclodecilprodigiosina	<i>Actinomadura pelletieri, Nocardia pelletieri</i>	Antibiótica	23
Metilciclooctilprodigiosina	<i>Actinomadura madurae</i>	Antimicrobiana	23
Nonilprodigiosina	<i>Actinomadura madurae, Nocardia madurae,</i>	Antimicrobiana	24
Prodigiosina	<i>S. marcescens Magnesorubra, Vibrio sychroerythreus</i>	Anticancerígena, Protecção UV	25
Metacicloprodigiosina	<i>Streptorubin-A; Porifera Mycale plumosa, Saccharopolyspora sp</i>	Antimicrobiana, Anti-palúdica, Anticancerígena	26
Vitamicina; Prodigiosina-25b	<i>Actinomadura aureovercillatus</i>	Anti-palúdica	27
Heptilprodiginina	<i>Rugamonas rubra</i>	Antimicrobiana	29
Butilcicloheptilprodiginina	<i>Streptovercillium</i>	Antimicrobiana	29
Undecilprodigiosina	<i>Streptomyces longisporus-ruber, Actinomadura pelletieri, Porifera Mycale plumosa, Saccharopolyspora</i>	Antimicrobiana, Anticancerígena, Anti-palúdica	30
Dipirrolil-dipirrometano-prodigiosina	<i>S. marcescens, Streptomyces coelicolor A3 Ascidian</i>	Antimicrobiana	31
Norpordigiosina	<i>S. marcescens</i>	NR	32
Dimetilprodiginina	<i>Actinomadura madurae, Actinomadura</i>	NR	23
Etil-metilprodiginina	<i>Actinomadura madurae, Actinomadura</i>	NR	23
2-(p-hidroxibenzenzil) prodigiosina	<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	Anti-palúdica, Anticancerígena	33
4-(n-Hexil) prodigiosina	<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	NR	33
N-butil prodigiosina	<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	NR	34

NR não relatada

Capitulo 2.Parte Experimental

2. Parte Experimental

Este capítulo encontra-se subdividido em duas secções: uma secção microbiológica em que os métodos de crescimento microbiano, extracção dos crude, os testes antimicrobianos e citotóxicos. Parte química que compreende o fraccionamento de extracto total à identificação dos compostos isolados.

2.1. Colheita dos Sedimentos Oceânicos

A colheita de sedimentos de areia foi realizada no quadro do projecto “Tesouros Oceânicos - Sedimentos oceânicos do Arquipélago da Madeira: nova fonte de compostos inovativos e bioactivos”, Ref: PTDC/QUI-QUI/119116/2011, decorrido de 4 a 17 de Junho de 2012 no arquipélago da Madeira (Madeira, Porto Santo e Desertas). A colheita foi feita por mergulho autônimo (baixa profundidade, aproximadamente 30 m) ou com ajuda de draga (colector de lamas) para altas profundidades. Fig. 17.



Figura 17. Aparelho de recolha de sedimentos em altas profundidades

Logo após a recolha e ainda debaixo de água (quando se trata dos sedimentos recolhidos por mergulho autônimo), os sedimentos são colocados em sacos de plástico de recolha estéreis, retirando a maior quantidade de água possível. Partes das amostras foram processadas in loco. Após o processamento, os restos dos sedimentos foram congeladas à -20°C . Colheu-se um total de 662 amostras, entre quais 42 foram recolhidas a profundidades entre os 129m e 1310m. O estudo subsequente destas amostras será feito posteriormente.

2.2 Identificação Microbiológica e Avaliação de Actividade Biocida

No âmbito deste trabalho foram estudadas 42 amostras de areia provenientes da Madeira no âmbito da campanha da EMAM, dos Açores (Projecto Marinat) e de Sesimbra, estas últimas cedidas por uma estudante (Sara Margarida Pereira). O objectivo foi a comparação sedimentos de uma zona costeira (Sesimbra) com sedimentos recolhidos em mar aberto (Madeira e Açores). Os estudos decorreram no laboratório de Centro de Recursos Microbiológicos (CREM) do Departamento de Ciências de Vida, da Faculdade de Ciências e Tecnologias de Universidade Nova de Lisboa (Resp. Ilda Sanches)

2.2.1 Materiais e Métodos

Amido

Difco
Soluble starch, difco certified
Control 686179
0178-17
Difco laboratories
Detroit Michigan USA

Extracto de levedura

Bacto™ Yeast Extract
BD
Extract of autolyse yeast cells
Ref. 212750
Lot. 6009803

Carbonato de cálcio

Reagezien Merck
Ref: 2067
Lot: 70107-015
E. Merck AG. Darmstadt

Brometo de potássio Cristalino

Sigma
P. 9881
Ref: 22-36/37/38 S 22-36
Pureza 99,0%

Sulfato de ferro

Analar Trade Mark
660640
Pureza: 99,0%

Dimetilsulóxido (DMSO) (CH₃)₂SO

Lote SO7225-175 99+% GC.

Brain Heart Infusion (BHI)

Dehydrated Lot 81972JC

Peptona

Enzymatic digest of proteins
Ref: 211677
Lot: 9247363

2.2.2 Composição dos Meios de Cultura ^[50,51]

A₁

H₂O de mar-----750 ml
H₂O desionizada-----250 ml
Amido-----10 g
Extracto de levedura-----4.0 g
Peptona-----2.0 g
Agarose -----18.0 g

M₁

H₂O de mar-----750 ml
H₂O desionizada-----250 ml
Amido-----1.0 g
Extracto de levedura-----0.4 g
Peptona-----0.2 g
Agarose -----18 g

A₁ líquido

H₂O de mar-----750 ml
H₂O desionizada-----250 ml
Amido-----10 g
Extracto de levedura-----4.0 g
Peptona-----2.0 g

½ A₁

H₂O de mar-----750 ml
H₂O desionizada-----250 ml
Amido-----5.0g
Extracto de levedura-----2.0g
Peptona-----1.0g
Agarose -----18.0g

A₁bfe+ C

H₂O do mar-----750 ml
H₂O desionizada-----250 ml
Amido-----10.0g
Extracto de levedura-----4.0g
Peptona-----2.0g
KBr-----5.0mg
FeSO₄-----5.0mg
CaCO₃-----1.0mg

SWA

H₂O do mar-----750ml
H₂O desionizada-----250ml
Agarose-----18.0g

A solução de glicerol a 10% foi feita v/v glicerol: água Mili-Q (Merck-Millipore). A solução foi autoclavada a 110° C. Após a pesagem e dissolução dos constituintes, os meios foram autoclavados durante quinze minutos a 120°C a uma pressão de 1,5 bar. A água do mar foi recolhida na zona balnear da Costa de Caparica e filtrada com sistema de filtração e filtro de 0.45 µm antes de ser utilizada na composição dos meios. Após a autoclavagem os meios foram arrefecidos até aproximadamente 60°C, adicionou de seguida 20 mL da solução de Ciclohexamida a 5mg/mL. O meio A₁ é caracterizado pelo seu elevado teor em nutriente, o meio ½ A₁ contém metade dos ingredientes comparativamente ao A₁ e este último contém dez vezes mais de ingredientes do que o M₁. O SWA é pobre em nutrientes. Os plaqueamentos foram feitos sob chama ou na câmara de fluxo laminar.

2.2.3 Equipamentos

- Todas as pesagens foram realizadas numa balança de precisão marca OHAUS Analytical Plus
- Rotavapor de marca *BÜCHI*461 Water Bath REIII foi utilizado para evaporar solventes nos crudes pertence As filtragens de água do mar foram feitas no aparelho marca: Vacuum Spress tipo P selecta
- Estufa marca Heraeus instruments, foi usada para incubação das placas de culturas microbianas
- Banho-Maria haake D1 tipo Diesel Strasse 4 serie 001-3603
- Shaker marca Gallenkamp, rotação orbital, rotação máxima: 150 rpm.

2.2.4 Procedimento Experimental

2.2.4.1 Propagação de Culturas Bacterianas

2.2.4.1.1 Método de Isolamento

Para a sementeira dos sedimentos (areias) usou-se dois métodos diferentes designados neste trabalho por P₁, com distribuição uniforme de sobre nadante de uma amostra húmida por todo o meio de cultura e P₂, com distribuição directa da amostra seca (a areia) por estampagem. Os métodos estão descritos como se segue.

2.2.4.1.1.1 Método P1

Este método consiste em colocar uma pequena quantidade da amostra húmida num politop com dois mililitros da H₂O do mar filtrada e autoclavada. Em seguida colocou-se o politop no Banho-Maria a 55°C durante oito minutos, com o objectivo de eliminar os seres unicelulares.^[50] O frasco politop com a cultura foi agitado durante cinco a oito segundos no vortex de modo que os microrganismos se possam libertar do sedimento para o sobrenadante. Por fim retirou-se 200 µl do conteúdo do politop e foram colocados no centro da placa com meios de cultura e espalhados com ajuda de esferas de vidro, previamente esterilizadas. O espalhamento do inóculo foi efectuado por um movimento circular da placa sobre a bancada, Fig. 18.

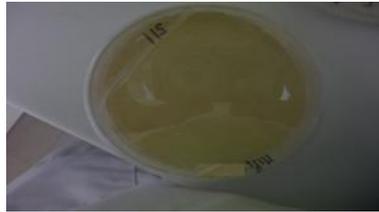


Figura 18 Placa de agar com cultura pelo método P₁.

2.2.4.1.1.2 Método P2

Este método refere-se à técnica de estampagem que consistiu em colocar pequenas quantidades de sedimento (que esteve vinte e quatro horas a secar na câmara de fluxo numa placa de Petri) em sete pontos da placa de meio de cultura, com ajuda de uma pequena “bolinha” de algodão previamente esterilizada. O algodão tocou primeiramente no agar para que este tenha humidade que lhe permita agarrar o sedimento seco, depois tocou-se no sedimento e outra vez no meio de cultura na placa de Petri.^[50] Fig. 19.

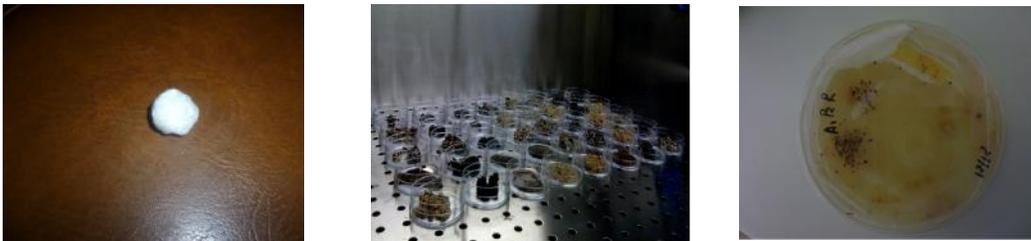


Figura 19. Materiais utilizados para cultura com método P₂ e placa de cultura

Para cada placa de Petri usou-se uma “bolinha” estéril de algodão diferente. Após o espalhamento da amostra e estampagem, todas as placas foram cobertas com as respectivas tampas e seladas com parafilme.

Os processamentos para cada amostra foram feitos pelos dois métodos e em quatro meios de cultura distintos, A₁, ½ A₁, M₁ e SWA, contendo todas a ciclohexamida a uma concentração de 100µg/L.^[36,37] A incubação é feita invertendo a placa numa estufa a temperatura compreendida entre 27°C e 30°C e controladas diariamente. A propagação das estirpes purificadas foi efectuada em meio de cultura líquida

A₁. Esta consiste em retirar uma colónia isolada com uma ansa descartável de 10µL para um Ernenmeyer de vidro de 100mL com 25 ml de cada meio líquido. Os balões com as suspensões celulares foram incubados a 28°C com agitação a 130 rpm, até se observar crescimento bacteriano, Fig. 20.



Figura 20 cultura microbiana após propagação em 25 mL de meio A₁ líquido

Após propagação em 25 mL de meio, foram congeladas a -80°C, nove réplicas de 1mL cada em solução de glicerol a 10%. A cultura restante, foi transferida para um balão de 2L, contendo 1L de meio líquido A₁ ou A₁bfe+C, e incubada a 28° C sob agitação contínua 130 rpm num período de sete dias, Fig.21



Figura 21. Cultura microbiana propagada em 1L de meio.

Tabela.5 Sedimentos processados.

