



MARINHA DO BRASIL

**INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**

**PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA MARINHA**

DANIELLE DA SILVA FRAGA GOMES

**ALCALOIDE MARINHO DO EXTRATO DE *Tubastraea spp.* COMO
ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA EM TUMOR CEREBRAL**

Orientadora: Giselle Pinto de Faria Lopes

Co-orientadora: Roberta da Costa Escaleira

ARRAIAL DO CABO/RJ

2025

DANIELLE DA SILVA FRAGA

**ALCALOIDE MARINHO DO EXTRATO *Tubastraea spp.* COMO ESTRATÉGIA
TERAPÊUTICA EM TUMOR CEREBRAL**

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

Orientadora: Prof. Dra. Giselle Pinto de Faria
Lopes

Coorientadora: Prof. Dra. Roberta da Costa
Escaleira

ARRAIAL DO CABO / RJ

2025

DANIELLE DA SILVA FRAGA

Biblioteca do IEAPM

G633a Gomes, Danielle da Silva Fraga
Alcaloide marinho do extrato tubastraea spp. como
estratégia terapêutica em tumor cerebral / [por] Danielle
da Silva Fraga Gomes.-- Arraial do Cabo, RJ : IEAPM, 2025.
92 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Giselle Pinto de Faria Lopes
Coorientada: Roberta da Costa Escaleira
Tese (Doutorado) - Instituto de Estudos do Mar Almirante
Paulo Moreira e Universidade Federal Fluminense, Arraial
do Cabo, 2025.
Inclui bibliografias.

1. Coral-sol. 2. Glioblastoma. 3. Tubastraea.
I.Lopes, Giselle Pinto de Faria. II.Escaleira, Roberta da
Costa. III. Título.

CDD: Ed. 22 -- 606.6

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, que é o motivo principal de toda a minha força pra sempre seguir e continuar, a base da minha crença e sentido da minha existência!

Agradeço aos meus pais (in memoriam), que estariam muito felizes e orgulhosos da minha trajetória e vida como ser humano e profissional, eu sempre vou amar vocês, até o infinito!!! Obrigada por tudo!

Agradeço imensamente a minha irmã mais velha, Simone Fraga, que assumiu em parte o papel dos nossos pais, e sempre esteve e está comigo, me ajudando, me incentivando e sendo nosso alicerce familiar, Obrigada por tanto!

Agradeço a minha irmã gêmea Vanielle Fraga, que nasceu e cresceu comigo, é minha metade e meu inteiro, assim seguimos e seguiremos, do ventre pra sempre!!!

Agradeço ao meu ex-esposo Alexandre Gomes, que no tempo que estivemos juntos sempre me ajudou e me incentivou a correr atrás dos meus objetivos, e me ajudou todas as vezes que eu precisei, obrigada!

Agradeço a toda a minha família por todo apoio e acreditar no meu potencial, meus tios, tias, primas...em especial minhas tias Fátima e Adriana, que são um pouco da minha mãe aqui!

Agradeço ao meu cunhado Ottassano Panetto, por muito me incentivar e ajudar na trajetória desde o mestrado.

Agradeço ao meu amigo Valdir Tutunji, que muito me ajudou com seu conhecimento e experiência profissional.

Agradeço ao meu amigo Rodolfo Padilha, por todo o incentivo, força e acreditar que eu seria capaz.

Agradeço a minha orientadora Dr^a. Giselle Pinto de Faria Lopes, por acreditar, confiar em mim, e entregar seu projeto e ideia em minhas mãos,

confiando que eu seria capaz de representá-la, e cumprir as etapas necessárias para obtermos resultados dessa pesquisa tão importante, que se destina a oferecer dados para a construção de uma busca mundial sobre tratamento e cura do câncer, obrigada por toda a paciência, persistência e sua determinação que me inspiram!

Agradeço a minha co-orientadora Dr^a. Roberta Escaleira, pela dedicação, paciência, por aceitar fazer parte desse projeto, por acreditar e confiar esse trabalho a mim, sem nem mesmo me conhecer, por me receber e me acolher tão bem no Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital Naval Marcílio Dias!

Agradeço a toda equipe do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital Naval Marcílio Dias, todos que me ajudaram na parte prática ou teórica. Dr^a Raquel Antonioli, Sargento Lucas Sant'anna, Sargento Bruno Miranda, Tenente Luciana Lobo, Tenente Joana Mona, e comandante Daniel Schulz.

Agradeço a todos os profissionais que aceitaram fazer parte da minha banca de defesa, Dr^o Vinícius Vizzoni, Dr^a Débora de Souza dos Santos Costa, Dr^a Caroline de Souza Barros, Dr^a Maria Helena Baeta Neves e Dra. Tailah Bernardo de Almeida, muito obrigada por aceitarem contribuir com suas experiências e conhecimento na avaliação e crescimento do meu trabalho!

Agradeço a todos os meus amigos do nosso grupo de pesquisa, por todas as risadas, momentos de diversão, companheirismo, ajuda nas vivências do trabalho, da rotina e compartilhamento de conhecimento. Bianca Mirra, por ter me levado para o Instituto e compartilhado comigo toda essa trajetória, Cassiana Di Carli pela amizade, apoio e ajuda acadêmica, Narcilo Cardoso por toda força, disponibilidade e auxílio no laboratório, Israel Araújo pelos conselhos e ajudas, Isabel Virgínia pelas ajudas no laboratório, Carla Davico por toda ajuda acadêmica, suporte e incentivo, Ana Paula Leal pelos compartilhamentos de experiência, vivências e amizade! A todos os outros companheiros de laboratório e do grupo de pesquisa, muito obrigada, pelo curto tempo de convivência porém troca de experiências e

receptividade, Rayanne, Lívia, Dayana, Michael, Giovanna, todos, foram muito importantes para que eu chegasse até aqui!

RESUMO

Os corais do gênero *Tubastraea*, conhecidos como coral-sol, correspondem a um gênero de coral com várias espécies já conhecidas, que chegaram ao Brasil na década de 1980. Esse coral não-nativo, é original do pacífico e compete com espécies nativas se estabelecendo com facilidade em outros *habitats*. Atualmente pode ser facilmente encontrado ao longo da costa do Brasil. Embora o coral-sol esteja relacionado a invasão e prejuízos ambientais, seu extrato tem sido investigado quanto a moléculas presentes em sua composição. A investigação de metabólitos presentes no seu extrato, como alcaloides, tem apontado para bioativos associados a atividades farmacológicas, inclusive atividade antitumoral. O Glioblastoma (GBM) é o tumor mais agressivo do sistema nervoso central, e atualmente a estratégia terapêutica padrão ouro prolonga a sobrevida entre 3 a 6 meses apenas. De acordo com a necessidade de desenvolver novas terapias, testou-se um alcaloide presente no extrato do coral-sol, conhecido como 6-bromoindol-3-carboxaldeído quanto ao seu potencial antitumoral *in vitro*. O alcaloide marinho foi investigado através de ferramentas *in silico* apresentando características adequadas ao seu uso na área farmacêutica, além de demonstrar efeito citotóxico significativo em modelo *in vitro* de células de GBM, em modelo 2D e 3D, via produção de espécies reativas de oxigênio. Afim de verificar possível toxicidade do alcaloide, este mostrou-se seguro nas concentrações menores testadas, causando a coagulação dos embriões de peixe zebra apenas nas maiores concentrações e em estágios iniciais, ausente em estágios tardios de seu desenvolvimento. De acordo com os resultados obtidos nesse estudo o alcalóide testado pode ser um futuro candidato a compor um bioativo de fármaco ou ter a função de complementar a estratégia terapêutica do GBM.

