



MARINHA DO BRASIL
INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MARINHA

NOREYNI CHRISTOPHE GREGO NDIAYE

**BIOPROSPECÇÃO DE INVERTEBRADOS MARINHOS EXÓTICOS E NATIVOS
DE ARRAIAL DO CABO: ATIVIDADE ANTI-INCRUSTANTE A ANTICÂNCER**

ARRAIAL DO CABO / RJ

2019

NOREYNI CHRISTOPHE GREGO NDIAYE

**BIOPROSPECÇÃO DE INVERTEBRADOS MARINHOS EXÓTICOS E NATIVOS
DE ARRAIAL DO CABO: ATIVIDADE ANTI-INCRUSTANTE A ANTICÂNCER**

Dissertação apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e a Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Marinha.

Orientador: Dr. Ricardo Coutinho
Coorientadoras: Dra. Giselle Pinto de Faria Lopes
Dra. Sabrina T. Martinez

ARRAIAL DO CABO / RJ

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares por sempre me apoiarem principalmente minha mãe, Maristela, pelo apoio incondicional em todos os períodos.

Ao meu orientador Ricardo, por ser um exemplo de perseverança e comprometimento com a ciência, e a orientação. Agradeço não apenas pelo período da dissertação, mas também por me aceitar como estagiário.

As minhas co-orientadoras, Giselle e Sabrina, por terem me ensinado praticamente tudo, pelas conversas e amizade. O trabalho só foi consolidado graças ao apoio de ambas.

Agradeço também à todos os amigos que o IEAPM, Pós-graduação e Arraial me proporcionaram, com as reuniões que tornaram os dias mais divertidos e agradáveis. Em especial o Júlio César Monteiro LOBATO por me aguentar todo o período e pela hospedagem temporária.

Ao IEAPM e todo o seu pessoal de apoio, tanto marítimo como terrestre, por me ter me recebido por todo o período e possibilitado o projeto.

Ao apoio técnico científico do pessoal do INCA, por todo o suporte na realização dos experimentos.

A todos envolvidos no Programa de Pós-graduação, das duas organizações IEAPM e UFF que possibilitaram esta jornada.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que participaram deste ciclo de aprendizado e amadurecimento científico, eu sou grato, ou melhor GRATIDÃO!

RESUMO

Os invertebrados marinhos são fonte de moléculas que possuem diferentes funções ecológicas e complexidade única. A bioprospecção visa identificar a aplicação dessas moléculas e isolamento das mesmas. Dentre essas aplicações, moléculas com propriedades anti-incrustante e anticâncer são objeto de bioprospecção em produtos naturais. A atividade citotóxica desses produtos é capaz de inibir organismos incrustantes de forma menos tóxica ao ambiente se comparado a tintas convencionais. A mesma citotoxicidade pode ser utilizada para o tratamento do câncer, uma das doenças mais letais no mundo. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial anti-incrustante e antitumoral de extratos oriundos de 6 invertebrados marinhos presentes na região sendo 2 exóticos invasores, 2 exóticos estabelecidos e 2 nativos. Para avaliação da sua atividade anti-incrustante, foi realizado ensaios de inibição com cinco espécies de bactérias formadoras do biofilme marinho, promotoras da bioincrustação. Já para avaliação anticâncer, foram analisadas a viabilidade celular das linhagens de glioblastoma T98G e U251 pelo método da fosfatase acida tanto em modelo em monocamada como tridimensional. Além disso, foi averiguado a morfologia, ciclo celular e percentual de células em mitose e apoptose por imunofluorescência para cada invertebrado. As espécies que se destacaram na atividade contra bactérias foram a *Tubastraea coccinea* e *Darwinella* sp. Já para avaliação anticâncer, as espécies mais eficazes foram *Didemnum* sp., *T. coccinea* e *Darwinella* sp.. A espécie *Didemnum* sp. foi ativa contra as duas linhagens em ambos modelos de cultivo, enquanto que *T. coccinea* demonstrou atividade contra as duas linhagens em modelo de monocamada e contra a T98G em modelo tridimensional. A IC₅₀ dos extratos foi estipulada para modelo em monocamada em 120,6, 432,8 e 703,7 (µg/ml) para a linhagem T98G sendo da *Didemnum* sp., *T. coccinea* e *Darwinella* sp. respectivamente. Para a linhagem U251 foi estipulado em 63,32, 317,2 e 882,4 (µg/ml) para *Didemnum* sp., *T. coccinea* e *Darwinella* sp. respectivamente. Além disso não foi verificada atividade tóxica contra uma linhagem sadia humana para *Didemnum* sp., *T. coccinea*. Conclui-se que *Didemnum* sp., *T. coccinea* são espécies promissoras para os desenvolvimentos de produtos biotecnológicos.

Palavras-chave: Invertebrados Marinhos. Bioprospecção Marinha. Anti-incrustante. Anticâncer. Exóticas Invasoras. Produtos Naturais Marinhos. Biotecnologia Marinha.

ABSTRACT

Marine invertebrates are a source of molecules that have differently ecological functions and unique complexity. Bioprospection aims to identify the application of those molecules and their isolation. Among these applications, molecules with antifouling and anticancer properties are goals on bioprospecting of natural products. The cytotoxic activity of these products is capable of inhibiting fouling organisms in a way less toxic to the environment compared to conventional paints. The same cytotoxicity can be used for the treatment of cancer, a disease that is most deadly in the world. Therefore, the present work aims to evaluate the antifouling and anticancer potential of extracts of 6 marine invertebrates present in the region, 2 exotic invaders, 2 established exotic and 2 natives. For the evaluation of its antifouling activity, inhibition tests were carried out against five species of marine biofilm forming bacteria, promoting biofouling. For the antitumoral evaluation, the cell viability of the T98G and U251 glioblastoma lines was analyzed by the acid phosphatase method in both monolayer and three-dimensional models. In addition, the morphology, cell cycle and percentage of cells in mitosis and apoptosis by immunofluorescence for each invertebrate were investigated. The species that be highlighted activity against bacteria were the *Tubastraea coccinea* and the *Darwinella* sp. For anticancer evaluation, the most effective species were *Didemnum* sp., *T. coccinea* and *Darwinella* sp. *Didemnum* sp. was active against both strains in both cultivation models, whereas *T. coccinea* showed activity against both strains in a monolayer model and against T98G in a three - dimensional model. The IC₅₀ of the extracts was stipulated for a monolayer model at 120.6, 432.8 and 703.7 (µg / mL) for the T98G strain on extracts of *Didemnum* sp., *T. coccinea* and *Darwinella* sp. respectively. For the U251 lineage was stipulated in 63.32, 317.2 and 882.4 (µg / ml) for *Didemnum* sp., *T. coccinea* and *Darwinella* sp. respectively. In addition, no toxic activity against a healthy human lineage for *Didemnum* sp., *T. coccinea*. It is concluded that *Didemnum* sp., *T. coccinea* are promising species for the development of biotechnological products.

Keywords: Marine Invertebrates. Marine Bioprospecting. Anti-fouling. Anticancer. Invasive Exotics. Marine Natural Products. Marine Biotechnology

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DAS VIAS METABÓLICAS (PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA) EM AMBIENTES MARINHO E TERRESTRE E EXEMPLOS DOS PRINCIPAIS GRUPOS DE SUBSTÂNCIAS FORMADAS.	13
FIGURA 2 - PRODUTOS NATURAIS ORIUNDOS DE INVERTEBRADOS MARINHOS NO MERCADO.	15
FIGURA 3 - CORES DA BIOTECNOLOGIA.....	16
FIGURA 4 - ESQUEMA DE FORMAÇÃO DO BIOFILME.	19
FIGURA 5 - MAPA IDENTIFICANDO OS PONTOS DE COLETAS EM ARRAIAL DO CABO – RJ.. ...	30
FIGURA 6 - ESPÉCIES DE INVERTEBRADOS MARINHOS COLETADOS PARA O ESTUDO.	32
FIGURA 7 - PROCESSO DE MACERAÇÃO DINÂMICA DA ASCÍDIA COLONIAL DIDEMNUM SP.	33
FIGURA 8 - DIAGRAMA DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS.	34
FIGURA 9 - DESENHO EXPERIMENTAL ILUSTRANDO A METODOLOGIA APLICADA NO PRESENTE ESTUDO.	35
FIGURA 10 - TESTE DE INIBIÇÃO BACTERIANA PELO MÉTODO DE DISCOS DE DIFUSÃO.	37
FIGURA 11 - EXTRATOS DOS INVERTEBRADOS MARINHOS DILUÍDOS COM ÁGUA DESTILADA E DMSO..	39
FIGURA 12 - ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DOS PARÂMETROS MORFOLÓGICOS UTILIZADOS DE MITOSE E APOPTOSE CELULAR.....	42
FIGURA 13 - PARÂMETROS UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DE CICLO CELULAR	44
FIGURA 14 - ATIVIDADE INIBITÓRIA DE CADA EXTRATO EM RELAÇÃO AS BACTÉRIAS FORMADORAS DO BIOFILME.	47
FIGURA 15 - VIABILIDADE DE CÉLULAS DA LINHAGEM T98G EM CULTURA EM MONOCAMADA TRATADAS COM EXTRATOS BRUTOS DOS INVERTEBRADOS APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO	52
FIGURA 16 - FOTOMICROGRAFIAS EM CONTRASTE DE FASE DAS CÉLULAS T98G CONTROLE E TRATADAS COM EXTRATOS BRUTOS NA CONCENTRAÇÃO 200 µG/ML.	53

FIGURA 17 - VIABILIDADE DE CÉLULAS DA LINHAGEM U251 EM CULTURA EM MONOCAMADA TRATADAS COM EXTRATOS BRUTOS DOS INVERTEBRADOS MARINHOS APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO	57
FIGURA 18 - FOTOMICROGRAFIA EM CONTRASTE DE FASE DAS CÉLULAS U251 CONTROLE E TRATADAS COM EXTRATOS BRUTOS NA CONCENTRAÇÃO 200 µG/ML APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO.....	58
FIGURA 19 - VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM T98G EM MODELO TRIDIMENSIONAL TRATADAS COM EXTRATOS BRUTOS DOS INVERTEBRADOS MARINHOS APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO	63
FIGURA 20 - FOTOMICROGRAFIAS EM CONTRASTE DE FASE DAS CÉLULAS T98G CONTROLE E TRATADAS COM EXTRATOS BRUTOS NA CONCENTRAÇÃO 400 µG/ML APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO.....	64
FIGURA 21 - VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS DA LINHAGEM U251 EM MODELO TRIDIMENSIONAL TRATADAS COM EXTRATOS BRUTOS DOS INVERTEBRADOS MARINHOS APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO	67
FIGURA 22 FOTOMICROGRAFIAS EM CONTRASTE DE FASE DAS CÉLULAS U251 CONTROLE E TRATADAS COM EXTRATOS BRUTOS NA CONCENTRAÇÃO 400 µG/ML APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO.....	68
FIGURA 23 - VOLUME DOS ESFEROIDES DA LINHAGEM T98G TRATADAS COM 400 µG/ML EXTRATOS BRUTOS DOS APÓS 72 HORAS E COMPARADAS COM O CONTROLE.....	70
FIGURA 24 - VOLUME DOS ESFEROIDES DA LINHAGEM U251 TRATADAS COM EXTRATOS BRUTOS DOS INVERTEBRADOS MARINHOS APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO.	71
FIGURA 25 - VIABILIDADE DA LINHAGEM SADIA IHF TRATADAS COM EXTRATOS BRUTOS E CONTROLE POR 72 HORAS E AVALIADAS PELO MÉTODO APH..	73
FIGURA 26 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS RELATIVOS AO CONTROLE PARA CADA EXTRATO DA LINHAGEM T98G APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO	76
FIGURA 27 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS EM APOPTOSE PARA CADA EXTRATO E CONTROLE DA LINHAGEM T98G APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO.....	77
FIGURA 28 - FOTOGRAFIAS DOS NÚCLEOS CELULARES DA LINHAGEM T98G TRATADAS COM EXTRATOS E CONTROLE POR 72 HORAS	79

FIGURA 29 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS EM MITOSE PARA CADA EXTRATO E CONTROLE DA LINHAGEM T98G APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO	80
FIGURA 30 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS RELATIVOS AO CONTROLE PARA CADA EXTRATO DA LINHAGEM U251 APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO.....	81
FIGURA 31 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS EM APOPTOSE PARA CADA EXTRATO E CONTROLE DA LINHAGEM U251 APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO.....	82
FIGURA 32 - FOTOGRAFIAS DOS NÚCLEOS CELULARES DA LINHAGEM U251 TRATADAS COM EXTRATOS E CONTROLE POR 72 HORAS	84
FIGURA 33 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS EM MITOSE PARA CADA EXTRATO E CONTROLE DA LINHAGEM U251 APÓS 72 HORAS DE TRATAMENTO.....	85
FIGURA 34 - CICLO CELULAR DE CÉLULAS TRATADAS COM EXTRATOS E O CONTROLE POR 72 HORAS	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- LISTA DE DROGAS APROVADAS COMERCIALMENTE DERIVADAS DE INVERTEBRADOS MARINHOS	26
TABELA 2 - ESPÉCIES DE INVERTEBRADOS MARINHOS AVALIADOS NO PRESENTE ESTUDO...	31
TABELA 3 - EXTRATOS QUE APRESENTARAM INIBIÇÃO AS BACTÉRIAS MARINHAS CONSIDERANDO UM HALO DE 5MM DE DIÂMETRO DOS DISCOS, SENDO + PARA MAIORES DE 5 MM E – PARA MENORES DO QUE 5 MM.	48
TABELA 4 - RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO CAPAZ DE INIBIR 50% DAS CÉLULAS VIÁVEIS (IC ₅₀) PELO TESTE DE VIABILIDADE CELULAR FOSFATASE ACIDA EM MONOCAMADA DA LINHAGEM T98G E U251.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
AC	Água Costeira
ACAS	Água Central do Atlântico Sul
DAPI	4,6-DiAmidino-2-Phenylindole, dllactate
DMSO	Dimetilsufóxido
EMEA	European Medicines Agency
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
FDA	Food and Drug Administration
GBM	Glioblastoma
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
IEAPM	Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira
IHF	Induced Human Fibrioblast
PBS	Tampão Fosfato-Salino
RJ	Rio de Janeiro
Resex-Mar	Reserva Extrativista Marinha
SBM	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
UFF	Universidade Federal Fluminense

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS.....	11
1.2 ESPÉCIES EXÓTICAS, BIOFILME E BIOINCRUSTAÇÃO	16
1.3 BIODIVERSIDADE MARINHA DE ARRAIAL DO CABO.....	20
1.4 BIOPROSPECÇÃO MARINHA ANTICANCER	23
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	28
3 HIPÓTESE	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 COLETA DOS ORGANISMOS MARINHOS	29
4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES	31
4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS	33
4.4 DESENHO EXPERIMENTAL	35
4.5 BIOFILME.....	36
4.5.1 <i>Cultura bacteriana</i>	36
4.5.2 <i>Ensaio de inibição bacteriana</i>	36
4.6 ATIVIDADE ANTITUMORAL	38
4.6.1 <i>Cultura celular</i>	38
4.6.2 <i>Ensaio de viabilidade celular</i>	39
4.6.3 <i>Imunofluorescência</i>	40
4.6.4 <i>Ciclo celular</i>	42
4.7 ANÁLISES ESTÁTÍSTICAS	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 BIOFILME.....	46
5.1.1 <i>Inibição bacteriana</i>	46
5.2 ATIVIDADE ANTICÂNCER.....	50
5.2.1 <i>Viabilidade celular - Modelo 2D</i>	50
5.2.2 <i>Viabilidade celular – Modelo 3D</i>	62
5.2.3 <i>Viabilidade de células sadias - (APH)</i>	73
5.2.4 <i>Potencial citotóxico ou citostático</i>	75

<i>5.2.5 Ciclo Celular</i>	86
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
6.1 CONCLUSÕES	87
6.2 PERSPECTIVAS	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

O mar vem sendo usado pela humanidade desde os primórdios da caça e pesca. Ao passar do tempo, a humanidade começou a fazer uso de organismos marinhos em diversas áreas além da alimentícia, como ambiental, energia e saúde. Nos últimos anos através do aperfeiçoamento técnico científico, os organismos marinhos são vistos como fontes de produtos naturais com relevante potencial biotecnológico (MOLINSKI et al., 2009; RAMPELOTTO et al., 2018). A biotecnologia é uma área que possui diversas definições, porém de forma ampla, ela é definida como qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos ou seus derivados para gerar um produto, processo, modificação ou serviço (ONU, 1992). O processo de descobrimento e aplicação de uma matriz biológica ou derivada dela, é denominado de bioprospecção (BRASIL, 2010).

Com o avanço da biotecnologia e da bioprospecção marinha, foi notado que os organismos marinhos possuem propriedades peculiares não encontradas no ambiente terrestre. Essas propriedades têm demonstrado diversas aplicações, valorizando potencialmente os 70% de ambiente marinho presentes na superfície do planeta (MALVE, 2016). Portanto, a área de estudo dos produtos naturais marinhos é extremamente importante, uma vez que caracteriza e identifica as moléculas bioativas encontradas nos organismos que possuam aplicabilidade em atividades das áreas industriais com importante impactos socioeconômicos. Atualmente os produtos naturais são um dos principais objetivos da bioprospecção marinha, que no qual visa entre outros encontrar metabolitos com propriedades de interesse humano (TEIXEIRA, 2009).

Todos os organismos são constituídos por moléculas ativas chamadas de metabolitos. Esses são classificados em metabolitos primários ou secundários. Os metabolitos primários são aqueles que possuem funções essenciais para a manutenção do metabolismo basal do organismo, e quando não estão presentes acarretam a morte do organismo. Como eles exercem funções essenciais no metabolismo, eles têm a tendência em não se diferenciar evolutivamente, já que o papel é comum na maioria dos organismos. Os carboidratos, aminoácidos comuns e

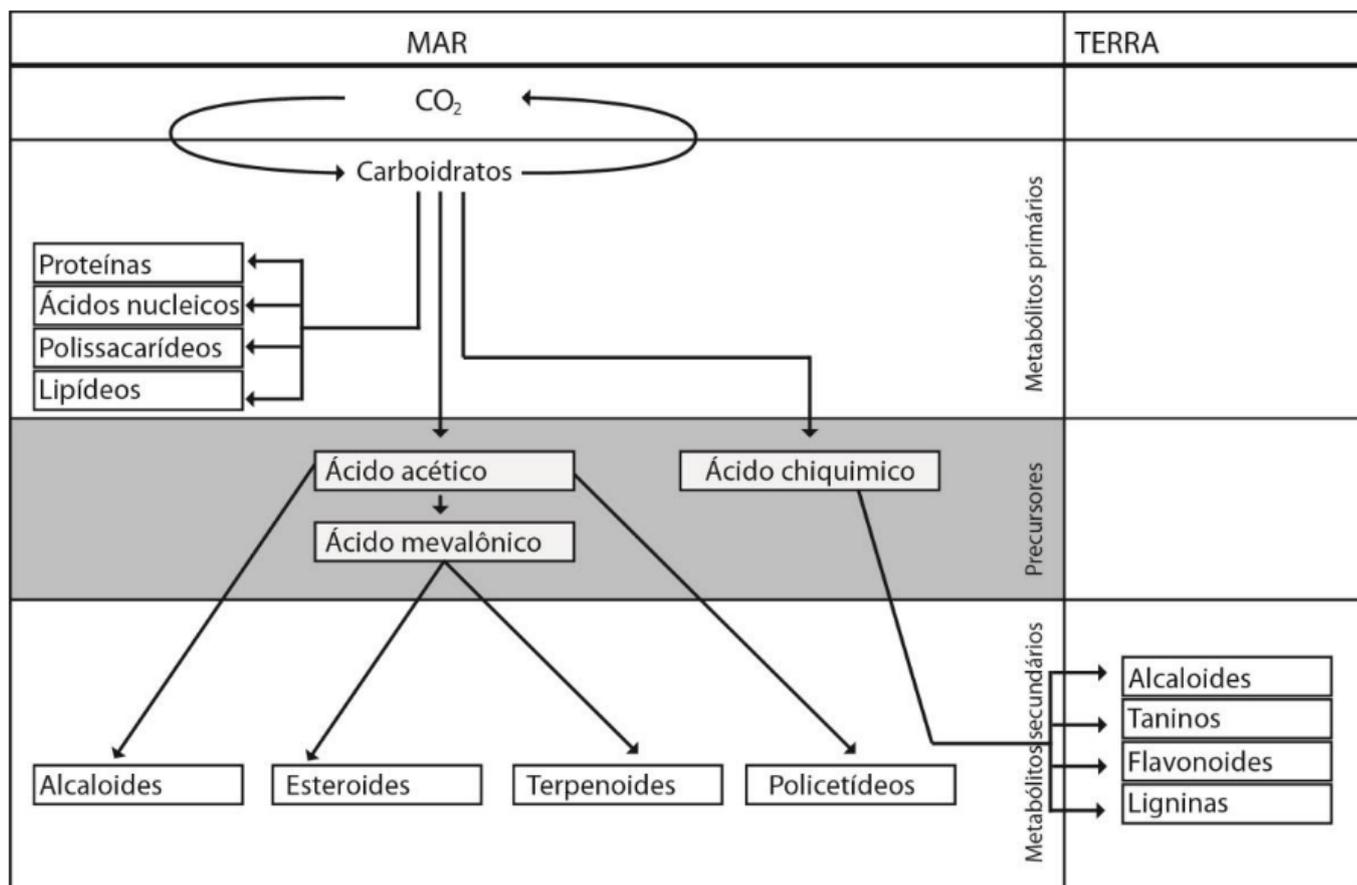
ácidos nucleicos estão entre os principais metabolitos primários e presentes em processos como a respiração celular, fotossíntese e síntese proteica (NELSON; COX, 2014)

Os metabolitos secundários ou complementares, também chamados de produtos naturais, consistem em moléculas bioativas não essenciais ao organismo, no possuem uma grande diversidade de funções específicas e grupos estruturais (NELSON; COX, 2014). Diversos metabolitos secundários apresentam funções conhecidas como os hormônios, pigmentos, feromônios, sinalizadores e defesas químicas, tanto nos organismos marinhos como terrestres. Os grupos de metabolitos secundários como alcaloides, polifenóis, terpenos e acetogeninas são encontrados entre os organismos marinhos e se diferenciam fundamentalmente dos metabolitos oriundo de fontes terrestres na via sua de produção (BRASIL, 2010; NELSON; COX, 2014).

Os metabolitos secundários possuem a sua biossíntese a partir de vias derivadas dos metabolitos primários. As principais rotas de transformação são a do ácido acético e a do ácido chiquímico (Figura 1). No ambiente terrestre os derivados do ácido chiquímico possuem grande relevância evolutiva, dando origem a compostos como a lignina presente nos vegetais superiores, porém no ambiente marinho esta via detém menor relevância. A via do ácido acético é mais expressiva no ambiente marinho, sendo que muitas vezes há uma convergência de rotas para produção de um metabolito secundário (TEIXEIRA, 2009).

A especificidade dos metabolitos secundários está correlacionada evolutivamente a adaptação das espécies, tendo um grande papel em seu nicho ecológico. São diversas interações ecológicas promovidas, como a proteção contra predadores, bioincrustação, comunicação química intraespecífica e interespecífica, hospedeiro-epibionte, hospedeiro-patógeno, reprodução e competição por substrato, nutrientes e luz, o que torna os metabolitos secundários imprescindíveis para o ecossistema marinho (PEREIRA et al., 2002; PEREIRA; OLIVEIRA; SUDATTI, 2011).

Figura 1 - Representação das vias metabólicas (primária e secundária) em ambientes marinho e terrestre e exemplos dos principais grupos de substâncias formadas.



Fonte: Teixeira et al. 2009

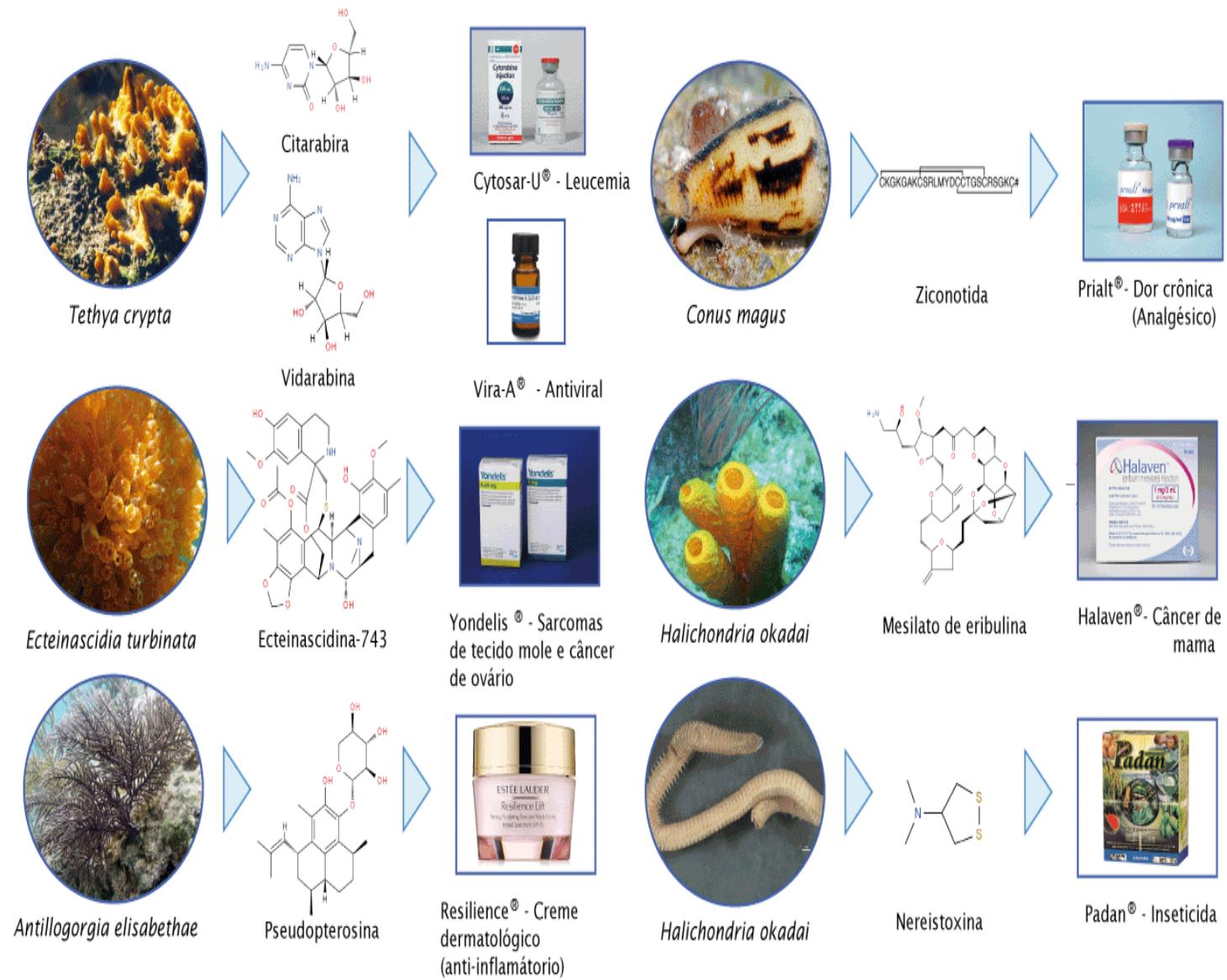
A produção dos metabólitos secundários ou produto natural é dependente do estágio de ciclo de vida do organismo e as condições ambientais que ele se encontra. Sua produção pode ser alterada em consequência das condições abióticas e bióticas como luz, temperatura, disponibilidade nutrientes, competição, presença de predadores e simbióticos (PEREIRA et al., 2002; PEREIRA; OLIVEIRA; SUDATTI, 2011). Tais condições implicam a necessidade de uma pesquisa do ponto de vista ecológico, para uma análise aprimorada da produção e das vias de biossíntese dos metabólitos secundários. Atualmente é reconhecido que muitos dos produtos naturais isolados de invertebrados marinhos, são na verdade oriundos ou possuem parte da via biossintética a partir de microrganismos associados (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

Organismos bentônicos sesséis são destaques na bioprospecção de produtos naturais marinhos, como as macroalgas e esponjas, cnidários, ascídias e moluscos.

Tal característica se deve pela sua natureza sésil, que no caso não possuem mobilidade ou é limitada. Além disso grande parte deles não detém defesas físicas, assim tornando sua defesa química seu maior recurso para inibição de predadores, competidores e patógenos (JASPARS et al., 2016). Tal condição evolutiva tornou estes organismos um verdadeiro arsenal de produtos naturais, com uma grande diversidade e complexidade de moléculas bioativas. Além disso, o microambiente específico proporcionado por estes organismos os tornam incubadores de microrganismos singulares, que também produzem produtos naturais (COSTA-LOTUFO et al., 2009; TIANERO et al., 2015). Atualmente, já existem produtos naturais derivados de invertebrados marinhos que já são comercializados em diversos setores, como cosméticos, alimentício, farmacológico (Figura 2).

As áreas de aplicação dos produtos naturais são diversificadas, porém a busca por novos fármacos é destaque na parte de bioprospecção marinha. Tal circunstância pode ser afirmada pelo grande índice de moléculas com citotoxicidade, garantindo assim uma ampla gama de aplicações biomédicas como antitumoral, antimicrobiana, antiviral e antiprotozoários (COSTA-LOTUFO et al., 2009; NEWMAN; CRAGG, 2016). Essa atividade citotóxica visada na farmacologia pode ser transpassada em diversos produtos de outras áreas como agrônômico com pesticidas e anti-incrustante na indústria naval.

