

CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DE ACTINOMYCETOTAS MARINHAS: AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E INIBIÇÃO DE PROTEASES

Ana Beatriz Oliveira Mulinário

ana.mulinario@fatec.sp.gov.br
Faculdade de Tecnologia de Praia Grande

Ma. Daniela Cristina Russo

Universidade Federal de São Paulo

Dra. Paula Rezende Teixeira

Universidade de São Paulo

Dra. Leticia Veras Costa Lotufo

Universidade de São Paulo

Andreas Russo Cavadas

Universidade Federal de São Paulo

Dr. Gustavo Bueno Gregoracci

Universidade Federal de São Paulo

Evandro Pereira da Silva

Universidade de São Paulo

Dr. Fabio Rodrigues

Universidade de São Paulo

Dra. Eduarda Antunes Moreira

Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto

Dr. Norberto Lopes Poperine

Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto

Dra. Paula Christine Jimenez

Universidade Federal de São Paulo
Faculdade de Tecnologia de Praia Grande.

Me. Waldemar Alves Ribeiro Filho

waldemar.ribeiro@fatec.sp.gov.br
Faculdade de Tecnologia de Praia Grande.

1. INTRODUÇÃO

A prospecção de substâncias bioativas em microrganismos marinhos representa uma oportunidade estratégica para a descoberta de novos fármacos. *Actinomycetotas* de sedimentos do litoral do Espírito Santo

apresentam potencial para produzir metabólitos antioxidantes e inibidores de proteases, de interesse no tratamento do câncer e de doenças crônicas. Este estudo teve como objetivos a caracterização de substâncias bioativas produzidas por *actinomycetotas* marinhas, com ênfase na

cepa BRB-382 (*Microbacterium sp.*), visando avaliar sua atividade antioxidante e inibição de proteases, além de explorar seu potencial citotóxico frente a linhagens tumorais. A pesquisa contribui para o avanço científico, a inovação tecnológica e a valorização da biodiversidade oceânica, em consonância com compromissos internacionais de sustentabilidade.

2. METODOLOGIA

A metodologia proposta contemplou três eixos principais: (i) isolamento e cultivo da cepa em diferentes condições, (ii) caracterização química dos extratos obtidos e (iii) ensaios funcionais para atividade biológica. Inicialmente, a cepa foi reativada e cultivada em diferentes meios líquidos e sólidos (A1, LB, MB, SCB e ISP2), de modo a ampliar a diversidade metabólica e permitir a comparação da produção de metabólitos especiais. A obtenção de extratos brutos foi realizada por extração com acetato de etila, tanto dos cultivos líquidos quanto sólidos, seguida de concentração em evaporador rotativo. A identificação molecular da cepa envolveu extração de DNA, amplificação do gene 16S rRNA e análise filogenética comparativa. Paralelamente, foi conduzida caracterização morfológica por microscopia óptica. Os extratos foram submetidos a ensaios biológicos direcionados, incluindo: atividade citotóxica contra linhagens HCT116 (cólon) e MCF-7 (mama), utilizando ensaio de viabilidade celular (MTT); atividade inibitória de proteases (tripsina) em placas de CCD, visando identificar compostos com potencial de modular enzimas envolvidas em processos tumorais; atividade antioxidante, avaliada pelo ensaio DPPH em CCD.

Para caracterização química, aplicou-se Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e CLAEEM/EM com ionização por *eletrospray*, permitindo a identificação preliminar dos compostos. A análise avançada dos perfis metabólicos foi realizada por meio de redes moleculares (GNPS2) e pela ferramenta MicrobeMASST, integrando espectrometria de massas e informações genômicas, possibilitando

correlação estrutural com metabólitos conhecidos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Microscopia Óptica

As análises em microscopia óptica permitiram observar microcolônias de *Microbacterium sp.* marinho (BRB-382) com morfologia esférica, coloração alaranjada uniforme e contornos regulares. O diâmetro das estruturas variou entre 70 e 90 μm , compatível com microcolônias jovens em fase inicial de crescimento. A presença de uma colônia menor na mesma preparação reforça a natureza heterogênea do crescimento bacteriano em superfície sólida. Esse padrão morfológico indica um crescimento compacto e radial, característico da adaptação inicial de actinobactérias marinhas em ambientes sólidos. A secreção de exopolissacarídeos (EPS), apontada em literatura como estratégia essencial de *Microbacterium* para formação de biofilmes, explica a coesão estrutural e a resistência a estresses ambientais. Assim, a análise morfológica evidencia mecanismos de colonização que podem estar diretamente relacionados à produção de metabólitos especiais.