Palavras chave: Coral-sol; Glioblastoma; *Tubastraea*.

ABSTRACT

Corals of the *Tubastraea* genus, known as sun coral, are a genus of coral with several known species that arrived in Brazil in the 1980s. This non-native coral is native to the Pacific and competes with native species, easily establishing itself in other habitats. It can currently be easily found along the coast of Brazil. Although sun coral is associated with invasion and environmental damage, its extract has been investigated for molecules present in its composition. Investigation of metabolites present in its extract, such as alkaloids, has pointed to bioactives associated with pharmacological activities, including antitumor activity. Glioblastoma (GBM) is the most aggressive tumor of the central nervous system, and currently the gold standard therapeutic strategy prolongs survival by only 3 to 6 months. In accordance with the need to develop new therapies, an alkaloid present in the sun coral extract, known as 6-bromoindole-3-carboxaldehyde, was tested for its antitumor potential in vitro. The marine alkaloid was investigated using in silico tools, presenting characteristics suitable for its use in the pharmaceutical area, in addition to demonstrating significant cytotoxic effect in an in vitro model of GBM cells, in 2D and 3D models, via production of reactive oxygen species. In order to verify possible toxicity of the alkaloid, it was shown to be safe in the lower concentrations tested, causing coagulation of zebrafish embryos only in the highest concentrations and in early stages, absent in late stages of their development. According to the results obtained in this study, the alkaloid tested may be a future candidate to compose a bioactive drug or have the function of complementing the therapeutic strategy of GBM.

Keywords: Sun coral; Glioblastoma; *Tubastraea*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

T. Sp.: Tubastraea sp.

T.spp.: Tubastraea spp.

T. micranthus: Tubastraea micranthus

T. aurea: Tubastrea aurea

T. coccinea: T. coccinea

T. tagusensis: T. tagusensis

T. faulkneri: T. faulkneri

T. diaphana: Tubastraea diaphana

GBM: Glioblastoma

TMZ: Temozolomida

ADMET: Absorção, distribuição, metabolismo, excreção, toxicidade.

MTT: Sal brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio

7-AAD: 7-aminoactinomycin D

AVOs: Organelas vesiculares ácidas

EROs: Espécies reativas de oxigênio

AO: acridine Orange

LA: Laranja de acridina

BHE: Barreira hemato encefálica

DMEM/F-12: Meio de Eagle Modificado por Dulbecco – Gibco

SFB: Soro fetal bovino

DCF: Diacetil-diclorofluoresceína

P&D: Pesquisa e desenvolvimento

PPGBM: Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Marinha

BMA: 6-bromo-2'-de-N-metilaplysinopsina

T. cruzi: *Trypanossoma cruzi*

GI: Gastro intestinal

FET: Fish embryo teste

OECD: Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

RMD: Resistência a múltiplos fármacos/drogas

SUMÁRIO

1.CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	13
2. JUSTIFICATIVA	16
3. HIPÓTESE	16
4. OBJETIVO GERAL	17
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 1. <i>Tubastraea</i> spp.: PASSADO, PRESENTE E FUTURO DE SUAS ESTRATÉGIAS FARMACOLÓGICAS	21
RESUMO.....	21
1. INTRODUÇÃO	22
2.METODOLOGIA.....	23
3. Descoberta das espécies do gênero <i>Tubastraea</i>	23
3.1 Dispersão e adaptação.....	25
4.0Bioprospecção da microbiota da <i>Tubastraea</i> <i>spp</i>	27
4.1 Atividades dos extratos brutos dos corais <i>Tubastraea</i> e simbiontes.....	27
4.2 Desenvolvimento farmacológico dos compostos isolados e seus sintéticos derivados de <i>Tubastraea</i> e seu microbioma.....	30
5.0 CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	35
CAPÍTULO 02: ALCALOIDE MARINHO DO EXTRATO DE <i>Tubastraea</i> spp. COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA EM TUMOR CEREBRAL.....	40
RESUMO.....	40
1. INTRODUÇÃO	42

2. MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 Obtenção da <i>Tubastraea spp.</i> e preparo do extrato bruto.....	46
2.2 Escolha do composto do extrato bruto de <i>Tubastraea spp.</i>	46
2.3 Obtenção do alcaloide.....	47
2.4 Identificação do alcaloide marinho no extrato bruto por cromatografia.....	47
2.5 Cultura celular em modelo 2D e 3D.....	48
2.6 Ensaio da fosfatase ácida em modelo 3D	49
2.7 Ensaio de atividade mitocondrial em modelo 2D.....	49
2.8 Ensaio dos fluorocromos DCFHDA, laranja de acridina e 7-AAD em modelo 2D.....	50
2.9 Ensaio de toxicidade <i>in vivo</i>	51
2.10 Análises estatísticas.....	52
3. RESULTADOS	53
3.1 Escolha do composto presente no extrato bruto de <i>Tubastraea spp.</i>	53
3.2 Identificação do 6-bromoindol-3carboxaldeído no extrato bruto de <i>Tubastraea spp.</i>	58
3.3 Potencial citotóxico do 6-bromoindol-3carboxaldeído em modelo 2D de GBM...59	
3.4 Potencial citotóxico do 6-bromoindol-3-carboxaldeído em modelo 3D de GBM..61	
3.5 Avaliação de espécies reativas de oxigênio através do fluorocromo DCFHDA.....	63
3.6 Avaliação da proliferação celular através do fluorocromo 7-AAD.....	64
3.7 Avaliação da autofagia e viabilidade celular através do fluorocromo laranja de acridina.....	66
3.8 Teste de toxicidade em embrião de peixe zebra.....	68
4. DISCUSSÃO	73
5. CONCLUSÃO.....	85