Região	Amostra	Coordenadas GPS	Profundidade	Método colheita	Método de isolamento	Meio de cultura de isolamento
Açores	AZ10_10	Santa Maria 25°10.235N,36°56.471W	10 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_13	Santa Maria 25°10.235N,36°56.471W	10 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_19	Santa Maria 25°10.235N,36°56.471W	10 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_34	Santa Maria 25°10.235N,36°56.471W	10 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_37	Santa Maria 25°10.235N,36°56.471W	10 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_100	Ponta Delgada 25°37.687N,37°44.601W	15 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_150	Ponta Delgada 25°37.687N,37°44.601W	15 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_172	Ponta Delgada 25°38.246N,37°44.619W	10 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_202	Ponta Delgada 25°38.246N,37°44.619W	10 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_207	Ponta Delgada 25°38.246N,37°44.619W	10 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA

Açores	AZ10_212	Ponta Delgada 25°38.246N,37°44.619W	10 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_222	Ponta Delgada 25°38.246N,37°44.619W	10 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_242	Ponta Delgada 25°34.199N,37°44.358W	15 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_292	Ponta Delgada 25°34.199N,37°44.358W	15 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_302	Ponta Delgada 25°35.845N,37°44.565W	17 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_322	Ponta Delgada 25°35.845N,37°44.565W	17 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_333	Ponta Delgada 25°35.845N,37°44.565W	17 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_352	Ponta Delgada 25°35.845N,37°44.565W	17 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_439	Ponta Delgada 25°41.005N,37°43.005W	16 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_456	Ponta Delgada 25°41.005N,37°43.005W	16 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_466	Ponta Delgada 25°41.005N,37°43.005W	16 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_485	Ponta Delgada 25°41.005N,37°43.005W	16 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Açores	AZ10_496	Ponta Delgada 25°41.005N,37°43.005W	16 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Madeira	PS11_001	Porto Santo 33°03.145N,16°17.120W	17m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Madeira	PS11-002	Porto Santo 33°03.145N,16°17.120W	17 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Madeira	PS11_003	Porto Santo 33°03.193N,16° 7.042W	17 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Madeira	PS11-004	Porto Santo 33°03.193N,16°17.042W	17 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Madeira	FG11_001	Formigas 37° 16.102N,24° 46.15W	31 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Madeira	FG11_002	Formigas 37° 16.102N,24° 46.15W	31 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Madeira	FC11_001	Funchal 32°40.615N,17°05.483W	45 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Madeira	FC11_002	Funchal 32°40.615N,17°05.483W	45 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Madeira	FC11_003	Funchal 32°40.615N,17°05.483W	45m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Madeira	FC11_004	Funchal 32°40.615N;17°05.483W	45 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Madeira	SM11_001	Santa Maria 36°56.102N;25°05.526W	29 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Madeira	SM11_002	Santa Maria 36°56.102N;25° 5.526W	29 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Madeira	SM11_003	Santa Maria 36°56.102N,25° 5.526W	29 m	mergulho	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Portugal Continental	SS11_001	Sesimbra 38°28'37N 8°58'54.839W	4 m	apneia	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Portugal Continental	SS11_002	Sesimbra 38°28'37N,38°58'54.839W	4 m	apneia	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Portugal Continental	SS11_003	Sesimbra 38° 28' 37N 8°58'54.839W	4 m	apneia	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Portugal Continental	SS11_004	Sesimbra 38° 28' 37N 8°58'54.839W	4 m	apneia	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Portugal Continental	SS11_005	Sesimbra 38° 28' 37N 8°58'54.839W	4 m	apneia	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA
Portugal	SS11_006	Sesimbra	4 m	apneia	P ₁ , P ₂	A ₁ , ½ A ₁ , M ₁ , SWA

2.2.4.1.2. Extração de Extratos ou Crudes

Após os sete dias de incubação das culturas em meio líquido de 2L, iniciou-se a extração a extração química de compostos com vista a obter crudes finais. Esta partiu de uma decantação simples. O meio de cultura foi colocado num balão de decantação com 2L de capacidade e extraiu-se os compostos com cerca de 1L de acetato de etilo, Fig. 22. Mediu-se o pH das culturas com papel de pH, antes de iniciar o processo, devendo o valor situar-se entre 7.0 e 8.0. Descartou-se o material celular, a mistura restante foi colocada num balão de 500 mL e evaporada no rotavapor. O peso dos extractos finais, foi registado posteriormente à secagem (mínimo 24 horas) das amostras em vácuo.



Figura 22. Cultura microbiana em extração por solvente orgânico.

2.2.4.1.3 Determinação de Actividade Antibacteriana e Citotóxica

Para avaliação do potencial biotecnológico das estirpes em estudo, foi avaliada a actividade antimicrobiana dos seus extratos por determinação da concentração mínima inibitória (MIC-Minimal Inhibitory Concentration) e avaliado o efeito bacteriostático ou bacteriolítico por determinação do número de unidades formadoras de colónias (CFU-Colony Forming Unit).

2.2.4.1.3.1 Bactérias Patogénicas Utilizados nos Ensaio Microbiológicos

Para avaliação da actividade antimicrobiana foram utilizadas duas estirpes bacterianas de Gram positivo multirresistentes: COL, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA, de Methicillin-Resistant *S. aureus*) e EF82, *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (VRE, de Vancomycin-Resistant *Enterococcus*), cedidas por H. de Lencastre (ITQB-UNL) e R. Mato (FCT-UNL), pertencentes à colecção de culturas do laboratório do Dep. Ciências da Vida (DCV) (Resp. Ilda Sanches).

Foram seguidos os procedimentos de acordo com as recomendações de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e com base em métodos descritos anteriormente para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana.^[36,37]

2.2.4.1.3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

O MIC foi definido como a concentração mínima de composto capaz de inibir o crescimento bacteriano, após o período de incubação apropriado.

Os ensaios para avaliação de actividade antibacteriana *in vitro* dos compostos químicos presentes nos crudes foram feitos por teste de microdiluição nas placas de 96 poços (12 colunas e 8 linhas) preenchidos com meio BHI, Fig. 23.



Figura 23. Placa de 96 poços

Fez-se o controlo de qualidade e esterilidade do meio de cultura BHI e o controlo da viabilidade das culturas das estirpes que foram propagadas previamente em 10 ml de meio líquido BHI e incubadas por 24h.

Para os ensaios, foi preparada uma solução de [10mg/mL] em Dimetil Sulfoxido (DMSO), para cada amostra de crude. As culturas foram usadas a uma D.O.₆₀₀ entre 0,04 e 0,06, correspondendo a uma concentração aproximada de 3×10^7 CFU/mL. Usou-se a vancomicina a uma concentração de [1mg/ml], como controlo positivo, no caso da estirpe VRE que é resistente à van cómica e da estirpe MRSA que é susceptível à vancomicina. A avaliação da actividade antimicrobiana para cada extracto, foi feita a concentrações compreendidas entre $0,25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ a $0,25 \times 10^{-10} \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (ver Tabela 6).

2.2.4.1.3.3 Protocolo do Ensaio para Determinação do MIC

- 1) Adicionou-se 195 μL da suspensão celular na linha A (poços 1a12)
- 2) Adicionou-se 100 μL da suspensão celular nas linhas seguintes B a F (poços 1a 10).
- 3) No poço 11 da linha A foi acrescentado 5 μL de DMSO, fazendo assim um controlo positivo da viabilidade das células, confirmando que o DMSO não inibe a multiplicação celular.
- 4) No poço 12 da linha A adicionou-se 5 μL vancomicina [1mg/mL], como descrito.
- 5) Adicionou-se 5 μL de extracto de em estudo em cada um dos poços da linha A excepto coluna, 11 e 12.
- 6) Fez-se diluições seriadas, retirando uma alíquota de 100 μL do poço precedente para o subsequente até a linha F. Fez-se a homogeneização, antes de cada pipetagem. Descartou-se alíquotas retiradas da linha F. vide tab 6.
- 7) A leitura dos resultados foi feita após um período compreendido entre de 18 a 24 horas incubação a 37°C

Tabela 6 concentrações do químico na placa de 96 poços [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]

#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25		
B	0,25E-02											
C	0,25E-04											
D	0,25E-06											
E	0,25E-08											
F	0,25E-10											

De 1 a 10 é a disposição de diferentes amostras de crude. Nas colunas (A a F) é a diluição seriada da mesma amostra.

2.2.4.1.3.4 Determinação da Actividade Bacteriostática/Bacteriolítica

Com base nos resultados obtidos no ensaio de determinação de CMI, fizeram-se os testes para determinação da actividade bacteriostática (inibição do crescimento bacteriano) ou bacteriolítica (destruição da bactéria) dos extractos testados. Os testes basearam-se na avaliação de capacidade de multiplicação das células bacterianas após terem sido inibidas (não se verificou crescimento) na presença de uma determinada concentração do composto. Para o efeito foram pipetadas 5 μl da cultura inibida para um tubo *falcon* com 5 ml de meio BHI. Após incubação a 37°C durante 24 horas registou-se o resultado (verificar presença/ausência de crescimento bacteriano).

2.2.4.1.3.5 Contagem das Unidades Formadoras de Colónias (CFU)

Para a contagem dos CFU's escolheram-se aleatoriamente três culturas de MRSA e VRE da placa de 96 poços em que se observou ter havido crescimento e todas as culturas de ambas as estirpes em que se observou inibição de crescimento. Retirou-se 10 μL de cada e fez-se quatro diluições seriadas: 10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} . Destas foi retirada uma alíquota de 20 μL para placa de Petri com meio BHI sólido dividida em 24 quadrículas (Fig. 24). Em cada quadrícula foi colocada uma diluição. Fez-se a incubação a 37°C durante 18 a 24h.

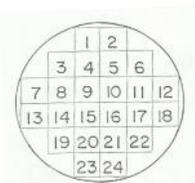


Figura 24. Esquema de distribuição das concentrações na placa

2.2.4.1.3.6 Ensaios Citológicos

A determinação da actividade anticancerígena foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia de Universidade de Lisboa.

Nos resultados apresentados constam os compostos mais e menos activos, diferenciação esta feita com base nos compostos que apresentam uma redução de viabilidade celular superior a 80% para a concentração de 0,0195mg/mL).

2.3 Estudos Químicos

2.3.1 Materiais e Métodos

Reagentes

Acetato de Etilo

Riedel-dehaen

Metanol

Carlo Erba

UN: 1230

CAS: 67-56-1

EEC: 200-659-6

Clorofórmio

Valente e Ribeiro

CE: 000-000-0

ONU: 1208

CAS: 75-09-1

EINECS: 203-452-2

Produto: 23373.320

Hexano

Valente e Ribeiro. Lda.®

CE: 000-000-00-0

ONU: 1208

CAS: 92112-69-1

EINECS: 295-570-2

Materiais

Areia do mar

MERCK

Diâmetro 0,1- 0,315 mm

Subst. Solúvel: 0,5%

Perda por combustão 900°

C 0,5%

TA 1676911-050

Sílica gel

Scharlau

Sílica gel 60

Diâmetro 0,04- 0,06 mm

230-400 Mesh ASTM

Batch: 11933501

Alumina em pó

Óxido de alumina neutro

Scharlau

Diâmetro. 0,05-0,2mm 70-

290mesh ASTM

Batch:81598

Semi-preparativa Alumina

Óxido de alumínio 60, F254

Merk

Espessura: 1,5mm

TLC Sílica

Sílica gel 60, 0,04-0,06

mm 230-400 mesh

ASTM- Merk

Semi-preparativa

Óxido de alumínio 60,

F254

Espessura: 0,2mm

RP-18 (Sílica de fase reversa)

RP-18, granulometria 40-

60µm,Merck

2.3.2 Técnicas/Equipamentos

Espectrofotómetro Infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho foram registados num espectrofotómetro de transformada de Fourier Perkin Elmer 683, em células de cloreto de sódio (NaCl).

Espectrofotómetro Ultra violeta (UV)

Os espectros no ultravioleta foram registados num espectrofotómetro UNICAM, modelo He os . O metanol (MeOH) foi usado com solvente. Os resultados estão apresentados pelos máximos de comprimentos de ondas de absorção.