3.2 Filogenia do Isolado BRB-382

A árvore filogenética baseada na sequência 16S rRNA demonstrou que a cepa BRB-382 agrupa-se no gênero *Microbacterium*, apresentando maior proximidade com *M. liangjiangensis* e *M. wangi* (bootstrap = 99). Esse resultado confirma a identificação preliminar e sugere uma relação filogenética estreita com espécies marinhas descritas como produtoras de metabólitos bioativos. Apesar da robustez dos agrupamentos principais (= 80), alguns clados apresentaram valores de bootstrap < 70, refletindo a limitação do marcador 16S rRNA para resolver relações internas em gêneros altamente conservados. Ainda assim, a posição do isolado dentro do gênero *Microbacterium* reforça sua relevância para a prospecção química, uma vez que espécies relacionadas já foram reportadas como fontes de compostos antioxidantes e citotóxicos [1].

3.3 Atividade Citotóxica

O extrato bruto da cepa BRB-382 apresentou alta atividade citotóxica frente às linhagens tumorais HCT-116 (côlon) e MCF-7 (mama), com inibições de 98,57% e 93,41% respectivamente (50 µg). Esses valores estão entre os mais elevados relatados para actinobactérias não-*Streptomyces*, reforçando o potencial do gênero *Microbacterium* na descoberta de compostos antitumorais emergentes. A atividade pode estar relacionada à presença de flavonoides O-metilados, como a swertisina, detectados no perfil químico, que induzem apoptose via geração de ROS e ativação de caspases. A presença concomitante de peptídeos bioativos detectados pela reação com ninidrina, aliada à inibição de proteases, sugere mecanismos combinatórios de ação antitumoral, como modulação de MMPs. Portanto, a elevada citotoxicidade provavelmente resulta de sinergia entre flavonoides, peptídeos e nucleosídeos modificados, destacando a complexidade metabólica da cepa.

3.4 Perfil Químico

Os testes fitoquímicos revelaram a presença de flavonoides (coloração amarela/alaranjada após KOH) e peptídeos (coloração púrpura com ninidrina) em todos os extratos, confirmando a capacidade metabólica diversificada da cepa em diferentes meios. Essa plasticidade biossintética é indicativa de que *Microbacterium sp.* possui vias ativas de produção de metabólitos especiais, moduladas pelo ambiente de cultivo.

3.5 Atividade Antioxidante

O ensaio de DPPH em placas de CCD mostrou variação significativa entre os diferentes meios de cultivo. Os extratos produzidos em SCB líquido (SCBL) e ISP2 sólido (ISP2S) apresentaram maior intensidade de redução do radical, evidenciando forte atividade antioxidante. Em contrapartida, MB e LB resultaram em baixa bioatividade. Esses resultados sugerem que nutrientes presentes em SCB e ISP2, ricos em amido, extratos de levedura e peptonas, estimulam rotas biossintéticas associadas à

produção de antioxidantes. Além disso, o tempo de reação de 15 minutos com DPPH foi mais adequado para detecção da atividade, demonstrando compostos de cinética redox variada, alguns de ação rápida e outros de interação mais lenta.