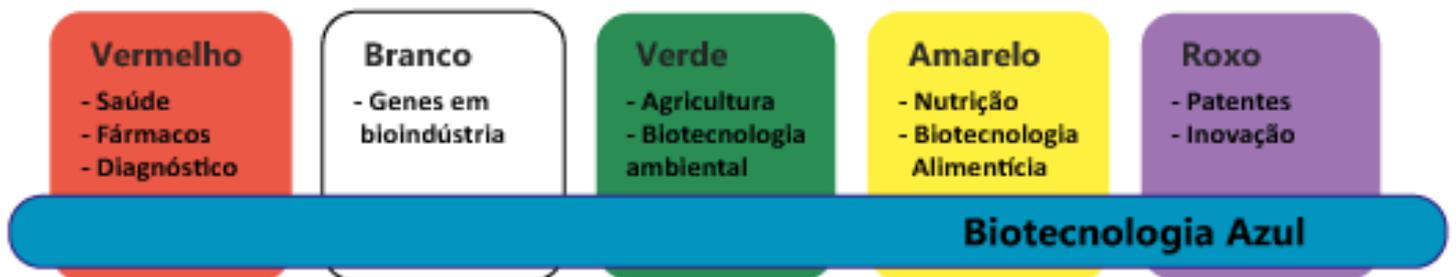
Figura 2 - Produtos naturais oriundos de invertebrados marinhos no mercado.



Fonte: Modificado de JASPARS et al., 2016

A biotecnologia marinha não se limita na aplicação no ambiente marinho, porém sua matriz biológica é derivada do mar. A biotecnologia pode ser classificada por cores de acordo com a área a ser aplicada ou derivada, tal classificação é mais utilizada para comunicação e percepção pública da área. Sendo dividida em 10 cores por da Da Silva em 2004. O branco para processos bioindustriais, o verde para agronomia e ambiente, o amarelo para o setor alimentício, a roxa para patentes e inovação, o vermelho para saúde e o azul para a área aquática, do mar. No caso da biotecnologia azul ou marinha, essa permuta em diversos setores ou cores da biotecnologia (Figura 3), sendo uma área com uma biodiversidade ou matriz biológica exclusiva, tornando-a peculiar (RAMPELOTTO et al., 2018)

Figura 3 - Cores da Biotecnologia..



Fonte adaptada: MICROBE; TIDE, 2005; RAMPELOTTO et al., 2018

1.2 ESPÉCIES EXÓTICAS, BIOFILME E BIOINCRUSTAÇÃO

As espécies exóticas são aquelas que se encontram fora do seu ponto de registro, que no qual podem ser introduzidas de forma proposital ou não (CARLTON, 1996). Elas podem ser classificadas de acordo com o seu estado populacional, ecológico e impactos na saúde pública, sendo estas espécies exóticas contidas, detectadas, estabelecidas ou invasoras.

As espécies exóticas contidas, são aquelas que se encontram em ambiente artificial controlado, com isolamento total ou parcial do ambiente natural. As espécies exóticas detectadas em ambiente natural, são consideradas em duas ocasiões, quando a espécie é detectada, porém não há um aumento na abundância ou não

havendo dispersão. As estabelecidas são aquelas que se fixaram de tal forma que sua presença é notada recorrentemente em uma área, porém sem apresentar impactos socioeconômicos ou ecológicos. Por fim as espécies invasoras, são exóticas estabelecidas que apresentem uma das seguintes características: exibem um crescimento populacional em abundância ou alta dispersão geográfica, ser predadora de espécies nativas, patogenicidade em espécies importantes ecologicamente e economicamente e/ou introduzir toxinas na cadeia trófica, além disso também são consideradas invasoras as espécies que demonstrarem qualquer tipo de impacto socioeconômico (LOPES et al., 2009) .

Existem diversos vetores de introdução das espécies exóticas, entre eles se destacam os cascos dos navios, plataformas petrolíferas e água de lastro (FERREIRA; GONÇALVES; COUTINHO, 2006). Com o aumento mundial do fluxo de navios pela globalização, utilização dos recursos marinhos e mudanças climáticas, se contribuiu para um aumento de introduções de espécies exóticas mundialmente. As espécies exóticas podem gerar diversas consequências negativas, ambientais e socioeconômicas. Pode resultar na diminuição da biodiversidade, com a homogeneização do ambiente que perde suas propriedades peculiares e ecológicas. Tal mudança nas dinâmicas ecológicas pode propiciar a introdução e estabelecimento de outras espécies exóticas, que em condições normais não se estabeleceria ou, por outro lado, pode levar a extinção de espécies nativas, que contribuem economicamente em uma região, devido a competição por alimento, luz e espaço (BRASIL, 2009; WILLIAMS et al., 2013)

No ambiente marinho, os costões rochosos, substratos naturais e artificiais, são ambientes que há uma grande competição por espaço por organismos bentônicos. O mar mesmo tendo uma grande área, poucas áreas detêm condições para estabelecimento de organismos bentônicos, já que grande parte deles necessita um substrato duro para fixação. A competição por substratos duros próximos as costas são ainda maiores para organismos bentônicos incrustantes, devido o aporte de nutrientes vindos da terra e da fonte de luz que propicia o crescimento de organismos filtradores e fotossintetizantes (LOPES et al., 2009; RICCIARDI et al., 2017).

Organismos bentônicos são os que possuem uma etapa da vida nos bentos, área que tem papel fundamental na dinâmica da cadeia trófica dos oceanos. Muitas

das espécies exóticas possuem algum momento do ciclo da vida que são bentônicas bioincrustantes, o que pode gerar um impacto indiretamente em todo o ecossistema costeiro. A bioincrustação nada mais é do que o processo de estabelecimento e crescimento de microrganismos e macrorganismos em um substrato natural ou artificial. A bioincrustação pode ser dividida entre microincrustação e macroincrustação, porém seu fenômeno negativo normalmente é ligado aos macrorganismos como cracas, briozoários, ascídias, esponjas e macroalgas (GAMA; PEREIRA; COUTINHO, 2009).

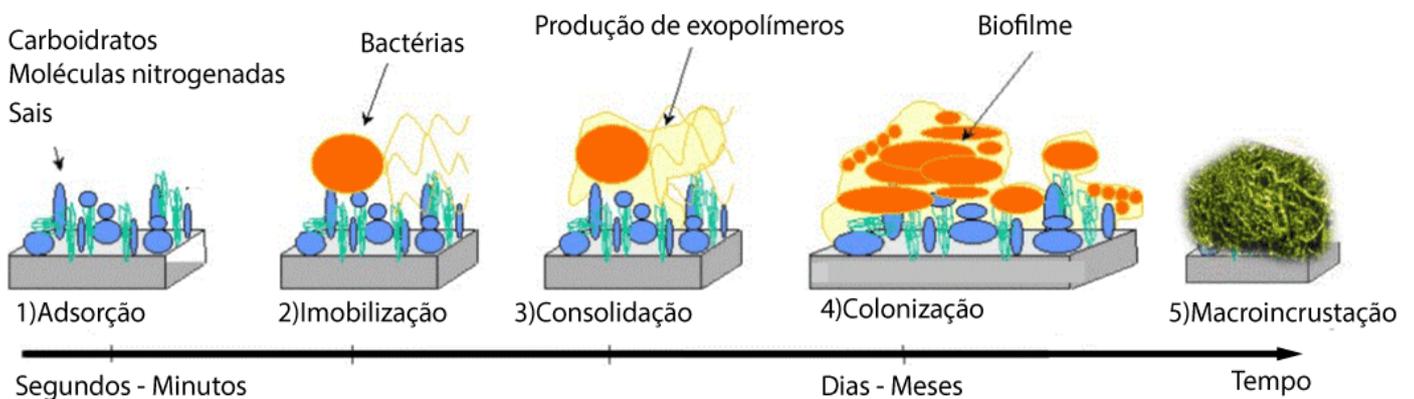
A bioincrustação favorece a corrosão e degradação de cascos de navios, plataformas e outras estruturas artificiais, o que no qual gera uma manutenção contínua e específica. Além disso a bioincrustação também ocasiona uma diminuição da velocidade dos navios devido a resistência friccional à água, logo um menor rendimento e um maior consumo de combustível, que pode chegar em até 40% (VETERE et al., 1999; OLIVEIRA; LARSSON; GRANHAG, 2018). A bioincrustação gera impactos socioeconômicos em todos os ambientes aquáticos não apenas o marítimo, em usinas hidrelétricas obstruindo a captação de água e arrefecimento, na captação de água potável, prejudicando sistemas de filtração e coleta e impedindo sistemas de refrigeração de embarcações (SANTOS; LAMONICA, 2008). A pesca artesanal de populações tradicionais ou indígenas e as atividades relacionadas ao uso dos recursos pesqueiros também podem sofrer impactos diretos e indiretos da introdução de espécies exóticas bentônicas bioincrustantes (LOPES et al., 2009).

A bioincrustação pode ser dividida em microincrustação e macroincrustação, considerando que microrganismos compõe a microincrustação e macrorganismos formam a macroincrustação. O processo de bioincrustação é complexo e diversificado, sendo diversos modelos propostos, no entanto um modelo clássico de “facilitação”, considera que a microincrustação é precursora da macroincrustação (GAMA; PEREIRA; COUTINHO, 2009). A microincrustação nada mais é que um biofilme microbiano de espécies oportunistas presentes no ambiente aquático. A formação do biofilme, que no qual é a colonização, congregação e crescimento de diversos microrganismos. A formação do biofilme se inicia com adsorção de macromoléculas orgânicas e/ou inorgânicas ao substrato logo após a imersão na água. Com adsorção de tais macromoléculas, se forma uma camada condicionadora que permite a colonização por adesão de bactérias. O crescimento bacteriano leva a

produção de polímeros extracelulares e modificações físico-químicas na superfície que influenciam a colonização por outras bactérias e microrganismos eucariotos unicelulares como diatomáceas, leveduras e protozoários. Os exopolímeros produzidos pelas bactérias e as modificações no substrato protegem e auxiliam o desenvolvimento dessa comunidade microincrustante, que no qual se estabelece de forma irreversível ao passar do tempo (M. LEHAITRE; C. COMPÈRE, 2008).

Esse microambiente possui uma alta diversidade de microrganismos, inclusive patógenos, que promove resistência, comunicação e adaptabilidade aos mesmos. Além disso, após o amadurecimento do biofilme os microrganismos podem se dispersar no ambiente assim colonizando outros pontos. Ao decorrer do desenvolvimento do biofilme, o substrato sofre alterações, como biocorrosão, que diminuem a sobrevivência do material no ambiente aquático e podem favorecer o estabelecimento de uma comunidade de organismos macroscópicos, os macroincrustantes (DANG; LOVELL, 2016; CARVALHO, 2018). O microambiente fornecido pelo biofilme e a secreção de substâncias no ambiente, como complexos de proteínas-lipossacarídeos e exopolímeros, podem induzir e estimular o estabelecimento de larvas de invertebrados que se desenvolvem sobre a microincrustação, acarretando na macroincrustação (HADFIELD, 2010).

Figura 4 - Esquema de formação do biofilme.



Fonte: Modificado de M. LEHAITRE; C. COMPÈRE, 2008

O biofilme não gera apenas impactos socioeconômicos em ambientes aquáticos, ele também é um grande desafio para indústria biomédica. É atribuído ao biofilme grande parte das infecções em superfícies de ambientes hospitalares como cateteres, portas, leitos, instrumentos cirúrgicos e dispositivos médicos (BRYERS, 2008; DEWASTHALE; MANI; VASDEV, 2018). A formação do biofilme induz uma infecção crônica nos pacientes hospitalares assim promovendo um novo quadro de enfermidade em pessoas já debilitadas, que pode levar ao óbito. Além disso, devido à estruturação do biofilme e sua produção de exopolímeros, eles são significativamente menos suscetíveis a antibióticos e ao sistema imunológico. Nem todas as bactérias no biofilme hospitalar são patogênicas, porém os diversos beneficiamentos proporcionados amplificam e criam oportunidades de infecção (DEWASTHALE; MANI; VASDEV, 2018). A formação de placas ateroscleróticas em paredes artérias pode ser descrito como um tipo de bioincrustação, que promove doenças vasculares (MAGIN; COOPER; BRENNAN, 2010; ALLEN et al., 2016).

1.3 BIODIVERSIDADE MARINHA DE ARRAIAL DO CABO

É possível afirmar que espécies exóticas, bioincrustação e biofilme desencadeiam impactos em diversos ambientes e setores, desde ecológicos, econômicos e de saúde pública. Assim analisando um ambiente regional, que possui grande dependência de atividades que fazem uso de recursos pesqueiros e marítimos, concretizam-se possibilidades de uma exploração ecologicamente sustentável e viável. Municípios que tenham um elevado fluxo de embarcações ou plataformas petrolíferas possuem maiores chances de introduzir espécies exóticas, devido a capacidade de bioincrustação nos cascos e estruturas (SEEBENS; GASTNER; BLASIUS, 2013). Diante disso, Arraial do Cabo é um município que se enquadra nessa alta atividade marítima e dependente de recursos naturais (FERREIRA; GONÇALVES; COUTINHO, 2006).

Arraial do Cabo é um município localizado no estado do Rio de Janeiro (42° 01' 40" W - 22° 57' 58" S), que faz parte da Unidade de Conservação Federal Resex-Mar (Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo). A Resex-Mar foi criada em 1997, com o objetivo de garantir a exploração sustentável e a conservação dos recursos

naturais tradicionalmente utilizados para pesca artesanal, pela população extrativista desse município (BRASIL, 1997).

Na região de Arraial do Cabo ocorre o fenômeno oceanográfico da ressurgência, que é descrito pelo afastamento da Água Costeira (AC) e ascensão de massas de águas frias, como a Água Central do Atlântico Sul (ACAS). Tal fenômeno ocorre devido a geomorfologia da costa de Arraial do Cabo e o regime de ventos que incidem na região (COELHO-SOUZA et al., 2012). Essa massa de água que ascende é caracterizada por temperaturas abaixo de 20°C e ricas em nutrientes, que quando atinge a camada eufótica proporciona um desenvolvimento da produção primária, como crescimento e aumento de fitoplânctons. Conseqüentemente o aumento dessa produção primária favorece o desenvolvimento de outros níveis tróficos da região (VALENTIN; ANDRE; JACOB, 1987; GONZALEZ-RODRIGUEZ, 1994). Tal conjuntura torna Arraial uma região de grande diversidade biológica e abundância marinha. Além disso, devido a baixa sedimentação e precipitação, e ausência de rios, tornam suas águas claras e com uma beleza extravagante, tornando assim Arraial uma cidade com grande atividade turística marítima (GIGLIO et al., 2017; SILVA et al., 2018).

Nesse contexto, Arraial é um município com grande dependência de atividades que fazem uso de recursos naturais e de alto fluxo de embarcações, possibilitando uma dispersão de espécies exóticas bioincrustantes, que podem gerar impactos diretos na economia e ambiente. Já foi relatado espécies exóticas de invertebrados bentônicos na região, classificadas desde exóticas estabelecidas à invasoras. Dentre elas, os cnidários enquadrando corais (Cnidaria), esponjas (Porifera) e ascídias (Chordata) são encontrados com abundância na região. Tais filos taxinômicos são conhecidos pela seus produtos naturais e suas aplicações cosméticas, ambientais e farmacológicas (IÓCA; NICACIO; BERLINCK, 2018).

O hexacoral *Tubastrea coccinea* Lesson, 1829 é uma espécie invasora presente em Arraial do Cabo, reportada pela primeira vez em 2003 (Ferreira, 2003) , introduzida na região provavelmente por bioincrustação em plataformas e navios de exploração petrolíferas. No mesmo ano, também foi registrada a presença do octacoral *Chromonephthea braziliensis* van Ofwegen (antiga *Stereonephthya* aff. *Curvata*), e provavelmente pelos mesmos vetores (FERREIRA, 2003; BATISTA et al., 2017). As duas espécies de coral demonstraram atividades biológicas em seus

metabolitos secundários na defesa química *in situ* contra outros invertebrados e peixes (LAGES et al., 2006, 2010b). Análises citotóxicas e de mutagenicidade foram realizadas com extratos de *C. braziliensis* em linhagens de *Salmonella typhimurium* porém não foi observado tal potencial *in vitro* (CARPES et al., 2013). No entanto foi verificado a toxicidade contra larvas do microcrustáceo *Artemia salina* e genotoxicidade no DNA plasmidial (CARPES; FELZENSZWALB; AIUB, 2013)

Atualmente, outra espécie exótica estabelecida em Arraial do Cabo é a esponja *Darwinella sp.* Estudos com o extrato bruto de seu gênero já demonstraram atividade antimicrobiana contra bactérias e leveduras (SELEGHIM et al., 2007). Além disso foi reportado que o extrato metanólico da mesma possuem atividade contra o parasita *Leishmania infantum* (RAMIREZ; BERLINCK, 2015).

A ascídia *Didemnum sp.* é uma nova espécie exótica encontrada em Arraial, sua identificação sendo estabelecida, porém se sugere que seja uma nova espécie. Atualmente ela pode ser considerada como invasora devido seu alto crescimento populacional e capacidade de reprodução (BRANCO; COUTINHO; COSTA, 2018). É relatado que o gênero *Didemnum* possui diversos produtos naturais com atividade de inibição contra bactérias patogênicas como *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio anguillarum*. Além disso diversas espécies do gênero *Didemnum* demonstraram atividade antiviral e anti-malarial (PALANISAMY; RAJENDRAN; MARINO, 2017). No entanto, a espécie invasora encontrada em Arraial do Cabo se assemelha morfológicamente a *Didemnum perlucidum* e *Didemnum vexillum*, duas espécies que não apresentam estudos na linha de produtos naturais até o momento (BRANCO; COUTINHO; COSTA, 2018).

Outros invertebrados nativos se encontram na região, porém não se tem uma investigação dos seus produtos naturais em uma nova perspectiva farmacêutica e ambiental, como a *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) e *Phyllogorgia dilatata* (Esper, 1806). Extratos do hexacoral *Palythoa caribaeorum* demonstrou atividade tóxica contra o microcrustáceo *A. salina*, no entanto nenhuma atividade antimicrobiana foi apresentada (LIMA et al., 2013; DE ALENCAR et al., 2015). No caso da gorgônia *Phyllogorgia dilatata* obtiveram atividade antibacteriana contra patógenas e análises em *in situ* demonstraram atividade anti-incrustante. No caso da avaliação da atividade anti-incrustante, extratos obtidos *P. dilatata* foram

inseridos em géis e adicionados em placas em campo, apresentando inibição contra cracas (PEREIRA et al., 2002; LIMA et al., 2013).

Diante disso, demonstra-se um grande potencial de produtos naturais oriundos de invertebrados marinhos exóticos estabelecidos, invasores e nativos na região de Arraial do Cabo, para atividade antibacteriana e conseqüentemente anti-incrustante. A capacidade de inibir bactérias formadoras do biofilme está ligada com a sua capacidade de inibição da microincrustação e possivelmente implicar na inibição da macroincrustação. A bioincrustação como um todo pode ocasionar problemas para engenharia naval, meio ambiente e saúde pública. O potencial invasor de espécies exóticas pode se relacionar com a sua ecologia química, que no qual lhe pode garantir vantagens ecológicas a novos ambientes (MOLLO; CIMINO; GHISELIN, 2015). Esse potencial invasor também pode se relacionar com a capacidade de bioincrustação do organismo, já que a bioincrustação é um processo dinâmico e competitivo entre espécies bioincrustantes. Com isso, a capacidade de bioincrustação e invasão, pode se relacionar com a produção de produtos naturais com potencial biotecnológico. Através do potencial biotecnológico desses produtos naturais, esse estudo propõe duas diferentes abordagens a partir de testes *in vitro*, em que além de ser testada sua atividade anti-incrustante, também é avaliado seu potencial farmacológico na área anticâncer.

1.4 BIOPROSPECÇÃO MARINHA ANTICANCER

De acordo com o *National Cancer Institute* dos Estados Unidos, aproximadamente 38,4% dos homens e mulheres serão diagnósticos com câncer em algum momento na sua vida. No Brasil, foi estimado que nos anos de 2018 e 2019, haverá 600 mil novos casos de câncer em cada ano. O câncer cerebral em conjunto com a medula central é classificado como câncer no sistema nervoso central (SNC), sendo que no Brasil foi estimado 11.320 novos casos de câncer no SNC nos anos de 2018 e 2019 em cada ano (INCA, 2017). Com esses dados é evidente a necessidade de desenvolvimento e busca constante de novas formas de tratamento para o câncer,

sendo a bioprospecção, uma estratégia em potencial, visto que já existem medicamentos baseados em compostos bioativos marinhos.

A bioprospecção de fármacos marinhos teve seu grande marco inicial na década de 1950, com a descoberta e isolamento de nucleosídeos com propriedades anticâncer e antivirais, derivados da esponja *Tethya crypta* (antiga *Cryptotethya crypta*) (BERGMANN; FEENEYZ, 1950). Tais nucleosídeos se tornaram a base para análogos sintéticos dos fármacos Ara-C (Citarabina), que é utilizado para o tratamento de Leucemia Mielóide Aguda, e a Ara-A (Vidarabina) indicada para o tratamento de vírus da *herpes simplex*. Além de ser a primeira descoberta marítima na área, também apresentou dois novos contextos científicos, que os nucleosídeos possuem função biológica sem uma ribose ou desoxirribose na sua estrutura e o conceito de antimetabólito para tratamentos quimioterápicos anticâncer. Os dois fármacos foram aprovados para uso clínico em 1969 pela agência reguladora “Food and Drug Administration” (FDA) nos Estados Unidos da América. (MAYER et al., 2010; SAGAR; KAUR; MINNEMAN, 2010; JIMENEZ; WILKE; COSTA-LOTUFO, 2018).

Outro passo histórico da bioprospecção marinha foi através de um invertebrado sésil em 1974, com o isolamento do primeiro metabolito de uma ascídia (*Aplidium sp.*) por Fenical et cols.. A molécula de hidroquinona isolada demonstrou atividade quimiopreventiva em sarcomas e carcinoma mamário em testes com animais, no entanto não foi aprovada em sua fase clínica devido sua elevada toxicidade (DAVMSON, 1992)

Os investimentos vindos da indústria farmacêutica, tiveram um ponto de partida e em 1978 com a publicação de uma grande quantidade de prostaglandinas isoladas da gorgônia *Plexaura homomalla*. Cerca de 2 a 3 % do peso seco do octacoral foi extraído em produtos naturais, o que no qual, é uma das maiores quantidades reportadas até o presente (COSTA-LOTUFO et al., 2009; FELÍCIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012). Foi observado que essas prostaglandinas tinham atividade contra predadores, que embora palatável inicialmente induzia êmese e aversão nos predadores (GERHART, 1991).

Em 2004, a FDA aprovou um novo fármaco de origem marinha, a ziconotida (Prialt®), produto derivado do veneno do molusco marinho *Conus magnus* para o tratamento de dor crônica (MOLINSKI et al., 2009; MAYER et al., 2010). O

espaçamento de tempo foi devido o declínio de investimento na área pela indústria farmacêutica. Um dos motivos desse declínio, foi a aposta na química combinatório para o descobrimento de novos fármacos, que no qual foi priorizada até a década de 90. Com a falta de resultados da química combinatória, paralelamente com o aumento do conhecimento e tecnologias, como a biotecnologia, possibilitou uma nova perspectiva do mar e retomada de investimentos no final dos anos 90 (HAEFNER, 2003; MAYER et al., 2010; JASPARS et al., 2016). Já em 2007, se teve um novo marco na bioprospecção marinha, a liberação comercial do Yondelis® ou Tracbetina pela “European Medicines Agency” (EMA), sendo o primeiro fármaco de origem marinha para o tratamento de sarcomas de tecido mole (CUEVAS; FRANCESCH, 2009).

A Tracbetina (Ecteinascidina-743 / ET-743) foi obtida inicialmente de uma ascídia colonial caribenha *Ecteinascidia turbinata*, sendo liberada em 2007 para tratamento sarcomas e posteriormente para o tratamento de câncer de ovário em 2009. A descoberta dos compostos com atividade biológica da *Ecteinascidia turbinata*, no entanto foi reportada desde os anos 60, porém até o isolamento e elucidação estrutural passaram-se 20 anos. Do isolamento e elucidação da molécula até os testes pré-clínicos, foram realizadas com extratos de espécimes obtidos na natureza. Porém tendo um rendimento muito baixo e uma dependência muito grande de aspectos ambientais, a empresa responsável pelo desenvolvimento do fármaco, a PhamaMar, optou por novas vias de obtenção, através da aquicultura e futuramente a semi-síntese. Mesmo enfrentando dificuldades na obtenção da Tracbetina na aquicultura, como logística de transporte, armazenamento e um rendimento ínfimo de 1 tonelada de biomassa para 1 grama da molécula, foi possível avançar clinicamente o fármaco. Em paralelo a avaliação clínica, foi desenvolvido um processo semi-sintético de produção da Tracbetina, sendo intermediado por um antibiótico já produzido em larga escala pela bactéria *Pseudomonas fluorescens* (KIJJOA; SAWANGWONG, 2004; CUEVAS; FRANCESCH, 2009; JIMENEZ; WILKE; COSTA-LOTUFO, 2018).

A Tracbetina, um alcaloide tetra-hidro-quinolínico, além de ser um marco na bioprospecção, seu mecanismo de ação alquilante também se diferenciou dos demais agentes alquilantes conhecidos na época (SOARES et al., 2007; COOPER; YAO, 2012). Com ação alquilante no DNA, a ET-743 faz uma ligação covalente em uma guanina em sítios específicos, onde se tem as menores fendas da dupla hélice

provocando alterações na dinâmica no DNA. A reação provoca uma torção na hélice para a direção oposta ao sitio de ligação da ET-743, com isso impedindo a transcrição do DNA através da inibição da atividade da RNA-polimerase II. Sua diferença entre outros agentes alquilantes, é que sendo um alquilante da volta de fenda menor, ele é capaz de induzir torção em direção a volta maior, propriedade que diferencia este composto de outras drogas estruturalmente similares (GROOVE, 1999). Algo mais interessante é que o gene de resistência a múltiplas drogas (MDR1) é um dos principais genes que não é transcrito, o qual codifica a ATPase glicoproteína-P, associada ao desenvolvimento do fenômeno MDR (CUEVAS; FRANCESCH, 2009; JIMENEZ; WILKE; COSTA-LOTUFO, 2018).

Novos fármacos oriundos de invertebrados marinhos para tratamento de diversos tipos de câncer estão em fase de testes clínicos ou já em mercado (Tabela 1). Os invertebrados marinhos se destacam na capacidade citotóxica, situação relacionada pela alta diversidade de produtos naturais presentes nestes grupos (NEWMAN; CRAGG, 2016)

Tabela 1 - Lista de drogas aprovadas comercialmente derivadas de invertebrados marinhos

Organismo marinho	Nome do composto	Classe química	Tipo de Câncer	Ano de aprovação e organização
Esponja	Citarabina (Ara-C)	Nucleosídeos	Leucemia Mielóide Aguda	1969 - FDA
Ascídia	Tracbetina (ET-743)	Alcaloide	Sarcoma Câncer de ovário	2007 - EMEA 2009 - EMEA
Esponja	Mesilato de eribulina	Macrólido	Câncer de mama	2010 - FDA
Molusco	Brentuximabe vedotina	Conjugado droga-anticorpo	Linfoma de Hodgkin	2011-FDA

Fonte: Food and Drug Administration (FDA); European Medicines Agency (EMA)

Dentre os invertebrados selecionados para estudo presentes em Arraial, já foi avaliado atividade anticâncer entre alguns deles até o momento. A *Darwinella* sp. que

demonstrou atividade antimicrobiana não demonstrou atividade anticâncer contra linhagens melanoma (B16), câncer de mama (MCF-7) e colón (HCT8) pelo método sulforrodamina B (SELEGHIM et al., 2007). Espécies do gênero *Didemnum* apresentaram citotoxicidade contra linhagens tumorais de leucemia em camundongos, câncer de colón (HCT-116), câncer de mama (MCF7), câncer de pulmão (H460), carcinoma epidermóide (COOPER; YAO, 2012; PALANISAMY; RAJENDRAN; MARINO, 2017). A *P. caribaeorum* que teve uma investigação do seu veneno observou-se atividade contra linhagens de glioblastoma (U251) e câncer pulmonar (SKLU-1) pelo método sulforrodamina B (LAZCANO-PÉREZ et al., 2018).

Atualmente com os avanços da biotecnologia é possível ultrapassar o gargalo do suprimento de produtos naturais, através de técnicas de modificação genética em microrganismos, aquicultura e da semi-síntese. Assim, o desenvolvimento de fármacos a partir de espécies que já tenham um crescimento e dispersão alta podem baratear os custos e tempo de desenvolvimento. Além disso, novas técnicas de testes pré-clínicos, que possam simular um microambiente mais natural do câncer, como culturas celulares tridimensionais, podem identificar com mais precisão moléculas com verdadeiro potencial de se tornar fármacos (GOMES et al., 2016).