Espectroscopia de massa

Os espectros da massa foram realizados pelo Doutor João Ferreira Borges no Laboratório de Análises, dirigido pela Professora Maria do Rosário Bronze na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa utilizando um espectrofotómetro de massa triploquadrupolo, marca Micro Mass Quattro micro (Micromass, Waters, Ireland), com software MassLynx, versão 4.1.

As amostras foram injectadas no espectrómetro em modo ião positivo (ESI+). A temperatura da fonte foi de 120°C e 350°C para o capilar e uma tensão de 4.0 kV. Usou-se o Árgon como gás na câmara de colisão. Para maximizar os sinais, usou-se uma voltagem de 20 a 30 eV uma energia de colisão de 10-40eV. Operou-se em dois modos: Spectrum Scan mode (MS Scan) para detecção do ião molecular e Daughter Ion Spectrum mode (Daughter Scan), para a fragmentação do mesmo.

Cromatografia em Camada Fina (c.c.f.)

As cromatografias em camada fina em sílica e alumina, foram efectuadas em placas de sílica Merck Kiesel gel 60, 0,04-0,06 mm,230-400 mesh ASTM- Merck Kiesel gel e/ou placas de óxido de alumínio Merck neutro 60.

2.3.3 Identificação dos Compostos

A identificação dos compostos decorreu sobre os extractos pré-extraídos da estirpe CNX-874. Esta provém da amostra AZ10-450-1-A colhida nos Açores na Ilha de São Miguel, nas seguintes coordenadas GPS: 25°41.005N;37°43.005W, a dezasseis metros de profundidade.

Isolada do meio $\frac{1}{2}$ A₁, por método P₂, as colónias apresentavam cores vermelho escuro com esporos cinzas densos. O crude foi obtido a partir de uma propagação em 10 L.

2.3.3.1 Procedimento Experimental

Anteriormente a este trabalho, foi levada a cabo um estudo preliminar, sobre extracto obtido da mesma estirpe. Baseando-se no perfil UV-vis, e na dereplicação, foi constatada a presença das prodigiosinas nas últimas fracções.

Para obtenção de fracções pura com vista uma melhor identificação dos compostos, o extracto em estudo foi submetida a fraccionamento por cromatografia em camada fina, procedendo da seguinte forma:

O extracto em estudo foi primeiramente fraccionado por cromatografia utilizando RP-18, de granulometria 40- 60 μm como fase estacionária com seguintes eluentes: H_2O , acetonitrilo (ACN), MeOH, ácido Trifluoroacético (TFA) e CH_2Cl_2 em diferentes proporções (v/v) indicadas na figura 25.

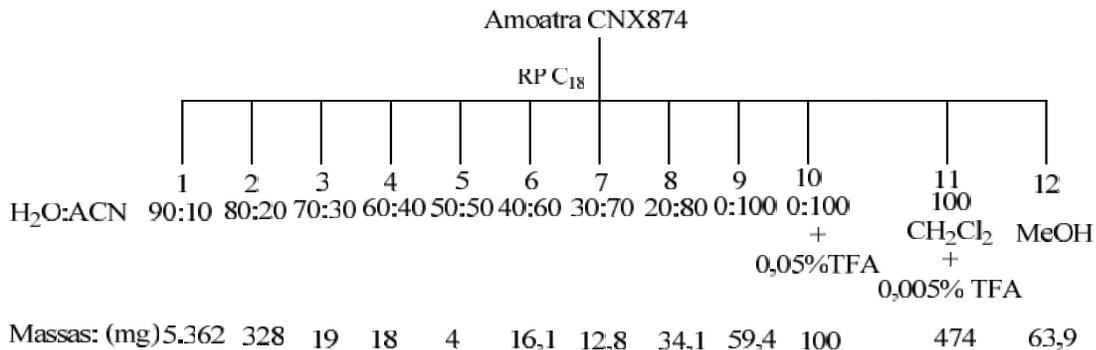


Figura 25. Esquema de fraccionamento de amostra do crude CNX-874

Com base nos resultados de estudos preliminares, foi pela Doutora Susana S.Gaudêncio, que deu indicações da presença das prodigiosinas a partir da fracção CNX-874-7, decidiu-se trabalhar-se sobre as Fracções CNX-874-9, CNX-874-10.

2.3.3.1.1 Purificação das Fracções

2.3.3.1.1.1 Fracções CNX-874-9 e CNX-874-10

Estas fracções foram refraccionadas por semi-preparativa em placa de óxido de alumínio (Al_2O_3), como fase estacionária. Usou-se como eluente o CHCl_3 e AcOEt na proporção de 9,5: 0,5 (v/v).

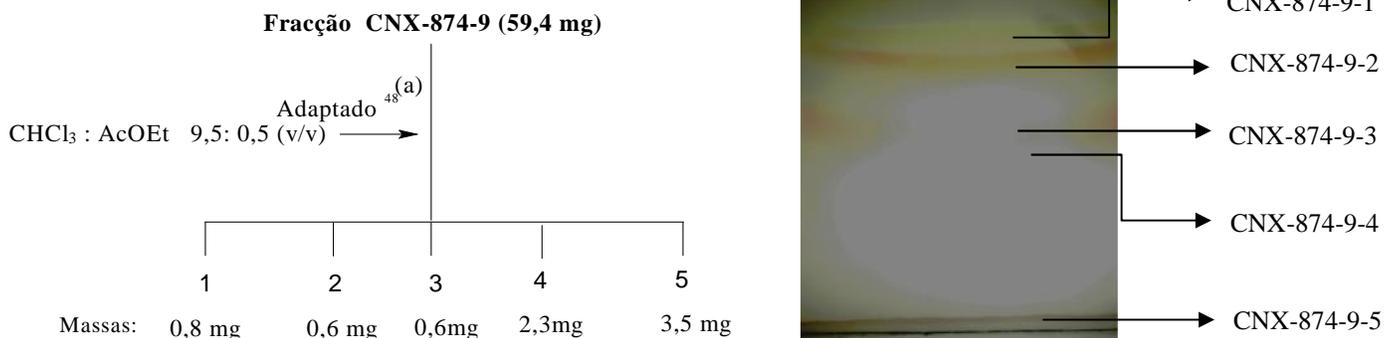


Figura 26. Refraccionamento CNX-874-9

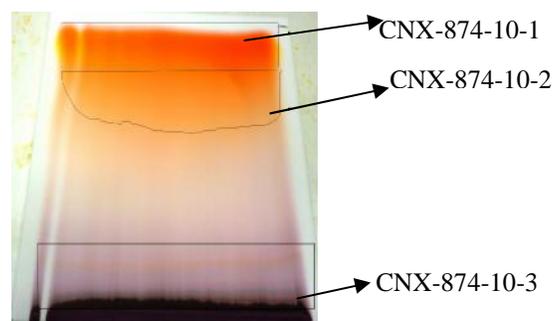


Figura 27. Refracção da fracção CNX-874-10

Após eluição, as sub-fracções CNX-874-9-2 e CNX-874-10-1, que aparentavam o mesmo factor de retenção (R_f). Para a sua confirmação fez-se TLC para essas fracções em que ambas foram postas uma ao lado da outra para uma comparação directa dos R_f . Usou-se a seguinte condição: Eluente: CHCl_3 : AcOEt em proporção de 9:1 (v/v), em Alumina. ^[30]

O resultado mostrou que as fracções tinham alguns compostos idênticos entre ambas.

R_f das sub-fracções: CNX-874-2 = 0; 0,38 e CNX-874-1 = 0; 0,30; 0,38. Assim decidiu-se reuni-las e refraccionar por semi-preparativa de Al_2O_3 como segue abaixo, usando os mesmos eluentes e a mesma proporção usada para comparar os R_f .

Fracção CNX-874-10-1 + CNX-874-9-2 (21,6 mg)

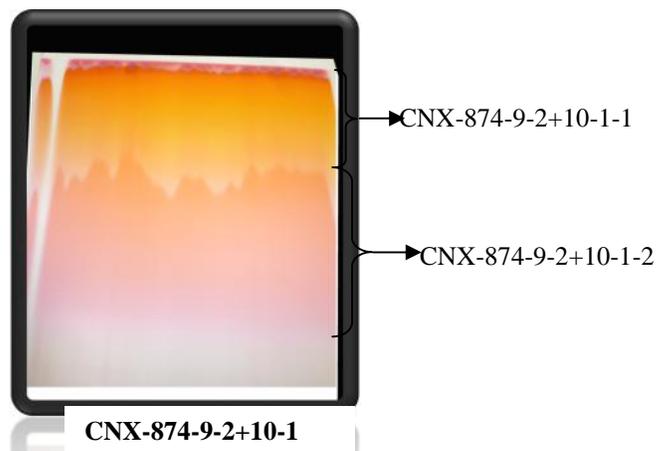
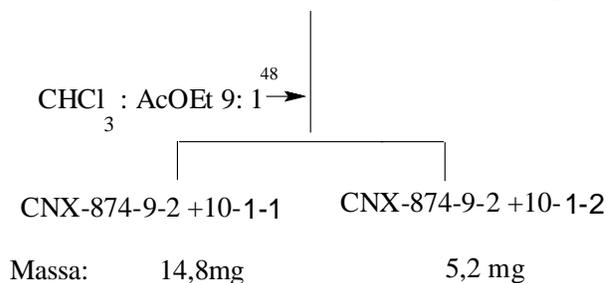


Figura 28. Refracção da fracção CNX-874-9-2+10-1

As duas fracções obtidas da purificação precedente, cada uma constituía uma mistura de fracções, Fig.30, razão pela qual foram refraccionadas por semi-preparativa em placa de Al_2O_3 , tendo usado o

CHCl_3 como eluente. Desta purificação obteve-se duas sub-fracções CNX-874-9-2+10-1-1 e CNX-874 9-2+10-1-2 cuja massa se encontra indicada por debaixo das respectivas fracções, Fig.29.

2.3.3.1.1.2 Fraccionamento da fracção CNX-874-10-1 + CNX-874-9-2

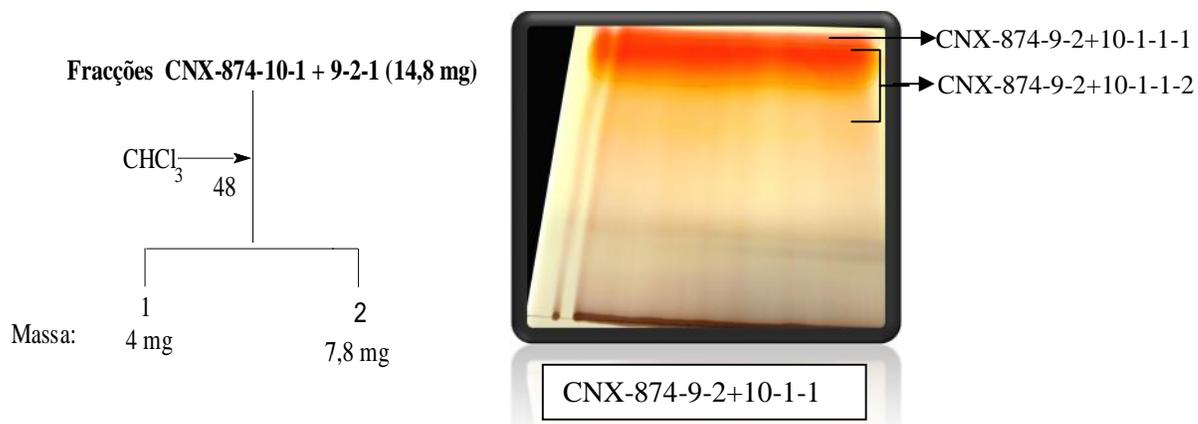


Figura 29. Fraccionamento da fracção CNX-874-9-2+10-1-1

Para o refraccionamento desta fracção, usou-se o CHCl_3 como eluente, em semi-preparativa de alumina.