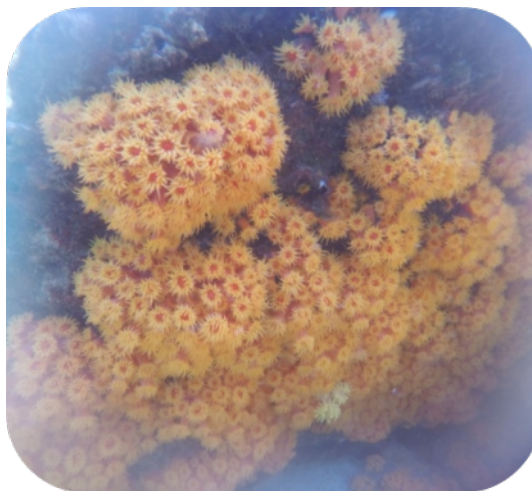
REFERÊNCIAS.....	86
CONSIDERAÇÕES FINAIS	92

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Organismos marinhos sésseis possuem mobilidade limitada, não possuindo defesa física, apresentam uma defesa química contra competidores, patógenos e predadores. Essas substâncias produzidas por estes animais são atualmente um grande destaque na bioprospecção de produtos naturais marinhos (Rampelotto *et al.*, 2019). A partir de 1980, a biotecnologia surgiu como um campo que direcionou o estudo da vida marinha, visando aplicações como o desenvolvimento de medicamentos (Khalifa *et al.*, 2019). O arranjo peculiar de moléculas naturais contém requisitos estruturais que permitem a ligação a alvos específicos ou interações moleculares que resultam em alterações fenotípicas nos sistemas biológicos. Essas propriedades estão intimamente relacionadas ao seu potencial farmacológico e sucesso terapêutico nas mais diversas doenças. Estima-se que 64% de todos os medicamentos atualmente registrados tenham um produto natural envolvido em seu desenvolvimento (Carpes *et al.*, 2019). Barreca *et al.* (2020) concluíram que o ambiente marinho é uma fonte inestimável e subestimada de alcalóides antitumorais e Jimenez *et al.* (2018), sugeriram que há uma relevante quantidade de compostos com atividade especificamente antineoplásica derivada de organismos marinhos, microrganismos e plantas. Além disso, há muitas substâncias conhecidas que mostram atividades sem precedentes quando testadas contra novos alvos terapêuticos.

Considerando a necessidade biotecnológica de novos fármacos na área biomédica e a crescente descoberta de bioativos de origem marinha, chama-se a atenção para o hexacoral *Tubastraea spp.*, conhecido popularmente como coral-sol.

Figura I: Espécie de *Tubastraea* spp. fotografada em Arraial do Cabo, RJ.



Fonte: Fraga, D., Mirra, B., Cardoso, N.

O gênero *Tubastraea* (Filo Cnidaria, Classe Anthozoa, Ordem Scleractinia, Família Dedrophylliidae) consiste em corais duros sem zooxantelas simbióticas e são considerados não formadores de recifes. As espécies do gênero são nativas do Oceano Pacífico. No entanto, algumas espécies, como *Tubastraea coccinea* agora são consideradas cosmopolitas devido à invasão biológica (Cairns, 2000; De Paula & Creed, 2004; Creed *et al.*, 2017). Atualmente o coral-sol pode ser encontrado ao longo da costa Brasileira e acredita-se que ele provavelmente tenha chegando ao Brasil no final da década de 1980 (De Paula *et al.*, 2004). Há mais de três décadas, já foi verificado em extratos brutos do gênero *Tubastraea* a presença de alcaloides como a aplisinopsina e seus análogos, conhecidos por possuírem atividades farmacológicas variadas (Okuda *et al.*, 1982; Guella *et al.*, 1988; Rashid *et al.*, Koh, *et al.*, 2000; Bialonska *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 2009., Maia *et al.*, 2014). Baird-Lambert e colaboradores já em 1982, utilizando diferentes modelos pré-clínicos demonstraram o potencial de neuromodulação desses alcaloides, tanto no estímulo quanto na inibição da liberação de neurotransmissores nas sinapses, demonstrando um importante papel na fisiologia do sistema nervoso central (SNC). O 6-bromoindol-3-carboxaldeído é um alcaloide que pode ser encontrado em alguns organismos marinhos, estando presente também no extrato bruto de *Tubastraea* spp., e já vem sendo descrito na literatura há alguns anos por apresentar atividades que podem ser empregadas na indústria farmacêutica

com o potencial antifúngico (Li; Fusetani, 1994) e antiincrustante (Olguin-Uribe *et al.*, 1997). Os derivados de indol já são conhecidos há mais de duas décadas por apresentarem várias atividades como citotoxicidade, antiviral, antiparasitária e antiinflamatória (Gul; Hamann, 2005).

Munekata *et al.* (2021) esclarecem que experimentos *in vivo*, utilizando alcaloides marinhos, resultaram em potenciais benefícios à saúde contra o desenvolvimento de câncer, doenças cardiovasculares, convulsões, doença de Alzheimer, distúrbios de saúde mental, doenças inflamatórias, osteoporose, fibrose cística, estresse oxidativo, parasitas e infecções bacterianas.

Recentemente, Carpes *et al.* (2020) demonstraram o potencial antiinflamatório desses alcaloides indólicos em modelos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*, evoluindo no estudo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de um possível biofármaco futuro. Carpes *et al.* (2019) verificaram o potencial citotóxico do extrato bruto de *Tubastraea coccinea* e *T. tagusensis* em células neoplásicas de carcinoma hepatocelular humano (HepG2).

Ainda há poucos estudos relacionados a prospecção de novos compostos dos corais *Tubastraea spp.* com potencial anti-câncer. Nos últimos anos existe um crescente interesse na realização de pesquisas científicas para explorar a síntese, bioatividades, e efeitos potenciais de novos compostos de indol, que são muito promissores para várias aplicações práticas (Saleem *et al.*, 2023). O indol é uma das moléculas farmacologicamente ativas mais promissoras e vários medicamentos derivados de indol são utilizados na área da saúde como o quimioterápico Vincristina (Kumar *et al.*, 2020).

Diante disso, esse estudo analisa o potencial de um alcaloide sintético marinho já descrito nos extratos de *Tubastraea*, o 6-bromoindol-3-carboxaldeído, utilizando o modelo experimental da neoplasia cerebral mais agressiva dentre os tumores malignos do sistema nervoso central (SNC), o GBM, em ensaios *in vitro*. O primeiro capítulo, consiste em uma revisão bibliográfica sobre o coral sol e suas aplicações farmacológicas. O segundo capítulo refere-se aos resultados do efeito anti-câncer do alcalóide indólico, em modelo *invitro* de GBM, e de toxicidade em embriões de peixe-zebra.