O mar tem um potencial imensurável para geração de novos produtos farmacêuticos e ambientais, que em conjunto com os avanços da biotecnologia novas perspectivas podem ser exploradas. O Brasil detém uma gigantesca biodiversidade marinha e área de exploração equivalente a 56% do continente terrestre, sendo Arraial do Cabo um ponto peculiar de biodiversidade na costa. Dessa forma, esse estudo tem como objetivos identificar a possível atividade inibidora em bactérias formadoras de biofilme e atividade anticâncer de extratos brutos de invertebrados marinhos exóticos e nativos encontrados no município de Arraial do Cabo. Pelo fato destas espécies estarem em abundância e serem invasoras, a premissa é facilitar o desenvolvimento dos possíveis produtos e auxiliar na solução do crescimento populacional invasor.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-incrustante e anticâncer de seis extratos brutos derivados de invertebrados marinhos exóticos (*Chromonephthea braziliensis*, *Darwinella sp.*, *Tubastrea coccinea*, *Didemnum sp.*) e nativos (*Palythoa caribaeorum* e *Phyllogorgia dilatata*) encontrados no município de Arraial do Cabo – RJ:

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Avaliar atividade inibitória dos extratos em bactérias formadoras do biofilme marinho.
- Determinar o efeito citotóxico dos extratos em células humanas de tumor cerebral (glioblastoma) e em fibroblastos em modelo de monocamada (2D) e modelo tridimensional (3D);
- Observar o efeito citostático dos extratos em linhagens humanas de glioblastoma;

3 HIPÓTESE

- Os invertebrados marinhos estudados em Arraial do Cabo – RJ possuem atividade anti-incrustante e anti-câncer.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

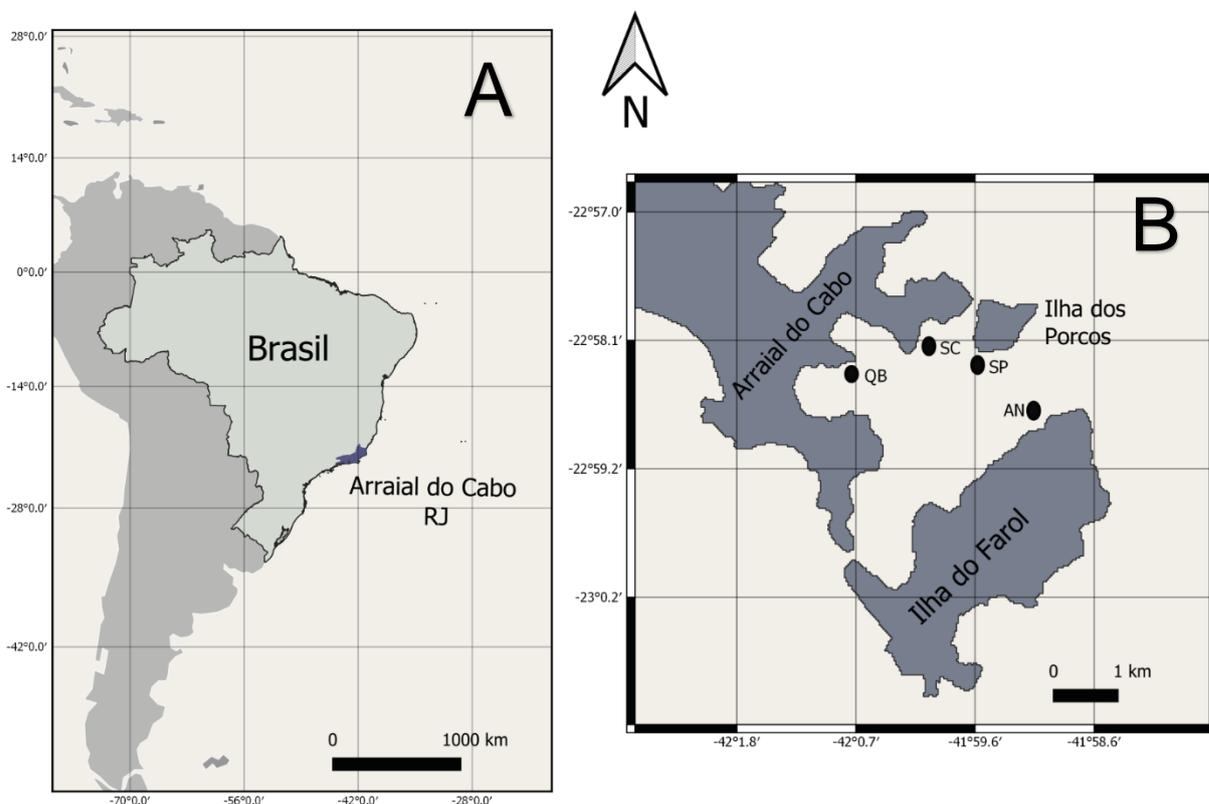
4.1 COLETA DOS ORGANISMOS MARINHOS

Todos os organismos foram coletados no município de Arraial do Cabo (42° 01' 40" W - 22° 57' 58" S) situado no estado do Rio de Janeiro (Figura 5A). As coletas foram realizadas em 4 pontos diferentes na região (Figura 5B) no período de outubro a dezembro de 2018.

Todas as coletas foram realizadas através de mergulho autônomo (SCUBA), sendo a profundidade variando entre 5m a 15 metros dependendo do ponto de coleta. Para todas as espécies foram coletadas 5 indivíduos de cada espécie. O material foi retirado com espátulas e martelo quando necessário, em seguida transportado com água marinha em um caixa térmica até o laboratório para análise e extração do extrato bruto.

Foi realizada uma triagem do material coletado, retirando-se a matéria inorgânica e organismos associados. Em seguida parte do material foi separada para identificação, enquanto o restante foi armazenado a -20°C sem água até o momento do preparo do extrato.

Figura 5 - Mapa identificando os pontos de coletas em Arraial do Cabo – RJ. QB = Quebra-mar do Porto do Forno, AN = Anequim, SC = Saco dos Cardeiros, SP = Saco dos Porcos.



Fonte: Próprio autor

Os invertebrados marinhos avaliados são dispostos em diferentes classificações de acordo com o Informe sobre as Espécies Exóticas Invasoras Marinhas no Brasil (2009) (Figura 6 e Tabela 2).

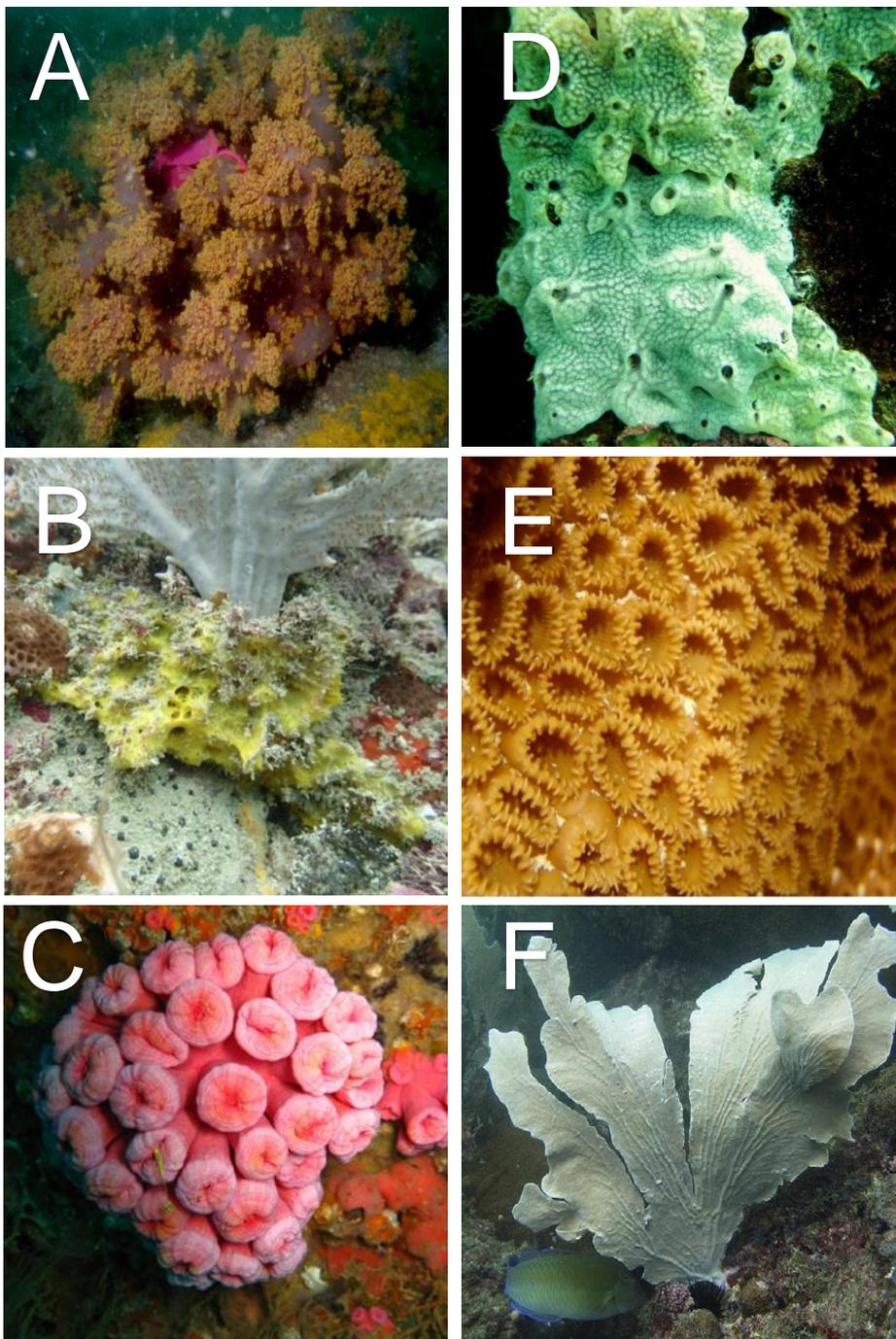
Tabela 2 - Espécies de invertebrados marinhos no presente estudo.

Espécie	Família	Foto	Classificação	Local de Coleta
<i>Chromonephtea braziliensis</i> van Ofwegen, 2005	<i>Nephtheidae</i>	A	Exótica estabelecida	Saco dos Porcos
<i>Darwinella</i> sp. Müller, 1865	<i>Darwinellidae</i>	B	Exótica estabelecida	Anequim
<i>Tubastraea coccinea</i> Lesson, 1829	<i>Dendrophylliidae</i>	C	Exótica Invasora	Anequim
<i>Didemnum</i> sp. Savigny, 1816	<i>Didemnidae</i>	D	Exótica Invasora	Quebra-mar do Porto do Forno
<i>Palythoa caribaeorum</i> (Duchassaing & Michelotti, 1860)	<i>Sphenopidae</i>	E	Nativa	Anequim
<i>Phyllogorgia dilatata</i> (Esper, 1806)	Gorgoniidae	F	Nativa	Saco dos Cardeiros

4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

Uma amostra de cada espécie coletada foi separada e fixada em solução de EtOH P.A 90%, variando por espécie, para a identificação em conjunto com o Dr. Júlio Cesar Monteiro, encarregado pela Coleção Científica do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira.

Figura 6 - Espécies de invertebrados marinhos coletados para o estudo. A = *Chromonephthea braziliensis*, B = *Darwinella* sp., C = *Tubastraea coccínea*, E = *Didemnum* sp., F = *Palythoa caribaeorum* e G = *Phyllogorgia dilatata*.



Fonte: CASSOLA *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2012; SAMPAIO *et al.*, 2012; RAMIREZ; BERLINCK, 2015.

4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS

Após o descongelamento das amostras, ela foi homogeneizada através de processo de trituração, exceto pela *T. coccinea* devido a sua estrutura calcária. Em seguida, foi pesado cerca de 60g de biomassa úmida e adicionado 300ml de MeOH, considerando uma proporção (1:5, biomassa/solvente). O processo de extração utilizado para todos os organismos foi o de maceração dinâmica com uma placa agitadora.

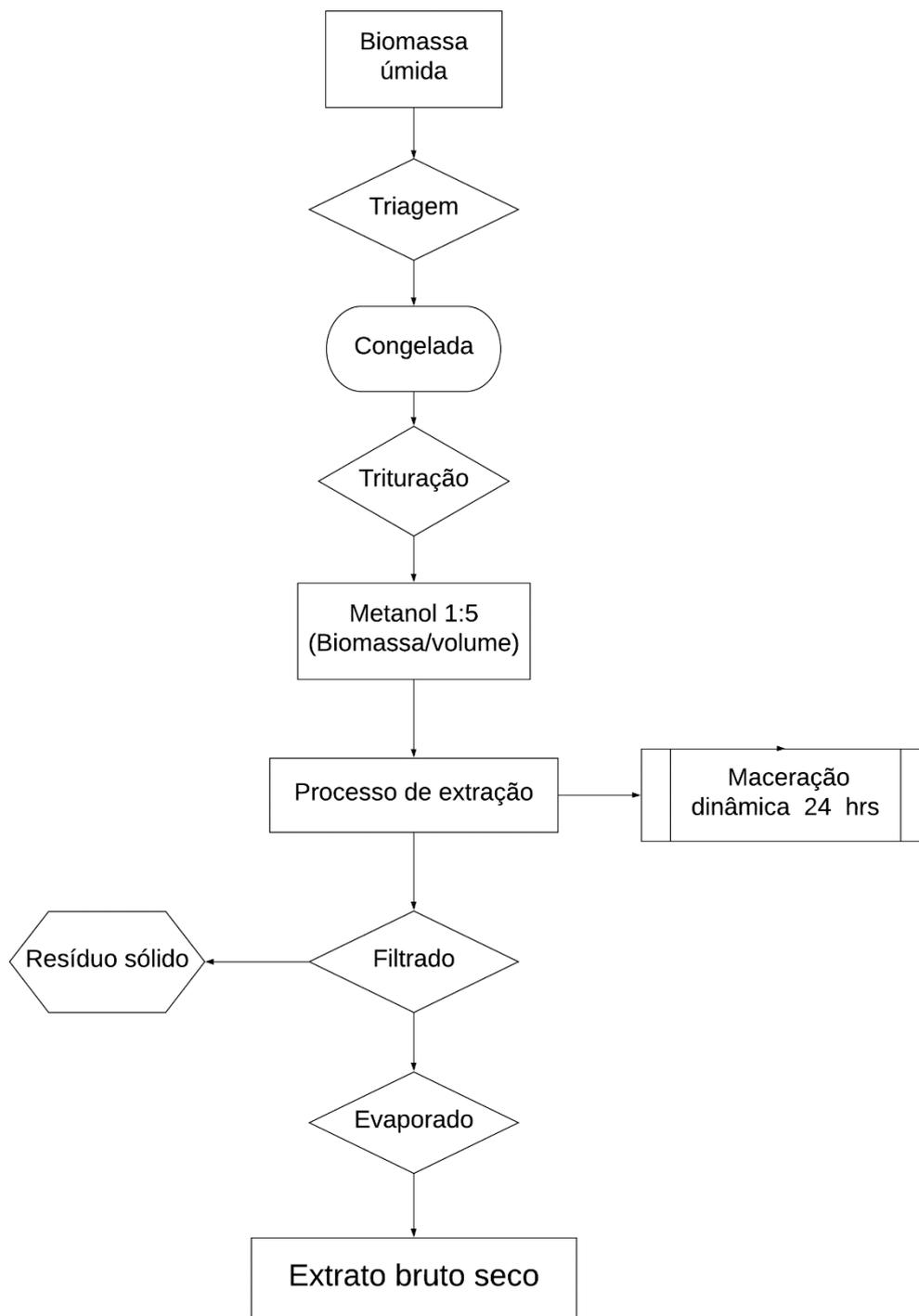
As espécies foram submetidas a 24 horas de maceração dinâmica contínua (Figura 7). Após o tempo de extração, o material foi filtrado com papel filtro qualitativo e em seguida evaporado o solvente através de um rotaevaporador em banho maria em 50°C durante pelo menos 4 horas, obtendo-se o extrato bruto (Figura 8)(JIMENEZ et al., 2003; PALANISAMY et al., 2016).

Figura 7 - Processo de maceração dinâmica da ascídia colonial *Didemnum* sp.



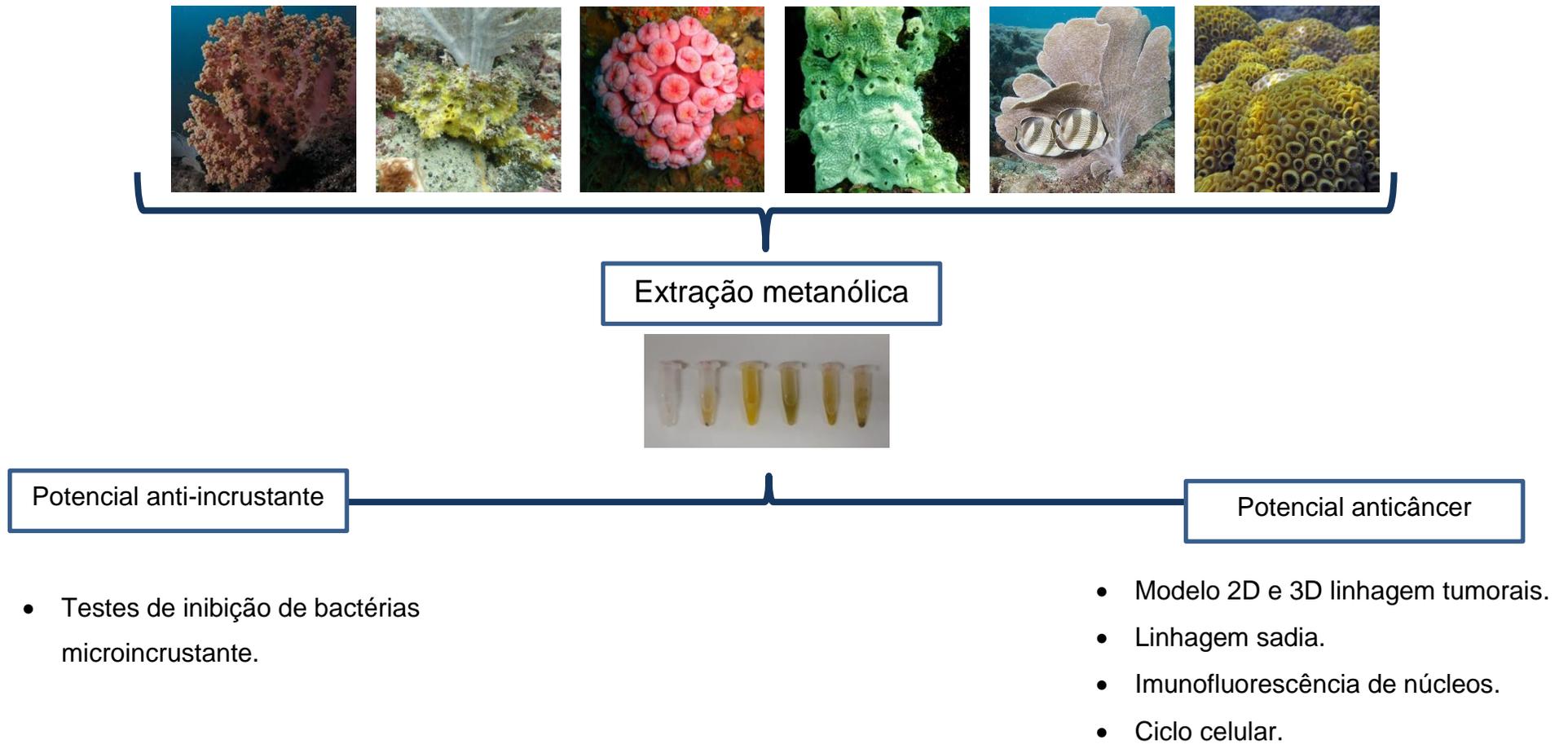
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 8 - Diagrama de obtenção dos extratos brutos.



4.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Figura 9 - Desenho experimental ilustrando a metodologia aplicada no presente estudo.



4.5 BIOFILME

4.5.1 Cultura bacteriana

O presente estudo avaliou 5 espécies de bactérias marinhas formadoras de biofilme marinho, *Shewanella putrefaciens*; *Vibrio estuarian*; *Pseudoalteromonas elyakovii*; *Polaribacter irgensii* e *Pseudomonas fluorences*. Exceto a cepa de *S. putrefaciens* que é Gram-positiva, todas as bactérias são Gram-negativas.

Todas as bactérias são mantidas em baixa temperatura (8°C) em meio de cultura marinha líquido (Difco – 2216) comercial pelo Laboratório de Biofilme localizado no IEAPM. Após aclimação das cepas bacterianas por 2 horas, foram inoculadas e incubadas por 24 horas a uma temperatura 31°C em meio marinho sólido (Difco – 2216) para aumento da densidade microbiana. Após o período de incubação de 24 horas, elas foram raspadas com auxílio de alças microbianas cuidadosamente para meio líquido marinho e novamente incubadas por 24 horas na temperatura de 31°C.

Em seguida, foram transferidos 200µl de cada solução com as bactérias para uma placa de 96 poços, e foi medida a densidade ótica através de um espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 630nm. Todas as bactérias só foram utilizadas para experimento quando atingiram uma densidade ótica entre 1.0 a 1.5 U.A. (unidade arbitrária).

4.5.2 Ensaio de inibição bacteriana

O teste realizado de inibição bacteriana foi o método de discos de difusão ou antibiograma (HUDZICKI, 2009). No teste, foi inoculado cerca de 150 µl de cada bactéria em uma placa de petri de 90 x 15 mm de diâmetro com meio marinho sólido (Difco – 2216) e acompanhado a secagem do material em fluxo laminar por 2 horas.

Previamente a secagem das bactérias no meio sólido, foram embebidos discos autoclavados de papel filtro diâmetro de 5mm com soluções de 10µl nas concentrações de 7,5, 15, 30, 60 e 120 (mg/ml) dos extratos brutos eluídos em metanol dos 6 invertebrados marinhos: *C. braziliensis*, *Darwinella* sp., *T. coccinea*, *Didemnum* sp., *P. caribaeorum* e *P. dilatata*. O controle positivo foi definido pela presença do antibiótico Rifampicina (Sigma-Aldrich) em uma concentração de 1 g/L e o controle

negativo foi utilizado metanol P.A., solvente utilizado no processo de extração e diluição dos extratos. A fim de evitar a exposição direta do solvente às bactérias, esperou-se 6 horas para que ocorresse a evaporação dos mesmos na capela em temperatura ambiente.

Com as bactérias secas em meio solido e os discos com as soluções já secas, foram inseridos os discos nas placas. Cada placa com uma espécie de bactéria recebeu 7 discos sendo, 5 de concentrações de extratos, 1 controle negativo e 1 controle positivo (Figura 10). Após a inserção dos discos, a bactéria foi transferida para a incubadora a 31°C e medido entorno dos discos durante 24 e 48 horas. A medição da zona de inibição foi caracterizada pelo diâmetro entorno do disco que não houve crescimento bacteriano. Todas as bactérias foram avaliadas em 5 réplicas para cada extrato.

Figura 10 - Teste de inibição bacteriana pelo método de discos de difusão. Avaliação do extrato de *T. coccinea* contra *Shewanella putrefaciens*. Cada disco possui uma concentração de extrato ou controle C1: 120 mg/mL, C2: 60 mg/mL, C3: 30 mg/mL, C2: 15 mg/mL, C1: 7,5 mg/mL. Branco: Solvente metanol Ant.: Antibiótico Rifampicina

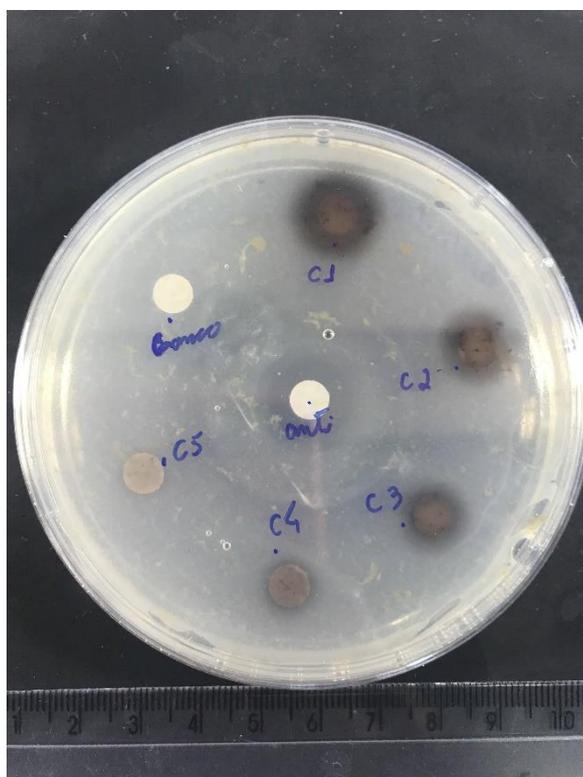


Foto: Ndiaye N. C. G.

4.6 ATIVIDADE ANTITUMORAL

4.6.1 Cultura celular

Para o estudo, foram utilizadas duas linhagens de glioblastoma (GBM) humano T98G e U251 (ATCC) e uma linhagem de células saudáveis de fibroblasto imortalizado humano BJ-5ta (IHF). As linhagens de GBM foram cultivadas em meio DMEM/F-12 (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco - Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), e uma solução de 100U/mL de penicilina/estreptomicina. Enquanto a linhagem IHF foi cultivada em meio DMEM (Gibco), contendo glicose (4,5g/L), 10% de SFB, 1mM de piruvato de sódio, 2mM de L-glutamina e 100U/mL de penicilina/estreptomicina. Todas as linhagens foram mantidas em ambiente úmido com estufa a 37°C e 5% de CO₂ (Thermo Fisher). As células foram mantidas nessas condições até o momento de 80% de confluência. Entre 2 a 3 dias, as células eram destacadas das garrafas, lavando-se com tampão fosfato (PBS - Sigma-Aldrich) e utilizando-se uma solução de 0,25% de tripsina/EDTA 2mM (Sigma-Aldrich). Respeitou-se o período de no máximo dez passagens para garantir a reprodutibilidade experimental. Além disso, todas as linhagens utilizadas apresentaram perfis STR compatíveis com sua classificação e não apresentaram contaminação com micoplasma.

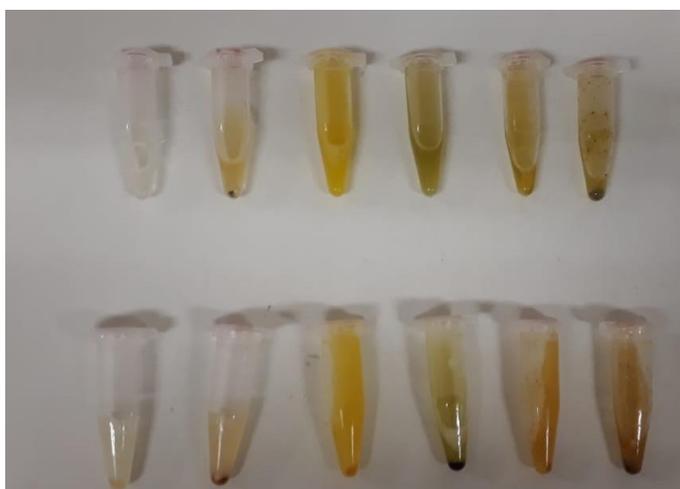
Para o modelo de cultura bidimensional (2D), em monocamada, as células destacadas eram centrifugadas a 700g por 3min e ressuspensas em seus respectivos meios de cultura. Foi realizada contagem em Câmara de Neubauer para distribuir as células em placas de 96, 24 ou 6 poços (Jetbiofil). A quantidade de células foi proporcional a cada área do poço utilizada e após 24h de cultivo, as células foram testadas em cada condição experimental descrita a seguir. Já o modelo de cultura tridimensional (3D), em esferoides, as células destacadas foram processadas da mesma forma descrita acima, mas sendo distribuídas em poços contendo 1% de agarose (Sigma-Aldrich), promovendo a formação de esferoides de 3 a 4 dias de cultivo para a realização dos testes a seguir.

4.6.2 Ensaio de viabilidade celular

O método de averiguação da viabilidade celular utilizado foi o ensaio que consiste na quantificação da atividade da fosfatase ácida citosólica. Essa enzima está ativa no meio intracelular de todas as células viáveis, e ao adicionar-se o p-nitrofenil fosfato, essas o hidrolisam resultando em p-nitrofenol, que é diluído e sua absorbância por espectrofotometria é interpretada como diretamente proporcional ao número de células viáveis. Esse método é indicado para avaliar a viabilidade celular de culturas tanto em modelo 2D como em 3D (YANG; SINAI; KAIN, 1996; FRIEDRICH et al., 2007).

As células (5×10^3) tumorais T98G e U251 foram cultivadas em placas de 96 poços na presença dos extratos brutos de *Chromonephthea braziliensis*, *Darwinella sp.*, *Tubastrea coccínea*, *Palythoacaribaeorum* e *Phyllogorgiadilatata* nas concentrações crescentes de 100, 200, 400, 800 e 1000 $\mu\text{g/mL}$; e *Didemnum sp.* nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$. Foi realizado o teste de diluição em água e em DMSO e os seis extratos obtiveram melhor solubilização em água (Figura 11). O controle consistiu das células cultivadas em seus respectivos meios de cultura na ausência dos extratos brutos. Todos os extratos foram filtrados em filtros com 0,22 μm de poro anteriormente ao tratamento das células. As células (5×10^3) de fibroblasto foram cultivadas com 400 $\mu\text{g/mL}$ dos extratos brutos, exceto o tratamento com a *Didemnum sp.*, o qual foi utilizada a concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 11 - Extratos dos invertebrados marinhos diluídos com água destilada e DMSO. Na primeira linha a diluição com água e na segunda com DMSO. Extratos na seguinte ordem da esquerda para direita C. braziliense, Darwinella sp., T. coccinea, Didemnum sp., P. caribaeorum e P. dilatata.



Após 72h de cultivo na presença ou ausência dos extratos, o meio foi retirado com pipetadora automática multicanal e cada poço foi lavado com PBS (pH 7,4). Depois as placas foram centrifugadas por 10 minutos a 400g. Para cada poço, 100 µl da solução contendo 0,1M de acetato de sódio (pH 5,0), 0,1% de Triton-X100 (Sigma-Aldrich) e 5 mM de p-nitrofenil fosfato foi adicionado. Depois as células foram incubadas por 90min a 37°C em estufa de CO₂. Em seguida a reação foi interrompida adicionando NaOH (1N) e a densidade ótica foi obtida pelo espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm. A densidade ótica do controle foi considerada 100% de viabilidade celular e foi feita a proporção do percentual para as condições das células cultivadas com os extratos. Foram realizados 3 experimentos independentes em octuplicata, tanto em culturas 2D quanto em 3D.