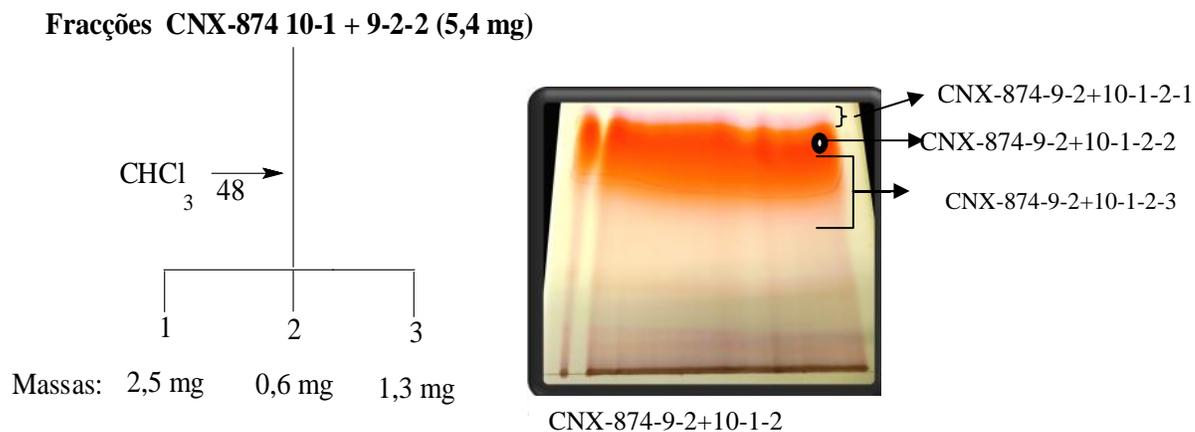


Figura 30 Refraccionamento da fracção CNX-874-9-2+10-1-2

No total obteve-se 10 fracções, entre quais, quatro nomeadamente CNX-874 (9-2+10-1) -2-3, CNX-874-9-2+10-1-1-1, CNX-874-9-2+10-1-1-2 e CNX-8749-1 foram escolhidas para a identificação de composto.

Capítulo 3. Resultados e Discussão

3.1 Estudos Microbiológicos

Os actinomicetos são microrganismos com um crescimento lento, podendo durar até 7 dias antes de começarem a crescer, nos meios A₁, ½ A₁, M₁. No meio de cultura SWA, o crescimento destes microrganismos, só se observou após um período entre 2 a 3 meses depois da data de cultura. A morfologia dos actinomicetos esporolados foi variando com o tempo, uns passado de cor branca para cor-de-cinza (em maioria dos casos) e outros cuja cor permanece igual ao longo do tempo, ver fig. 31.



Figura 31 Morfologia de algumas estirpes isoladas.

Um dos aspectos característico dos actinomicetos que crescem no meio SWA é o padrão da pigmentação e forma inicial, (pontos pretos) que com o decorrer do tempo ficam rosas, e raramente têm esporos. Na tabela 7 estão sumarizados os resultados obtidos de crescimento de cada estirpe, as descrições das mesmas, condições de crescimento e a quantidade do extrato obtido.

Tabela 7. Descrição de estirpes de Actinomicetos

Estirpe	Amostra	Coordenada GPS	Descrição de colônia	Meio Sólido	Meio Líquido	Cong	Ext.	Crude (mg)	pH
PTA-001	AZ10-322-A	25° 35'845N 37° 44,565W	Branco com esporos brancos	A1P2	A1	Sim	Sim	51,2	8,0
PTA-002	AZ10-439-A-1	25° 41'005N 37° 43'005W	Verde com esporos brancos	A1P1	A1	Sim	Sim	51,5	7,5
PTA-003	SS11-004-G	38°28' 37N 38°58'54W	Castanho com esporos brancos	A1P2	A1	Sim	Sim	52,7	7,5
PTA-003	SS11-004-G	38° 28' 37N 38°58'54W	Castanho com esporos brancos	A1P2	A1bfe+C	Não	Sim	35,1	7,0
PTA-004	PS11-004-A	33°03,193N 16°17,042W	Cinzento com esporos cinzentos	A1P2	A1	Sim	Sim	33,2	7,5
PTA-004	PS11-004-A	33°03,193N 16°17,042W	Cinzento com esporos cinzentos	A1P2	A1bfe+C	Não	Sim	33,6	7,0
PTA-005	SS11-003-C-1	38° 28' 37N 38°58'54W	Branco com esporos cinzentos	A1P2	A1	Sim	Sim	9,8	7,0
PTA-005	SS11-003-C-1	38° 28' 37N 38°58'54W	Branco com esporos cinzentos	A1P2	A1bfe+C	Não	Sim	40,9	7,0
PTA-006	SS11-001-E-1-A	38° 28' 37N 38°58'54W	Bege com esporos cinzentos	A1P2	A1	Sim	Sim	52,5	7,5
PTA-006	SS11-001-E-1-A	38° 28' 37N 38°58'54W	Bege com esporos cinzentos	A1P2	A1bfe+C	Não	Sim	20,2	8,0
PTA-007	SS11-003-G-1	38° 28' 37N 38°58'54W	Bege com esporos cinzentos	A1P1	A1	Sim	Sim	44,1	7,5
PTA-008	SS11-003-G-1	38° 28' 37N 38°58'54W	Bege com esporos cinzentos	A1P2	A1	Sim	Sim	19,1	7,0
PTA-009	SS11-004-F-1-A-1	36° 56,102N 25°05,526W	Bege com esporos brancos	A1P1	A1	Sim	Sim	22,6	7,5
PTA-009	SS11-004-F-1-A-1	36° 56,102N 25°05,526W	Bege com esporos brancos	A1P1	A1bfe+C	Não	Sim	38,4	7,5

Tabela 7. Descrição de estirpes de Actinomicetos (continuação)

PTA-010	SM11-002-A-1	25° 38,246N 37° 44,619W	Bege com esporos cinzentos	½ A1P1	A1	Sim	Sim	4,5	7,5
PTA-011	SM11-002-A-1	36° 56,102N 25°05,526W	Cinzento com pontos pretos e líquido brilhante	½ A1P2	A1	Sim	Sim	14,4	7,0
PTA-012	AZ10-202-A	25° 35,845N 37° 44,565W	Verde cinza com esporos bege	½ A1P1	A1	Sim	Sim	20,5	7,5
PTA-013	SM11-001-B-1	25° 35,845N 37° 44,565W	Bege com esporos cinzentos e pontos pretos	½ A1P1	A1	Sim	Sim	23,4	7,5
PTA-014	AZ10-322-A-1	25° 41,005N 37° 43,005W	Amarelo com esporos brancos	SWAP1	A1	Sim	Sim	89,7	6,5
PTA-015	AZ10-333-B	36° 56,102N 25°05,526W	Branco com esporos cinzentos	½ A1P2	A1	Sim	Sim	10,2	7,5
PTA-016	AZ10-496-A-1	36° 56,102N 25°05,526W	Bege com pontos vermelhos	½ A1P2	A1	Sim	Sim	27,5	7,5
PTA-016	SM11-001-B-3-A	36° 56,102N 25°05,526W	Vermelho e rosa brilhante	½ A1P2	A1bfe+C	Não	Sim	19,5	7,5
PTA-017	SM11-003-A-1	25° 35,845N 37° 44,565W	Bege com esporos cinza e pontos brancos	½ A1P1	A1	Sim	Sim	14,4	7,5
PTA-018	SM11-003-A-1	36° 56,102N 25°05,526W	Vermelho com esporos Cinzentos	½ A1P2	A1	Sim	Sim	25,9	8,0
PTA-018	AZ10-352-A-1-B	36° 56,102N 25°05,526W	Vermelho com esporos Cinzentos	½ A1P2	A1bfe+C	Não	Sim	84,8	8,0
PTA-019	SM11-001-A-1	25° 38,246N 37° 44,619W	Branco com esporos cinzentos	½ A1P1	A1	Sim	Sim	57,5	7,0
PTA-020	SM11-001-A-1	25° 38,246N 37° 44,619W	Bege com esporos brancos	½ A1P1	A1	Sim	Sim	15,3	8,0
PTA-021	Igual a PTA-010	38° 28' 37N 38°58'54W	Bege com esporos brancos	A1P2	A1	Sim	Sim	6,8	7,0
PTA-022	AZ10-202-B-1	25° 35,845N 37° 44,565W	Cinzento com esporos Cinzentos	½ A1P1	A1	Sim	Sim	21,6	7,5
PTA-023	SS11-03-D-2-A	36° 56,102N 25°05,526W	Castanho claro com esporos brancos	A1P2	A1	Sim	Sim	34,7	7,0
PTA-024	AZ10-333-A	25° 35,845N 37° 44,565W	Bege com esporos brancos	A1P2	A1	Sim	Sim	94,8	7,5
PTA-024	SS11-003-F-1-A	36° 56,102N 25°05,526W	Bege com esporos brancos	A1P2	A1bfe+C	Não	Sim	120,6	8,0
PTA-025	SS11-004-G-1-C	36° 56,102N 25°05,526W	Vermelho com esporos Cinzentos	½ A1P2	A1	Sim	Não	-	-
PTA-026	SS11-004-G-1-C	36° 56,102N 25°05,526W	Laranja com esporos pretos	A1P2	A1	Sim	Sim	43,0	8,0
PTA-027	SM11-002-A-1-A-2	25° 38,246N 37° 44,619W	Laranja com esporos Castanhos	SWAP2	A1	Não	Sim	23,4	7,5
PTA-028	SS11-003-I-A	36° 56,102N 25°05,526W	Bege com esporos bege E pontos brancos	A1P2	A1	Não	Sim	14,6	7,0
PTA-029	AZ10-202-A	25°38.246N, 37°44.619W	Bege com esporos brancos e pontos pretos	A1P2	A1	Não	Sim	23,9	8,0
PTA-030	SM11-003-I-1	25° 38,246N 37° 44,619W	Bege com esporos brancos	M1P1	A1	Não	Não	-	-
PTA-031	SS11-003-C-1-B	36° 56,102N 25°05,526W	Branco com esporos cinzentos esverdeados	M1P2	A1	Não	Não	-	-
PTA-032	SS11-004-C-1	36° 56,102N 25°05,526W	Bege com esporos cinzentos	½ A1P1	A1	Não	Não	-	-
PTA-033	AZ10-333-B-1	25° 35,845N 37° 44,565W	Laranja brilhante	A1P2	A1	Não	Não	-	-
PTA-034	SM11-003-A	25° 38,246N 37°44,619W	Bege com esporos azuis	SWAP2	A1	sim	sim	9,2	7,0
PTA-034B	SM11-003-A	25° 38,246N 37°44,619W	Bege com esporos azuis	SWAP2	A1bf+C	sim	sim	7,8	8,0
PTA-035A	FC11-003-D-1	32° 40.615N 17°05.483W	Laranja com esporos laranja	A1P1	A1	sim	sim	7,0	7,5
PTA-035B	FC11-003-D-1	32° 40.615N 17°05.483W	Laranja com esporos laranja	A1P1	A1bfe+C	sim	sim	25,0	7,5
PTA-036A	FG11-001-A-1	37°16.102N 24°15.526W	Laranja com esporos coral	SWAP2	A1bfe+C	sim	sim	10,7	7,5
PTA-036B	FG11-001-A-1	37°16.102N 24°15.526W	Laranja com esporos coral	SWAP2	A1bfe+C	sim	sim	10,4	7,5