2. JUSTIFICATIVA

Esse estudo foi desenvolvido a partir dos resultados da dissertação de Noreyini Ndiaye Grego (2019), pelo Programa associado de Pós-graduação em Biotecnologia Marinha (PPGBM), no qual que foi demonstrado que o extrato bruto da *Tubastraea spp.*, excluindo-se o esqueleto de carbonato de cálcio, apresentou significativo efeito citotóxico e citostático seletivo usando-se duas linhagens celulares humanas de GBM (T98G e U251), em dois diferentes modelos *in vitro* (culturas 2D e 3D), não afetando a viabilidade de células humanas não tumorais. Em continuidade ao estudo, escolheu-se trabalhar com um alcaloide presente no coral-sol, identificado no extrato utilizado no trabalho anterior, e selecionado a partir de características fornecidas por ferramentas de análises *in silico*. O alcaloide 6-bromoindol-3-carboxaldeído já sintetizado e fornecido comercialmente, foi adquirido para a realização dos testes no intuito de avançar no P&D na área farmacológica nos testes com células de GBM.

Apesar da crescente busca pelo desenvolvimento de fármacos que forneçam tratamento a doenças como o câncer, é importante considerar que o consumo crescente de fármacos pode gerar a contaminação de lagos, rios ou depósitos subterrâneos (mananciais) com resíduos desses produtos devido ao descarte inapropriado. Kirsten *et al.* (2020) demonstraram que a exposição a fármacos, mesmo em concentrações baixas foi capaz de alterar o comportamento de peixes-zebra, além de prejudicar o desenvolvimento de embriões e larvas. Isso foi associado diretamente ao aumento da expressão de fatores de estresse liberados pelo SNC. Com tais indícios e raros estudos associados a atividade anti-câncer, esse trabalho abrange aspectos biotecnológicos de um alcaloide marinho identificado no extrato bruto de *Tubastraea spp.*, seu potencial anti-câncer, além de elucidar os mecanismos de ação *in vitro*, considerando sua toxicidade em embriões de peixe-zebra.

3. HIPÓTESE

O alcaloide identificado no extrato bruto da *Tubastraea spp.* possui efeito antitumoral.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antitumoral e toxicidade do alcaloide identificado no extrato bruto da *Tubastraea spp.* em células tumorais do sistema nervoso central (SNC) *in vitro*.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar quimicamente o alcaloide marinho no extrato bruto de *Tubastraea spp.*;
- Testar o efeito citotóxico do alcaloide marinho da *Tubastraea spp.* em modelo 2D de células tumorais humanas de GBM;
- Analisar o efeito citotóxico do alcaloide marinho da *Tubastraea spp.* em modelo 3D de células tumorais humanas de GBM;
- Observar o mecanismo de ação via formação de espécies reativas de oxigênio nesta citotoxicidade;
- Verificar a toxicidade do alcaloide presente no extrato.

REFERÊNCIAS

BATISTA, Daniela *et al.* 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, 2017.

BAIRD-LAMBERT, J; DAVIS, Pa; TAYLOR, Km. Methyaplysinsin: a natural product of marine origin with effects on serotonergic neurotransmission. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 9(2):203-12, 1982.

BARRECA, Marilia *et al.* Marine anticancer agents: An overview with a particular focus on their chemical classes. **Marine Drugs**, 18(12), 2020.

BIALONSKA, Dobrosława; ZJAWIONY, Jordan. Aplysinsins--marine indole alkaloids: chemistry, bioactivity and ecological significance. **Marine Drugs**. 19;7(2):166-83, 2009.

DIAO, Wenwen *et al.* Behaviors of Glioblastoma Cells in in Vitro Microenvironments. **Scientific Reports**, 9(1), 1–9, 2019.

CARPES, Raphael de Mello. Anti-inflammatory potential of invasive sun corals (Scleractinia: *Tubastraea spp.*) from Brazil: alternative use for management? **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 72(4), 633–647, 2020.

CREED, Joel Christofer *et al.* The invasion of the azooxanthellate coral *Tubastraea* (Scleractinia: Dendrophylliidae) throughout the world: history, pathways and vectors. **Biological Invasions**, 19(1), 283–305, 2016.

DE PAULA, Aline Figueira; CREED, Joel Christofer. Two species of the coral *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) in Brazil: A case of accidental introduction. **Bulletin of Marine Science**, 74(1), 175–183, 2004.

WASEEM, Gul; HAMANN, Mark. Indole alkaloid marine natural products: An established source of cancer drug leads with considerable promise for the control of parasitic, neurological and other diseases. **Life Sciences** 78(5): 442–453, 2005.

GUELLA, Graziano *et al.* Novel Aplysinopsin-Type Alkaloids from Scleractinian Corals of the Family Dendrophylliidae of the Mediterranean and the Philippines. Configurational-assignment criteria, stereospecific synthesis, and photoisomerization. **Helvetica Chimica Acta**, 71(4), 773–782, 1988.

KIRSTEN, Karina. Acute and chronic stress differently alter the expression of cytokine and neuronal markers genes in zebrafish brain. **Stress** 24(1):107-112, 2021.

KOH, Esther; SWEATMAN, Hugh. Chemical warfare among scleractinians: Bioactive Natural Products from *Tubastraea faulkneri* Wells kill larvae of potential competitors. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 30;251(2):141-160, 2000.

KUMAR, Devendra *et al.* Medicinal Perspective of Indole Derivatives: Recent Developments and Structure-Activity Relationship Studies. **Current Drug Targets**.21(9):864-891, 2020.

JIMENEZ, Paula Christine *et al.* Marine drugs for cancer: surfacing biotechnological innovations from the oceans. **Clinics**, 73(Suppl 1), 1–7(2018).

Akay, Metin *et al.* Drug Screening of Human GBM Spheroids in Brain Cancer Chip. **Scientific Reports**, 1–9, 2018.

KHALIFA, Shaden *et al.* Marine Natural Products: A Source of Novel Anticancer Drugs. **Marine Drugs**. 23;17(9):491, 2019.

HONG-YU, Li; MATSUNAGA, Shigeki; FUSEYANI, Nobuhiro. Simple antifungal metabolites from a marine sponge, *Halichondria* sp. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And Physiology**,107(2), 261–264, 1994.

MAIA, Lenize *et al.* Raman Spectroscopic study of antioxidant pigments from cup corals *Tubastraea* spp. **Journal of Physical Chemistry**. May 15;118(19):3429-37, 2014.

MEYER, Michèle *et al.* An antiplasmodial new (bis)indole alkaloid from the hard coral *Tubastraea* sp. **Natural Products Research**.23(2):178-82 (2009). doi: 10.1080/14786410801925134

MUNEKATA, Pes. Marine Alkaloids: Compounds with In Vivo Activity and Chemical Synthesis. **Marine Drugs**. 28;19(7):374, 2021.

SALEEM, Faiza; Khalid, Mohammed Khan. Indole Derivatives: Unveiling New Frontiers in Medicinal and Synthetic Organic Chemistry. **Molecules**. 18;28(14):5477, 2023.

OKUDA, Roy. Marine natural products: the past twenty years and beyond. **Pure and Applied Chemistry**, 54(10), 1907–1914, 1982.