4.5.3 Microscopia de contraste de fase

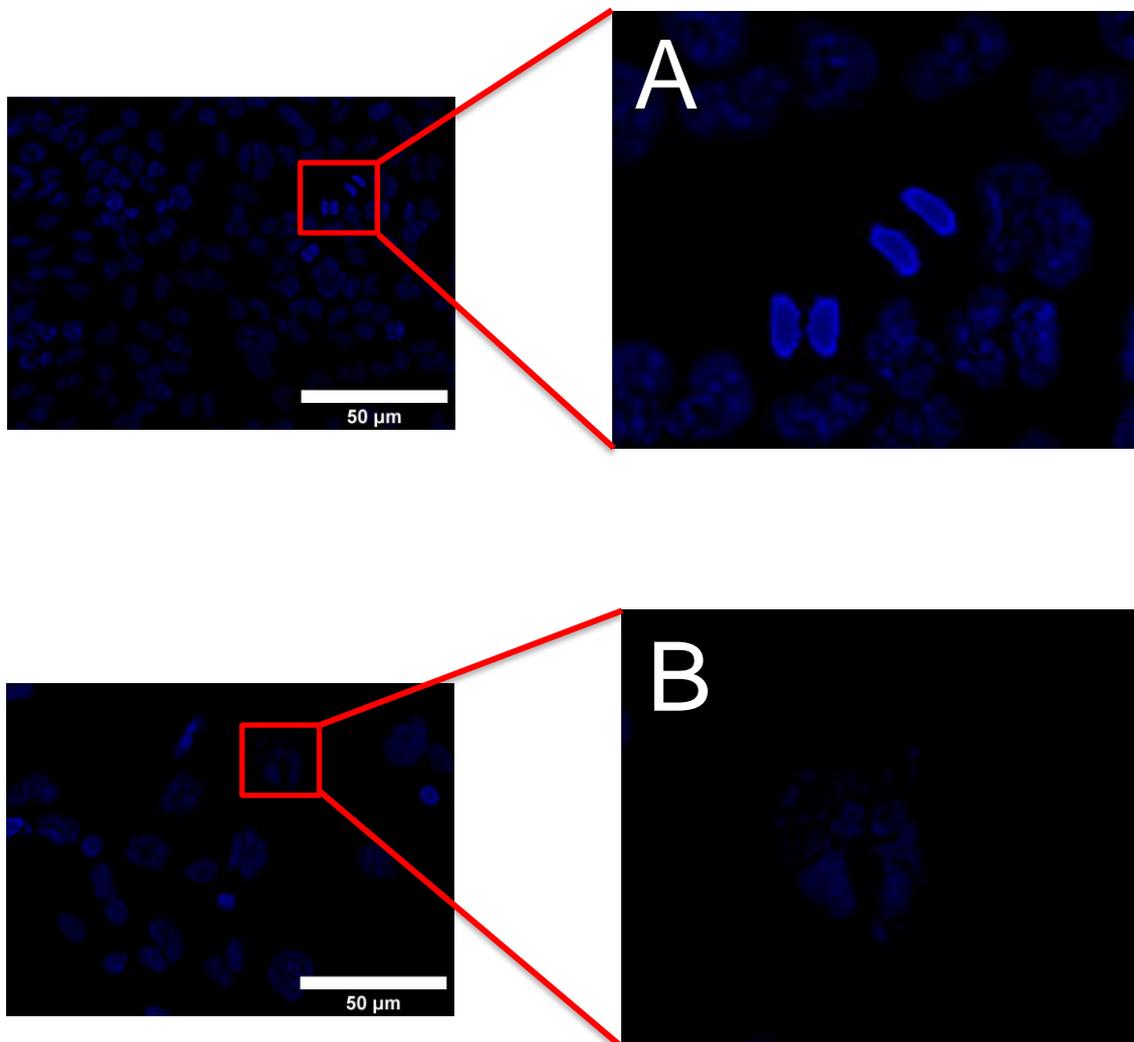
A observação da morfologia das linhagens T98G, U251 e IHF foi fotodocumentada em microscópio invertido Nikon Eclipse através de contraste de fase ao final do tratamento com os extratos. Para a cultura 3D, o volume pode ser quantificado através dessas imagens pelo *software Image J versão 1.52i*, em que a área foi convertida através da fórmula: $A = 4 \times \pi \times R^2$ considerando A = Área do esferoide e R = Raio do esferoide. Com o raio do esferoide foi possível calcular o volume dele através da formula: $V = R^3 \times \frac{4}{3}$ considerando V = Volume do esferoide (WEN et al., 2013).

4.6.3 Imunofluorescência

As células T98G e U251 ($9,5 \times 10^3$) foram semeadas sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços, sendo cultivadas com os diferentes extratos brutos marinhos na concentração de 200 µg/mL, exceto o extrato da *Didemnum sp.*, utilizado 100 µg/mL durante 72h. Posteriormente, as células foram fixadas com formaldeído 10% (Merck) durante 10min a temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBS, foi adicionado anticorpo secundário conjugado a um fluorocromo específico por 1 hora na ausência de luz. Utilizou-se a imunoglobulina IgG de camundongo conjugada ao Alexa-488 (1:200, Molecular Probes). Após a incubação do anticorpo secundário, as lamínulas foram 3 vezes lavadas novamente com PBS e foi adicionado o marcador de

núcleo, DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, dilactate) (Sigma-Aldrich), sendo incubadas por 10 minutos. Após as últimas 3 lavagens com PBS, as lamínulas foram passadas rapidamente na água destilada e montadas sobre lâminas com N-Propilgalacto/PBS (0,2M, Vetec). As células foram observadas pelo microscópio invertido Leica DiM-8 em fluorescência, equipado com câmera digital (ROPER SCIENTIFIC™ Photometrics). Para a quantificação morfológica de células totais, apoptóticas ou mitóticas, foram considerados 5 campos aleatórios e em torno de 500 células de cada condição foram quantificadas, sendo realizados 3 experimentos independentes. As análises foram realizadas no *software Image J versão 1.52i*. O número total de DAPIs quantificados foi considerado 100% e foi feita a proporção do percentual de figuras mitóticas ou apoptóticas e imunomarcadas com Ki-67 correspondentes de cada campo aleatório fotografado (Figura 12).

Figura 12 - Ilustração representativa dos parâmetros morfológicos utilizados de mitose e apoptose celular da linhagem T98G. A: Células em processo de mitose, B: Células em processo de apoptose. Barra de escala: 50µm



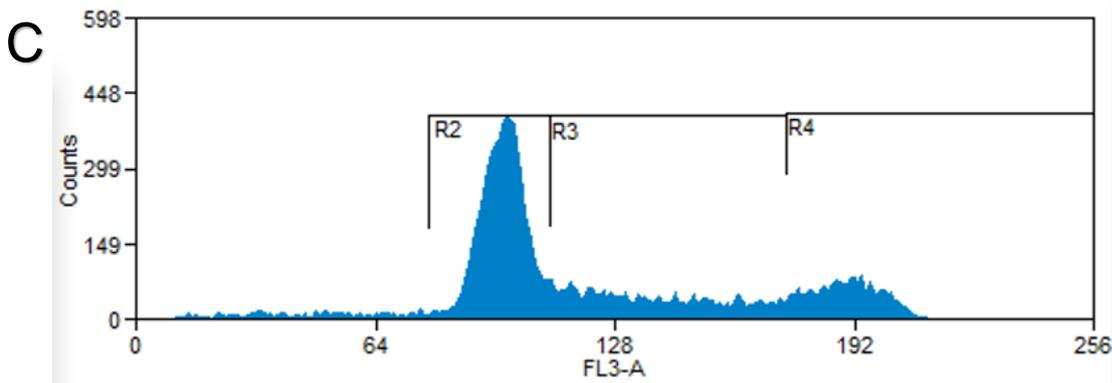
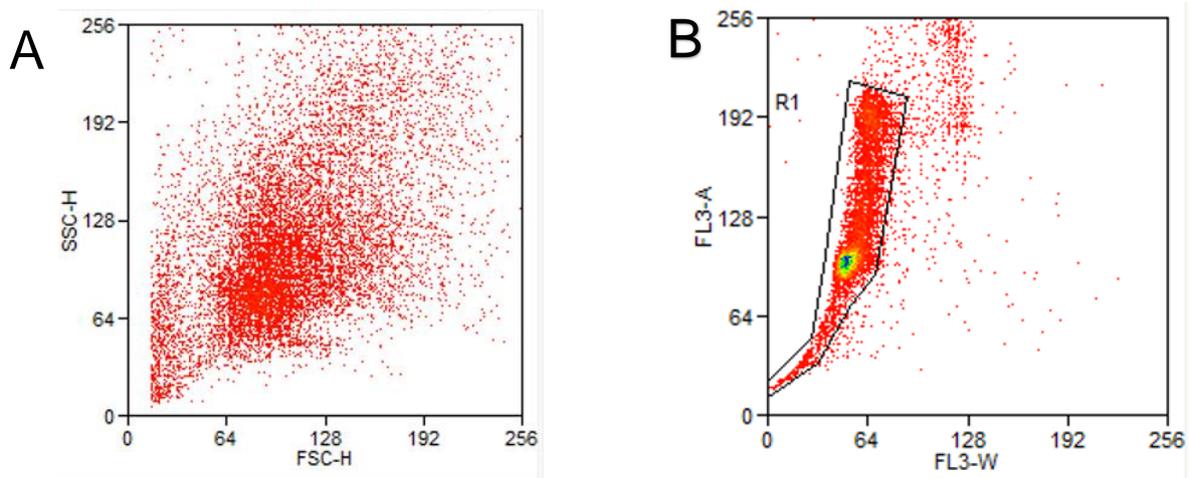
4.6.4 Ciclo celular

Para avaliar o efeito citostático nas células T98G, $47,5 \times 10^3$ células foram semeadas em placas de 6 poços previamente ao experimento e incubadas por 24 horas. Posteriormente foram cultivadas com 200 µg/mL de cada extrato, exceto *Didemnum sp.* que foi utilizado 100 µg/mL. Ao fim do período de incubação de 72 horas, as células foram destacadas dos poços com uma solução de 0,25% de tripsina/EDTA 2mM e centrifugadas a 700g por 3min (microcentrífuga 5430R, Eppendorf) em temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuspensão em uma solução contendo iodeto de

propídeo (PI) na concentração de 50 µg/mL (Sigma-Aldrich), 0,3% de Triton-X100 (Sigma-Aldrich) e tampão citrato de sódio (4mM) (Sigma-Aldrich).

A fim de avaliar o ciclo celular, foram analisados três gráficos a partir dos dados da citometria com *software Summit*, versão 4.3 (Beckman Coulter) (Figura 13). Foram utilizados os seguintes parâmetros morfológicos e de fluorescência: *Forward Scatter (FSC-H)* e *Side Scatter (SSC-H)* (Figura 13A), Largura (FL3-Width) e a área (FL3-Area) do pulso elétrico captado pelos fotomultiplicadores do canal que capta a fluorescência acima de 670nm, para a distinção entre *doublets* e células na fase G2/M (Figura 13B), e dois histogramas que correspondem a determinada região de eventos celulares representada por R1. A partir do histograma do parâmetro FL3-A em conjunto com número de eventos celulares, definiu-se marcas estatísticas baseadas nas bases dos picos correspondentes às fases do ciclo celular G0/G1, S e G2/M (Figura 13C). O outro histograma em escala log do parâmetro FL3-H (Height) demonstra a quantificação de eventos celulares que apresentaram DNA fragmentado (Figura 13D). Foram realizados 2 experimentos independentes com ambas as linhagens, adquiridos pelo menos 10.000 eventos e utilizou-se o citômetro FACScalibur (Becton & Dickinson) da plataforma multiusuário do INCA, cuja responsável pela aquisição dos dados foi a Dra Karina Lani.

Figura 13 - Parâmetros utilizados para avaliação de ciclo celular. A: gráfico representativo da morfologia celular através dos parâmetros Forward Scatter (FSC-H) para tamanho e Side Scatter (SSC-H) para granulosidade da célula. B: gráfico representativo do canal de fluorescência FL3 através da área (FL3-A) e da largura (FL3-W) do pulso elétrico gerado a partir da captação da fluorescência do PI pelo citômetro, onde R1 representa os eventos excluindo-se *doublets* do experimento. C: gráfico histograma de FL3-A correspondente a área R1 representativo das marcas estatísticas R2, R3 e R4, representam, respectivamente, as fases G0/G1, S e G2/M D: gráfico de FL3-H representativo da marca estatística R2,3, e 4, representando suas respectivas porcentagens. Gráficos obtidos da linhagem T98G



Region	Count	% Hist	% All	Bounds	Mode Co...	Mode	Mean
Total	10800	100.00	78.52	(0.00,25...	399	99.00	121.22
R2	5656	52.37	41.12	(78.00,1...	399	99.00	97.87
R3	2727	25.25	19.83	(110.00,...	79	110.00	137.29
R4	1943	17.99	14.13	(173.00,...	86	194.00	189.65

4.7 ANALISES ESTÁTÍSTICAS

As análises estatísticas foram feitas inicialmente para verificar a distribuição paramétrica ou não-paramétrica dos valores obtidos em cada experimento realizado nesse estudo através dos testes de Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino e Pearson, e Shapiro Wilk quando possível. Sendo que todos os dados foram classificados como não-paramétricos.

Todos os ensaios de inibição bacteriana e viabilidade celular foram analisados por teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguidos de comparação múltipla ao controle pelo teste de Dunn. Para o ensaio de percentual de células, mitose e apoptose foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney comparado ao controle. Os valores foram expressos pela mediana e sua distribuição (min-max) e foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$.

5 Resultados e Discussão

5.1 BIOFILME

5.1.1 Inibição bacteriana

Primeiramente, testou-se a possível atividade inibitória dos extratos brutos dos seis organismos invertebrados marinhos sobre cinco tipos de cepas bacterianas diferentes formadoras de biofilme. Os resultados quando significativos demonstraram maior atividade em relação ao branco, sendo que o controle positivo com antibiótico apresentou efeito inibitório maior em todos os tratamentos comparado aos extratos (Figura 14). A bactéria que foi mais suscetível aos extratos foi a *Pseudomonas fluorescens*, sendo inibida pela *C. braziliensis*, *Darwinella* sp., *T. coccinea* e *P. dilatata* e também em uma concentração menor sob o extrato de *C. braziliensis*. Apenas o extrato de *T. coccinea*, apresentou resultados significativos em todas as cinco cepas (Figura 14C). Nenhuma atividade foi observada com os extratos de *Didemnum* sp. e *P. caribaeorum* em todas as concentrações analisadas. Se considerarmos a capacidade de inibição por uma análise qualitativa, em que a atividade de inibição positiva é definida por halos acima de 5mm de diâmetro, considera-se a ordem decrescente de eficácia: *T. coccinea* > *Darwinella* sp. > *C. braziliensis* > *P. dilatata* (Tabela 2).

Figura 14 - Atividade inibitória de cada extrato em relação as bactérias formadoras do biofilme. . A = *C. braziliensis*, B = *Darwinella* sp., C = *T. coccínea*, D = *P. dilatata* e Antb. = Antibiótico. Cada gráfico é representativo de 1 experimento independente feito em quintuplicata, sendo a média \pm desvio padrão. (Kruskal-Wallis com teste de Dunn; * $P \leq 0,05$;))

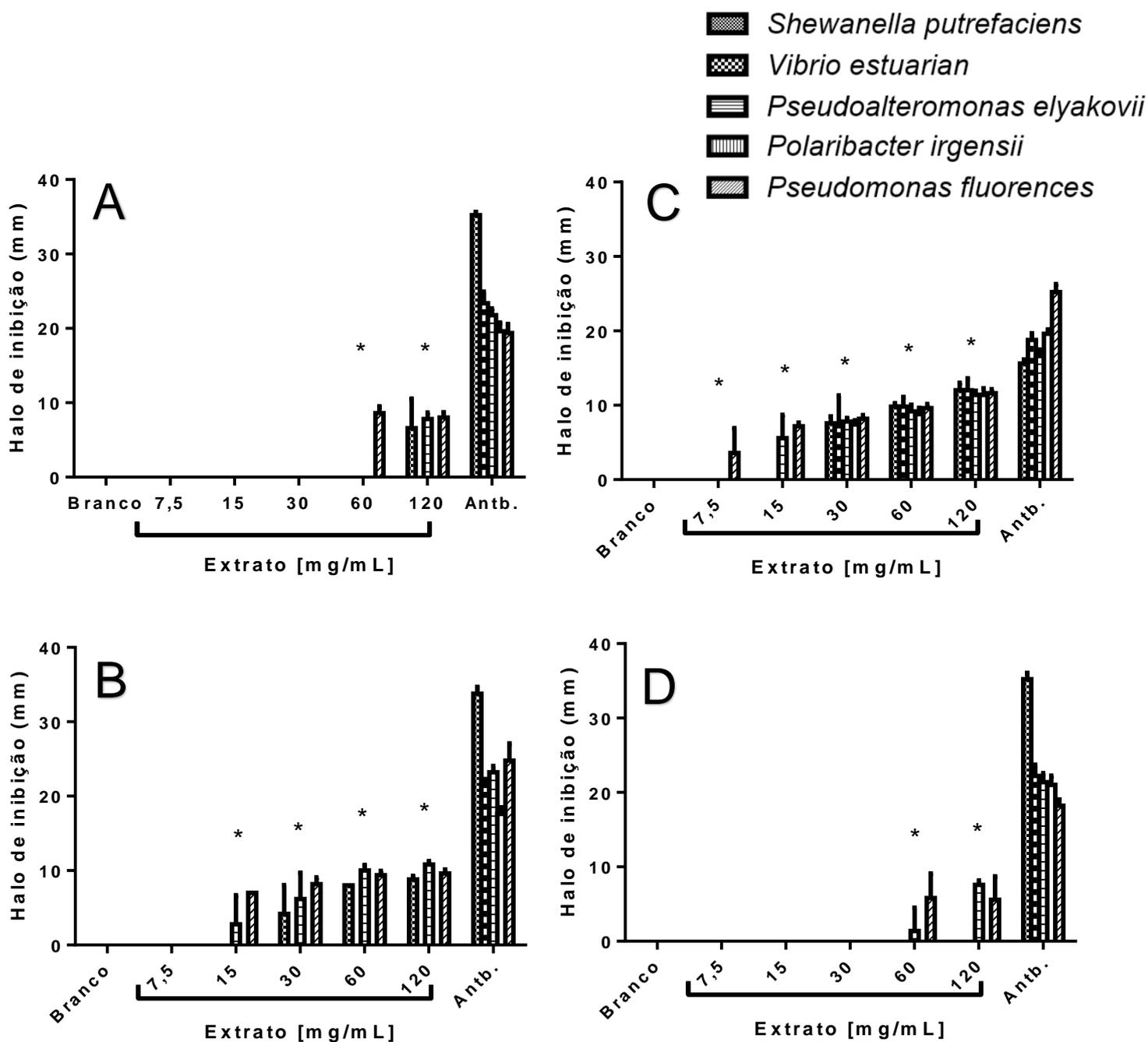


Tabela 3 - Extratos que apresentaram inibição das bactérias marinhas .

Espécies	<i>C. braziliensis</i>	<i>Darwinella</i> sp.	<i>T. coccinea</i>	<i>P. dilatata</i>
<i>Shewanella putrefaciens</i>	+	+	+	-
<i>Vibrio estuarian</i>	-	-	+	-
<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	+	+	+	+
<i>Polaribacter irgensii</i>	-	+	+	-
<i>Pseudomonas fluoresces</i>	+	+	+	+

(+) positivo para halos maiores de 5 mm e (-) negativo para halos menores do que 5 mm

O coral mole *C. braziliensis* é um invasor que possui capacidade de liberação de substâncias alelopáticas em ambiente, assim como a *T. coccinea*. Já foi observado que extratos oriundos da *C. braziliensis* dispostos em géis são capazes de inibir a predação *in situ* de peixes (LAGES et al., 2006; FLEURY et al., 2008). Além disso foi analisado *in situ* a atividade alelopática natural da *C. braziliensis* contra a *P. dilatata*, no qual foi observado necrose no tecido *P. dilatata*. Esse conjunto de inibições tóxicas também foi evidenciado pela falta de organismos associados a *C. braziliensis* observado em campo (Observação pessoal). No entanto, sua atividade antimicrobiana já foi avaliada para linhagens de *Salmonella typhimurium* em relação a sua citotoxicidade e não apresentou nenhum efeito com diferentes extrações (CARPES et al., 2013).

A esponja *Darwinella* sp. teve a segunda melhor resposta de inibição, sendo capaz de inibir todas as bactérias exceto *V. estuarian* e apresentou resposta com 15 (mg/ml) (Figura 14B). Esponjas do gênero *Darwinella* já exibiram atividade antimicrobiana em linhagens de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (SELEGHIM et al., 2007). Tal dado de toxicidade congrega com estudos de inibição de *quorum sensing* bacteriano e atividade leishmanicida (RAMIREZ; BERLINCK, 2015; BATISTA et al., 2018). O *quorum sensing* é o mecanismo caracterizado pela comunicação e coordenação entre células tanto interespecíficas como intraespecíficas de microrganismos. Esse mecanismo ocorre através de metabolitos secundários e possui papel fundamental na formação e maturação do biofilme (DEWASTHALE; MANI; VASDEV, 2018).

O coral petrio *T.coccinea* teve a maior atividade antimicrobiana de todas as espécies testadas, sendo capaz de inibir as cinco bactérias avaliadas e em concentrações inferiores comparado aos outros extratos (Figura 14C). Esse resultado se relaciona diretamente com a sua defesa química já avaliada in situ. É reportado que *T. coccinea* é capaz de liberar in situ diversos metabólitos a partir de um ferimento (LAGES et al., 2010b).Esses metabólitos liberados atuam como defesa química a predação por peixe e competição por espaço contra outros invertebrados, promovendo a necrose nos competidores (CREED, 2006). Além disso já foi observado que extrato metanólico de *T. coccinea* é capaz de inibir espécies macroalgas incrustantes em experimento com placas em campo (LAGES et al., 2010a). Esse conjunto de propriedades possivelmente promove uma ação inibitória de bactérias patogênicas e de organismos incrustantes. A junção dessas características é uma vantagem ecológica para a espécie, assim beneficiando seu potencial de invasão (MOLLO; CIMINO; GHISELIN, 2015).

A falta de atividade de inibição bacteriana da *Didemnum* sp. demonstra uma falta de toxicidade ampla a microrganismos. A composição do seu extrato pode estar ligada a microbiota associada à mesma, a qual pode conter algumas das espécies bacterianas avaliadas. A microbiota associada às ascídias é relacionada à especificidade da espécie, e não se correlaciona com a localização geograficamente e latitude das hospedeiras (TIANERO et al., 2015). Essa microbiota pode contribuir com adaptação da espécie a novos ambientes, através da biossíntese de metabolitos e catalisação de substâncias, com isso favorecendo potencial invasor. (EVANS et al., 2017)

A falta de atividade inibitória do extrato de *P. caribaeorum* pode ser devido à característica do seu muco de agregar e proteger uma gama de microrganismos, mesmo que previamente a extração, foi retirado o muco (CAMPOS; PÉREZ; GARCIA, 2011; MELO; SOUZA; PÉREZ, 2017) . É descrito a falta de atividade inibitória de extratos de *P. caribaeorum* em outras espécies de bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecales*, *Salmonella entérica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus* e *E. coli* (DE ALENCAR et al., 2015).

O extrato de *P. dilatata* demonstrou uma baixa atividade contra *P. elyakovii* e *P. fluorences*. Tal resposta coincidi em parte com as características apresentas em

outros trabalhos, que no caso reportaram uma atividade de defesa química contra predação, anti-incrustante e antimicrobiana. O isolamento de metabolitos *P. dilatata* foi feito em 1998 sendo isolado um novo sesquiterpeno natural, (E) germacra-1(10),4(15),7(11)-trien-5-ol-8-ona (MARTINS; EPIFANIO, 1998). A atividade anti-incrustante foi observada em experimento em campo, através da inserção extratos brutos inseridos em gel em placas, sendo avaliado a cobertura após dois meses e espécies incrustantes na placa. No caso a inibição foi observada seletivamente ativa contra o estabelecimento de balanídeos (PEREIRA et al., 2002). Já para avaliação contra predação de peixes, foi inserido extrato bruto e frações do mesmo em tiras de comida mimetizando concentrações naturais da *P. dilata* e avaliado a predação em campo (EPIFANIO et al., 1999). A inibição bacteriana foi visualizada para linhagens de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexineri* *Streptococcus pyogenes* *Salmonella typhimurium* sendo uma avaliação direcionada a peptídeos da *P. dilatata* diferenciando dos outros experimento, que investigavam extratos brutos e terpenos. Assim pode se indicar que o presente estudo estava mais próximo metodologicamente de possuir terpenos a partir do extrato bruto, já que o método avaliado favorece essa classe, para futuros estudos é sugerido uma investigação voltada para peptídeos para atividades antimicrobiana.

5.2 ATIVIDADE ANTICÂNCER

5.2.1 Viabilidade celular - Modelo 2D

Os resultados obtidos de viabilidade celular da linhagem de glioblastoma humano T98G em 2D pelo ensaio de fosfatase acida (Figura 15) demonstraram algum efeito significativo em alguma concentração comparado ao controle. Os extratos de *C. braziliensis* e de *P. caribaeorum*, apresentaram um aumento significativo na viabilidade celular cultivadas com 200µg/mL, sendo que a segunda espécie continuou demonstrando aumento crescente e significativo de viabilidade comparado ao controle (Figura 15A e E). Os extratos de *Darwinella sp.* e *T. coccinea* demonstraram inibição da viabilidade celular a partir de 400µg/mL, diferente do tratamento com *P. dilatata* que começou a mostrar efeito com 800µg/mL (Figura 15B, C e F). Porém vale ressaltar que a concentração do tratamento com extrato *Didemnum sp.* foi menor para obtenção da IC₅₀, a partir de 100µg/mL. Tal resultado em tais concentrações denota uma

atividade antitumoral superior da *Didemnum* sp. comparado aos outros extratos para a estratégia terapêutico de glioblastomas humanos in vitro (Figura 15D).

As imagens em contraste de fase das células da linhagem T98G sob tratamento com os extratos por 72 horas permitiram comparar os efeitos avaliados pelo ensaio de fosfatase ácida em monocamada (Figura 16). Todos as culturas sob extratos aparentam uma diminuição na quantidade de células, uma vez que observamos a monocamada menos confluenta se comparada ao controle. É notável a inexistência quase total de células no tratamento de *Didemnum* sp. em 200µg/mL que elucida e corrobora sua alta atividade antitumoral na linhagem T98G pelo teste fosfatase ácida nessa concentração (Figura 16E e 16E).