Cong= congelamento; Ext= Extracção

Tabela 8 Descrição de estirpes de unicelulares

Estirpe	Amostra	Coordenadas GPS	Descrição de colônia	Meio Sólido	Meio Líquido	Cong.	Ext.	Crude (mg)	pH
PTU-001	SS11-005-A	38°28'37N 8°58'54W	Salmão	A1P2	A1	Sim	Sim	15,2	7,5
PTU-002	SS11-003-A	38°28'37N 38°58'54W	Amarelo-torrado	A1P1	A1	Sim	Não	--	-
PTU-003	FG11-002-A-3	37°16.102N 24°15.526W	Amarelo-torrado	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-004	SS11-004-D-1	38°28'37N 38°58'54W	Amarelo	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-005	SS11-001-B	38°28'37N 38°58'54W	Amarelo	A1P2	A1	Sim	Sim	9,8	7,5
PTU-006	AZ10-207-A	25°38'24N 37°44.61W	Amarela torrado	A1P1	A1	Sim	Não	--	-
PTU-007	PS11-002-A	33°03.145N 16°17.12W	Amarelo	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-008	SS11-001-A-1	38°28'37N 38°58'54W	Salmão	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-009	AZ10-19-A	25° 10.23N 36° 56.47W	Amarelo	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-010	PS11-001-A	33°03.145N 16°17.120W	Amarelo	A1P1	A1	Sim	Não	--	-
PTU-011	FC11-001-A	32° 40.615N 17°05.483W	Amarelo	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-012	FC11-004-A	32° 40.615N 17°05.483W	Amarelo	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-013	SS11-003-B	38°28'37N 38°58'54W	Amarelo-torrado	A1P1	A1	Sim	Não	--	-
PTU-014	FG11-001-A	37°16.102N 24°15.526W	Amarelo claro	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-015	PS11-003-B	33°03.193N 16°17.042W	Amarelo-torrado	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-016	AZ10-302-A	25° 35.845N 37° 44.565W	Bege	A1P2	A1	Sim	Sim	18,3	7,0
PTU-017	PS 11-03-A	33°03.193N 16°17.042W	Laranja	½ A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-018	FC11-001-A	32° 40.615N 17°05.483W	Amarelo Laranja	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-019	FG11-002-A-3	37°16.102N 24°15.526W	Amarelo-torrado	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-020	SS11-04-C-1-B	38°28'37N 38°58'54W	Salmão	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-021	FG11-001-B	37°16.102N 24°15.526W	Amarelo Laranja	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-022	SS11-004-B-1	38°28'37N 38°58'54W	Salmão	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-023	AZ10-10-A-1	25° 10.235N 36° 56.471W	Laranja Salmão	½ A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-024	AZ10-13-B	25° 10.235N 36° 56.471W	Laranja	A1P1	A1	Sim	Sim	21,3	7,0
PTU-025	AZ172-A-1	25° 38.246N 37° 44.619W	Laranja Brilhante	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-026	SS11-05-A	38° 28' 37N 38°58'54W	Salmão	A1P2	A1	Sim	Não	6,1	7,5
PTU-027	SS11-04-F-2-A	38° 28' 37N 38°58'54W	Amarelo claro	A1P2	A1	Sim	Não	64,5	6,5
PTU-028	SS11-01-D-1-A	38° 28' 37N 38°58'54W	Amarelo Pálido	A1P2	A1	Sim	Não	9,8	7,5
PTU-029	SS1104-B-1	38° 28' 37N 38°58'54W	Salmão	A1P2	A1	Sim	Não	102,4	7,5
PTU-030	SS1105-B	38° 28' 37N 8°58'54W	Amarelo	A1P1	A1	Sim	Não	--	-
PTU-031	SS11001-A-1	38° 28' 37N 38°58'54W	Salmão	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-032	AZ10-456	25° 41.005N 37° 43.005W	Castanho	A1P1	A1	Sim	Não	--	-
PTU-033	SS11-04-B-2	38° 28' 37N 38°58'54W	Amarelo	A1P1	A1	Sim	Não	--	-
PTU-034	SS11-04-C	38° 28' 37N 38°58'54W	Salmão	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-035	SS11-05-C	38° 28' 37N 38°58'54W	Laranja brilhante	A1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-036	AZ10-333-A	25° 35.845N 37° 44.565W	Bege	½ A1P2	A1	Sim	Não	--	-

Tabela 8 Descrição de estirpes de unicelulares (continuação)

PTU-037	AZ10-333-C	25° 35.845N 37° 44.565W	Bege	½ A1P2	A1	Sim	Não	29,2	7,5
PTU-038	FG11-002-A-1-A	37°16.102N 24°15.526W	Amarelo	A1P2	A1	Sim	Não	1,1	7,5
PTU-039	FG11-001-A	37°16.102N 24°15.526W	Amarelo-torrado	M1P2	A1	Sim	Não	--	-
PTU-040	FG11-002-A-2	37°16.102N 24°15.526W	Laranja brilhante	A1P2	A1	Sim	Não	43,3	7,0
PTU-041	AZ10-292	25° 34.199N 37° 44.358W	Laranja	SWAP2	A1	Sim	Não	--	-

Com estes resultados, e fazendo uma comparação em termos de meios, métodos culturas e características das estirpes segundo a localização geográfica, nota-se:

O meio A₁ é muito favorável ao crescimento de organismos unicelulares, contrariamente ao meio ½ A₁ onde cresce predominantemente os actinomicetos.

O meio SWA caracteriza-se pela sua selectividade favorecendo mais o crescimento de actinomicetos.

Existe uma grande semelhança entre os meios ½ A₁ e M₁ na maioria dos casos a nível de morfologia como quantidade dos microrganismos que nestes meios crescem.

As amostras recolhidas na zona de Santa Maria e Sesimbra são as únicas onde crescem actinomicetos de cor vermelha. É aqui também que aparece uma estirpe de actinomicetos com esporos brancos e pontos pretos que excreta um líquido para o meio.

As amostras colhidas no Funchal são as que apresentam um crescimento muito baixo de actinomicetos e os unicelulares são de cor amarela e de cor laranja. Fig. 32 e Fig. 33.

Das amostras de Formigas, conseguiu-se isolar poucos microrganismos.

Sesimbra é a localização que apresenta um maior número de actinomicetos isolados com cores que variam entre castanho, branco, bege e cinzento com esporos brancos ou cinzentos. Fig. 33 e Fig. 34.

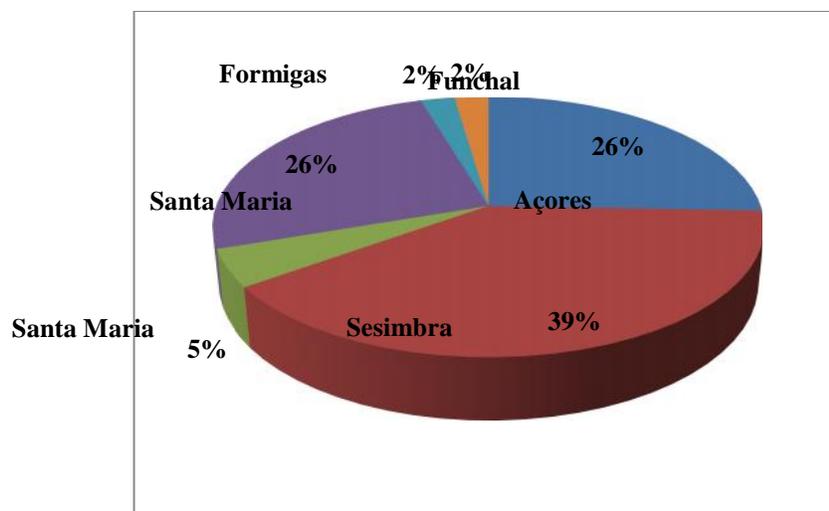


Figura 32. Percentagem geral das estirpes de actinomicetos isolados/ influência do tempo de conservação

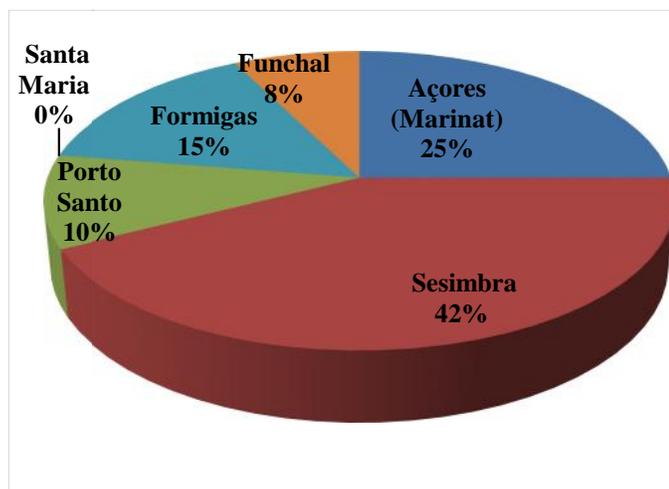


Figura 33. Percentagem geral das estirpes de unicelulares isolados/ influência do tempo de conservação

3.1.1 Ensaio Antimicrobianos

3.1.1.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Após 18 a 24 horas de incubação, fez-se a leitura dos resultados a olho nu comparando a turvação das culturas com as amostras (crudes) em estudo e os de controlos. Deste identificaram-se seis amostras que inibiram culturas de MRSA e VRE, Tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Crudes activos contra MRSA

Código de estirpe	Código de amostra (crude)	Método de isolamento	MIC [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
PTA-001A	AZ10-322-A	A1P2	MRSA <0.25
PTA-005A	SS11-003-C-1	A1P2	MRSA $<0.25 \times 10^{-10}$
PTA-017A	AZ10-352-A-1-B	$\frac{1}{2}$ A1P1	MRSA $<0.25 \times 10^{-2}$
PTA-020A	AZ10-202-B-1	$\frac{1}{2}$ A1P1	MRSA $<0.25 \times 10^{-2}$
PTA-021A	SS11-03-D-2-A	A1P2	MRSA $<0.25 \times 10^0$
PTA-026A	SS11-003-I-A	A1P2	MRSA $<0.25 \times 10^0$

Tabela 10. Crudes activos contra VRE

Código de estirpe	Código de amostra (crude)	Método de isolamento	MIC [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]
PTA-001A	AZ10-322-A	A1P2	VRE <0.25
PTA-005A	SS11-003-C-1	A1P2	VRE $<0.25 \times 10^{-8}$
PTA-017A	AZ10-352-A-1-B	$\frac{1}{2}$ A1P1	VRE $<0.25 \times 10^{-2}$
PTA-020A	AZ10-202-B-1	$\frac{1}{2}$ A1P1	VRE $<0.25 \times 10^{-4}$
PTA-021A	SS11-03-D-2-A	A1P2	VRE $<0.25 \times 10^0$
PTA-026A	SS11-003-I-A	A1P2	VRE $> 0.25 \times 10^0$

3.1.1.2 Avaliação de actividade bacteriolítica/ bacteriostática.

Na determinação de actividade bacteriostática/bacteriolítica dos químicos, três destes revelaram actividade bacteriolítica contra MRSA nomeadamente, crudes das estirpes PTA001A, PTA005A, PTA017A, PTAA, especificamente na concentração de 0,25µg/uL e nas restantes concentrações verificou-se actividade do tipo bacteriostática, tab 11. Para VRE houve seis crudes activos, um deles (código da estirpe PTA005A) exibiu actividade bacteriolítica apenas na concentração de 0,25µg/uL e bacteriostática nas outras concentrações. Os restantes crudes revelaram actividade bacteriostática em todas as concentrações para VRE, tab 12.

3.1.1.3 Ensaio por Macrodiluição

Tabela 11. Resultados dos extractos com a estirpe MRSA

Extracto	Concentração µg/ µ L	Resultado
PTA001A	5,00*10 ⁺⁰¹	Turvo
PTA005A	5,00*10 ⁺⁰¹	Transparente
TA005A	5,00*10 ⁻⁰¹	Turvo
PTA005A	5,00*10 ⁻⁰³	Turvo
PTA005A	5,00*10 ⁻⁰⁵	Turvo
PTA005A	5,00*10 ⁻⁰⁷	Turvo
PTA005A	5,00*10 ⁻⁰⁹	Turvo
PTA017A	5,00*10 ⁺⁰¹	Transparente
PTA017A	5,00*10 ⁻⁰¹	Turvo

Tabela 12. Resultados dos extractos com a estirpe VRE

Extracto	Concentração µg/ µ L	Resultado
PTA005A	5,00*10 ⁺⁰¹	Transparente
PTA005A	5,00*10 ⁻⁰¹	Turvo
PTA005A	5,00*10 ⁻⁰³	Turvo
PTA005A	5,00*10 ⁻⁰⁵	Turvo
PTA005A	5,00*10 ⁻⁰⁷	Turvo
PTA017A	5,00*10 ⁺⁰¹	Turvo
PTA017A	5,00*10 ⁻⁰¹	Turvo

Legenda: Transparente = sem crescimento microbiano; Turvo = crescimento microbiano

Estes resultados sugerem que os extractos das estirpes PTA005A, PTA017A exibem propriedade bacteriolítica anti-MRSA e anti-VRE a uma concentração de 0,25µg/µL.