Olguin-Urbe, G *et al.* 6-bromoindole-3-carbaldehyde, from an *Acinetobacter* Sp. Bacterium associated with the ascidian *Stomozoa murrayi*. **Journal of Chemical Ecology**, 23(11), 2507–2521, 1997.

RAMPELOTTO, Pabul; TRINCONE, Antonio. 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**, Cap. 8. p. 261, 2018.

RASHID, Mohammad *et al.* Mycalolides D and E, new cytotoxic macrolides from a collection of the stony coral *Tubastrea faulkneri*. **Journal Natural Products**. 58(7):1120-5, 1995.

CAPÍTULO 1: *Tubastraea* spp.: passado, presente e futuro de suas estratégias farmacológicas

Danielle da Silva Fraga Gomes^{1,2}; Roberta da Costa Escaleira^{1,3}; Giselle Pinto de Faria Lopes^{1,2}

¹Programa associado de Pós-graduação em Biotecnologia Marinha, Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) e Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFF), Rua Daniel Barreto s/n, Prédio Amazônia Azul, Praia dos Anjos, Arraial do Cabo, RJ, 28.930-000, Brazil

²Divisão de Bioprodutos, Departamento de Biotecnologia Marinha, Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM), Rua Kioto 253, Praia dos Anjos, Arraial do Cabo, RJ, 28.930-000, Brazil.

³Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB), Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD), Rua: César Zama, 185, Lins de Vasconcelos, Rio de Janeiro, RJ, 20.725-090, Brazil.

RESUMO

Os corais do gênero *Tubastraea* são conhecidos pelo nome popular de coral-sol, são comumente relacionados à capacidade invasiva, competitiva e de causar danos em habitats não-nativos. Com sua alta capacidade invasiva, o coral-sol invadiu o Atlântico e tem dominado regiões costeiras até o sul do Brasil, podendo ser encontrado facilmente na região costeira. Recentemente foram descobertas quatro novas espécies do gênero. Espécies de *Tubastraea* foram rastreadas nos últimos anos em testes relativos a composição do seu extrato, microbiota associada e produção de metabólitos secundários. Sabe-se que organismos marinhos produzem substâncias com propriedades utilizadas na farmacologia e o coral-sol apresenta algumas substâncias, já sendo identificado entre eles a aplysinopsina e seus derivados, alcaloides e carotenóides. Tanto o extrato quanto compostos isolados de algumas dessas espécies já foi testado com relação a atividades antifúngica, antitumoral, citotóxica, anti-parasitária entre

outras. De maneira geral organismos marinhos parecem produzir compostos em comum, sendo possível encontrar compostos presentes em *Tubastraea* em outros animais marinhos. A investigação das novas espécies encontradas pode apresentar novas possibilidades de encontro de bioativos com propriedades farmacológicas.

1. Introdução

Tubastraea é um gênero de corais escleractinianos conhecidos popularmente como corais-sol (Yiu *et al.*, 2022). O gênero *Tubastraea* (Classe Anthozoa, Ordem Scleractinia, Família Dendrophylliidae), foi caracterizado como um coral duro sem a presença de zooxantelas (Carpes *et al.*, 2020). Nas últimas décadas, esses corais se espalharam globalmente, revelando-se organismos de grande capacidade invasiva (Bastos *et al.*, 2024). Sávio *et al.* (2021), ressalta que a introdução de espécies exóticas é uma das principais causas da perda de biodiversidade em ambientes marinhos e que espécies introduzidas podem impactar comunidades locais alterando o funcionamento do ecossistema. Os corais *Tubastraea* podem causar impactos econômicos e ambientais por incrustação na navegação e modificação de comunidades nativas (Mantelatto *et al.*, 2020). Sua alta capacidade invasiva está relacionada a estratégias reprodutivas que lhe permitiram dispersar-se de maneira rápida e ampla (Luz *et al.*, 2020). Capel *et al.* (2017) sugeriram que espécies não-nativas possuem o potencial de desencadear rapidamente mudanças em comunidades nativas e nas funções do ecossistema, o que pode ter impactos negativos abrangentes. Silva *et al.* (2022), esclarecem que os corais azooxantelados *T. coccinea* e *T. tagusensis* invadiram a costa brasileira na década de 1980 e ainda estão em expansão, favorecidos pela menor predação e pressão de competição em seus novos habitats. Essas duas espécies são reconhecidas como altamente invasivas e por estarem causando impactos ambientais, econômicos e sociais significativos que exigem ações de gestão (Creed *et al.*, 2017).

2. Metodologia

A busca literária foi realizada através de 3 plataformas de base de dados (PubMed, Litmaps e Connected papers). Considerando-se a palavra de busca “*Tubastraea*”, foram encontrados 239 resultados no site de busca Connected papers, enquanto PubMed mostrou 72 resultados e o Litmaps apenas 8. Quando a busca foi realizada com as palavras: “*Tubastraea* activity”, o PubMed apresentou 14 resultados, o Connected Papers 25 e o Litmap 8.

3.0 Descoberta das espécies do gênero *Tubastraea*

Os corais do gênero *Tubastraea* concentram algumas dezenas de espécies identificadas até o presente momento, a (Tabela 1) mostra algumas das espécies mais conhecidas e estudadas do gênero de acordo com a ordem cronológica de descoberta. A primeira delas foi a *Tubastraea coccinea* (Lesson, 1830), a partir de então *Tubastraea aurea* (Quoy; Gaimard, 1833), *Tubastraea micranthus* (Ehrenberg, 1834), *Tubastraea diaphana* (Dana, 1846), *Tubastraea tagusensis* (Wells, 1833) e *Tubastraea faulkneri* (Wells, 1982). Das dez espécies de *Tubastraea* identificadas, 4 delas foram descobertas recentemente. Em 2021, foi descoberta a *Tubastraea megacoralita* sp. nov., exibindo várias características do gênero, incluindo apresentar-se em forma de colônia e distinguindo-se de seus congêneres por coralitos maiores e pelo arranjo do plano de seus septos (Yiu *et al.*, 2021). Em 2022 mais 3 novas espécies foram reportadas em Hong Kong na China, incluindo *T. dendroidea* sp. nov., que tem uma colônia semelhante a uma árvore, *T. violacea* sp. nov., que tem pólipos violetas, e *T. chloromura* sp. nov., que tem pólipos verde-oliva (Yiu *et al.*, 2022). Além das espécies de *Tubastraea* relatadas na literatura, também já foram identificados morfotipos, sendo essas variações da mesma espécie do gênero. O que pode dificultar um pouco essa identificação. Bastos *et al.* (2022), demonstrou que esses corais ainda apresentam uma taxonomia com sobreposição de caracteres morfológicos entre as espécies, sendo necessário mais ferramentas de validação. Nesse estudo foram investigadas três espécies de *Tubastraea* encontradas no Atlântico ocidental, e embora

três morfotipos tenham sido identificados, foram delimitados geneticamente em apenas duas espécies: *T. coccinea* (morfotipos I e II) e *Tubastraea* sp. (morfotipo III) (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies mais comuns de *Tubastraea* identificadas até o momento

Espécie	Referência
<i>Tubastraea coccinea</i>	Lesson, 1830
<i>Tubastraea aurea</i>	Quoy & Gaimard, 1833
<i>Tubastraea micranthus</i>	Ehrenberg, 1834
<i>Tubastraea diaphana</i>	Dana, 1846
<i>Tubastraea tagusensis</i>	Wells, 1982
<i>Tubastraea faulkneri</i>	Wells, 1982
<i>Tubastraea megacoralita</i> sp. nov.	Yiu <i>et al.</i> , 2021
<i>Tubastraea dendroidea</i> sp.	

nov. Yiu *et al.*, 2022

T. violacea sp. nov.

Yiu *et al.*, 2022

T. chloromura sp. nov. Yiu *et al.*, 2022

Fonte: Autoria própria.