Figura 15 - Viabilidade de células da linhagem T98G em cultura em monocamada tratadas com extratos brutos dos invertebrados após 72 horas de tratamento. A = *C. braziliensis*, B = *Darwinella* sp., C = *T. coccinea*, D = *Didemnum* sp., E = *P. caribaeorum*, F = *P. dilatata*, CTRL = Controle. Cada gráfico é representativo de 3 experimento independentes feito em octuplicata, sendo a média \pm desvio padrão. (Kruskal-Wallis com teste de Dunn; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ e *** $P \leq 0,001$)

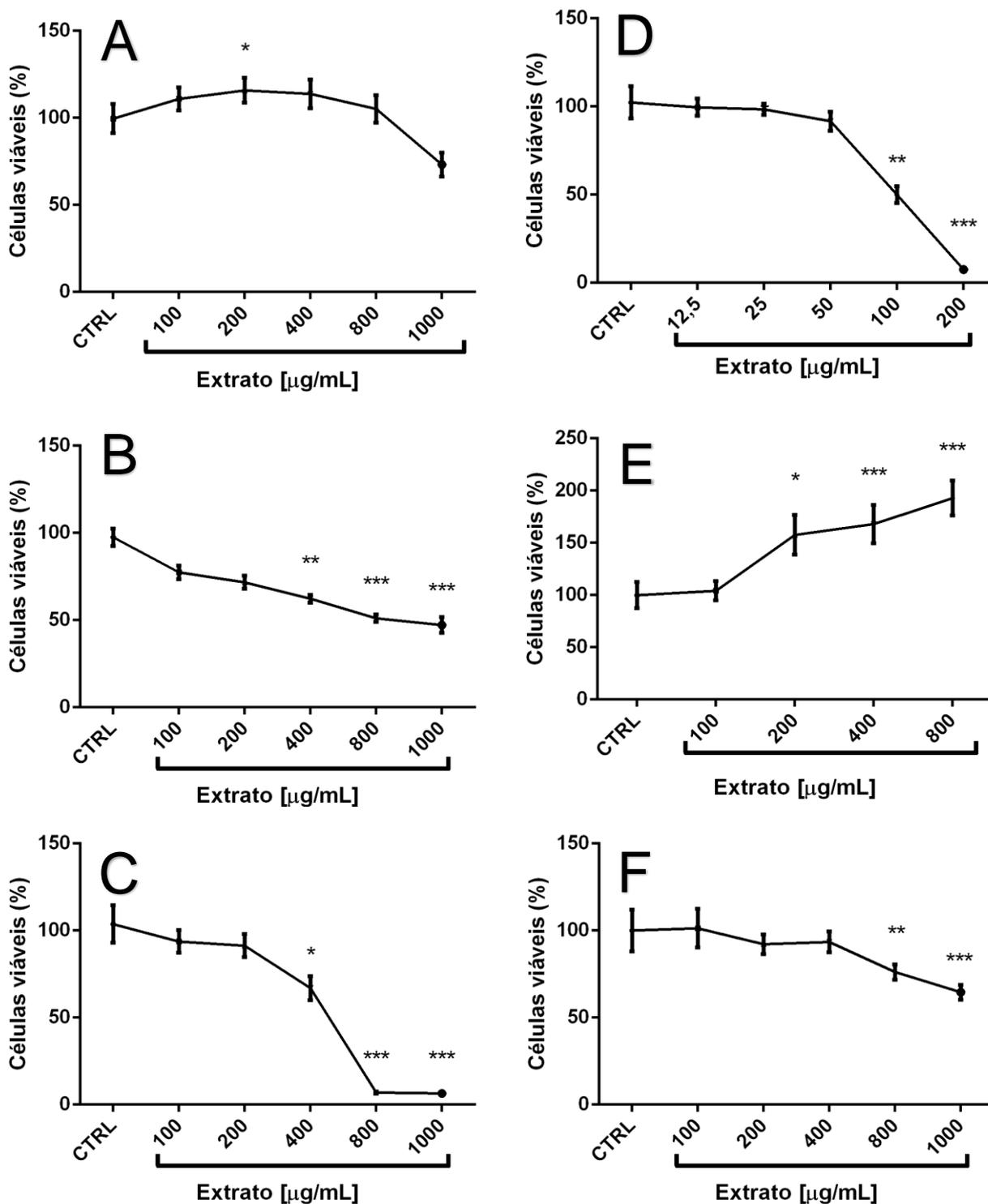
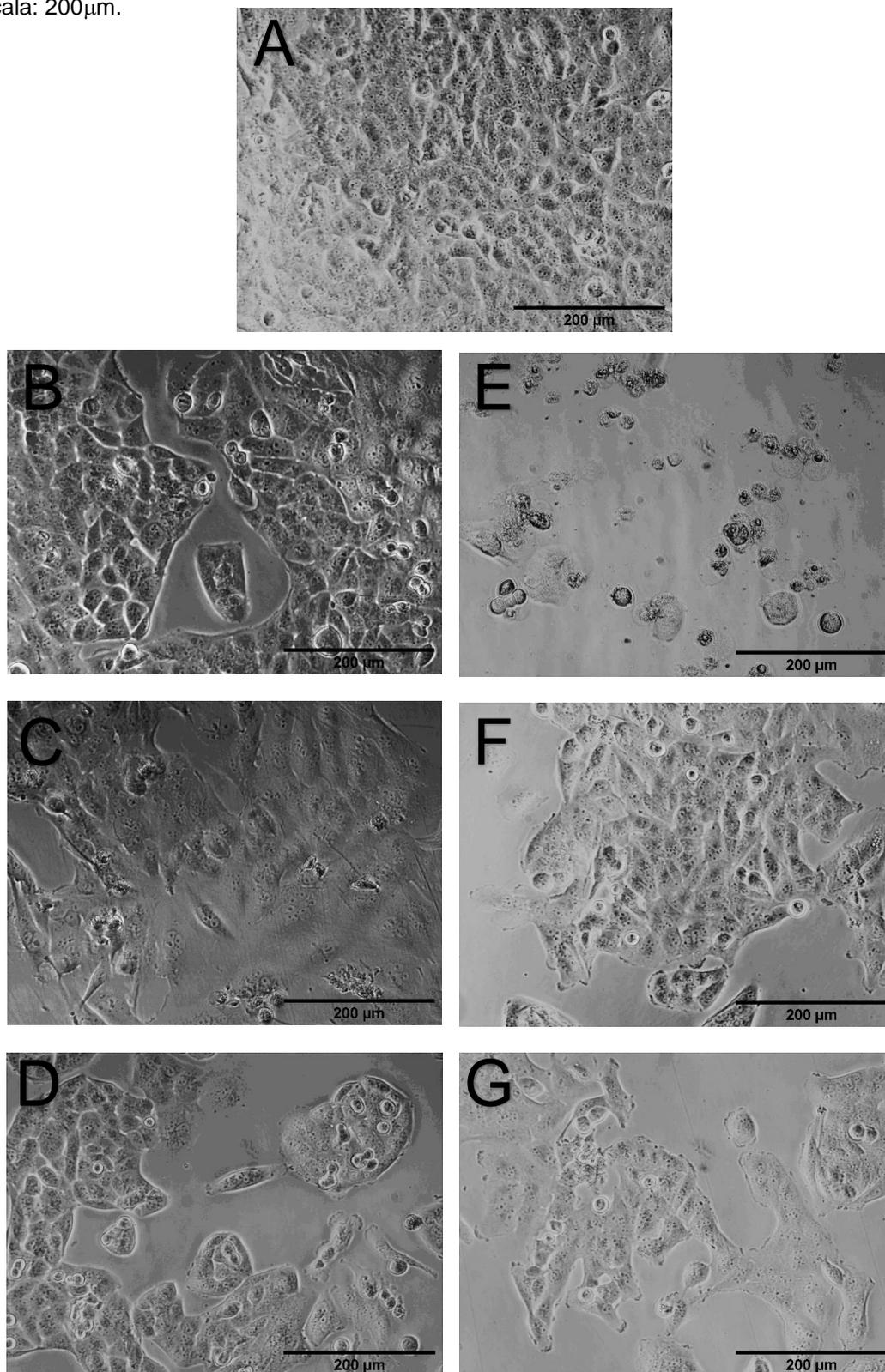


Figura 16 - Fotomicrografias em contraste de fase das células T98G controle e tratadas com extratos brutos na concentração 200 µg/ml após 72 horas de tratamento. A = Controle, B = *C. braziliensis*, C = *Darwinella* sp., D = *T. coccínea*, E = *Didemnum* sp., F = *P. caribaeorum* e G = *P. dilatata*. Barra de escala: 200µm.



Atualmente, estudos com extratos brutos de organismos marinhos ou seus compostos isolados muitas vezes são raros para alguns organismos na área anti-câncer. O que torna esse estudo relevante em suas descobertas de potenciais futuros candidatos a fármacos. Entretanto, a falta de resposta significativa ao tratamento de *C. braziliensis* pode ser devido a faixa de polaridade do solvente de extração. É documentado que *C. braziliensis* possui metabolitos com propriedades alelopáticas contra predação e outros invertebrados, em extratos apolares (LAGES et al., 2006; FLEURY et al., 2008). Há grande possibilidade que os metabolitos carregados no metanol sejam apenas os polares, assim não sendo avaliados os metabolitos descritos nos trabalhos de predação e competição por espaço, a próxima etapa será traçar o perfil químico e otimizar o tipo de extração química de cada composto em específico.

O extrato de *Darwinella sp.*, apresentou resposta significativa com concentrações mais elevadas comparada aos outros extratos de *T. coccínea* e *Didemnum sp.* O único estudo encontrado com o extrato bruto do gênero da *Darwinella* observou que sua citotoxicidade avaliada contra câncer de mama (MCF-7), melanoma de murinos B16 e câncer de colón (HCT8), não foi significativa pelo teste de sulforodamina B (SELEGHIM et al., 2007). Esponjas são famosas pelo potencial farmacológico, sendo um dos primeiros grupos a serem estudados nessa perspectiva. Contudo tal reconhecimento não é verdadeiro inteiramente, já que os verdadeiros produtores são muitas vezes os microrganismos associados às esponjas. O microambiente que elas proporcionam em seu entorno selecionam e sustentam uma grande gama de microrganismos associados. Esses microrganismos podem produzir diversas substâncias, porém muitas vezes é necessário um fracionamento bio-guiado para avaliar os metabolitos com atividade de interesse (BERGMANN; FEENEYZ, 1950; BLOCKLEY et al., 2017; IÓCA; NICACIO; BERLINCK, 2018).

O extrato de *T. coccínea* apresentou o segundo maior efeito de citotoxicidade na linhagem T98G. O potencial citotóxico já havia sido demonstrado no teste de inibição bacteriana do presente estudo. Creed et. al. (2006) detectaram a atividade alelopática de *T. coccínea* através da geração de necrose nos tecidos do invertebrado bentônico *Mussismilia hispida*. Também já foi averiguado que extratos em gel de *T. coccínea* promovem inibição de predação por peixes in situ e ação anti-incrustante contra macrorganismos (CREED, 2006; LAGES et al., 2010a, 2010b). Por outro lado,

seu potencial anti-câncer foi demonstrado nesse estudo pela primeira vez e, de acordo com o método de extração utilizado, será avaliado o perfil químico desse extrato bruto afim de reconhecer os compostos bioativos responsáveis por esse potencial, isolá-los e posteriormente sintetizá-los depois de comprovada ação anti-câncer

A ascídia *Didemnum* sp. demonstrou maiores resultados com concentrações mais baixas contra a linhagem T98G comparado aos demais extratos. Tal resposta pode ser referenciada com da sua família *Didemnidae* que já tem vários relatos de produtos naturais com propriedades farmacológicas. *Didemnin B* é um metabolito isolado da *Trididemnum solidum* (*Didemnidae*), sendo o primeiro produto natural marinho testado em fases clínicas I e II pela FDA (RINEHART JR. et al., 1981; PALANISAMY; RAJENDRAN; MARINO, 2017). Esse composto demonstrou uma atividade contra diversos tipos de câncer como câncer no pulmão, câncer de mama, melanoma, linfoma não Hodgkin e glioblastomas. Porém devido a sua toxicidade sem especificidade, toxicidade neuromuscular e anafilaxia, os testes foram paralisados (S.A. et al., 1999; PALANISAMY; RAJENDRAN; MARINO, 2017).

Já o extrato de *P. caribaeorum* demonstrou grande efetividade em induzir maior viabilidade celular, tendo um aumento próximo ao dobro comparado ao controle. Tal efeito se contradiz com a literatura, que relata dados de toxicidade do seu nematocisto de veneno em nas linhagens de glioblastoma (U251) e adenocarcinoma pulmonário (SKLU-1). No entanto, no mesmo trabalho não foi observado toxicidade para outras linhas de adenocarcinoma colorretal (HCT-15), adenocarcinoma de mama (MCF-7), Leucemia Mielóide crônica (K562), adenocarcinoma em próstata (PC-3), linfócitos (MT-2) e macrofagos de rato (J774). (LAZCANO-PÉREZ et al., 2018). Contudo, ressalta-se que, a forma de extração foi direcionada para os nematocistos de veneno em outros trabalhos, e espécies pertencentes a família Palythoa relatam atividade antitumoral em seus nematocistos. Além disso, o método de avaliação da citotoxicidade é diferente, sendo o sulforodamina B (DE ALENCAR et al., 2015; LAZCANO-PÉREZ et al., 2018). Por outro lado, o muco expelido pelas células glandulares da ectododerme da *P. caribaeorum* é capaz de fomentar e proteger células microbianas (CAMPOS, 2011). Além disso já foi verificado que extratos do muco de *P. caribaeorum* podem induzir a cicatrização de feridas (COSTA; SANTOS; LIRA, 2013). Considerando tais pontos e a condição de que propriedades do muco

foram aderidas ao extrato, podemos responder em parte essa alta na proliferação celular.

A gorgônia *P. dilatata* demonstrou atividade significativa nas concentrações mais elevadas testadas de 800 e 1000 µg/ml. Esta abordagem de análise do potencial antitumoral ainda não foi descrita pela literatura, apenas suas atividades anti-incrustante e antimicrobiana (PEREIRA et al., 2002; LIMA et al., 2013). Tais atividades podem estar relacionadas diretamente com os mesmos metabolitos capazes de induzir a inviabilização das células tumorais. Entretanto, não foi possível determinar uma IC50 devido a concentração máxima estipulada ser de 1mg/mL

A outra linhagem de glioblastoma humano U251 apresentou uma diminuição da viabilidade celular significativa quando cultivada com todos os extratos quando comparados ao controle (Figura 17). Diferente da linhagem T98G, todos os tratamentos diminuíram a viabilidade celular significativamente inclusive o extrato de *C. braziliensis* e *P. caribaeorum*. Isso demonstra uma maior sensibilidade da linhagem U251 aos tratamentos se comparada a T98G. Contudo o tratamento com *Darwinella* sp. demonstrou uma IC50 maior, sendo de 882,4 (µg/ml) comparada a 703,7 (µg/ml) a linhagem T98G (Tabela 4).

As imagens em contraste de fase das células da linhagem U251 foi possível observar e comparar com os dados do ensaio de fosfatase ácida. Existe uma diminuição perceptível confluência celular nos tratamentos com *C. braziliensis*, *Darwinella* sp, *T. coccinea* e *Didemnum* sp. (Figura 18). Contudo, o extrato de *Didemnum* sp. reduziu a quantidade de células em 200µg/mL, assim como na T98G, o que corrobora com sua alta citotoxicidade em concentrações menores do que os demais extratos.

Figura 17 - Viabilidade de células da linhagem U251 em cultura em monocamada tratadas com extratos brutos dos invertebrados marinhos após 72 horas de tratamento. . A = *C. braziliensis*, B = *Darwinella* sp., C = *T. coccinea*, D = *Didemnum* sp., E = *P. caribaeorum*, F = *P. dilatata*, CTRL = Controle. Cada gráfico é representativo de 3 experimentos independentes feitos em octuplicata, sendo a média \pm desvio padrão. (Kruskal-Wallis com teste de Dunn; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ e *** $P \leq 0,001$)

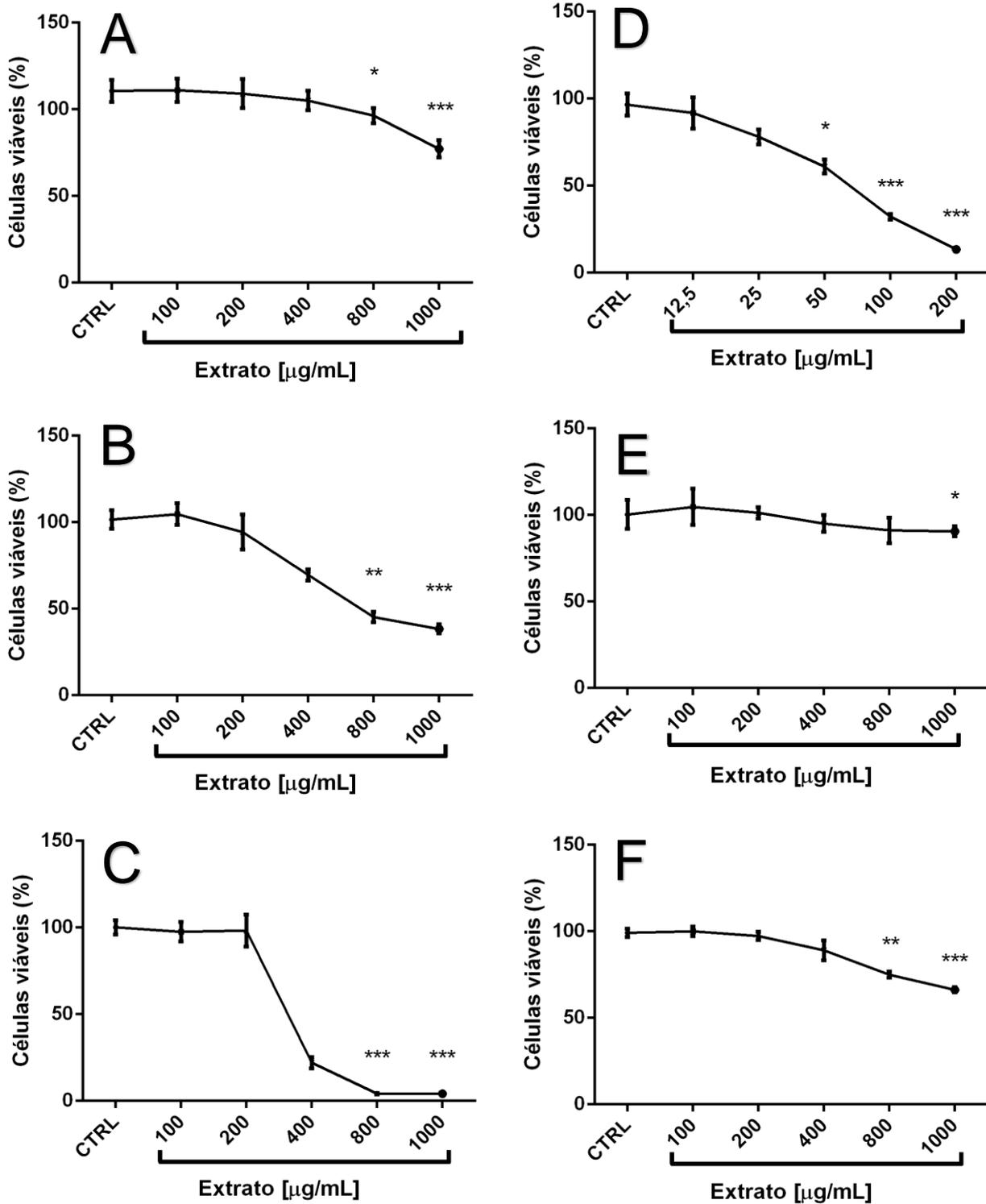
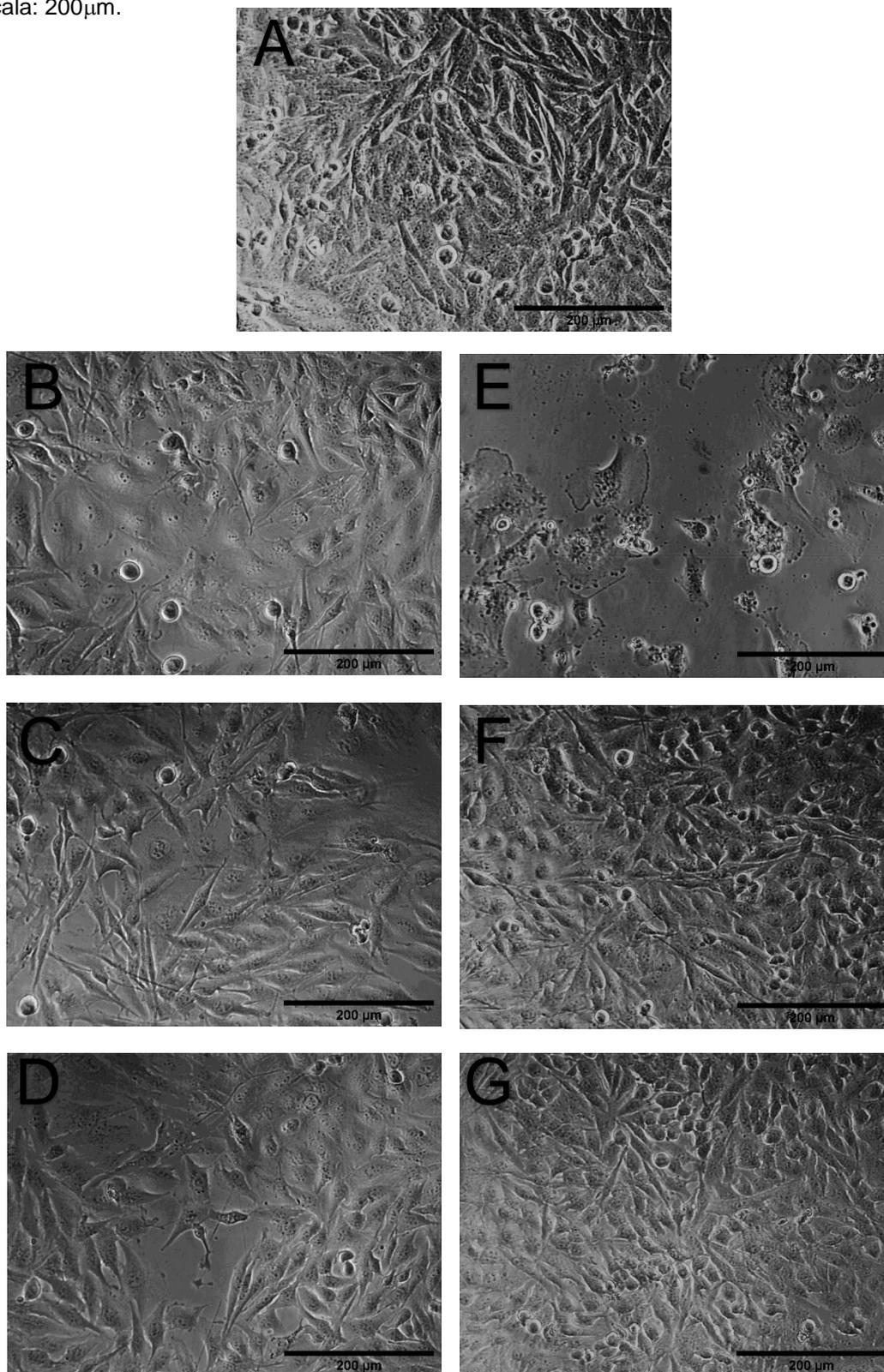


Figura 18 - Fotomicrografia em contraste de fase das células U251 controle e tratadas com extratos brutos na concentração 200 µg/mL após 72 horas de tratamento. A = Controle, B = *C. braziliensis*, C = *Darwinella* sp., D = *T. coccinea*, E = *Didemnum* sp., F = *P. caribaeorum* e G = *P. dilatata*. Barra de escala: 200µm.



O extrato de *C. braziliensis* apresentou um decréscimo significativo das células nas concentrações 800 e 1000µg/mL para a linhagem U251. Comparando aos resultados com a linhagem T98G e da literatura, reacende novamente a possibilidade que extrações com enfoque em substâncias apolares pode vir a obter melhores resultados devido o carreamento de substâncias como esteróides (FLEURY et al., 2008).

A atividade do extrato de *Darwinella* sp. demonstrou-se menos eficiente em quase todas as concentrações se comparada a T98G. Porém mesmo com uma atividade menor de inibição da viabilidade celular, ainda continuou destaque entre os três em tratamentos mais efetivos na linhagem de U251 (Figura 17B). Com isso devemos pôr em mente que uma análise mais específica do extrato, tanto no sentido microbiológico como dos metabolitos e sua extração serão investigados futuramente.

O extrato de *T. coccinea* novamente foi alocado como segundo na maior efetividade na inviabilização celular tumoral (Figura 17C). Sua atividade antitumoral foi mais eficiente se comparada com a linhagem T98G, que novamente corrobora com a teoria de que a U251 possui maior sensibilidade. A atividade citotóxica de *T. coccinea* demonstra ser mais ampla devido seus resultados inibitórios de bactérias se comparado ao extrato de *Didemnum* sp.. No entanto sua toxicidade a uma concentração em 800µg/mL eliminou cerca de 95% das células, sendo a maior atividade descrita no presente trabalho. Com isso vale ressaltar o potencial de produto na parte antitumoral, antibiótica e anti-incrustante desse extrato bruto.

O tratamento com *Didemnum* sp. foi o mais eficiente que os outros extratos. Sua concentração cinco vezes mais baixa do que os demais extratos garantiram resultados tão quão efetivos (Figura 17D). Do mesmo modo com os outros extratos, a sensibilidade da linhagem U251 se demonstrou maior aos tratamentos. A efetividade da *Didemnum* sp. nas duas linhagens traz a questão de quanto seletivo é a sua toxicidade, já que obteve ótimo desempenho para linhagens tumorais e nenhuma para bactérias.

A *P. caribaeorum* teve a menor redução celular significativa entre todos os extratos. Tal resultado congrega em parte com os resultados na T98G que induziram

um aumento celular. Possivelmente por deter uma maior sensibilidade a linhagem U251 sofreu mesmo que minimamente a morte celular pelos metabolitos com tal atividade.

O extrato *P. dilatata* mostrou uma diminuição significativa nas concentrações 800 e 1000 μ g/MI (Figura 17F). No entanto seu resultado não foi capaz de atingir uma inviabilização de 50% das células mesmo com a sensibilidade maior na U251. Nesse contexto será válido alterar a abordagem de busca dos metabolitos, modificando a polaridade ou então o grupo alvo como peptídeos que já demonstraram atividade antimicrobiana (LIMA et al., 2013)

A Tabela 4 mostra o valor necessário para inibição do crescimento de 50% das células viáveis (IC₅₀) para cada extrato pelo ensaio de fosfatase ácida em monocamada. Os extratos de *C. braziliensis*, *P. caribaeorum* e *P. dilatata* não atingiram uma inibição de 50% das células em nenhum tratamento, inviabilizando o cálculo de uma IC₅₀ não superestimada. Para os testes de fosfatase ácida em modelo 2D a linhagem U251 foi mais sensível exceto para o tratamento com *Darwinella* sp. em que a T98G foi mais sensível. Tal dado pode sugerir de que o mecanismo de ação da *Darwinella* sp. pode ser diferente entre as linhagens.

Tabela 4 - IC₅₀ dos extratos brutos dos invertebrados marinhos em modelo 2D.

Espécie	IC ₅₀ (µg/mL)	
	T98G	U251
<i>Chromonephthea braziliensis</i>	-	-
<i>Darwinella sp.</i>	703,7	882,4
<i>Tubeastraea coccinea</i>	432,8	317,2
<i>Didemnum sp.</i>	120,6	63,32
<i>Palythoa caribaeorum</i>	-	-
<i>Phyllogorgia dilatata</i>	-	-

O extrato de *T. coccinea* estimou uma IC₅₀ de 432,8 (µg/mL) para T98G e 317,2 (µg/ml), cerca de 50% mais baixa do que o extrato de *Darwinella sp.* Essa atividade citotóxica é clara em todos os experimentos até então, sendo capaz de agir contra células tumorais e bacteriana. Tais dados constataam a atividade tóxica já avaliada in situ contra predadores e competidores invertebrados (CREED, 2006; LAGES et al., 2010a).

A IC₅₀ da *Didemnum sp.* se destaca em comparação com outras ascídias já avaliadas e promissoras (PALANISAMY; RAJENDRAN; MARINO, 2017). No estudo de Jimenez et al. (2003) foi avaliado nos aspectos citotóxicos, cerca de 10 espécies de ascídias encontradas no Brasil, considerando que o teste avaliado foi o de MTT e as linhagens foram de colón (HCT-8), leucemia mielóide aguda (HL-60), limfoblasto T agudo (CEM) e melanoma em camundongos (B16), no estudo foi obtido uma IC₅₀ de 23,80 e 53,0 (µg/ml) para as espécies mais promissoras e nenhuma resposta até 100 (µg/ml) das demais ascídias. As análises em modelos em monocamada indicam o potencial anticâncer dos produtos naturais oriundos da *Didemnum sp.* e *T. coccinea*.

5.2.2 Viabilidade celular – Modelo 3D

No ensaio de viabilidade celular em cultivo em esferoides da linhagem T98G, se obteve diferença significativas nos extratos de *T. coccinea* e *Didemnum sp.* comparado ao controle (Figura 19C e D). O modelo 3D permite uma análise mais próxima às condições naturais de um microambiente tumoral. Esse sistema por si só aumenta as interações entre células e as interações células e matriz extracelular, simulando melhor o microambiente *in vivo*. Tal conjuntura torna esse sistema um melhor indicador de substâncias com um verdadeiro potencial farmacológico, no qual tenta contornar as adaptações dos testes bidimensionais e em animais. Com esse contexto os testes com culturas tridimensionais requerem uma concentração maior de substância teste e uma análise da sua morfologia para elaborar os resultados (FRIEDRICH et al., 2007; BACHINSKI et al., 2015).

As imagens em contraste de fase da Figura 20 ilustram os esferoides cultivados por 72 horas sob o tratamento dos extratos na concentração de 400 µg/ml e do controle. É perceptível um desarranjo estrutural do esferoide para o tratamento do extrato de *Didemnum sp* (Figura 20E).