3.1.1.4 Contagem das Unidades Formadoras de Colónias

A contagem baseou-se na seguinte fórmula:

$$\text{CFU (mL)} = N \cdot 1/D \cdot 1/I$$

Em que N= número de colónias contadas, I= volume do inóculo, D= o factor de diluição

Uma vez que usamos sempre um volume de inóculo de 20µl, o número de colónias foi multiplicado por 50 e pelo respectivo factor de diluição, tab 13

Tabela 13 contagem de CFU's- MRSA e VRE

Crude	[µg/µL]	Diluição	MRSA	VRE
PTA001A	0,25	10 ⁰	00	-
PTA001A	0,25	10 ⁻²	00	-
PTA001A	0,25	10 ⁻⁴	00	-
PTA001A	0,25	10 ⁻⁶	00	-
PTA005A	0,25	10 ⁰	00	00
PTA005A	0,25	10 ⁻²	00	00
PTA005A	0,25	10 ⁻⁴	00	00
PTA005A	0,25	10 ⁻⁶	00	00
PTA017A	0,25	10 ⁰	2,5*10 ⁵	-
PTA017A	0,25	10 ⁻²	00	-
PTA017A	0,25	10 ⁻⁴	00	-
PTA017A	0,25	10 ⁻⁶	00	-

Os resultados mostram que o extracto da estirpe PTA001A manifestou uma propriedade anti-MRSA de tipo bacteriostática e PTA005A uma actividade bacteriolítica contra MRSA e VRE. Por outro lado o extracto da estirpe PTA017 tem uma actividade bacteriostática. No entanto essas actividades foram confirmadas com os ensaios por macrodiluição.

3.1.2 Ensaios Anticancerígenos

Das amostras do crude testadas, seis mostraram uma actividade citotóxica, anti- HCT-116 cujo resultado estão sumarizados na tabela 14.

Tabela 14 Resultados de ensaios cotóxicos

Código de estirpe	Código de amostra	Método de cultura	HCT-116 IC50 (mg/mL)
PTA-004B	PS11-004-A	A1P2	0.0807
PTA-005A	SS11-003-C-1	A1P2	0.0167
PTA-007B	SS11-003-G-1	A1P1	0.0711
PTA-008B	SS11-004-F-1-A-1	A1P2	0.0437
PTA-016B	SM11-003-A-1	½ A1P2	0.0475
PTA-018A	SM11-001-A-1	½ A1P2	0.0626

Das amostras de crude testadas, seis revelaram actividade citotóxica. Destas quatro são as que foram obtidas por propagação das células em 1L de meio A₁bfe+C.

Entre as estirpes activas, uma (PTA005-A) destaca-se do resto de amostras, mostrando actividade contra MRSA, VRE e HCT-116.

Sendo um estudo preliminar para a descoberta de novos compostos bioactivos a partir das águas portuguesas, muitos estudos restam ainda para fazer, a fim confirmar a potencial farmacêutico das estirpes activas.

3.2 Elucidação Estrutural

A elucidação/identificação dos compostos é feita com base nos resultados espectroscópicos (IV, UV, ES-MS) e por comparação com os dados existentes na literatura.

3.2.1 Identificação

3.2.1.1 Composto/fracção CNX-874-9-1

O composto CNX-874-9-1 foi obtido por refraccionamento da fracção CNX-874-9 eluída da mostra CNX-847 com ACN. De cor amarela, este composto apresenta uma banda de absorção UV situada a 203 nm em MeOH, tab. 15.

Submetido a espectroscopia de massa por electro-spray, o composto CNX-874-9-1 apresentou um espectro com ião molecular de forma protonada $[M+H]^+$ 454, e as fragmentações a m/z 429, 413, 338, 301, 274.

Tendo como base o perfil UV/Vis, e fazendo uma comparação com a literatura este composto, verificou-se que não se enquadra no grupo da família das prodigiosinas actualmente conhecidas, que têm um máximo de absorção a partir dos 525nm. Desta forma conclui-se que o composto CNX-874-9-1 não é uma prodigiosina.

Tabela 15 Resultados espectrais da fracção CNX-874-9-1

Composto/fracção	Cor	Massa m/z	UV-VIS	IV
CNX-874-9-1	Amarela	454(M ⁺), 429, 413, 301,96, 82, 68.	203	3365, 2946, 2834, 2511, 2040, 1654, 1449, 411, 1112, 1025

3.2.1.2 Composto/fracção CNX-874-9-2+10-1-1-1

Este composto foi isolado de uma placa cromatográfica semi-preparativa de Al₂O₃ com CHCl₃:AcOEt a 9:1 (v/v), a partir de uma mistura de duas sub-fracções (CNX-874-9-2 e CNX-874-10-1) sendo a fracção CNX-874-10, eluída com ACN e 0,05% de TFA da amostra CNX-874. Partiu-se de um refraccionamento das fracções (CNX-874-9 e CNX-874-10) em placa semi-preparativa de Al₂O₃, usando como eluente CHCl₃:AcOEt a 9,5: 0,5 (v/v), para obtenção das fracções CNX-874-9-2 e CNX-874-10-1.

De cor rosa magenta, o composto/ fracção CNX-874-9-2+10-1-1-1, tem uma banda de absorção máxima no UV/Vis situada a 526 nm.

Submetida a espectroscopia de massa por impacto eletrónico, apresenta um espectro com ião molecular sob forma protonada $[M+H]^+$ 394 m/z e a fragmentação mostra existência de dois fragmentos de m/z 238 e 252 (Tab. 16).

O espectro no IV mostra a presença de duas bandas intensas a 2923, 2855, 2360 cm^{-1} .

Exibindo um espectro de massa e fragmentação idêntico a undecilprodigiosina, difere deste último pelo seu perfil de UV, e não condiz com mais outro membro da família prodigiosina. Isto sugere que se trata de composto ainda não descrita na literatura como prodigiosinas.

Tabela 16. Resultados espectrais da fracção CNX-874-9-2+10-1-1-1

Composto/fracção	Cor	Massa m/z	UV-Vis	IV	Ref.
CNX-874- 9-2+10-1 -1-1	Magenta	394 $[M+H]^+$ 238	526 (MeOH)	2923, 2855, 2360, 1736 1714, 1605, 1455	--
Undecilprodigiosina	Laranja	393 M^+ 378, 364, 350, 336 322, 308, 280, 252, 238	530(EtOH)	2924, 2855, 1040	29

3.2.1.3 Composto /fracção CNX-874-9-2+10-1-1-2

Situado logo na posição seguinte a fracção CNX-874-9-2+10-1-1-1, este composto apresenta uma coloração laranja. Na espectroscopia de massa por electro-spray, exhibe um espectro com ião molecular a 394, que coincide com o ião $C_{25}H_{35}N_3O$. O espectro UV apresenta uma absorção máxima a 530 nm, um perfil UV idêntico ao da undecilprodigiosina, Fig.34.

Efectuando uma análise comparativa dos resultados espectrais com as prodigiosinas descritas na literatura, existe uma semelhança deste composto com a undecilprodigiosina.^[51, 52] Aplicada uma energia de colisão de 30 ev, a fragmentação do pico 394 (ião molecular), apresenta um fragmento de 379 m/z , correspondente a perda de $[M-CH_3+H]^+$, antecedido pelos picos da perda de $[M-C_{10}H_{21}]$, $[M-C_{11}H_{23}]$ 252 m/z e 238 m/z respectivamente.

O pico m/z 308 indica a perda de C_6H_{13} e 322 m/z corresponde a desintegração de C_5H_{11} .

As fragmentações no espectro de massa, e o espectro UV do composto constituem indicações que suportam esta atribuição estrutural, tab 17.

Tabela 17. comparação dos resultados espectrais da fracção CNX-874-9-2+10-1-1-2 com undecilprodigiosina

Fracção/ Composto	Cor	Massa m/z	Fragmentação m/z	UV-Vis	IV	Ref
CNX-874-9-2+10-1-1-2	Laranja	394 $[M+H]^+$	379, 351, 343, 322, 308, 254, 252, 238.	530	3732,2923, 2855, 1039	--
Undecilprodigiosina	Laranja	393 M^+	378, 364, 350, 336, 322, 308, 280, 252, 238	530	2924, 2855, 1040	30

Undecilprodigiosina foi isolada pela primeira vez em 1966 pelo K. Harashima e seus colaboradores (N. Tsuchida, J. Nagat), a partir da estirpe de *Streptomyces ruber*.^[29] É descrita como sendo a terceira prodigiosina análoga identificada na natureza com 25 carbonos e daí o nome prodigiosina 25-C atribuído por parte de K. Harashima.^[29] Apresenta uma fórmula molecular C₂₅H₃₅N₃O, e fórmula química abaixo indicada.

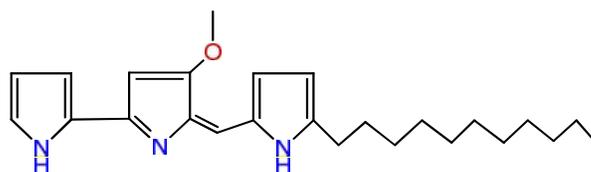


Figura 34 Undecilprodigiosina

3.2.1.4 Composto/fracção CNX-874-9-2+10-1-2-3

Esta fracção foi tentativamente identificada como sendo família das prodigiosinas cíclicas, tais como butilcicloheptilprodiginina, Fig.35. Com uma absorção máxima no UV/Vis a 530 nm em MeOH a fracção CNX-874-9-2+10-1-2-3, apresenta um pico de ião molecular sob forma protonada de 392. É uma prodigiosina que considera-se derivada da ciclização oxidativa de undecilprodigiosina.^[30]

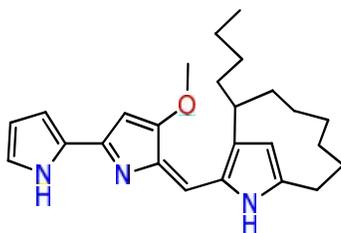


Figura 35. Estrutura química da butilciclo-heptilprodiginina

Submetida a uma energia de colisão de 40eV, a fracção CNX-874-9-2+10-1-2-3 apresenta fragmentação indicadas na tabela 18, estes sugerem a presença de butilciclo-heptilprodiginina, descrita na literatura.^[29]

Tabela 18 comparação de dados espectrais da fracção CNX-874-9-2+10-1-2-3 e butilciclo-heptilprodiginina

Fracção/ composto	Cor	Massa (ião molecular)	Fragmentação m/z	UV-Vis	IV	Ref
CNX-874-9-2+10-1-1-3	Rosa	392 [M+H] ⁺	377,348, 334, 320, 266, 252, 91	530 (MeOH)	3408, 2923, 2853, 1731, 1631,1601, 1455, 1377, 1260, 1098	--
Butilciclo-heptilprodiginina	Rosa	392 [M+H] ⁺	376, 348, 334, 252, 175, 91	536 (EtOH)	2935, 2865, 1627, 1550, 1458, 1379,1145	29

Contudo registam-se diferenças grandes no seu espectro de IV, em relação ao da literatura, e também alguma diferença (menor) no espectro UV, pelo que esta sugestão para ser aceite teria de ser confirmada por outras espectroscopias, como por exemplo $^1\text{H-NMR}$.

As estruturas dos dois compostos identificados foram confirmadas através de espectroscopia $^1\text{H-NMR}$ pelo Doutor Daniel Silva.

Capítulo 4: Conclusões

4. Conclusões

Existem enormes potencialidades para a exploração dos recursos microbianos do habitat marinho. No entanto a Biotecnologia tem ainda enormes condicionantes por resolver. Um desses condicionantes diz respeito a reprodução no laboratório das formas de vida que ocorrem em ambiente marinho. As condições usadas no laboratório para o seu crescimento ou conservação, nem sempre conseguem fornecer as condições ideais para a sobrevivência destes seres vivos. Um exemplo observado neste trabalho, evidenciou um desses condicionantes, nomeadamente a influência do tempo de conservação dos microrganismos. Verificamos que foram isoladas menos quantidade de microrganismos de amostras de sedimentos colhidos e conservados num período de quase um ano, antes de serem processadas, por comparação com as amostras processadas poucos dias depois da sua colheita.

Em termos de crescimento microbiano, verificou-se um crescimento mais rápido dos microrganismos unicelulares comparativamente com os actinomicetose. Aqueles foram os primeiros que aparecem nos meios de cultura.