3.1 Dispersão e adaptação

Lu *et al.* (2021), esclarecem que a capacidade regenerativa dos cnidários desempenha um papel essencial na manutenção e restauração dos ecossistemas de recifes de corais, essa condição permite uma recuperação mais rápida e uma dispersão mais eficiente. No entanto, esse fator também contribui para a dispersão dessas espécies e fixação em *habitats* não nativos. Coelho *et al.* (2022), explicam que a maioria das espécies marinhas tem uma fase larval planctônica, ambientalmente resistentes, com diferentes regimes de fluxo e substratos artificiais que demonstram padrões complexos de sua dispersão, impulsionando a expansão geográfica. As colônias de *Tubastraea* são comumente associadas a recifes de corais, costões rochosos, bancos de mexilhões, detritos de madeira, lixo marinho e substratos artificiais estacionários, como naufrágios ferrosos, portos e estruturas *offshore* de petróleo e gás (Creed & de Paula, 2007; Mantellato & Creed, 2015; Miranda *et al.*, 2016; Creed *et al.*, 2017; Lopez ´ *et al.*, 2020; Mantellato *et al.*, 2020 Braga *et al.*, 2021). Em um estudo no qual foram realizadas observações de colônias de coral-sol presos a lixo flutuante, foi verificado que ocorreu o transporte dessas colônias por longas distâncias, a aderência a esses substratos móveis aparece como um mecanismo de expansão e introdução secundária (Mantelatto *et al.*, 2020).

Desde a invasão do coral escleractíneo indo-pacífico *T. coccinea* no Atlântico, ocorrida no final da década de 1930, populações foram

encontradas ao longo de 8.000 km do Atlântico oeste e nas Ilhas Canárias da Espanha (Atlântico leste), relacionadas à poluição de embarcações na indústria de petróleo e gás (Crivellaro *et al.*, 2022). A primeira espécie de *Tubastrea* introduzida, a *T. coccinea*, chegou ao Caribe, em Curaçao e Porto Rico por volta de 1940, Vaughan *et al.* (1943), e posteriormente, expandiu sua distribuição para o norte até a Geórgia (EUA) e até o sul do Brasil (Cairns, 2000). Desde o final da década de 1980, no Atlântico sudoeste, os primeiros registros de corais invasores *Tubastraea spp.* foram encontrados em plataformas de petróleo, sendo favorecidos por menor predação e pressão de competição em seus novos habitats (Silva *et al.*, 2022). Essas plataformas são consideradas vetores importantes de introdução à espécies não nativas, para as populações estabelecidas em toda a costa brasileira. O coral-sol, tem se espalhando ao longo da costa brasileira, onde competem com por espaço com espécies nativas, produzindo compostos químicos com propriedades antincrustantes e antipredatórias, modificando a estrutura e a função da biodiversidade local (Vançato *et al.*, 2023). Sua rápida reprodução e crescimento, monopolizaram recifes rochosos ao redor do Oceano Atlântico, reduzindo a diversidade de invertebrados e macroalgas incrustantes, e consequentemente também alterando a composição de invertebrados móveis que vivem associados a recifes (Merz *et al.*, 2023). Um fator que também parece estar associado ao mecanismo de dispersão e adaptação da *Tubastraea* é sua microbiota associada, um estudo realizado na costa Nordeste de Taiwan comparou comunidades bacterianas associadas a *T. aurea*, mostrando variações que parecem contribuir para aumentar tanto a capacidade de adaptação do hospedeiro quanto seus mecanismos fisiológicos de dispersão resultando em sua resiliência em ambientes extremos (Igiriya *et al.*, 2023). Nos últimos anos, espécies incomuns de *Tubastraea* tem sido avistadas no Atlântico, em 2010 foi relatado pela primeira vez a observação de uma *T. micranthus* no Atlântico ocidental. Esta foi encontrada na Louisiana nos Estados Unidos, perto da foz do rio Mississippi, em uma plataforma petrolífera. Suas taxas reprodutivas tanto sexuais quanto assexuais são semelhantes às de *T. coccinea*, indicando grande possibilidade de dispersão (Sammarco *et al.*,

2010). Indicando grande possibilidade de se dispersar com rapidez e facilidade.

4.0 Bioprospecção da microbiota da *Tubastraea* spp.

De acordo com More *et al.* (2014), corais saudáveis exibem uma simbiose complexa entre pólipos de corais, algas endossimbióticas e uma variedade de microrganismos, acredita-se que a secreção de metabólitos específicos da microbiota contribua para a defesa desse organismo sésil contra fatores bióticos e abióticos. Recentemente foram identificados 2 cepas de bactérias marinhas associadas a microbiota de *T. coccinea* (*Alteromonas macleodi* e *Vibrio alginolyticus*), coletadas no canal de São Sebastião e Ilha de Búzios, a microbiota testada com relação a atividade anti-parasitária, apresentou significativo potencial contra *Trypanossoma cruzi* (Santos *et al.*, 2024), (Tabela 2).

4.1 Atividades dos extratos brutos dos corais *Tubastraea* e simbioses

Extratos de diferentes espécies de *Tubastraea* foram estudados quanto as propriedades farmacológicas *in vitro* e *in vivo*. O primeiro estudo foi realizado com o extrato etanólico de *T. aurea* que apresentou efeito citostático inibindo a divisão celular de ovos fertilizados de ouriço-do-mar (*Hemicentrotus pulcherrimus*) (Jacobs *et al.*, 1981). Em seguida, Koh *et al.* (1997) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de 100 espécies de corais escleractinianos (44 gêneros e 13 famílias), contra 7 espécies de microrganismos, e foi encontrada uma significativa ação antibiótica contra bactérias marinhas em seis espécies de *Tubastraea*., dentre eles *T. faulkneri*, *T. micranthus*, *T. diaphana*. Em um estudo *in vivo*, Santos *et al.* (2013), também testaram extratos metanólicos de *T. coccinea* e *T. tagusensis* em camundongos, tratados no modelo de edema de pata induzido por carragenina, ambos os extratos apresentaram atividade anti-inflamatória significativa, ocorrendo diminuição do edema a partir de 2h do tratamento. Em um estudo mais recente, frações do extrato do coral *T. coccinea* foram testadas quanto a atividade antibiótica em 21 cepas de bactéria, através do método de difusão em disco. A fração extraída com n-butanol apresentou atividade contra as cepas de *Staphylococcus aureus*,

Klebsiella pneumoniae carbapenemase e *Enterococcus faecalis* (Bianc *et al.*, 2016) (Tabela 2).