3.6 Inibição de Proteases

A cepa BRB-382 demonstrou atividade de inibição de tripsina principalmente nos meios A1 líquido e ISP2 líquido, confirmada pela presença de halos amarelos intensos. Esse achado é particularmente relevante, pois a modulação de serino-proteases está diretamente associada a processos tumorais como invasão e metástase. O fato de meios ricos em carbono e nitrogênio favorecerem a produção sugere que clusters gênicos biossintéticos foram ativados nessas condições, corroborando dados que indicam que actinobactérias respondem a microgradientes de estresse e diversidade nutricional [2]. Assim, A1L e ISP2L mostraram-se os meios mais promissores para escalonamento de cultivos com foco na obtenção de inibidores de proteases. modificado). A swertisina, tipicamente descrita em plantas, foi identificada com alta similaridade espectral (cosseno 0,93) e confirmada por testes fitoquímicos. Sua presença em *Microbacterium* pode ser explicada por três hipóteses: (i) biossíntese endógena por vias PKS tipo III e glicosiltransferases; (ii) transferência horizontal de genes em ambiente marinho ou (iii) biotransformação de compostos vegetais/algais. A substância N6,N6-dimetiladenosina, associada a modulação de síntese de RNA e interferência em vias celulares, foi detectada com cosseno de 0,94, reforçando o papel de *Microbacterium* como produtor de nucleosídeos bioativos com potencial antitumoral.

3.7 Rede Molecular e Identificação de Metabólitos

A rede molecular construída via GNPS2 evidenciou diversidade de metabólitos incluindo flavonas, terpenos modificados, nucleosídeos derivados de purina e ácidos biliares oxidados. Entre os compostos anotados, destacam-se swertisina (flavonoide

O-glicosilado) e N6,N6-dimetiladenosina (nucleosídeo modificado). A swertisina, tipicamente descrita em plantas, foi identificada com alta similaridade espectral (cosseno 0,93) e confirmada por testes fitoquímicos. Sua presença em *Microbacterium* pode ser explicada por três hipóteses: (i) biossíntese endógena por vias PKS tipo III e glicosiltransferases; (ii) transferência horizontal de genes em ambiente marinho ou (iii) biotransformação de compostos vegetais/algais. A substância N6,N6-dimetiladenosina, associada a modulação de síntese de RNA e interferência em vias celulares, foi detectada com cosseno de 0,94, reforçando o papel de *Microbacterium* como produtor de nucleosídeos bioativos com potencial antitumoral.

3.8 Integração dos Resultados

A análise conjunta evidencia que a cepa BRB-382 combina propriedades citotóxicas, antioxidantes e inibitórias de proteases, sustentadas por um perfil químico diverso que inclui flavonoides, peptídeos e nucleosídeos modificados. Essa combinação de bioatividades é estratégica, uma vez que antioxidantes podem atuar na prevenção do estresse oxidativo associado ao câncer, enquanto inibidores de proteases e metabólitos citotóxicos podem atuar diretamente na progressão tumoral. Além disso, a identificação de swertisina e N6,N6-dimetiladenosina sugere rotas biossintéticas incomuns em bactérias, reforçando a originalidade dos resultados e ampliando o potencial biotecnológico da cepa marinha BRB-382.

4. CONCLUSÕES

O isolado marinho *Microbacterium* sp. BRB382, obtido de sedimentos profundos, demonstrou potencial biotecnológico significativo, reunindo atividades citotóxica, antioxidante e inibitória de proteases. A detecção de metabólitos como swertisina e N6,N6-dimetiladenosina evidencia a capacidade dessa cepa em produzir compostos bioativos raros, reforçando a diversidade química de actinobactérias marinhas. Esses achados indicam o potencial da BRB-382 como fonte de moléculas inovadoras para aplicação farmacêutica.

REFERÊNCIAS

- [1] RIBEIRO, I. et al. Actinobacteria from Arctic and Atlantic deep-sea sediments: biodiversity and bioactive potential. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, 2023.
- [2] FENICAL, W.; JENSEN, P.R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology*, v. 2, n. 12, p. 666–673, 2006.

AGRADECIMENTOS

Aos pesquisadores da UNIFESP e da USP pela colaboração neste estudo. Ao CPS e ao CNPq pelo apoio dado para este projeto.

¹ Ana Beatriz Oliveira Mulinário é aluna de IC com bolsa PIBITI CPS-CNPq.