Nos ensaios para avaliação da actividade antimicrobiana, das 42 amostras processadas, foram seleccionadas seis estirpes que podem vir a ter interesse biotecnológico. No entanto, o extracto obtido da estirpe PTA005A, revelou-se ser mais activo (exibindo actividade bacteriostática contra MRSA e VRE) comparativamente ao resto dos extractos de outras estirpes. Os extractos das estirpes PTA-001A, PTA-017A, PTA-020A, PTA-021A, PTA-026A parecerem ter actividade bacteriostática em relação a MRSA e VRE

Dos ensaios anticancerígenos, seis estirpes exibiram actividade citotóxica contra HTC116: PTA004B, PTA005A, PTA007B, PTA008B, PTA016B, PTA018A.

No total foram obtidos 11 extractos bioactivos, sendo um bastante promissor, nomeadamente PTA005A uma vez que tem propriedades bacteriolítica para MRSA e para VRE exibindo também actividade citotóxica.

Observou-se uma maior actividade antimicrobiana dos extractos obtidos com as estirpes propagadas no meio A₁ do que nos meios A₁bfe+C. No entanto, dos seis extractos que exibiram actividade citotóxica, quatro provinham de estirpes propagadas neste último meio. Estes resultados devem contudo ser confirmados com mais amostras porque à escolha do meio de cultura segundo actividade pretendida poderá ser um factor importante.

Na parte de estudos de análise química isolaram-se várias fracções das quais foi possível identificar dois membros da família das prodigiosinas, undecilprodigiosina e butilciclo-

heptilprodigiosina. Este trabalho permitiu perceber a instabilidade destes compostos nomeadamente quando deixados ao ar livre ou em solução.

No âmbito deste trabalho não foi feita a identificação do género ou espécie bacteriana produtora de qual se obteve o extracto, o qual será feito posteriormente.

As prodigiosinas constituem uma família de compostos promissores para aplicações em vários domínios, por exemplo são agentes anticancerígenos. As prodigiosinas apresentam vantagens comparativamente aos outros fármacos por activarem apoptose por uma via distinta da p53, requerida por muitos fármacos actualmente conhecidos. A proteína p53 encontra-se alterada na maioria parte dos cancros.

Ao seu uso como corante biológico e em tecidos antimicrobianos, pode acrescentar-se o uso para as tendas impregnadas usadas como repelentes de mosquitos em países onde o paludismo é endémico, uma vez que são dotadas de propriedades antimaláricas.

Muitos estudos sobre as prodigiosinas são ainda necessários, nomeadamente para conhecer o mecanismo, a regulação da sua biossíntese e a sua localização na célula produtora.

O mecanismo de acção sobre as células cancerígenas, ainda é discutível e em relação ao tratamento da malária poucos estudos foram publicados. Uma descoberta do mecanismo de acção das prodigiosinas sobre as parasitas da malária constituiria uma nova oportunidade terapêutica para esta doença.

Apesar de as prodigiosinas serem promissores antimicrobianos quando incorporadas em tecidos, um uso abusivo destes compostos pode conduzir ao desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos microrganismos sobre as quais agem .

Por outro lado as prodigiosinas são compostos instáveis o que poderá constituir um dos obstáculos a serem ultrapassadas pela indústrias biotecnológica /farmacêutica.

5. Bibliografia

1. D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snad, *Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2000*, Journal of Natural Products, **2003**, 66, 1022–1037.
2. T. A. M. Gulder, B. S. Moore, *Salinosporamide Natural Products: Potent 20 S Proteasome Inhibitors as Promising Cancer Chemotherapeutics*; Angewandte Chemistry International Edition, **2010**, 49, 9346–9367.
3. J. Bérdy, *Bioactive Microbial Metabolites*, Journal of Antibiotics, **2005**, 58, 1–26.
4. B. Hoff, S. Poggler, U. Kuck, *Eighty Years after Its Discovery, Fleming's Penicillium Strain Discloses the Secret of Its Sex*, American Society for Microbiology, **2008**, 3, 465–470.
5. A. Penesyan, S. Kjelleberg and S. Egan, *Development of Novel Drugs from Marine Surface Associated Microorganisms*, Mariner Drugs, **2010**, 8, 438–459.
6. K. Papireddy, M. Smilkstein, J. X. Kelly, S. Shaimaa M. Salem, M. Alhamadsheh, S.T.W. Haynes, G.L.Challis, K.A.Reynolds, *Antimalarial Activity of Natural and Synthetic Prodiginines*, American Chemical Society, **2011**, 56, 5296–5306.
7. M. Isaka, A. Jaturapat, J. Kramyu, M. Tanticharoen, Y. Thebtaranonth, *Potent In Vitro Antimalarial Activity of Metacycloprodigiosin Isolated from Streptomyces spectabilis BCC 4785*, American Society for Microbiology, **2002**, 46, 1112–1113.
8. UNISEF *Le paludisme: Une des principales causes de décès et de pauvreté des enfants en Afrique* Relatório, **2010**.
9. OMS, Roll Back Malaria **2010**.
10. http://www.dn.pt/inicio/portugal/interior.aspx?content_id=1585293 (consultado em 18/05/2012)
11. P. R. Jensen, W. Fenical, *Marine bacterial diversity as a source for novel microbial products*, Journal of Industrial Microbiology, **1969**, 17, 346–351.
12. M. Martinell, M. Giral, E. Montaner, B. Navarro, S. Pique, M. Gil, J. P. Ricardo, *Prodigiosin from supernatant Serratia marcescens induces apoptosis haematopoietic in cancer cells lines*, British Journal of Pharmacology, **2000**, 131, 585–593.
13. A. T. Bull, A. C. Ward, M. Goodfellow, *Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the paradigm shift*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, **2000**, 3, 573–606.
14. D. J. Newman and G. M. Cragg, *Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years*, Journal of Natural Products, **2007**, 70, 461–477.
15. A. B. Soliev, K. Hosokawa, K. Enomoto, *Bioactive Pigments from Marine Bacteria: Applications and Physiological Roles*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, **2011**, 10, 1–17.
16. M. D'Incalci, C. M. Galmarini, *A Unique Mechanism of Action of Trabectedin*, American Association for Cancer Research, **2010**, 9, 2157–2163.
17. H. Rapoport and K. G. Holden, *The synthesis of prodigiosin*, Journal of the American Chemical Society, **1962**, 84, 635–642.
18. A. Furstner, *Chemistry and Biology of Roseophilin and the Prodigiosin Alkaloids: A Survey of the Last 2500 Years*, Angewandte Chemistry International Edition, **2003**, 42, 3582–3603.
19. N. R. Williamson, P. C. Fineran, F. J. Leeper, G. P. C. Salmond, *The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines*, Nature, **2006**, 4, 887–899.
20. A. Hejazi, F. R. Falkner, *Serratia marcescens*, Journal of Medical Microbiology, **1997**, 46, 903–912.
21. R. V. Houdt, M. Givskov, C. W. Michiels, *Quorum sensing in Serratia*, Federation of European Microbiological Societies, **2007**, 31, 407–424.
22. N. N. Gerber, L. C. Vining, *Biosynthesis of prodiginines. ¹³C resonance assignments and enrichment patterns in nonyl-, cyclononyl-, methylcyclodecyl-, and butylcycloheptylprodiginine produced by actinomycete cultures supplemented with ¹³C-labeled acetate and ¹⁵N-labeled nitrate*, Canadian Journal of Chemistry, **1978**, 56, 1155–1163.
23. N.N. Gerber, *Minor prodigine*, Journal of Heterocyclic Chemistry, **1973**, 10, 925–928.

24. N N Gerber, *Prodigiosin-like pigments from Actinomadura (Nocardia) pelletieri and Actinomadura madurae*, Applied microbiology, **1969**, 18, 1–3.
25. I. D. B. Arthaud, *Studies on the Secondary Metabolites of a Pseudoalteromonas sp. Isolated from Sediments Collected at the Northeastern Coast of Brazil*, Chemistry & Biodiversity, **2012**, 9, 418–427.
26. M. D. Clift, R. J. Thomson, *Development of a Merged Conjugate Addition/Oxidative Coupling Sequence. Application to the Enantioselective Total Synthesis of Metacycloprodigiosin and Prodigiosin R1*, Journal American Chemistry Society, **2009**, 131, 14579–14583.
27. Y. M. Khokhlova, L. N. sergreeva, N. S. Vul'fson V.I Zaretskii, V. G. Zaikin, V.I Sheichenko A. S Khokholov, *Diference of vitamycin A from other natural analogs of Prodigiosin*, Khimiya prirodnyky Soedinenii, **1968**, 5, 307–312.
28. A. A. Sertan-de Guzman, R. Z. Predicala, E. B. Bernardo, B. A. Neilan, S. P. Elardo, G. C. Mangalindan, D. Tasdemir, C. M. Ireland, W. L. Barraquio, G. P. Concepcion, “*Pseudovibrio denitrificans strain Z143-1, a heptylprodigiosin-producing bacterium isolated from a Philippine tunicate*” FEMS Microbiol Letter, **2007**, 277, 188–196.
29. N.N. Gerber, *A new prodiginine (prodigiosin-like) pigment from Streptomyces. Antimalarial activity of several prodiginines*, The Journal of Antibiotics, **1975**, 3, 194–199.
30. K. Harashima, N. Tsuchida, T. Tanaka J. Nagat, *Prodigiosin-25 C, Isolation and the Chemical Structure*, Agricultural and Biological Chemistry, **1966**, 4, 481–489.
31. R. Kazlauskas, J. F. Marwood, P.T. Murphy, R. J. Wells, *A Blue Pigment from a Ascidian Compound*, Australian. Journal of Chemistry ,**1982**, 35, 215–217.
32. N. N Gerber, *Prodigiosin-like pigments from Actinomadura Nocardia pelletieri and Actinomadura madurae*, Applied Microbiology, **1969**, 18, 1–3.
33. H. Laatsch, R. H. Thomson, *Revised structure for cycloprodigiosin*, Tetrahedron Letters, **1983**, 24, 2701–2704.
34. D. Feher, R. S. Barlow, P. S. Lorenzo, T. K. Hemscheidt, *A 2-Substituted prodiginine, 2-(p-Hydroxybenzyl)prodigiosin, from Pseudoalteromonas rubra*, Journal of Natural Products, **2008**, 71, 1970–1972.
35. Notas de Aulas de Engenharia Bioquímica I, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, **2010**.
36. R. Pandeya, R. Chanderb, K. B Sainis, *Prodigiosins, A Novel Family of Immunosuppressants with Anticancer Activity*, Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, **2007**, 44, 295–302.
37. R. P. Tomás, M. Viñas, *New Insights on the Antitumoral Properties of Prodiginines*, Current Medicinal Chemistry, **2010**, 17, 2222–2231.
38. R. P. Williams, C. L. Gott, S. M. H. Qadri, R. H. Scott, *Influence of Temperature of Incubation and Type of Growth Medium on Pigmentation in Serratia marcescens*, journal of Bacteriology, **1971**, 106, 438–443.
39. M. P. Silverman, E. F. Munoz, *Effect of Iron and Salt on Prodigiosin Synthesis in Serratia marcescens*, Journal of Bacteriology, **1973**, 114, 999–1006.
40. V. K Joshi, D. Attri, A. BaJa, *Microbial Pigments*, Indian Journal of Biotechnology, **2003**, 2, 362 – 369.
41. F. Alihosseini, K.S. Ju, J. Lango, B.D. Hammock, G. Sun, *Antibacterial Colorants: Characterization of Prodiginines and Their Applications on Textile Materials*, Biotechnology Progress, **2008**, 24, 742–747.
42. L. R. Zacharski, V. P. sukhatme, *Coley's toxin revisited: immunotherapy or plasminogen activator, therapy of cancer?* Journal of Thrombosis and Haemostasis, **2004**, 3, 424 – 427.
43. C. C. Chang, W.C. Chen, T.F. Ho, H.S. Wu, Y.H. Wei, *Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms*, Journal of Bioscience and Bioengineering, **2011**, 111, 501–511.
44. T. Sato, H. Konno, Y. Tanaka, T. Kataoka, K. Nagai, H. H. Wasserman, S. Ohkuma, *Prodigiosins as a New Group of H⁺/Cl⁻ Symporters that Uncouple Proton Translocators*, The Journal of Biological Chemistry, **1998**, 273, 21455–21462.