Em um estudo voltado para atividade antitumoral dos extratos, testou-se o potencial citotóxico de extratos metanólico e etanólico de *T. coccinea* e *T. tagusensis* em células de carcinoma hepatocelular humanas (HepG2), em que foi verificado atividade significativa da desidrogenase mitocondrial e danos a membrana citoplasmática (Carpes *et al.*, 2020). Os mesmos autores testaram duas frações desses extratos metanólicos de *T.coccinea* e *T. tagusensis in vivo*, os quais apresentaram atividade anti-inflamatória através da diminuição do edema da pata do camundongo via inibição da produção de nitrito (Carpes *et al.*, 2020). Assim como foi visto potencial farmacológico nos extratos dos corais, os estudos evoluíram na busca dos bioativos presentes nos extratos, responsáveis pelas atividades *in vitro* e *in vivo*, evoluindo no P&D para um futuro medicamento baseado em *Tubastraea* (Tabela 2).

Tabela II: Extrato bruto de espécies do gênero *Tubastraea* e atividades farmacológicas anteriormente relacionadas

Extratos	Espécies	Local	Atividades farmacológicas	Referências
Etanólico	<i>Tubastraea faulkneri</i>	Grande Barreira de corais, Australia	Atividade citotóxica	Koh & Sweatman (2000)
Etanólico	<i>Tubastraea coccinea</i> <i>Cepas bacterianas associadas aos corais</i>	Canal de São Sebastião, Ilha de Búzios, Brasil	Anti-tripanosômica	Santos <i>et al.</i> (2024)
Diclorometano	<i>Tubastraea faulkneri</i>	Canal de São Sebastião, Ilha de Búzios, Brazil	Atividade antibacteriana	Koh & Sweatman (2000)

Metanólico	<i>Tubastraea faulkneri</i>	Recife Davies, Grande Barreira de corais, Austrália	Atividade antibacteriana	Koh & Sweatman (2000)
Metanólico	<i>Tubastraea coccinea</i>	Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil	Atividade antioxidante	Maia <i>et al.</i> (2014)
Hexânico	<i>Tubastraea coccinea</i>	Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil	Atividade antioxidante	Maia <i>et al.</i> (2014)
Metanólico	<i>Tubastraea coccinea</i>	Ilha dos Macacos, Baía da Ilha Grande , Brasil	Efeito citotóxico (HepG2 e RAW 264.7)	Carpes <i>et al</i> (2020)
Hidroal-cólico	<i>Tubastraea coccinea</i>	Ilha dos Macacos, Baía da Ilha Grande, Brasil	Efeito citotóxico (HepG2 e RAW 264.7)	Carpes <i>et al</i> ., 2020
Hidroalcólico	<i>Tubastraea tagusensis</i>	Ilha dos Macacos, Ilha Grande Bay, RJ, Brazil	Efeito citotóxico (HepG2 e RAW 264.7)	Carpes <i>et al</i> (2020)
Metanólico	<i>Tubastraeatagusensis</i>	Ilha dos Macacos, Ilha Grande Bay, RJ, Brazil	Efeito citotóxico (HepG2 and RAW 264.7)	Carpes <i>et al</i> (2020)

Metanólico Fração de acetato de etila	<i>T. coccinea</i>	Ilha dos Macacos, Ilha Grande Bay, RJ, Brazil	Antinflamatório	Carpes <i>et al</i> (2020)
Metanólico	<i>T. tagusensis</i>	Ilha dos Macacos, Ilha Grande Bay, RJ, Brazil	Antinflamatório	Carpes <i>et al</i> (2020)

4.2 Desenvolvimento farmacológico dos compostos isolados e seus sintéticos derivados de *Tubastraea* e seu microbioma

Até o momento, onze compostos já foram isolados e identificados de corais do gênero *Tubastraea* e testados quanto à atividade farmacológica, entre eles, 8 alcaloides e 2 carotenoides (Tabela 3). As espécies de coral-sol são conhecidas por possuírem alcaloides derivados do composto aplisinopsina, essa molécula vem sendo relacionada a atividades farmacológicas ao longo dos anos. Na década de 80, corais identificados apenas pelo gênero *Tubastraea* foram coletados no Arquipélago das Ilhas Hanish no Iêmen. A partir do extrato metanólico de *Tubastraea sp.*, dois pigmentos amarelos foram isolados quimicamente, aplisinopsina 1 e 6-bromo-30-oxoaplsinopsina (Fusetani *et al.*, 1986; Guella *et al.* 1988). Em 1995, em um bioensaio no qual foi utilizado extrato metanólico de *T. faulkneri*, da grande barreira de corais da Austrália, este forneceu, pela primeira vez, frações ricas em macrolídeos de polioxazol citotóxicos (mycalolide D e E), além do composto (mycalolide C) que já era conhecido anteriormente Rashid *et al.*(1995); os compostos (mycalolide C e D), foram identificados com atividade citotóxica em um ensaio de triagem de células antitumorais de 60 linhagens celulares do NCI, mycalolide E, não foi testado devido não foi testado devido ao material insuficiente (Boyd,1993; Boyd & K.D., 1995) (Tabela 3).

Vários compostos presentes nos corais *Tubastraea* também são sintetizados por outros animais marinhos, o alcaloide 6-bromoindol-3-

carboxaldeído, embora presente e identificado em *T. coccinea* e *T. faulkneri*, foi testado com relação à bioatividade quando isolado de outras fontes, como bactérias, algas, esponjas e pseudomona marinha, apresentando atividades antifúngica, antibiótica, antiincrustante, e antitumoral (Wratten *et al.*, 1977; Olguin *et al.*, 1997; Carletti *et al.*, 2000; Hong-yu *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2013). Já o 6-bromoindole-3-carboxaldeído quando isolado da esponja *Halichondria sp.* apresentou atividade antifúngica contra *Mortierella ramannianus* (Hong-yu *et al.*, 1994). O alcaloide também presente na macroalga *Laminaria japonica*, demonstrou efeito antitumoral *in vitro*, através de células de tumores de próstata e não apresentou citotoxicidade contra a linha celular HEK293 (linha de célula renal embrionária humana), apresentando assim, um efeito seletivo (Wang *et al.*, 2013). Em 2009 um novo bis(indol) identificado, denominado cicloaplysinopsina C, foi capaz de inibir o crescimento do *Plasmodium falciparum* apresentando efeito anti-malária (Meyer *et al.*, 2009).