Figura 19 - Viabilidade celular da linhagem T98G em modelo tridimensional tratadas com extratos brutos dos invertebrados marinhos após 72 horas de tratamento. A = *C. braziliensis*, B = *Darwinella* sp., C = *T. coccinea*, D = *Didemnum* sp., E = *P. caribaeorum*, F = *P. dilatata*, CTRL = Controle. Cada gráfico é representativo de 3 experimentos independentes feito em octuplicata, sendo a média \pm desvio padrão. (Kruskal-Wallis com teste de Dunn; * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$)

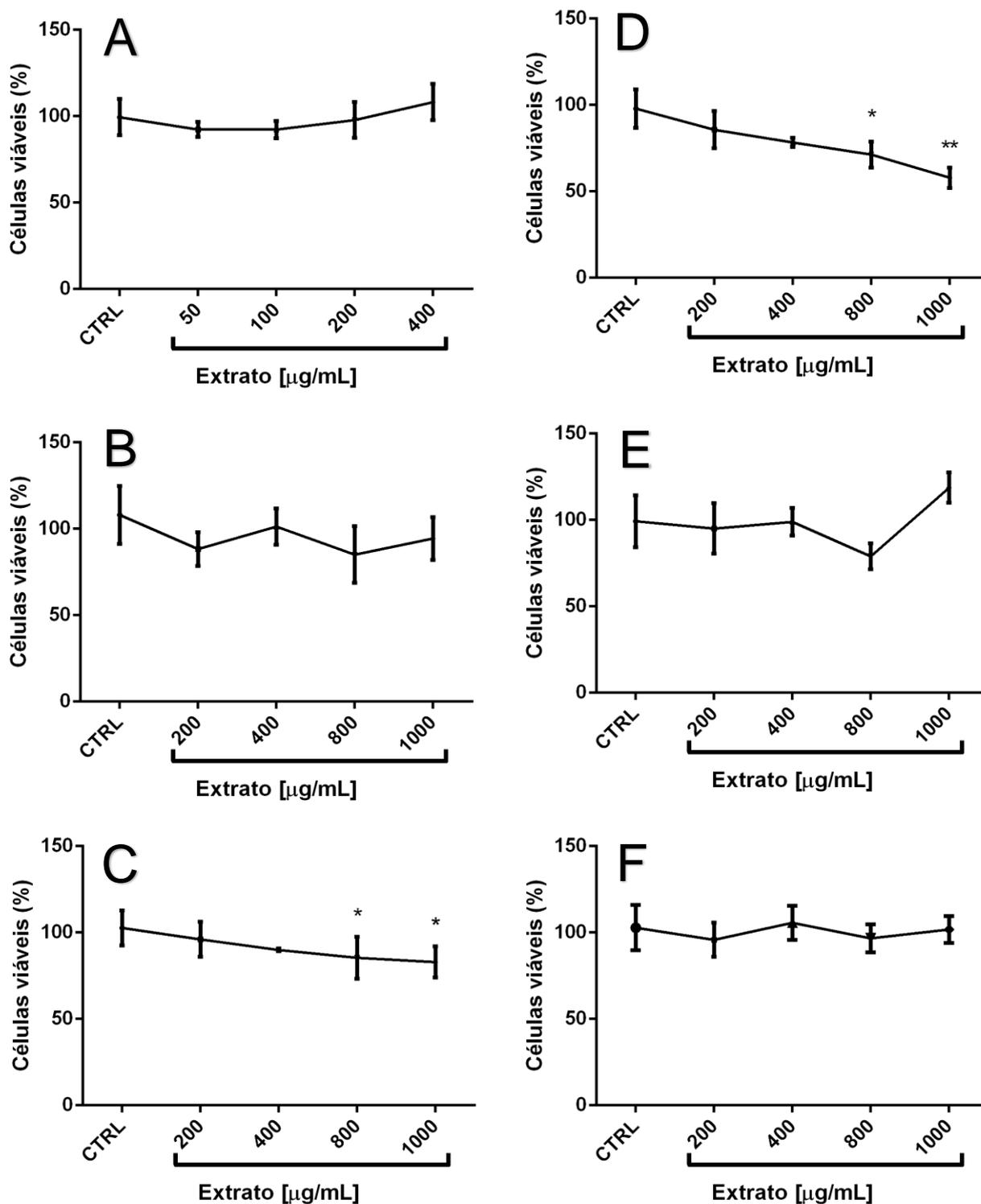
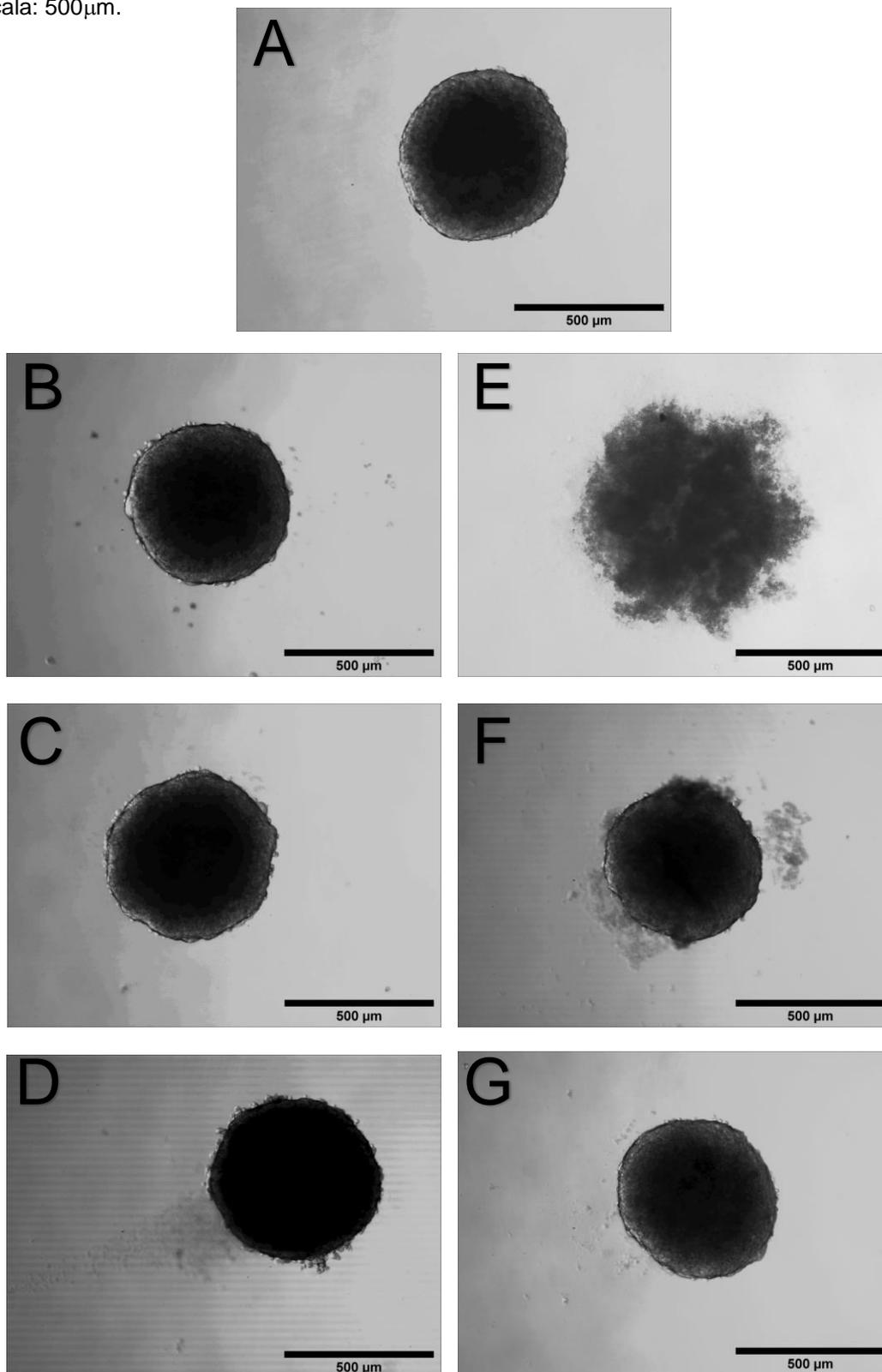


Figura 20 - Fotomicrografias em contraste de fase das células T98G controle e tratadas com extratos brutos na concentração 400 µg/ml após 72 horas de tratamento .A = Controle, B = *C. braziliensis*, C = *Darwinella* sp., D = *T. coccínea*, E = *Didemnum* sp., F = *P. caribaeorum* e G = *P. dilatata*. Barra de escala: 500µm.



Os extratos de *C. braziliensis*, *Darwinella* sp, *P. caribaeorum* e *P. dilatata* não demonstraram nenhuma atividade significativa se comparada ao controle através do ensaio de atividade da fosfatase ácida (Figura 19). Tal resultado era esperado para os tratamentos que já não demonstraram resultados em testes bidimensionais. O extrato de *Darwinella* sp. mesmo que tenha atingido uma IC₅₀ nos testes bidimensionais, obteve uma IC₅₀ próxima a 1000 (µg/ml), que no caso é refletida na falta resultados na cultura tridimensional (Figura 19C). As perspectivas futuras do estudo consideram-se um fracionamento do extrato bruto e isolamento dos compostos bioativos para assim inferir uma concentração do metabolito de interesse. Outros estudos com produtos naturais marinhos em modelo 3D, realizaram uma análise mais seletiva dos extratos para obtenção de resultados significantes (ABOLHASANI et al., 2018; GARCÍA-DAVIS et al., 2019).

O extrato de *T. coccinea* também desempenhou uma atividade citotóxica significativa na linhagem. Tal resultado embasa ainda mais o potencial biotecnológico já averiguado nos outros experimentos da espécie. Os testes em cultura 3D além de indicar uma substância com eficiência mais promissora também elimina parte dos gastos e tempo, promovendo uma pesquisa e desenvolvimento de produtos mais facilitado (THOMA et al., 2014; GOMES et al., 2016). Analisando a sua morfologia (Figura 20D) não se vê alteração estrutural perceptível do esferoide, o que pode ser explicado pela concentração de cultivo abaixo do IC₅₀ nessa condição experimental.

A *Didemnum* sp. atingiu os resultados significativos mais próximos de uma IC₅₀. Dessa forma podemos afirmar que o mecanismo de ação da inviabilização celular é capaz de atingir microambientes mais complexos. Essa característica do extrato pode indicar aptidão para o desenvolvimento e pesquisa de um candidato a fármaco. Sua característica invasora também pode auxiliar a pesquisa já que se encontra em abundância na região de Arraial do Cabo (GOMES et al., 2016). Sua morfologia (Figura 20E) também evidencia ação do extrato demonstrando desestruturação do esferoide e possível morte celular. Os esferoides possuem uma citoarquitetura dinâmica, que normalmente a região periférica do esferoide é constituído por células em alta atividade proliferação, ao mais centro do núcleo em estágio quiescente e no núcleo em apoptose, essa característica ocorre devido à baixa de nutrientes e hipóxia gradativo quão mais próximo ao núcleo, em conjunto com um aumento gradativo de CO₂ e detritos (ZANONI et al., 2016). No caso de esferoides que perdem essa

integridade morfológica pode ser relacionado com células em necrose que não possuem coesão suficiente para congregação morfológica esferoide (WEN et al., 2013)

A viabilidade celular da linhagem U251 em 3D pelo ensaio fosfatase ácida apenas mostrou diferença significativa para o tratamento com o extrato de *Didemnum* sp. ilustrado na Figura 21D . A linhagem U251 apresentou maior sensibilidade aos extratos do que a T98G nos ensaios em monocamada, no entanto obteve apenas um resultado significativo no sistema tridimensional. Além disso, foi evidente a dificuldade da formação do esferóide que no qual dificulta um discernimento verdadeiro do efeito do extrato do ponto de vista morfológico (Figura 22). A falta de estruturação dimensional não pode ser definida apenas como efeito citotóxico, porém os resultados ensaio de viabilidade por fosfatase ácida, corroboram para um efeito citotóxico no extrato de *Didemnum* sp..

Na Figura 22 é possível observar as imagens em contraste de fase dos esferoides da linhagem U251 sob o tratamento dos extratos na concentração de 400 µg/ml e do controle. Os esferoides sob tratamento da *C. braziliensis*, *Darwinella* sp., *Didemnum* sp. e *P. caribaeorum* (Figura 22 B, C, E e F) sofreram uma desestruturação da sua forma tridimensional. Tal desestruturação é mais evidente nos tratamentos com *C. braziliensis* e *Didemnum* sp.

Figura 21 - Viabilidade celular de células da linhagem U251 em modelo tridimensional tratadas com extratos brutos dos invertebrados marinhos após 72 horas de tratamento. A = *C. braziliensis*, B = *Darwinella* sp., C = *T. coccinea*, D = *Didemnum* sp., E = *P. caribaeorum*, F = *P. dilatata*, CTRL = Controle. Cada gráfico é representativo de 1 experimento independente feito em octuplicata, sendo a média \pm desvio padrão. (Kruskal-Wallis com teste de Dunn; * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$)

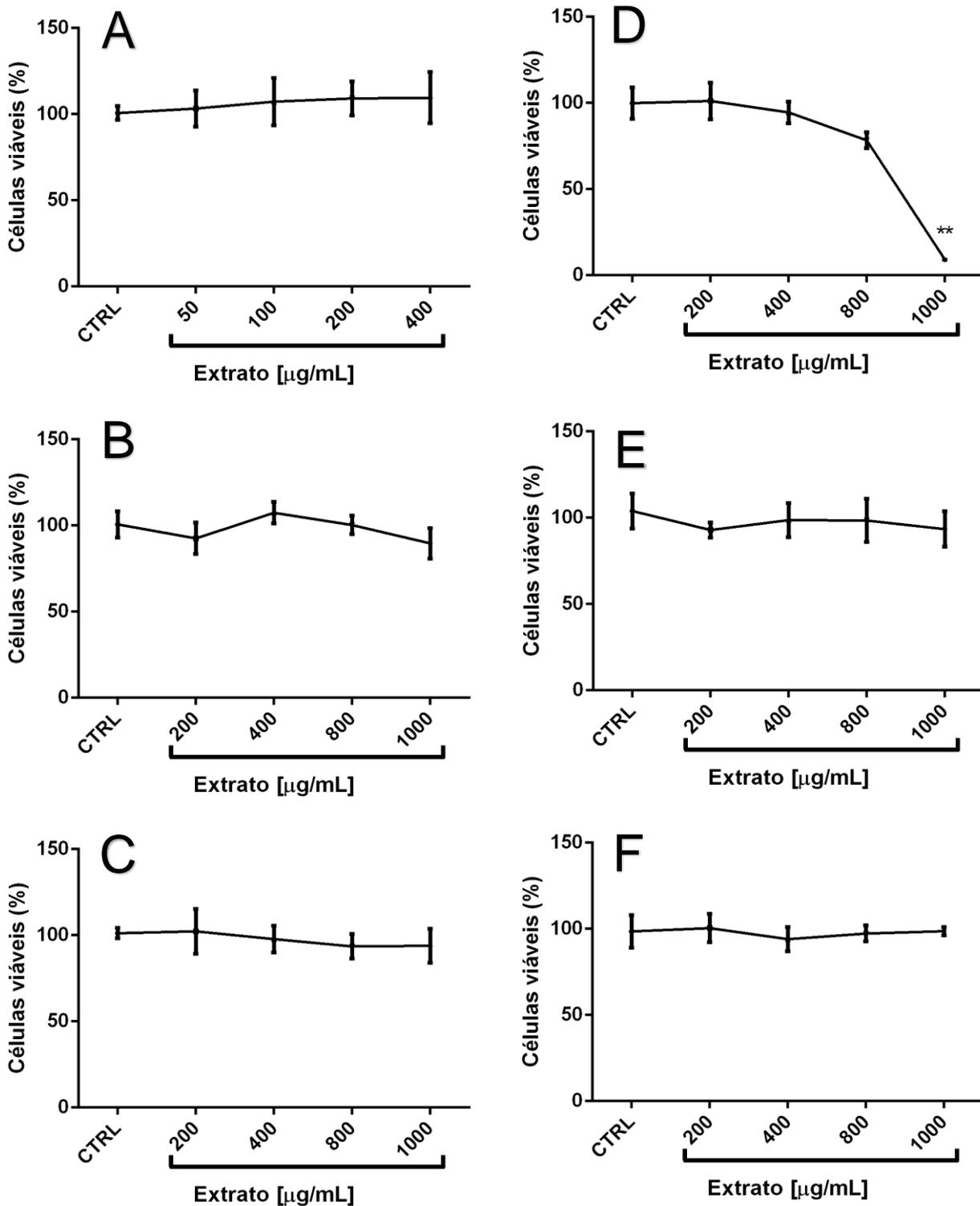
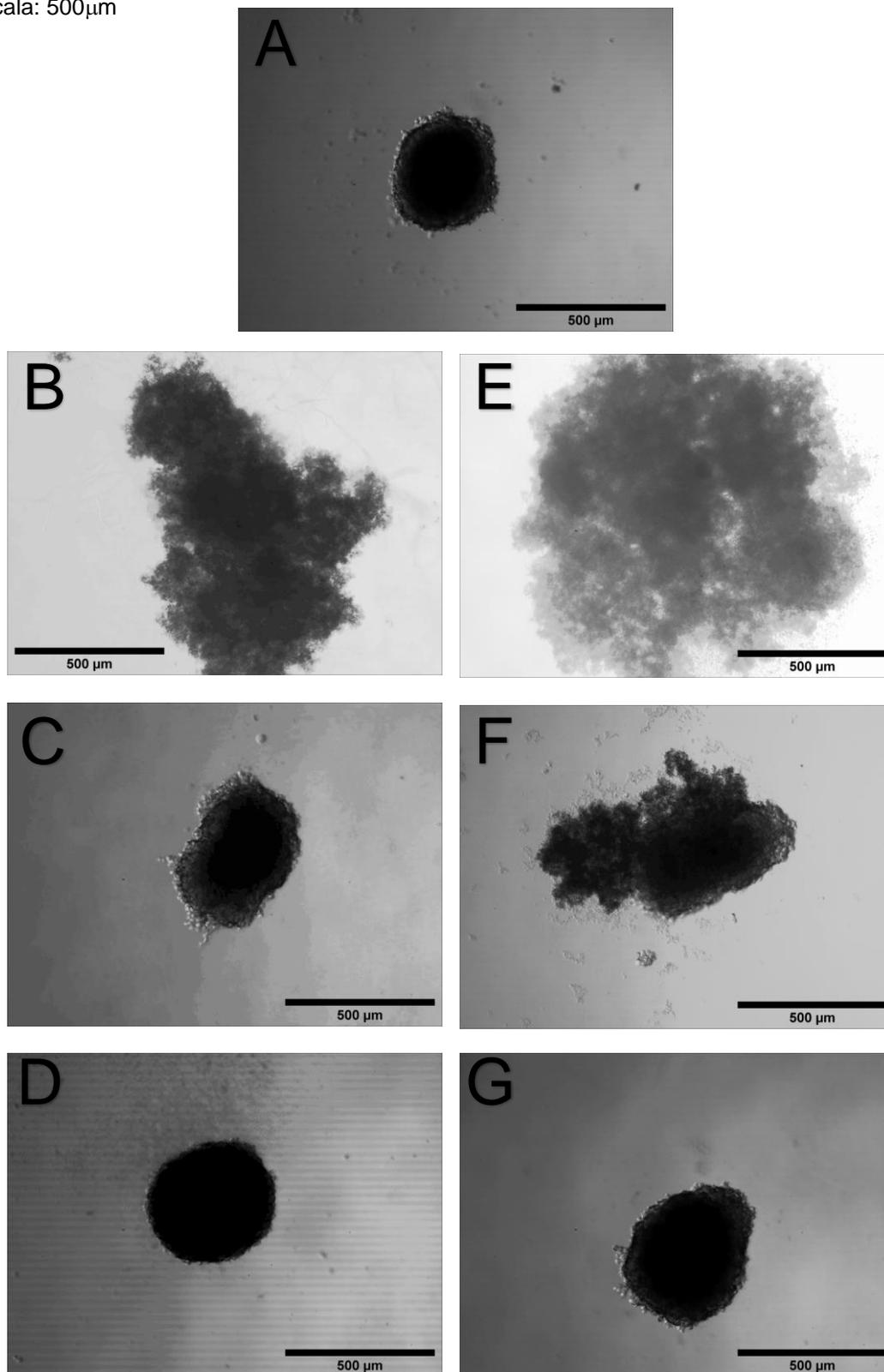


Figura 22 Fotomicrografias em contraste de fase das células U251 controle e tratadas com extratos brutos na concentração 400 µg/ml após 72 horas de tratamento. A = Controle, B = *C. braziliensis*, C = *Darwinella* sp., D = *T. coccinea*, E = *Didemnum* sp., F = *P. caribaeorum* e G = *P. dilatata*. Barra de escala: 500µm



A falta de resultados significativos em quase todos os extratos demonstra a maior complexidade do sistema tridimensional. O mecanismo de ação dos extratos não obteve resposta neste sistema mais complexo, o que sugere a inadaptabilidade dos extratos brutos para futuros testes mais complexos. No entanto uma nova abordagem com frações mais definidas e concentrações dos metabolitos de interesse poderão se adequar melhor a este teste, definindo maior especificidade em relação aos compostos ativos. O efeito citotóxico de *Didemnum* sp. foi averiguado apenas na concentração de 1000µg/mL, tal resultado indica que o seu mecanismo de ação conseguiu se reproduzir nesse sistema mais complexo. Duas grandes possibilidades podem estar inseridas nessa resposta, a quantidade de metabolito de interesse presente no extrato é maior se comparada aos outros extratos e também uma maior toxicidade desse metabolito.

A fim de esclarecer os efeitos citotóxicos na morfologia dos esferoides, foi analisada o volume dos mesmos e comparado ao controle (Figuras 23 e 24). Como descrito anteriormente, a morte celular está relacionada a perda da coesão no aglomerado celular, assim gerando uma expansão do volume e perda da sua forma tridimensional (THOMA et al., 2014). A linhagem T98G demonstrou diferenças significativas para os extratos de *T. coccinea*, *Didemnum* sp. e *P. dilatata* (Figuras 23C D e E). Já a linhagem U251 só obteve diferença significativa para o extrato de *Didemnum* sp. (Figura 24D).

Figura 23 - Volume dos esferoides da linhagem T98G tratadas com 400 µg/ml extratos brutos dos após 72 horas e comparadas com o controle. A = *C. braziliensis*, B = *Darwinella* sp., C = *T. coccinea*, D = *Didemnum* sp., E = *P. caribaeorum*, F = *P. dilatata* e CTRL = Controle. Cada gráfico é representativo de 1 experimento independente feito em octuplicata, sendo a média ± desvio padrão (Teste de Mann-Whitney; * P ≤ 0.05 e *** P ≤ 0.001)

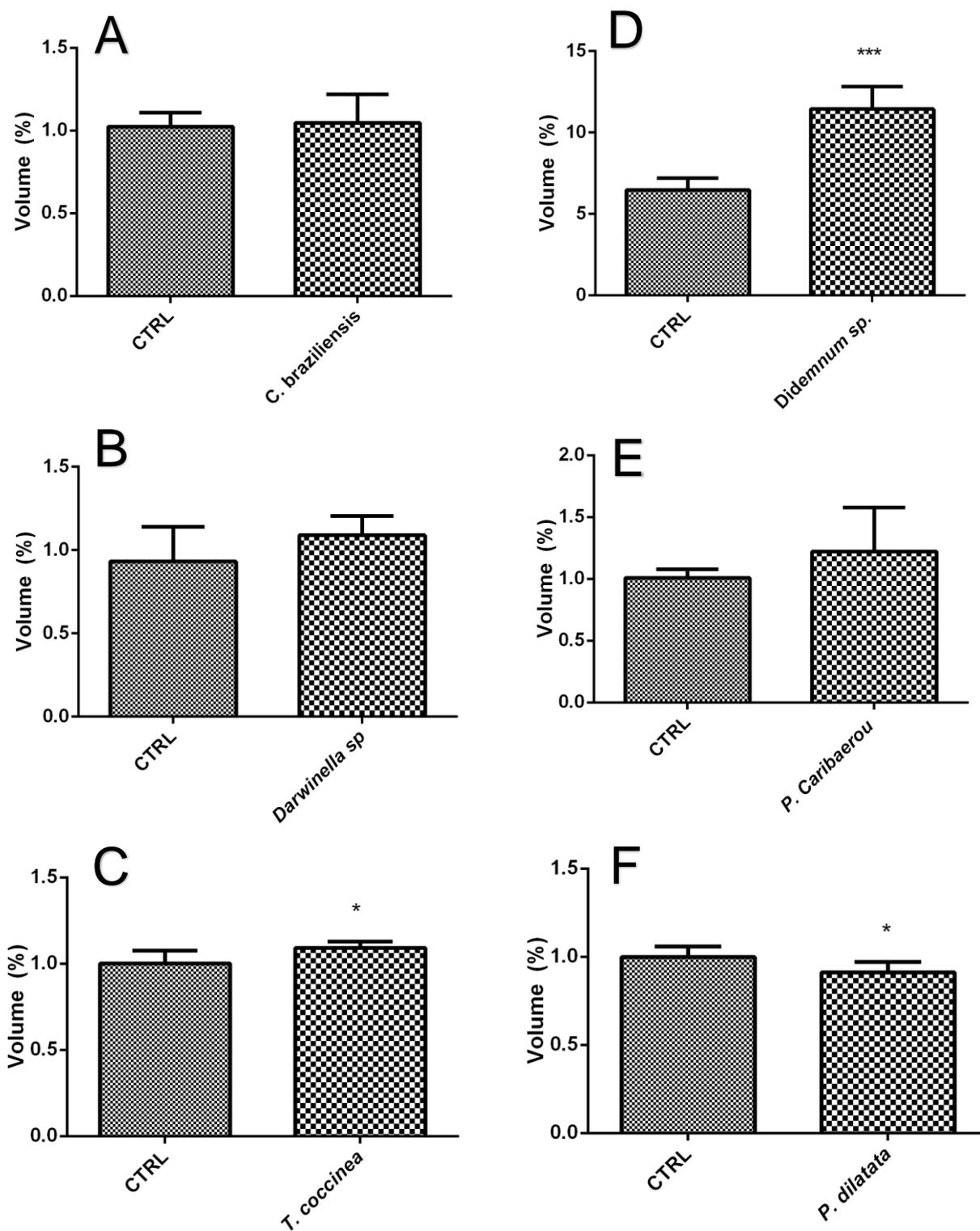
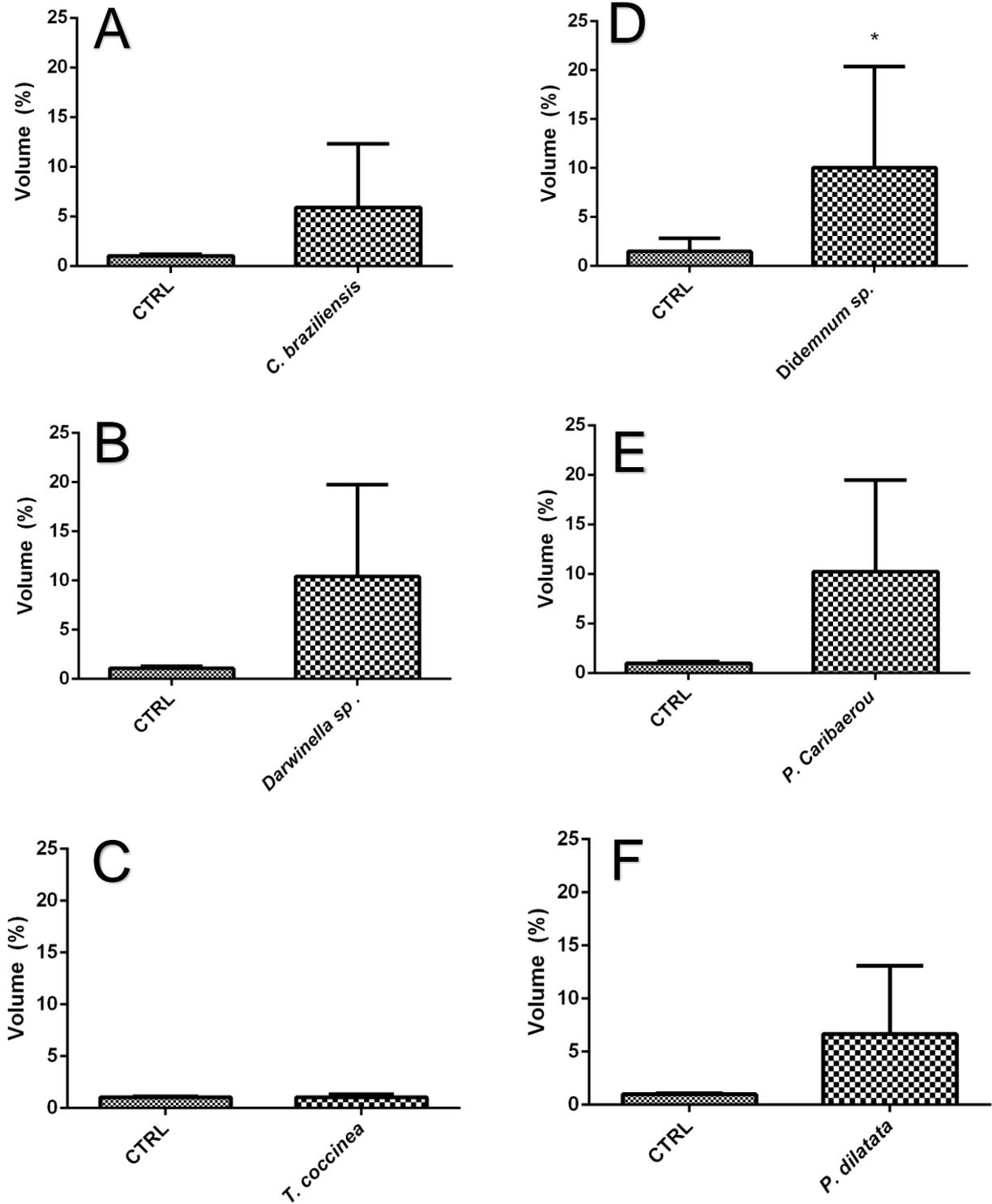


Figura 24 - Volume dos esferoides da linhagem U251 tratadas com extratos brutos dos invertebrados marinhos após 72 horas de tratamento. A = *C. braziliensis*, B = *Darwinella* sp., C = *T. coccinea*, D = *Didemnum* sp., E = *P. caribaeroum*, F = *P. dilatata* e CTRL = Controle. Cada gráfico é representativo de 1 experimento independente feito em octuplicata, sendo a média \pm desvio padrão (Teste de Mann-Whitney; * $P \leq 0.05$).



O aumento do volume na linhagem T98G pelo extrato da *T. coccinea* corrobora com o seu resultado de viabilidade celular em 3D. Mesmo não atingindo a IC50 no modelo tridimensional as respostas de toxicidade *T. coccinea* são altas e amplas, indicando um produto natural promissor. Sua amplitude tóxica foi capaz de inviabilizar células procariotas bacterianas gram-negativas e gram-positivas, células tumorais em monocamada e tridimensional. Contudo é necessário avaliar se tal toxicidade é limitada a células tumorais e bacterianas ou pode atingir células saudáveis, problema já visto em fases clínicas com outros produtos naturais marinhos (MOLINSKI et al., 2009)

O extrato de *Didemnum* sp. foi o único que ocorreu uma diferença significativa em ambas as linhagens em seu volume. Tal resposta apoia os testes de fosfatase ácida e da morfologia em ambas as linhagens para *Didemnum* sp.. Para a linhagem U251 que demonstrou dificuldade na sua estruturação tridimensional em três extratos, o aumento significativo do volume da *Didemnum* sp. indica uma toxicidade verdadeira representada na sua morfologia (Figura 24D).

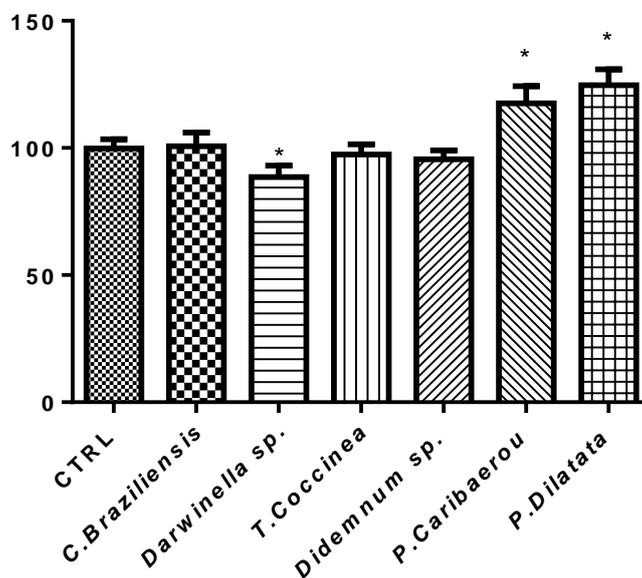
Os resultados obtidos da *P. dilatata* diferem dos demais, tendo como resposta uma diminuição significativa do volume para a linhagem T98G. Tal resposta contrapõe os resultados em monocamada que demonstraram uma leve toxicidade e os tridimensionais que não obtiveram diferenças significantes nem morfológicas (Figura 23F).

Os resultados em modelo 3D podem direcionar os organismos para as futuras investigações, já que esse tipo de modelo mesmo sendo *in vitro* mimetiza uma massa tumoral de forma mais autêntica se comparada ao modelo 2D. Da mesma forma esse modelo permite considerar novas abordagens de extração e refinamento dos outros extratos menos eficientes (THOMA et al., 2014).