45. G. Park, J. T. Tomlinson, J. A. Misenheimer, G. L. Kucera, R. A. Manderville, *Photo-Induced Cytotoxicity of Prodigiosin Analogues*, Korean Chemistry Society, **2007**, 28, 49–52.
46. M. Isaka, A. Jaturapat, J. Kramyu, M. Tanticharoen, Y. Thebtaranonth, *Potent In Vitro Antimalarial Activity of Metacycloprodigiosin Isolated from Streptomyces spectabilis BCC 4785*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2002**, 46, 1112–1113.
47. S. B. Han, S. H. Park, Y. J. Jeon, Y. K. Kim, K. M. Kim, K. K. Yang, *Prodigiosin blocks t cell activation by inhibiting interleukin 2r expression and delays progression of autoimmune diabetes and collageninduced arthritis*, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*, **2001**, 299, 415–425.
48. D. Kim, J.S. Lee, Y.K. Park, J.F. Kim, H. Jeon, T.-K. Oh, B.S. Ki, C.H. Lee, *Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium Halobacterium chejuensis KCTC 2396*, *The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology*, **2007**, 102, 937–944.
49. M. Boric, T. Danevcic, D. Stopar, *Prodigiosin from Vibrio sp. DSM 14379; a New UV-Protective Pigment*, *Environmental Microbiology*, **2011**, 62, 528–536.
50. M.I. G. Roman, R. B. Mendoza, M. F. Dunn, F. H. Melendez, K. G. Navarro, G. H. Palacios, *Production of prodigiosin and chitinases by tropical Serratia marcescens strains with potential to control plant pathogens*, *World Journal Microbiology Biotechnology*, **2012**, 28, 145–153.
51. W. Fenical, R. Paul, M. A. Palladino, K. S. Lam, G. K. Lloyd, C. B. Potts, *Discovery and Development of the Anticancer Agent Salinosporamide A (NPI-0052)*, *Bioorganic Medicinal Chemistry*, **2009**, 15, 1–13.
52. A. J. Kaeding, J. C. Ast, M. M. Pearce, H. Urbanczyk, S. Kimura, H. Endo, M. Nakamura, P. V. Dunlap, *Phylogenetic Diversity and Cosymbiosis in the Bioluminescent Symbioses of "Photobacterium mandapamensis"*, *Applied Environmental Microbiology*, **2007**, 73, 3173–3182.

Anexo

Tabela 16 Resultados gerais de estudos microbiológicos

Código de estirpe	Código de amostra	Descrição De estirpe	Meio / Método de cultura	Extracto (mg)	HCT-116 IC50 (mg/ml)	MIC (µg/µl)
PTA-001A	AZ10-322-A	Cinzento esverdeado com esporos brancos	A ₁ P ₂	51.2	NSA	MRSA <0.25 VRE <0.25
PTA-002A	AZ10-439-A-1	Cinzento esverdeado com esporos beges	A ₁ P ₁	51.5	NSA	NSA
PTA-003A	SS11-004-G	Castanho com esporos brancos	A ₁ P ₂	52.7	I	NSA
PTA-003B	SS11-004-G	Castanho com esporos brancos	A ₁ P ₂	35.1	I	NSA
PTA-004A	PS11-004-A	Cinzento com esporos brancos que ficam cinzentos	A ₁ P ₂	33.2	NSA	NSA
PTA-004B	PS11-004-A	Cinzento com esporos brancos que ficam cinzentos	A ₁ P ₂	33.6	0.0807	NSA
PTA-005A	SS11-003-C-1	Branco com esporos cinzentos	A ₁ P ₂	9.8	0.0167	MRSA <0.25x10 ⁻¹⁰ VRE <0.25x10 ⁻⁸
PTA-005B	SS11-003-C-1	Branco com esporos cinzentos	A ₁ P ₂	40.9	NSA	NSA
PTA-006A	SS11-001-E-1-A	Bege com esporos cinzentos	A ₁ P ₂	52.5	-	NSA
PTA-006B	SS11-001-E-1-A	Bege com esporos cinzentos	A ₁ P ₂	20.2		NSA
PTA-007A	SS11-003-G	Bege com esporos cinzentos	A ₁ P ₁	44.1	NSA	NSA
PTA-007B	SS11-003-G-1	Bege com esporos cinzentos	A ₁ P ₁	19.1	0.0711	NSA
PTA-008A	SS11-004-F-1-A-1	Bege com esporos cinzentos e pontos brancos	A ₁ P ₂	22.6	NSA	NSA
PTA-008B	SS11-004-F-1-A-1	Bege com esporos cinzentos	A ₁ P ₂	38.4	0.0437	NSA
PTA-009A	SM11-002-A-1	Bege com esporos brancos	A ₁ P ₁	22.5	-	NSA
PTA-010A	AZ10-202-A	Bege com esporos cinzentos	½ A ₁ P ₁	4.5	-	NSA
PTA-011A	SM11-001-B-1	Cinzento com pontos pretos e líquido brilhante	½ A ₁ P ₂	14.4	-	NSA
PTA-012A	AZ10-322-A-1	Verde cinza com esporos beges	½ A ₁ P ₁	20.5	NSA	NSA
PTA-013A	AZ10-333-B	Bege com esporos cinzentos e pontos pretos	½ A ₁ P ₁	23.4	-	NSA
PTA-014A	AZ10-496-A-1	Amarelo com esporos brancos	SWAP ₁	89.7	-	NSA

Tabela 16 Resultados gerais de estudos microbiológicos (continuação)

PTA-015A	SM11-001-B-3-A	Branco com esporos cinzentos	½ A ₁ P ₂	10.2	-	NSA
PTA-016A	SM11-003-A-1	Vermelho e rosa brilhante	½ A ₁ P ₂	27.5	NSA	NSA
PTA-016B	SM11-003-A-1	Vermelho e rosa brilhante	½ A ₁ P ₂	19.5	0.0475	NSA
PTA-017A	AZ10-352-A-1-B	Bege com esporos cinza e pontos brancos	½ A ₁ P ₁	14.4	I	MRSA <0.25x10 ⁻² VRE <0.25x10 ⁻²
PTA-018A	SM11-001-A-1	Vermelho com esporos cinzentos	½ A ₁ P ₂	25.9	0.0626	NSA
PTA-018B	SM11-001-A-1	Vermelho com esporos cinzentos	½ A ₁ P ₂	84.8	-	NSA
PTA-019A	PTA-010	Bege com esporos cinzentos	½ A ₁ P ₁	57.5	-	NSA
PTA-020A	AZ10-202-B-1	Bege com esporos brancos	½ A ₁ P ₁	15.3	-	MRSA <0.25x10 ⁻² VRE <0.25x10 ⁻⁴
PTA-021A	SS11-03-D-2-A	Bege com esporos brancos	A ₁ P ₂	6.8	-	MRSA <0.25x10 ⁰ VRE <0.25x10 ⁰
PTA-022A	AZ10-333-A	Cinzento com esporos cinzentos	½ A ₁ P ₁	21.6	-	NSA
PTA-023A	SS11-003-F-1-A	Castanho claro com esporos brancos	A ₁ P ₂	34.7	NSA	NSA
PTA-024A	SS11-004-G-1-C	Bege com esporos brancos	A ₁ P ₂	94.8	I	NSA
PTA-024B	SS11-004-G-1-C	Bege com esporos brancos	A ₁ P ₂	120.6	I	NSA
PTA-025A	SM11-002-A-1-A-2	Vermelho com esporos cinzentos	½ A ₁ P ₂	--	-	-
PTA-026A	SS11-003-I-A	Laranja com esporos pretos	A ₁ P ₂	43.0	-	MRSA <0.25x10 ⁰ VRE > 0.25x10 ⁰
PTA-027A	AZ10-202-A	Laranja com pontos castanhos	SWAP ₂	23.4	-	NSA
PTA-028A	SM11-003-I-1	Bege c/ esporos bege e pontos brancos	A ₁ P ₂	--	-	-
PTA-029A	SS11-003-C-1-B	Bege com esporos brancos e pontos pretos	A ₁ P ₂	--	-	-
PTA-030A	SS11-004-C-1	Bege com esporos brancos	M ₁ P ₂	--	-	-
PTA-031A	AZ10-333-B-1	Branco com esporos cinzentos e verdes	M ₁ P ₂	--	-	-
PTA-032A	AZ10-333-D-2-A-1	Bege com esporos cinzentos	½ A ₁ P ₁	--	-	-
PTA-033A	SS11-005-C	Laranja brilhante	A ₁ P ₂	--	-	-

Tabela 17. Resultados geral dos ensaios anti- MRSA

Estirpes	Concentração do químico em µg/uL					
	0,25	0,25x10 ⁻⁰²	0,25x10 ⁻⁰⁴	0,25x10 ⁻⁰⁶	0,25x10 ⁻⁰⁸	0,25x10 ⁻¹⁰
PTA001A	-	+	++	+++	+++	+++
PTU001	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PTA002A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PTA003A	++	+++	+++	+++	+++	+++
PTA003B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PTA004A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PTA004B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PTU004	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PTA005A	-	-	-	-	-	-
PTA005B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PTA006A	+++	+++	++	+++	+++	+++
PTA006B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PTA007A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PTA007B	++	+++	+++	+++	+++	+++
PTA008A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PTA008B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PTA012A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PTA016A	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PTA001B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PTU016	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PTA017A	-	-	+++	+++	+++	+++
PTA018A	+++	++	+++	+++	+++	+++
PTA018B	+++	+++	+++	+++	+++	+++
PTA023A	++	+++	+++	+++	+++	+++
PTA024A	+	+	+++	+++	+++	+++
PTA024B	+	+++	+++	+++	+++	+++
Controlo +	+++					
Controlo -	-					

Tabela 18. Resultados geral dos ensaios anti-VRE

	Concentração do químico em µg/uL					
	0,25E	0,25E-02	0,25E-04	0,25E-06	0,25E-08	0,25E-010
PTA001A	+	+++	+++	+++	++	+++
PTU001	+++	+++	+++	+++	++	+++
PTA002A	+++	+++	+++	+++	++	+++
PTA003A	++	+++	+++	+++	++	+++
PTA003B	+++	+++	+++	+++	++	+++
PTA004A	+++	+++	+++	+++	++	+++
PTA004B	+++	+++	+++	+++	++	+++
PTU004	+++	+++	+++	+++	++	+++
PTA005A	-		-	-	-	+
PTA005B	+		+	+	+	+
PTA006A	+++	+++	+++	+++	++	+++
PTA006 B	+++	+++	+++	+++	++	+++
PTA007A	+++	+++	+++	+++	++	+++
PTA007B	+	+++	+++	+++	++	+++
PTA008A	+++	+++	+++	+++	++	+++
PTA008B	+++	+++	+++	+++	++	+++
PTA012A	+++	+++	+++	+++	++	+++
PTA016A	+++	+++	+++	+++	++	+++
PTA016B	+++	+++	+++	+++	++	+++
PTU016	+	+++	+++	+++	++	+++
PTA017A			++	+++	++	+++
PTA018A	+++	+++	+++	+++	++	+++
PTA018B	+	+	++	++	++	++
PTA023A	+++	+++	+++	+++	++	+++
PTA024A	++	+++	+++	+++	++	+++
PTA024B	++	+++	+++	+++	+++	+++
Controlo +	+++					
Controlo +	+++					
Esterilidade de DMSC	-					
Esterilidade da vancomicina	-					
Esterilidade de BHI	-					

Divulgação de resultados

Parte dos resultados obtidos neste trabalho foi apresentado em encontros científicos através comunicação em *posters*.

S. P. Gaudêncio, S. M. Pereira, V. M'Bana, P. M. Borralho, C. M. Rodrigues, I. Santos Sanches, P. R. Jensen, W. Fenical and A. M. Lobo

"Marine Bacteria as a Novel Resource for Drug Discovery", Marie Curie Actions Congress, June 10-15th, 2012, Dublin, Ireland.

S. P. Gaudêncio, S. M. Pereira, V. M'Bana, P. M. Borralho, S. E. Gomes, C. M. Rodrigues, I. Santos Sanches, P. R. Jensen and A. M. Lobo

"Marine Bacteria: Anticancer and Antibiotic Activity Novel Source for Drug Discovery", 6th Spanish Portuguese Japanese Organic Chemistry Symposium/6SPJOCS - SPQ, June 18-20th, 2012, Lisbon, Portugal