5.2.3 Viabilidade de células saudáveis - (APH)

A linhagem saudável de fibroblastos humanos (*Induced Human Fibroblast* - IHF) foi avaliada a fim de averiguar se os extratos possuem toxicidade a células saudáveis sendo representado na Figura 25 Utilizando-se o modelo de monocamada, mostrou-se que o extrato de *Darwinella* sp. provocou uma diminuição significativa da viabilidade celular enquanto que *P. caribaeorum* e *P. dilatata* obtiveram um aumento significativo comparado ao controle. Já os demais extratos não demonstraram toxicidade significativa, porém vale ressaltar a concentração de 200 µg/mL foi usada para o extrato de *Didemnum* sp. enquanto que o restante dos extratos foi de 400 µg/mL.

Figura 25 - Viabilidade da linhagem saudável IHF tratadas com extratos brutos e controle por 72 horas e avaliadas pelo método APH. As concentrações utilizadas de cada extrato foram de 400 µg/mL exceto o extrato da *Didemnum* sp. sendo 200 µg/mL. CTRL = Controle. A diferença significativa foi entre o controle e o extrato (Teste de Mann-Whitney; * P ≤ 0.05). O gráfico é representativo de 1 experimento independente feito em quintuplicata, sendo a média ± desvio padrão.



A falta de atividade da *C. braziliensis* contra as células IHF é um sinal favorável para a bioprospecção antitumoral. Porém deve se contestar com o resultado em monocamada da linhagem U251, no qual só obtive respostas significativas em concentrações a partir de 800 e 1000µg/mL. Tal condição questiona se a falta de

resultados significativos na linhagem IHF é devido a toxicidade específica a linhagens tumorais ou é em decorrência da concentração mais baixa no teste de 400 µg/ml.

A diminuição significativa de *Darwinella* sp. indica uma toxicidade não específica para linhagens tumorais, sendo que a *Darwinella* sp. já apresentou no presente estudo nível significativo de citotoxicidade contra as duas linhagens tumorais e bacterianas. Podemos indagar se essa falta de seletividade é devido do seus metabolitos ou dos metabolitos presentes nos microrganismos associados muitas vezes associados as esponjas (BLOCKLEY et al., 2017)

A falta de toxicidade do extrato de *T. coccinea* indica o potencial farmacológico da espécie para tratamento neoplasias. A *T. coccinea* exibiu os melhores resultados para ambas linhagens tumorais T98G e U251 nos testes em monocamada e tridimensional após a *Didemnum* sp. No entanto vale ressaltar que diferente da *Didemnum* sp. e dos outros extratos, ela demonstrou atividade antibacteriana contra todas espécies bacterianas. Essa conjuntura de respostas certamente indicariam uma toxicidade celular ampla, que no qual foi indeferida pelos testes com IHF. Essa toxicidade seletiva pode ser indicativa do mecanismo de ação do metabolito é em resposta alguma via de alta proliferação celular como no tumor.

A *Didemnum* sp. não demonstrou atividade inibitória das bactérias, porém foi o único extrato a demonstrar atividade significativa contra ambas as linhagens tumorais em modelo em monocamada e tridimensional. No entanto a menor concentração de 200 µg/ml com a *Didemnum* sp. para as células IHF deve ser ponderada. Se analisarmos os resultados em 2D com as linhagens T98G e U251 que obtiveram redução significativa com a concentração de 200 µg/ml e uma IC50 de 120,6 µg/ml e 63,32 µg/ml para cada linhagem respectivamente, corroboram com toxicidade seletiva para neoplasias da *Didemnum* sp.. As ascídias já possuem um histórico de produtos naturais para tratamento tumoral, porém vale denotar que algumas espécies que forem encaminhadas para as fases clínicas I e II, foram suspensa ou canceladas devido a sua alta toxicidade neuromuscular e anafilaxia (S.A. et al., 1999; COOPER; YAO, 2012). Com esse conjunto de informações é possível afirmar que *Didemnum* sp. possui grande potencial farmacológico para tratamento de glioblastoma, caso se isole os compostos bioativos e os resultados com tecidos sadios continuem promissores.

O resultado do extrato de *P. caribaeorum* exhibe novamente a capacidade de indução a proliferação celular de tal espécie, sendo ela evidenciada pela falta de resultados citotóxicos e um aumento celular significativo na linhagem T98G em 2D. Tal propriedade, confere com a capacidade de proteção e proliferação de microrganismos em seu muco e da habilidade cicatrização do mesmo, que no qual parte de tais propriedades podem ter sido alocados no extrato (CAMPOS; PÉREZ; GARCIA, 2011; COSTA; SANTOS; LIRA, 2013) Portanto, futuramente, sugere-se investigar as propriedades de cicatrização desse extrato bruto, uma vez que resultou em significativa proliferação de fibroblastos humanos.

Por fim o extrato de *P. dilatata* também demonstrou aumento significativo do número de células se comparado ao controle. O aumento celular pode indicar que a substancia presente no extrato possuem certa seletividade citotóxica. Os resultados com as linhagens tumorais obtiveram uma diluição celular significativa e inibição em algumas bactérias. Esses resultados inferiores podem estar associados a forma de extração da substancia carregada, que podem indicar que o metabolito de interesse não foi carregado corretamente pelo solvente na extração.

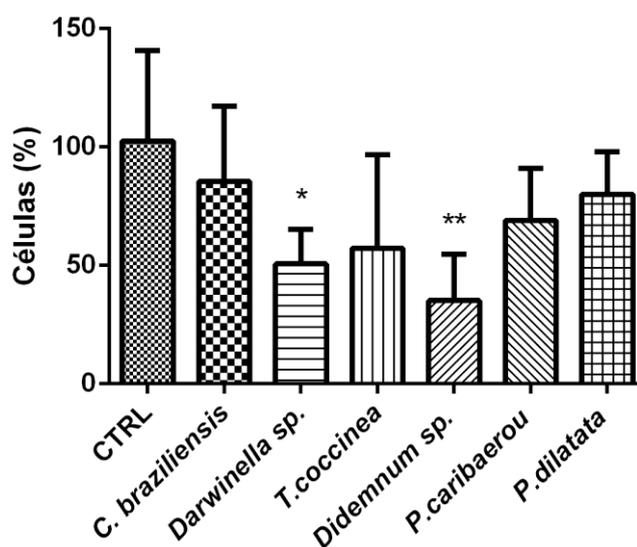
Diante da verificação de especificidade anticâncer dos substratos estudados, a etapa seguinte foi verificar potencial citotóxico e/ou citostático desses a fim de comprovar o mecanismo de ação visto no resultado dos testes de viabilidade celular.

5.2.4 Potencial citotóxico ou citostático

A contagem do total de núcleos celulares é realizada a fim apoiar e averiguar os resultados já fornecidos pelos ensaios de viabilidade celular em modelo em monocamada. O dado é uma resposta quantitativa do número de células, apoptose e células em mitose, sendo assim possível indicar o tipo de ação que o extrato nas células.

Os extratos de *Darwinella* sp. e *Didemnum* sp. apresentaram uma redução no número de células significativo. O restante dos tratamentos não apresentou diferença significativa

Figura 26 - Porcentagem de células relativas ao controle para cada extrato da linhagem T98G após 72 horas de tratamento. As concentrações utilizadas de cada extrato foram de 200 µg/ml exceto o extrato da *Didemnum* sp. sendo 100 µg/ml. CTRL = Controle. A diferença significativa é entre o controle e o extrato (Teste de Mann-Whitney; * P ≤ 0,05 e ** P ≤ 0,01) O gráfico é representativo de 3 experimentos independentes feito em sendo a média ± desvio padrão.



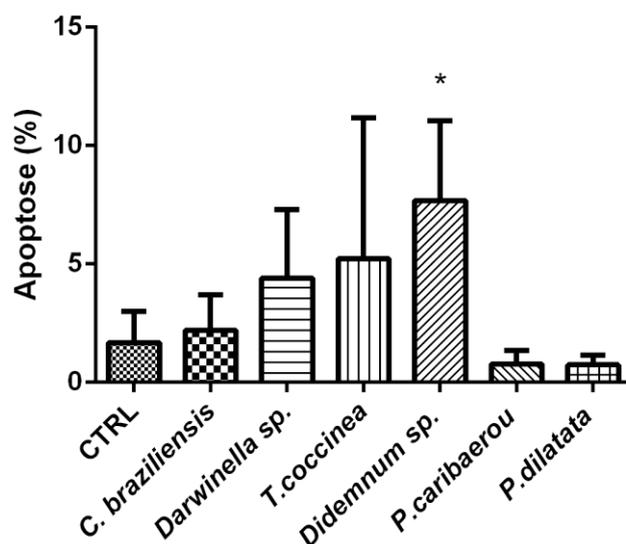
O extrato de *Darwinella* sp. reduziu significativamente o número de células, assim como nos ensaios de viabilidade celular no modelo em monocamada para linhagem T98G e U251. Esse resultado confirma a atividade citotóxica da *Darwinella* sp. perante as linhagens tumorais e bactérias, que no qual o grupo das esponjas se destacam farmacologicamente. No entanto o gênero *Darwinella* ainda detém poucos estudos referente sua capacidade antitumoral e antibacteriana até o momento, com isso uma ampliação da investigação sobre suas propriedades é necessária (SELEGHIM et al., 2007; MALVE, 2016; CALCABRINI et al., 2017).

O número de células no tratamento por *Didemnum* sp. foi o que sofreu maior redução significante. Em todos os testes contra linhagens tumorais tanto em modelo 2D e 3D a ascídia teve algum efeito de redução celular. Além disso a falta de toxicidade a linhagem sadia fortalece o potencial antitumoral da ascídia. Até então não existe nenhum fármaco oriundo de invertebrados marinhos em fase clinicas para tratamentos de glioblastomas, que pode ser devido a baixo índice de estudos pré-clinicos com linhagens de glioblastoma e também pela agressividade do tumor em si (PALANISAMY; RAJENDRAN; MARINO, 2017; DYSHLOVOY; HONECKER, 2018)

Tais resultados para a *Didemnum* sp. além de avaliar um tipo de tumor mais negligenciado pelos produtos naturais marinhos, não a limita, mas sim fortalece a perspectiva de um fármaco com potencial para outros tipos de tumores.

Somente o extrato de *Didemnum* sp. apresentou um aumento significativo no número de células em apoptose das células T98G. O restante dos tratamentos não apresentou diferença significativa.

Figura 27 - Porcentagem de células em apoptose para cada extrato e controle da linhagem T98G após 72 horas de tratamento. As concentrações utilizadas de cada extrato foram de 200 µg/ml exceto o extrato da *Didemnum* sp. sendo 100 µg/ml. A diferença significativa é entre o controle e o extrato (Teste de Mann-Whitney; * $P \leq 0,05$) O gráfico é representativo de 3 experimentos independentes sendo a média \pm desvio padrão.

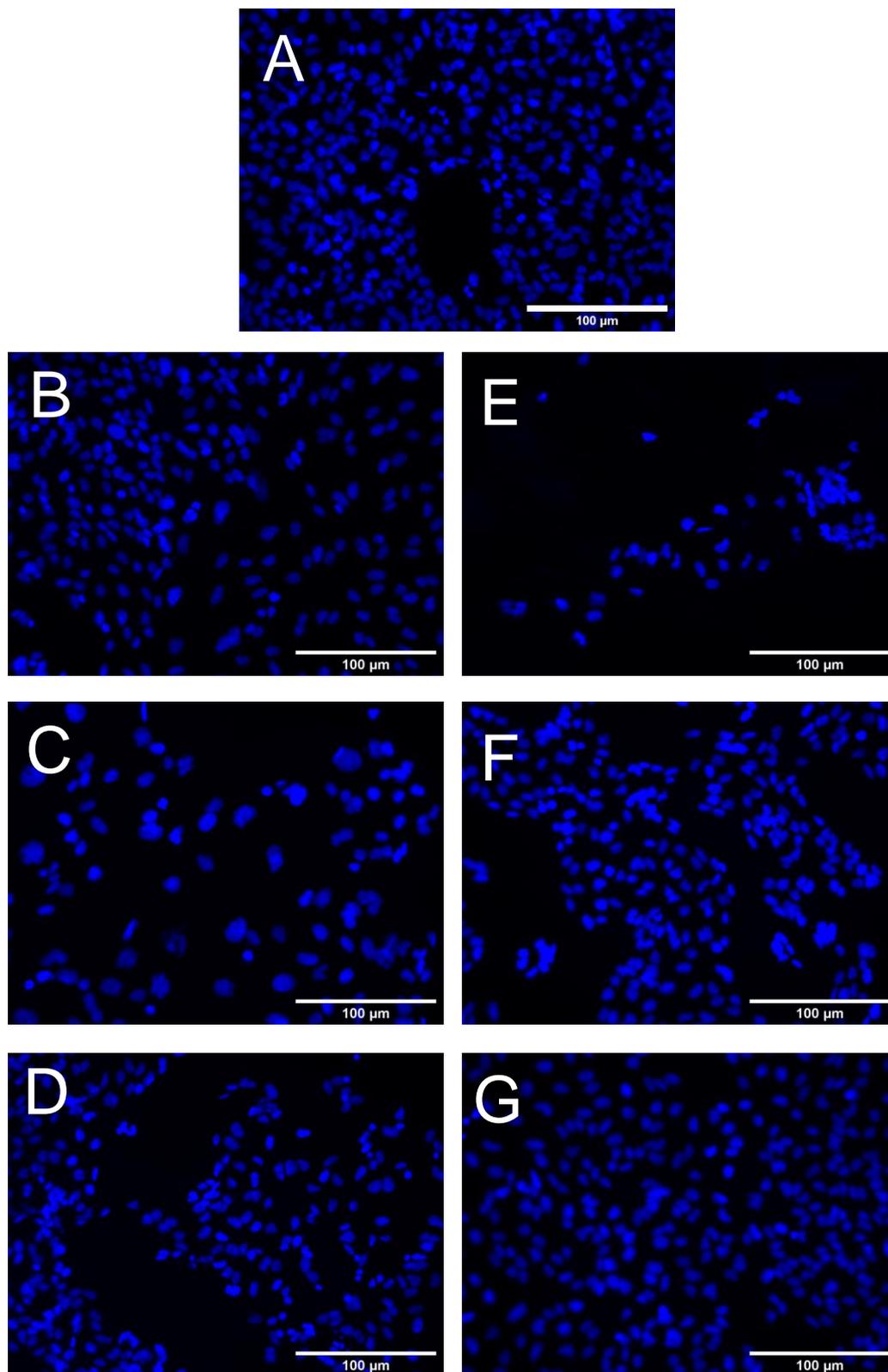


O aumento significativo de células em apoptose pelo tratamento da *Didemnum* sp. na linhagem T98G reflete os dados a diluição do número de células. Isso indica que possivelmente a *Didemnum* sp. induz a apoptose nas células em vez de inibir a proliferação, exercendo um efeito citotóxico em vez de citostático. Essa indicação pode facilitar as futuras investigações no mecanismo de ação do produto natural. O

estudo de Takeara et al. (2008), observou efeito citostático de frações do extrato da *Didemnum psammatoedes* na linhagem de leucemia mielóide aguda (HL-60), essa atividade possivelmente mecanismos similares.

Na Figura 28 podemos observar as fotos em microscópio de fluorescência as células da linhagem T98G incubadas por 72 horas com os extratos e controle. É possível notar que ocorreu uma considerável diminuição na proliferação ou apoptose celular nas nos tratamentos com *Darwinella* sp. e *Didemnum* sp. Nos outros extratos, aparentemente à uma diminuição celular comparada ao controle.

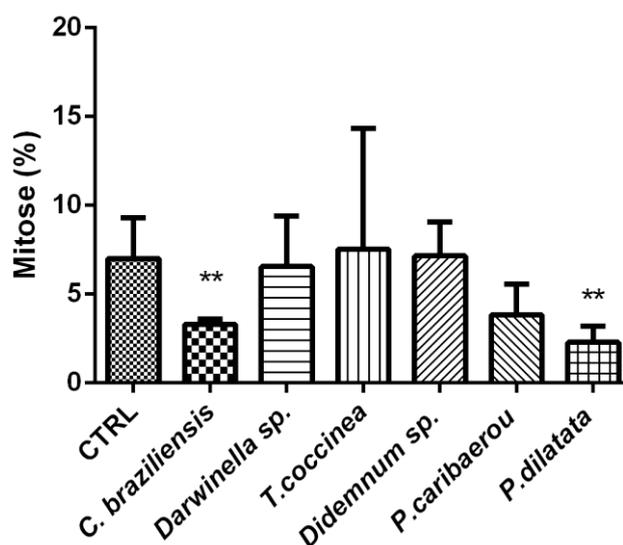
Figura 28 - Fotografias dos núcleos celulares da linhagem T98G tratadas com extratos e controle por 72 horas. As concentrações utilizadas de cada extrato foram de 200 µg/ml exceto o extrato da *Didemnum* sp. sendo 100 µg/ml. A = Controle, B = *C. braziliensis*, C = *Darwinella* sp., D = *T. coccínea*, E = *Didemnum* sp., F = *P. caribaeorum* e G = *P. dilatata*. Barra de escala: 100µm



Os dois tratamentos que obtiveram uma diminuição celular significativa na linhagem T98G, *Darwinella* sp e *Didemnum* sp., são confirmados pelas fotografias com um número consistentemente inferior de células se comparado ao controle (Figura 28 C e E). As fotografias ainda demonstram um número menor de células para o tratamento de *Didemnum* sp. do que *Darwinella* sp. corroborando ainda mais com os resultados de células e apoptose (Figura 29 e 30). Os outros tratamentos aparentam uma redução simplória do número celular se comparado ao extrato, que no coincide com a resposta não significativa para os mesmos.

Afim de clarear o tipo de atividade realizada dos extratos sobre as células foi analisada as células que estão no processo de mitose. Nos resultados ocorrem uma diminuição significativa do número de células da linhagem T98G em mitose nos tratamentos com *C. braziliensis* e *P. dilatata* se comparado ao controle (Figura 29).

Figura 29 - Porcentagem de células em mitose para cada extrato e controle da linhagem T98G após 72 horas de tratamento. As concentrações utilizadas de cada extrato foram de 200 µg/ml exceto o extrato da *Didemnum* sp. sendo 100 µg/ml A diferença significativa é entre o controle e o extrato (Teste de Mann-Whitney; ** P ≤ 0,01) O gráfico é representativo de 3 experimentos independentes sendo a média ± desvio padrão.

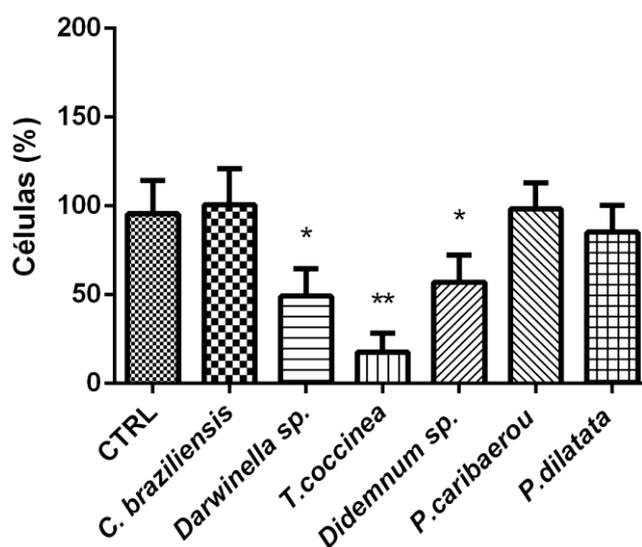


A diminuição nos tratamentos com *C. braziliensis* e *P. dilatata* não congregam com os resultados de células totais e células em apoptose obtidos para linhagem T98G. Essa redução da porcentagem de células em mitose pode condizer com o ligeira diminuição significativa da viabilidade celular em monocamada da linhagem T98G (Figura 15A e F).

Outro resultado que não compactua com os demais é a falta de um aumento significativo para o extrato de *P. caribaerou*, que no caso havia proporcionado um aumento significativo da linhagem T98G na análise de viabilidade celular em fosfatase (Figura 15G). A falta do aumento da porcentagem de células em mitose pode se relacionar com a concentração do extrato para esta análise (200 µg/ml), sendo que a outra análise obteve resultados gradativos para concentrações partir de 200 µg/ml.

Os tratamentos com os extratos de *Darwinella sp.*, *T. coccinea* e *Didemnum sp.* apresentaram uma redução no número de células significante. O restante dos tratamentos não apresentou diferença significativa.

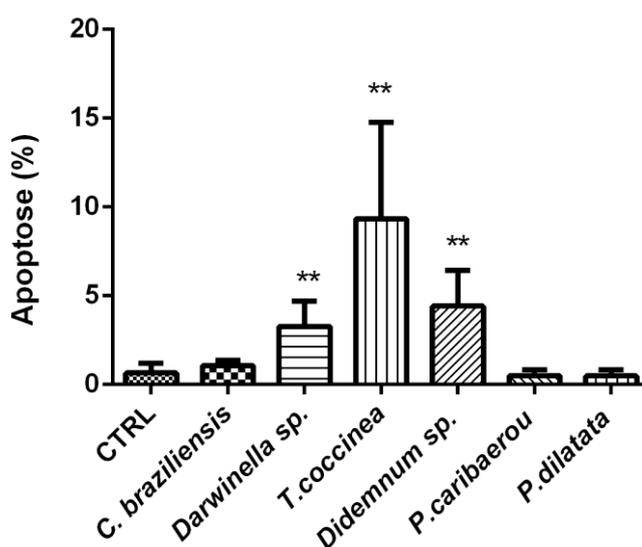
Figura 30 - Porcentagem de células relativos ao controle para cada extrato da linhagem U251 após 72 horas de tratamento. As concentrações utilizadas de cada extrato foram de 200 µg/ml exceto o extrato da *Didemnum sp.* sendo 100 µg/ml. CTRL = Controle. A diferença significativa é entre o controle e o extrato (Teste de Mann-Whitney; * P ≤ 0,05 e ** P ≤ 0,01) O gráfico é representativo de 3 experimentos independentes, sendo a média ± desvio padrão.



Os tratamentos com *Darwinella* sp., *T. coccinea* e *Didemnum* sp. demonstraram a maior atividade antitumoral na maioria dos testes. Sendo que a linhagem U251 apresentou maior sensibilidade para todos tratamentos exceto para *Darwinella* sp., era esperado uma redução no número de células para os extratos que obtiveram uma IC₅₀ no ensaio de viabilidade celular. No entanto a resposta dos três extratos não foi repetida de tal forma para linhagem T98G para a *T. coccinea* (Figura 15C), sendo que a *T. coccinea* teve uma redução celular maior do que 50% para a U251. Considerando os outros testes tumorais em conjunto com esse resultado é proeminente que os três extratos devem ser alocados para futuras pesquisas. Além disso é interessante denotar que as três espécies são exóticas introduzidas na região, sendo a *T. coccinea* e *Didemnum* sp. consideradas invasoras (LOPES et al., 2009).

A análise da porcentagem das células em apoptose para cada extrato e controle da linhagem U251 está representado no gráfico da Figura 31. Os tratamentos com *Darwinella* sp., *T. coccinea* e *Didemnum* sp. apresentaram um aumento significativo baseado entre cada extrato e o controle.

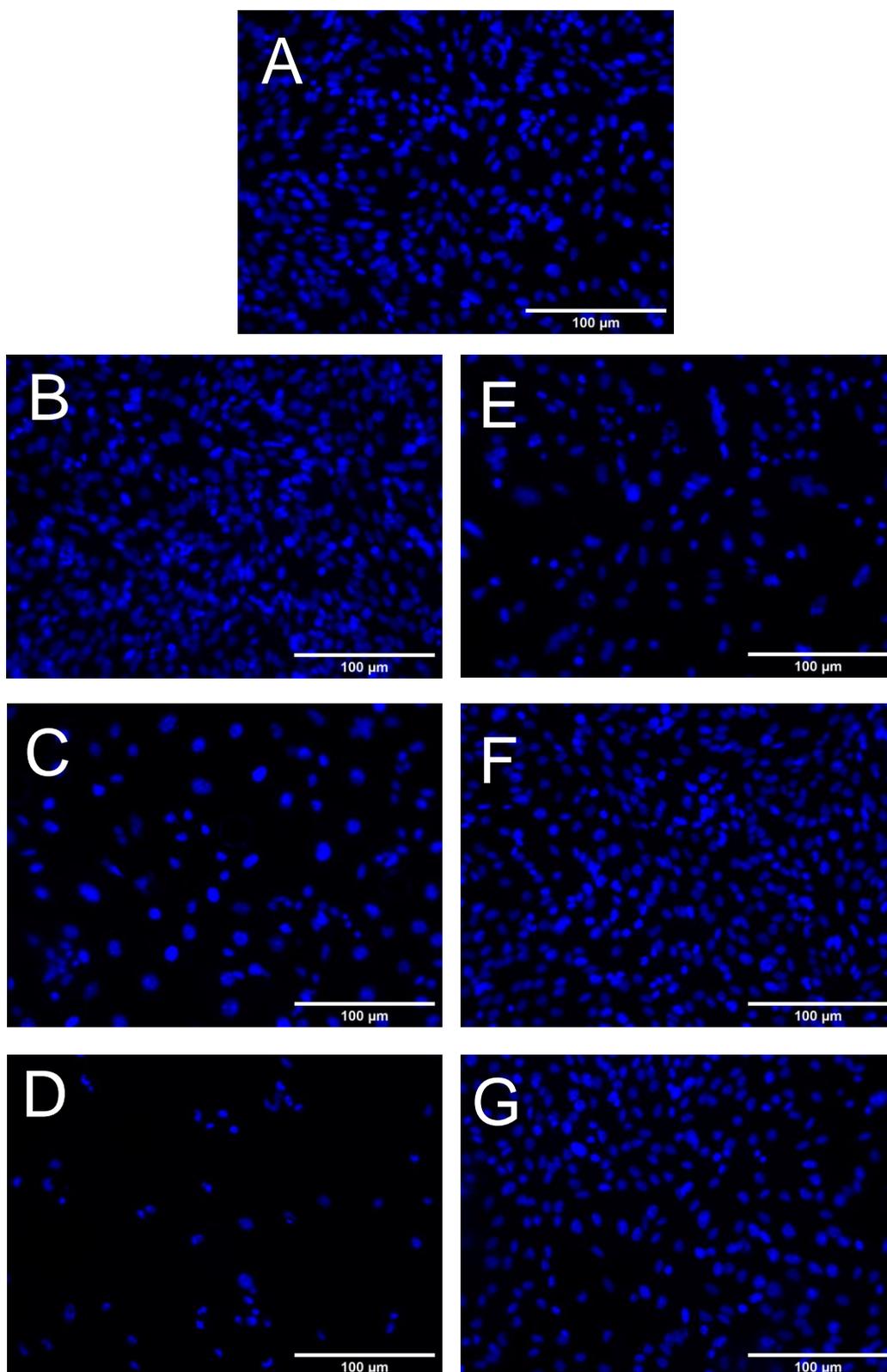
Figura 31 - Porcentagem de células em apoptose para cada extrato e controle da linhagem U251 após 72 horas de tratamento. As concentrações utilizadas de cada extrato foram de 200 µg/ml exceto o extrato da *Didemnum* sp. sendo 100 µg/ml A diferença significativa é entre o controle e o extrato (Teste de Mann-Whitney; ** P ≤ 0,01 e *** P ≤ 0,001) O gráfico é representativo de 3 experimentos independentes, sendo a média ± desvio padrão.



O aumento significativo da porcentagem de células em apoptose para os três tratamentos na linhagem U251 condizem e colaboram com os resultados obtidos da porcentagem de células totais (Figura 30). A sólida redução de células pelo tratamento com *T. coccinea* e o aumento significativo das células em apoptose, confirmam a atividade citotóxica do extrato, capaz de induzir apoptose na linhagem. O mesmo ocorre para os outros dois extratos, porém tendo uma observação menor na porcentagem de células totais e do apoptose. Tal resultado também acompanha os ensaios de viabilidade celular por fosfatase acida em monocamada.

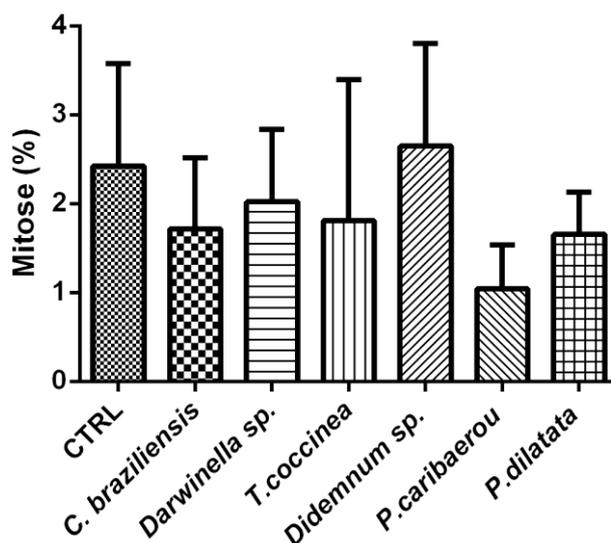
Afim de avaliar a contagem, apoptose e mitose celular dos extratos e do controle, foram utilizadas as fotos da Figura 32 para linhagem U251. No caso é evidente uma diminuição do número de células para os tratamentos com *Darwinella* sp., *T. coccinea* e *Didemnum* sp. (Figura 32 C, D e E) se comparado ao controle. Já nos extratos *C. braziliensis*, *P. caribaeorum* e *P. dilatata* não é possível observar uma grande variação ao controle.

Figura 32 - Fotografias dos núcleos celulares da linhagem U251 tratadas com extratos e controle por 72 horas. As concentrações utilizadas de cada extrato foram de 200 µg/ml exceto o extrato da *Didemnum* sp. sendo 100 µg/ml. A = Controle, B = *C. braziliensis*, C = *Darwinella* sp., D = *T. coccinea*, E = *Didemnum* sp., F = *P. caribaeorum* e G = *P. dilatata*. Barra de escala: 100µm



As fotografias contribuem com os resultados de porcentagem de células e de apoptose da linhagem U251. Sendo que o tratamento com *T. coccinea* (Figura 32 D) demonstra uma menor quantidade de células na fotografia e obteve uma menor contagem de células e uma maior taxa de células em apoptose do que os outros tratamentos. O baixo número de células dos tratamentos com *Darwinella* sp. e *Didemnum* sp. também corroboram com os resultados contagem de células e apoptose.

Figura 33 - Porcentagem de células em mitose para cada extrato e controle da linhagem U251 após 72 horas de tratamento. As concentrações utilizadas de cada extrato foram de 200 µg/ml exceto o extrato da *Didemnum* sp. sendo 100 µg/ml A diferença significativa é entre o controle e o extrato (Teste de Mann-Whitney) O gráfico é representativo de 3 experimentos independentes, sendo a média ± desvio padrão.

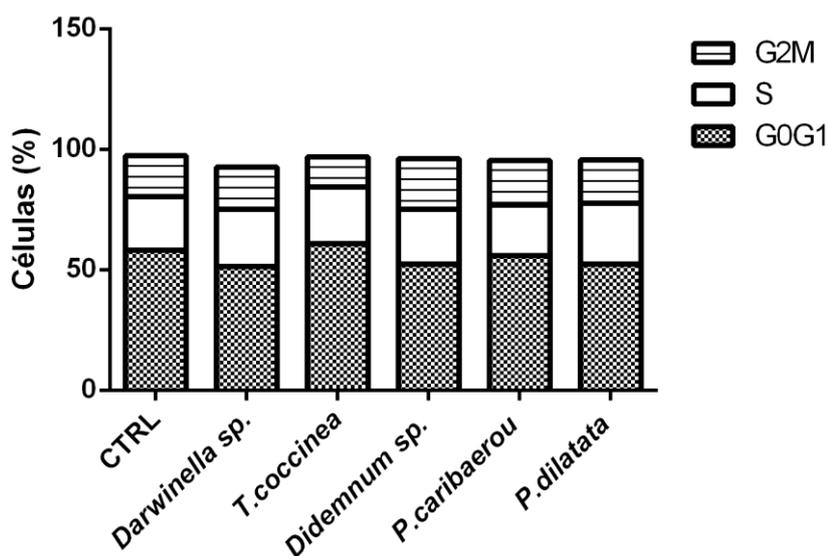


A falta de resultados significantes pode deoia em parte para os resultados com os tratamentos com *Darwinella* sp., *T. coccinea* e *Didemnum* sp., que no qual era esperado uma redução da porcentagem de células em mitose. Porém vale denotar o alto desvio dos dados que não colabora para uma análise significativa dos dados.

5.2.5 Ciclo Celular

A fim de elucidar que tipo de efeito os extratos possuem sobre as células, foi analisado o ciclo celular delas por meio da citometria de fluxo da linhagem T98G (Figura 34). Os ciclos celulares não demonstraram grande diferenciação entre si. O extrato de *C. braziliensis* não foi avaliado devido inviabilidade do extrato no momento do experimento.

Figura 34 - Ciclo celular de células tratadas com extratos e o controle por 72 horas. As concentrações utilizadas de cada extrato foram de 200 µg/ml exceto o extrato da *Didemnum sp.* sendo 100 µg/ml. O gráfico representa um experimento independente com uma contagem aproximada de 10.000 células.



A falta de alteração no ciclo diverge dos resultados dos resultados já apresentados para a linhagem T98G, principalmente para análise de mitose. A falta de diferenciação do ciclo pode indicar que os extratos não induzem um efeito citostático. No entanto é recomendável uma repetição do experimento com novas concentrações.

6 Considerações finais

6.1 CONCLUSÕES

O presente estudo investigou o potencial anti-incrustante e anticâncer dos extratos oriundos de invertebrados marinhos exóticos e nativos presentes na região de Arraial do Cabo - RJ. As espécies exóticas *Tubastraea coccinea* e *Darwinella* sp. se destacaram na atividade contra bactérias formadoras do biofilme que pode induzir a macroincrustação. Essa atividade inibitória pode estar relacionada com a sua capacidade de invasão através da sua ecologia química que lhe garante vantagens ecológicas aos demais competidores e predadores. Além disso essa capacidade antibacteriana pode vir a servir para outras áreas além da naval, como farmacêutica na produção de antibióticos.

Na avaliação antitumoral contra glioblastomas humano se destacaram e os invertebrados *Didemnum* sp., *T. coccinea* e *Darwinella* sp. em ordem de efetividade respectivamente. A atividade antitumoral da *Didemnum* sp. foi eficiente para as duas linhagens tumorais T98G e U251 e nos dois modelos de cultivo, monocamada e tridimensional. Tal efetividade em ambos os modelos demonstra o potencial da ascídia *Didemnum* sp. para geração de um fármaco, já que o modelo tridimensional simula condições mais próximas ao modelo in vivo. A *T. coccinea* foi efetiva para ambas as linhagens em modelo de monocamada, porém não demonstrou atividade no modelo 3D contra a linhagem U251. Já a *Darwinella* sp. demonstrou atividade significativa apenas contra as linhagens no modelo em monocamada. Acresce que a espécie *Palythoa caribaeorum* exibiu uma atividade de aumento da proliferação celular, que pode ser em decorrência do seu muco protetor, tal característica pode indicar uma um outro viés de fármaco.

Tais resultados antitumorais são ainda mais enaltecidos para a *Didemnum* sp. e *T. coccinea* devido ambas as espécies não demonstraram atividade citotóxica contra uma linhagem sadia humana. Tal característica indica uma toxicidade seletiva que no qual é uma qualidade desejada para o desenvolvimento de um fármaco antitumoral e já é relatada como um gargalo para os produtos naturais marinhos (PALANISAMY; RAJENDRAN; MARINO, 2017)

Por fim, vale ressaltar que as duas espécies *Didemnum* sp e *T. coccinea*, são espécies exóticas invasoras na região, portanto possuem certa abundância e dispersão geográfica capaz de gerar impactos ecológicos e econômicos na região. Esse potencial invasor dessas espécies possivelmente está relacionado com a capacidade toxica dos metabolitos secundários inseridos nos extratos avaliados no presente estudo. Com essa conjuntura de abundancia e invasão, pode vir a tornar um problema ambiental e econômico em uma solução para o desenvolvimento do potencial fármaco, já que o problema de demanda pode ser suprido.

O presente trabalho atingiu os seus objetivos, conseguindo colaborar para ciência em âmbito nacional e internacional, e possivelmente para novos produtos biotecnológicos tanto para área ambiental como da saúde.

6.2 PERSPECTIVAS

- É necessária uma elucidação dos metabolitos presentes nos extratos e seus mecanismos de ação tanto para uma avaliação anti-incrustante como antitumoral.
- Outras linhagens tumorais e possivelmente outros organismos bioincrustantes devem ser avaliados afim averiguar a amplitude da capacidade das *Didemnum* sp., *T. coccinea* e *Darwinella* sp.
- Os outros invertebrados marinhos que obtiverem resultados menos eficazes contra as linhagens tumorais e bacterianas devem ter uma abordagem diferente na forma de extração, favorecendo outros grupos metabolitos possivelmente não avaliados no presente estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOLHASANI, M. H.; SAFAVI, M.; GOODARZI, M. T.; KASSAEE, S. M.; AZIN, M. Identification and anti-cancer activity in 2D and 3D cell culture evaluation of an Iranian isolated marine microalgae *Picochlorum* sp. RCC486. **DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, n. 2, p. 105–116, 2018.

ALLEN, H. B.; BOLES, J.; MORALES, D.; BALLAL, S.; JOSHI, S. G. Arteriosclerosis: The Novel Finding of Biofilms and Innate Immune System Activity within the Plaques. **Journal of Medical & Surgical Pathology**, v. 01, n. 04, p. 1–5, 2016. Disponível em:

BACHINSKI, R; ALVES, G; GRANJEIRO, J; HARTUNG, T. **Padronização De Testes De Citotoxicidade Para Cultivo Celular Em Agregados Tridimensionais**. 2015. 74 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Biotecnologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2015.

BATISTA, D.; COSTA, R.; CARVALHO, A. P.; BATISTA, W. R.; RUA, C. P. J.; DE OLIVEIRA, L.; LEOMIL, L.; FRÓES, A. M.; THOMPSON, F. L.; COUTINHO, R.; DOBRETISOV, S. Environmental conditions affect activity and associated microorganisms of marine sponges. **Marine Environmental Research**, p. 59–68, 2018.

BATISTA, D.; GONÇALVES, J. E. A.; MESSANO, H. F.; ALTVATER, L.; CANDELLA, R.; ELIAS, L. M. C.; DE MESSANO, L. V. R.; APOLINARIO, M.; COUTINHO, R. Distribution of the invasive orange cup coral *tubastraea coccinea* lesson, 1829 in an upwelling area in the South Atlantic Ocean fifteen years after its first record. **Aquatic Invasions**, v. 12, n. 1, p. 23–32, 2017.

BERGMANN, W.; FEENEYZ, R. J. The Isolation of a New Thymine Pentoside from Sponges. **Communications to the Editor**, n. 1, p. 2809–2810, 1950.

BLOCKLEY, A.; ELLIOTT, D. R.; ROBERTS, A. P.; SWEET, M. Symbiotic microbes from marine invertebrates: Driving a new era of natural product drug discovery. **Diversity**, v. 9, n. 4, p. 1–13, 2017.

BRANCO, L. P. C.; COUTINHO, R.; GRANTON, L. **POTENCIAL INVASOR DE *Didemnum* sp (CHORDATA:TUNICATA: ASCIDIACEA)**. 2018. 60 f. Dissertação

(Mestrado) - Curso de Biotecnologia Marinha, Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira; Universidade Federal Fluminense, Arraial do Cabo, 2018.

BRASIL. Decreto s/no, de 03 janeiro de 1997. **Dispõe sobre a criação da Reserva Extrativista Marinha do Arraial do Cabo, no Município de Arraial do Cabo, Estado do Rio de Janeiro, e dá outras providências.**, p. 11, 1997.

BRASIL. Estratégia nacional sobre espécies exóticas invasoras. **Resolução CONABIO n.o 05, de 21 de outubro de 2009**, p. 23, 2009.

BRASIL. **Caracterização do estado da arte em biotecnologia marinha no Brasil.** Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRYERS, J. D. Medical Biofilms. **Artificial Cells Blood Substitutes And Immobilization Biotechnology**artif Cells Blood Substit Immobi, v. 100, n. 1, p. 1–18, 2008.

CALCABRINI, C.; CATANZARO, E.; BISHAYEE, A.; TURRINI, E.; FIMOGNARI, C. **Marine sponge natural products with anticancer potential: An updated review.** [s.l: s.n.]v. 15

CAMPOS, F. F.; PÉREZ, C. D.; GARCIA, J. E. **Diversidade de bactérias associadas ao muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) do litoral sul de Pernambuco.** 2011. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2011

CARLTON, J. T. Pattern, process, and prediction in marine invasion ecology. **Biological Conservation**, v. 78, n. 1–2, p. 97–106, 1996.

CARPES, R. M.; FELZENSZWALB, Is.; AIUB, C. A. F.. **Estudo toxicológico de extratos do coral alcionáceo *Chromonephthea braziliensis* (Alcyonacea, Nephthe).** 2013. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biociências, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013

CARPES, R. M.; FLEURY, B. G.; LAGES, B. G.; PINTO, A. C.; AIUB, C. A. F.; FELZENSZWALB, I. Mutagenicity, genotoxicity, and scavenging activities of extracts from the soft coral *Chromonephthea braziliensis*: A possibility of new bioactive compounds. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 3575–3587, 2013.

CARVALHO, C. C. C. R. De. Marine Biofilms : A Successful Microbial Strategy With Economic Implications. **Frontiers in Marine Science**, v. 5, n. April, p. 1–11, 2018.

CASSOLA, Gabriel Erni et al. Decline in abundance and health state of an Atlantic subtropical gorgonian population. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 104, n. 1-2, p.329-334, mar. 2016

COELHO-SOUZA, S. A.; LÓPEZ, M. S.; GUIMARÃES, J. R. D.; COUTINHO, R.; CANDELLA, R. N. Biophysical interactions in the Cabo Frio upwelling systems Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 60, n. 3, p. 353–365, 2012.

COOPER, E. L.; YAO, D. Diving for drugs: Tunicate anticancer compounds. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 11–12, p. 636–648, 2012.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R. D. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: historico & perspectivas. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 703–716, 2009.

COSTA, S. L. A.; SANTOS, N. P. S.; LIRA, M. C. B.. **Avaliação da ação cicatrizante de extratos orgânicos do muco produzido pelo Zoantídeo Palythoa caribaeorum**. 2013. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2013.

CREED, J. C. Two invasive alien azooxanthellate corals, *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*, dominate the native zooxanthellate *Mussismilia hispida* in Brazil. **Coral Reefs**, v. 25, n. 3, p. 350–350, 2006.

CUEVAS, C.; FRANCESCH, A. Development of Yondelis® (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 3, p. 322–337, 2009.

DANG, H.; LOVELL, C. R. Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 91–138, 2016.

DAVMSON, B. S. Ascidians : Producers of Amino Acid Derived Metabolites. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 5, p. 1771–1791, 1992.

DE ALENCAR, D. B.; MELO, A. A.; SILVA, G. C.; LIMA, R. L.; PIRES-CAVALCANTE, K. M. S.; CARNEIRO, R. F.; RABELO, A. S.; SOUSA, O. V.; VIEIRA, R. H. S. F.; VIANA, F. A.; SAMPAIO, A. H.; SAKER-SAMPAIO, S. Antioxidant, hemolytic, antimicrobial, and cytotoxic activities of the tropical Atlantic marine zoanthid *Palythoa caribaeorum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 87, n. 2, p. 1113–1123, 2015.

DEWASTHALE, S.; MANI, I.; VASDEV, K. Microbial biofilm: current challenges in health care industry. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, v. 5, n. 3, p. 156–160, 2018.

DYSHLOVOY, S. A.; HONECKER, F. Marine compounds and cancer: 2017 updates. **Marine Drugs**, v. 16, n. 2, p. 2017–2019, 2018.

EPIFANIO, R. D. A.; MARTINS, D. L.; VILLAÇA, R.; GABRIEL, R. Chemical defenses against fish predation in three Brazilian octocorals: 11 β ,12 β -epoxypukalide as a feeding deterrent in *Phyllogorgia dilatata*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 10, p. 2255–2265, 1999.

FELÍCIO, R. de; OLIVEIRA, A. L. L. de; DEBONSI, H. M. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 39–42, 2012.

FERREIRA, C. E. L. Non-indigenous corals at marginal sites. **Coral Reefs**, v. 22, n. 4, p. 498, 2003.

FERREIRA, C. E. L.; GONÇALVES, J. E. A.; COUTINHO, R. Ship Hulls and Oil Platforms as Potential Vectors to Marine Species Introduction. **Journal of Coastal Research**, n. 39, p. 1341–1346, 2006.

FLEURY, B. G.; LAGES, B. G.; BARBOSA, J. P.; KAISER, C. R.; PINTO, A. C. New Hemiketal Steroid from the Introduced Soft Coral *Chromonephtea braziliensis* is a Chemical Defense against Predatory Fishes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 987–993, 2008.

FRIEDRICH, J.; EDER, W.; CASTANEDA, J.; DOSS, M.; HUBER, E.; EBNER, R.; KUNZ-SCHUGHART, L. A. A reliable tool to determine cell viability in complex 3-D culture: The acid phosphatase assay. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 12, n.

7, p. 925–937, 2007.

GAMA, B. A. P.; PEREIRA, R. C.; COUTINHO, R. Bioincrustacao marinha. In: Pereira RC, Soares-Gomes A. **Biologia Marinha**. nº2. p. 299–318 Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2009. 443-72.

GARCÍA-DAVIS, S.; VIVEROS-VALDEZ, E.; DÍAZ-MARRERO, A.; FERNÁNDEZ, J.; VALENCIA-MERCADO, D.; ESQUIVEL-HERNÁNDEZ, O.; CARRANZA-ROSALES, P.; CARRANZA-TORRES, I.; GUZMÁN-DELGADO, N. Antitumoral Effect of Laurinterol on 3D Culture of Breast Cancer Explants. **Marine Drugs**, v. 17, n. 4, p. 201, 2019.

GERHART, D. J. Emesis, learned aversion, and chemical defense in octocorals: a central role for prostaglandins? **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 260, n. 5, p. 839–843, 1991.

GIGLIO, V. J.; TERNES, M. L. F.; MENDES, T. C.; CORDEIRO, C. A. M. M.; FERREIRA, C. E. L. Anchoring damages to benthic organisms in a subtropical scuba dive hotspot. **Journal of Coastal Conservation**, v. 21, n. 2, p. 311–316, 2017.

GOMES, N. G. M.; DASARI, R.; CHANDRA, S.; KISS, R.; KORNIENKO, A. Marine invertebrate metabolites with anticancer activities: Solutions to the “supply problem”. **Marine Drugs**, v. 14, n. 5, p. 1–39, 2016.

GONZALEZ-RODRIGUEZ, E. Yearly variation in primary productivity of marine phytoplankton from Cabo Frio (RJ, Brazil) region. **Hydrobiologia**, v. 294, n. 2, p. 145–156, 1994.

GROOVE, M. Ecteinascidin 743 : A Minor Groove Alkylator That Bends DNA toward the. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 14, p. 1–5, 1999.

HADFIELD, M. G. Biofilms and Marine Invertebrate Larvae: What Bacteria Produce That Larvae Use to Choose Settlement Sites. **Annual Review of Marine Science**, v. 3, n. 1, p. 453–470, 2010.

HAEFNER, B. Drugs from the deep: Marine natural products as drug candidates. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 12, p. 536–544, 2003.

HUDZICKI, J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author

Information. **American Society for Microbiology**, n. December 2009, p. 1–25, 2009.

INCA. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, p. 1-130, 2017.

IÓCA, L. P.; NICACIO, K. J.; BERLINCK, R. G. S. Natural products from marine invertebrates and microorganisms in Brazil between 2004 and 2017: Still the challenges, more rewards. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 5, p. 998–1031, 2018.

JASPARS, M.; DE PASCALE, D.; ANDERSEN, J. H.; REYES, F.; CRAWFORD, A. D.; IANORA, A. The marine biodiscovery pipeline and ocean medicines of tomorrow. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 96, n. 1, p. 151–158, 2016.

JIMENEZ, P. C.; FORTIER, S. C.; LOTUFO, T. M. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 287, n. 1, p. 93–101, 2003.

JIMENEZ, P.; WILKE, D.; COSTA-LOTUFO, L. Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans. **Clinics**, v. 73, n. Suppl 1, p. 1–7, 2018.

KIJJOA, A.; SAWANGWONG, P. Drugs and Cosmetics from the Sea. **Marine Drugs**, v. 2, n. 2, p. 73–82, 2004.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; FERREIRA, C. E. L.; PEREIRA, R. C. Chemical defense of an exotic coral as invasion strategy. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 328, p. 127–135, 2006.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; PINTO, A. C.; CREED, J. C. Chemical defenses against generalist fish predators and fouling organisms in two invasive ahermatypic corals in the genus *Tubastraea*. **Marine Ecology**, v. 31, n. 3, p. 473–482, 2010a.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; CREED, J. C. Chemical composition and release in situ due to injury of the invasive coral *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58, n. SPEC. ISSUE, p. 47–56, 2010b.

LAZCANO-PÉREZ, F.; ZAVALA-MORENO, A.; RUFINO-GONZÁLEZ, Y.; PONCE-MACOTELA, M.; GARCÍA-ARREDONDO, A.; CUEVAS-CRUZ, M.; GÓMEZ-MANZO, S.; MARCIAL-QUINO, J.; ARREGUÍN-ESPINOSA, R. Hemolytic, anticancer and anti-giardial activity of *Palythoa caribaeorum* venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 1–7, 2018.

LIMA, L. A. de; MIGLIOLO, L.; CASTRO, C. B. e; PIRES, D. de O.; LÓPEZ-ABARRATEGUI, C.; GONÇALVES, E. F.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. de; OTERO-GONZALEZ, A. de J.; FRANCO, O. L.; DIAS, S. C. Identification of a Novel Antimicrobial Peptide from Brazilian Coast Coral *Phyllogorgia dilatata*. **Protein and Peptide Letters**, v. 20, n. 10, p. 1153–1158, 2013.

LOPES, R. M.; CORADIN, L.; POMBO, V. B.; CUNHA, D. R. Informe sobre as Espécies Exóticas Invasoras Marinhas no Brasil. **Brasília, Ministério do Meio Ambiente, Série Biodiversidade**, v. 33, p. 440, 2009.

M. LEHAITRE; C. COMPÈRE. BIOFOULING and UNDERWATER MEASUREMENTS. In: **BIOFOULING and UNDERWATER MEASUREMENTS**. [s.l.: s.n.]p. 205-220.

MAGIN, C. M.; COOPER, S. P.; BRENNAN, A. B. Non-toxic antifouling strategies. **Materials Today**, v. 13, n. 4, p. 36–44, 2010.

MALVE, H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 8, n. 2, p. 83, 2016.

MARTINS, D. L.; EPIFANIO, R. D. A. A new germacrane sesquiterpene from the Brazilian endemic Gorgonian *Phyllogorgia dilatata* Esper. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 6, p. 586–590, 1998.

MAYER, A. M. S.; GLASER, K. B.; CUEVAS, C.; JACOBS, R. S.; KEM, W.; LITTLE, R. D.; MCINTOSH, J. M.; NEWMAN, D. J.; POTTS, B. C.; SHUSTER, D. E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, n. 6, p. 255–265, 2010.

MELO, L. F. A.; SOUZA, I. A.; PÉREZ, C. D.. **Screening farmacológico e diversidade bacteriana do muco de *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) da praia de Porto de Galinhas - PE, Brasil**. 2017. 96 f. Tese (Doutorado) - Curso de

Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

MELO, Liany Figuerêdo de Andrade et al. Toxicity against *Artemia salina* of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) used in folk medicine on the coast of Pernambuco, Brazil. **Biotemas**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.145-151, 30 ago. 2012.

MICROBE, T.; TIDE, R. The Colours of Biotechnology: Science, Development and Humankind Biotechnology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 2–5, 2005.

MOLINSKI, T. F.; DALISAY, D. S.; LIEVENS, S. L.; SALUDES, J. P. Drug development from marine natural products. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 1, p. 69–86, 2009.

MOLLO, E.; CIMINO, G.; GHISELIN, M. T. Alien biomolecules: a new challenge for natural product chemists. **Biological Invasions**, v. 17, n. 3, p. 941–950, 2015.

N, D. L; COX, M. M (Ed.). Bioenergética e Tipos de Reações Bioquímicas. In: N, D. L; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. Cap. 13. p. 501-535.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

OLIVEIRA, D.; LARSSON, A. I.; GRANHAG, L. Effect of ship hull form on the resistance penalty from biofouling. **Biofouling**, v. 34, n. 3, p. 262–272, 2018.

ONU, Organização das Nações Unidas. Convention on biological diversity. **Diversity**, p. 30, 1992.

PALANISAMY, S. K.; MORABITO, R.; REMIGANTE, A.; SPANÒ, N.; LA SPADA, G.; GIACOBBE, S.; MARINO, A. Biological activity of extract from *Styela plicata* and *Ascidia mentula* (Ascidacea). **Journal of Biological Research - Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale**, v. 89, n. 1, p. 27–32, 2016.

PALANISAMY, S. K.; RAJENDRAN, N. M.; MARINO, A. Natural Products Diversity of Marine Ascidiaceans (Tunicates; Ascidiacea) and Successful Drugs in Clinical Development. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 7, n. 1, p. 1–111, 2017.

PEREIRA, R. C.; CARVALHO, A. G. V.; GAMA, B. A. P.; COUTINHO, R. Field

experimental evaluation of secondary metabolites from marine invertebrates as antifoulants. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 2, p. 311–320, 2002.

PEREIRA, R. C.; OLIVEIRA, A. S. De; SUDATTI, D. B. ECOLOGIA QUÍMICA MARINHA : ORIGEM , EVOLUÇÃO E PERSPECTIVAS NO. **Oecologia Australis**, v. 15, n. 2, p. 412–435, 2011.

RAMÍREZ, M. C. A.; BERLINCK, R. G. S. **Terpenos rearranjados da esponja Darwinella cf. oxeata com potencial leishmanicida**. 2015. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

RAMPELOTTO, P. H; TRINCONE, A; GRECO, Gaia Raffaella; CINQUEGRANI, Marco. The Global Market for Marine Biotechnology: The Underwater World of Marine Biotech Firms. In: RAMPELOTTO, P. H; TRINCONE, A.. **Grand Challenges in Marine Biotechnology**. Suécia: Springer, 2018. Cap. 8. p. 261-289.

RICCIARDI, A.; BLACKBURN, T. M.; CARLTON, J. T.; DICK, J. T. A.; HULME, P. E.; IACARELLA, J. C.; JESCHKE, J. M.; LIEBHOLD, A. M.; LOCKWOOD, J. L.; MACISAAC, H. J.; PYŠEK, P.; RICHARDSON, D. M.; RUIZ, G. M.; SIMBERLOFF, D.; SUTHERLAND, W. J.; WARDLE, D. A.; ALDRIDGE, D. C. Invasion Science: A Horizon Scan of Emerging Challenges and Opportunities. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 32, n. 6, p. 464–474, 2017.

RINEHART JR., K. L.; GLOER, J. B.; RENIS, H. E.; MCGOVREN, J. P.; SWYNENBERG, E. B.; STRINGFELLOW, D. A.; KUENTZEL, S. L.; LI, L. H. Didemnins: Antiviral and antitumor depsipeptides from a Caribbean tunicate. **Science**, v. 212, n. May, p. 933–935, 1981.

S.A., T.; D.J., G.; K.A., J.; T.J., P.; S.R., D.; S.C., S. Phase II study of Didemnin B in central nervous system tumors: A Southwest Oncology Group study. **Investigational New Drugs**, v. 16, n. 4, p. 331–332, 1999.

SAGAR, S.; KAUR, M.; MINNEMAN, K. P. Antiviral lead compounds from marine sponges. **Marine Drugs**, v. 8, n. 10, p. 2619–2638, 2010.

SAMPAIO, C. L. S. *et al.* New occurrences of the nonindigenous orange cup corals *tubastraea coccinea* and *T. tagusensis* (Scleractinia: Dendrophylliidae) in southwestern Atlantic. **Check List**, v. 8, n. 3, p. 528–530, 2012

SANTOS, J.; LAMONICA, M. Água De Lastro E Bioinvasão: Introdução De Espécies Exóticas Associada Ao Processo De Mundialização. **Vértices**, v. 10, n. 1–3, p. 141–152, 2008.

SEEBENS, H.; GASTNER, M. T.; BLASIUS, B. The risk of marine bioinvasion caused by global shipping. **Ecology Letters**, v. 16, n. 6, p. 782–790, 2013.

SELEGHIM, M. H. R.; LIRA, S. P.; KOSSUGA, M. H.; BATISTA, T.; BERLINCK, R. G. S.; HAJDU, E.; MURICY, G.; DA ROCHA, R. M.; DO NASCIMENTO, G. G. F.; SILVA, M.; PIMENTA, E. F.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; DE MORUES, M. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; DE SOUZA, A. O.; PEIXINHO, S. Antibiotic, cytotoxic and enzyme inhibitory activity of crude extracts from Brazilian marine invertebrates. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 287–318, 2007.

SILVA, M. L. da; CASTRO, R. O.; SALES, A. S.; ARAÚJO, F. V. de. Marine debris on beaches of Arraial do Cabo, RJ, Brazil: An important coastal tourist destination. **Marine Pollution Bulletin**, v. 130, n. December 2017, p. 153–158, 2018.

SOARES, D. G.; ESCARGUEIL, A. E.; POINDESSOUS, V.; SARASIN, A.; DE GRAMONT, A.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J. A. P.; LARSEN, A. K. Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 32, p. 13062–13067, 2007.

Teixeira VL. Produtos Naturais Marinhos. In: Pereira RC, Soares-Gomes A. **Biologia Marinha**. nº2. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2009. 443-72.

THOMA, C. R.; ZIMMERMANN, M.; AGARKOVA, I.; KELM, J. M.; KREK, W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 69–70, p. 29–41, 2014.

TIANERO, M. D. B.; KWAN, J. C.; WYCHE, T. P.; PRESSON, A. P.; KOCH, M.; BARROWS, L. R.; BUGNI, T. S.; SCHMIDT, E. W. Species specificity of symbiosis and secondary metabolism in ascidians. **ISME Journal**, v. 9, n. 3, 2015.

VALENTIN, J. L.; ANDRE, D. L.; JACOB, S. A. Hydrobiology in the Cabo Frio (Brazil) upwelling: two-dimensional structure and variability during a wind cycle. **Continental**

Shelf Research, v. 7, n. 1, p. 77–88, 1987.

VETERE, V.; PÉREZ, M.; GARCÍA, M.; DEYÁ, M.; STUPAK, M.; DEL AMO, B. A non-toxic antifouling compound for marine paints. **JOCCA - Surface Coatings International**, v. 82, n. 12, p. 586–589, 1999.

WEN, Z.; LIAO, Q.; HU, Y.; YOU, L.; ZHOU, L.; ZHAO, Y. A spheroid-based 3-D culture model for pancreatic cancer drug testing, using the acid phosphatase assay. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 7, p. 634–642, 2013.

WILLIAMS, A. S. L.; DAVIDSON, I. C.; PASARI, J. R.; ASHTON, G. V.; JAMES, T.; WILLIAMS, S. L.; DAVIDSON, I. C.; PASARI, J. R.; ASHTON, G. V.; CARLTON, J. T.; CRAFTON, R. E. Managing Multiple Vectors for Marine Invasions in an Increasingly Connected World. *BioScience*, v. 63, n. 12, p. 952–966, 2013.

YANG, T. T.; SINAI, P.; KAIN, S. R. An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells. **Analytical Biochemistry**, v. 241, n. 1, p. 103–108, 1996.

ZANONI, M.; PICCININI, F.; ARIENTI, C.; ZAMAGNI, A.; SANTI, S.; POLICO, R.; BEVILACQUA, A.; TESEI, A. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: A systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Scientific Reports**, v. 6, n. January, p. 1–11, 2016.