A composição do pigmento dos tecidos laranja de *T. coccinea* e amarelo dos tecidos de *T. tagusensis* são decorrentes da presença de carotenoides como a astaxantina e alcaloides indólicos como derivados de aplisinopsina que já demonstraram ação antioxidante (Maia *et al.*, 2014). Alguns compostos também já foram isolados de organismos associados diretamente a *Tubastraea sp.*, como os três novos alcanol imidazóis: bulbimidazóis A, B e C, produzidos pela bactéria do gênero *Microbulbifer sp.*, que apresentaram potencial antibiotico e *K. rhizophila* e *S. Aureus* que exibiram atividade antifúngica (Karim *et al.* 2020) (Tabela 2). Esses compostos também apresentaram atividade antitumoral, em células de leucemia murina *in vitro*. Um outro alcaloide indólico, conhecido como 6-bromo-2'-de-N-metilaplysinopsina (BMA) foi isolado e caracterizado quimicamente do coral marinho *T. tagusensis*. O BMA foi menos eficaz contra tripomastigotas extracelulares de *T. cruzi* extracelulares, porém mostrou-se eficaz contra amastigotas intracelulares em comparação ao benzinidazol. Além disso a molécula foi testada com relação a toxicidade nas células de mamíferos, não causando toxicidade, demonstrando assim apresentando assim importante efeito seletivo (Romanelli *et al.*, 2022). A

citotoxicidade de análogos de aplisinopsina sintetizados já foi rastreada em diferentes células cancerígenas como em linhagens de câncer de mama humano (MCF-7), câncer de cólon humano (HCT-116), câncer de fígado humano (HepG2), câncer de pulmão (A549) e câncer de próstata humano (PC3), a aplisynopsina e todos os 5 análogos testados apresentaram citotoxicidade contra a linhagem celular de próstata humano (PC3) em comparação com células não tratadas (El-Sawy *et al.*, 2023). Recentemente, uma molécula inédita foi isolada de *T. tagusensis*. Os mecanismos de ação da tubastrina em células de neurônios (SH-SY5Y) como modelo experimental para a Doença de Alzheimer, resultaram na inibição significativa de espécies reativas de oxigênio e diminuição da morte celular causada pelo peptídeo amiloide (Aβ42) (Silva *et al.*, 2024) (Tabela 3).

Tabela III. Compostos isolados de espécies do gênero *Tubastraea* e atividades farmacológicas descritas

Compostos	Espécies	Local	Atividades farmacológicas	Referências
Alcaloides				
Aplinopsina	<i>Tubastraea coccinea</i>	Pupukea, Hawaii		Fusetani <i>et al.</i> (1986)
	<i>Tubastraea faulkneri</i>		Atividade citotóxica/síntese Identificação	Carpes <i>et al.</i> (2020) Koh & Sweatman (2000)
Cycloaplysinopsina C	<i>Tubastraea sp.</i>	Arquipelago das Ilhas Hanish Yemen	Atividade Antimalarial	Meyer <i>et al.</i> (2009)
6-bromoindol-3-carboxaldeido	<i>Tubastraea coccinea</i>	Pupukea, Hawaii		Okuda <i>et al.</i> (1982) Rashid <i>et al.</i> (1995)
6-bromo-2'-de-N-metilaplysinopsina	<i>Tubastraea faulkneri</i> <i>Tubastraea tagusensis</i>	Ilha Bela São Paulo Brazil	Atividade antitripanossômica	Koh & Sweatman (2000) Romanelli <i>et al</i> (2022)
Tubastrina	<i>Tubastraea tagusensis</i>	São Sebastião,	Antioxidante	Silva <i>et al.</i> , (2024)

Brasil				
Bulbimidazole A	<i>Tubastraea</i> sp. (gammaproteo bacterium <i>Microbulbifer</i> sp. associada a <i>Tubastraea</i>).	Minami-Ise, Mie, Japan	Antibacteriana, Antifúngica, Citotóxica (P388 células de leucemia murina)	Karim <i>et al.</i> (2020)
Bulbimidazole B	<i>Tubastraea</i> sp. (gammaproteo bacterium <i>Microbulbifer</i> sp. associada a <i>Tubastraea</i>)	Minami-Ise, Mie, Japan	Antibacteriana, Antifúngica, citotóxica (P388 células de leucemia murina)	Karim <i>et al.</i> (2020)
Bulbimidazole C	<i>Tubastraeasp.</i> (gamma proteo bacterium <i>Microbulbifer</i> sp. associada a <i>Tubastraea</i>)	Minamiise, Mie, Japão	Antibacteriana, Antifúngica, citotóxica (P388 células de leucemia murina)	Karim <i>et al.</i> (2020)
Carotenoides				
Mycalolide C	<i>Tubastraea faulkneri</i>	Recife de Salamandras em Cape Cleveland, Australia	Identificação/ Atividade citotóxica (60 linhagens NCI)	Rashid <i>et al.</i> (1995) Boyd <i>et al.</i> (1993) Boyd <i>et al.</i> (1995)
Mycalolide D	<i>Tubastraea faulkneri</i>	Recife de SalamandrasCa pe Cleveland, Australia	Identificação Atividade citotóxica (60 linhagens NCI)	Rashid <i>et al.</i> (1995) Boyd <i>et al.</i> (1993) Boyd <i>et al.</i> (1995)

5.0 Conclusão

A biodiversidade das espécies dos corais do gênero *Tubastraea* resulta em uma variedade de compostos com propriedades usadas como estratégia de sobrevivência. Esses têm sido utilizados em pesquisa através de modelos *in vitro* e *in vivo* para verificação de propriedades com uso biotecnológico. Como descrito, sua composição, considerando extrato bruto do próprio coral ou da sua microbiota, além dos compostos isolados e derivados sintéticos, tem papel antioxidante, antitumoral, antibiótico e antiparasitário. Novas espécies do gênero *Tubastraea* foram descobertas recentemente e ainda não foram exploradas com relação a sua composição e seu potencial de produção de bioativos, podendo representar novas

possibilidades de fornecimento de moléculas com atividades. Considerando o impacto ambiental que essas espécies causam no ambiente através da invasão biológica, destaca-se a importância de um manejo efetivo e consciente. O uso e aproveitamento desses organismos invasores para fins de estudos de novos fármacos configura uma alternativa sustentável e futuramente a descoberta de bioativos inéditos para diferentes fins. Apesar de sua descoberta há mais de dois séculos atrás, há apenas duas décadas em que foram estudadas as primeiras atividades farmacológicas. Por enquanto, foram descobertos em torno de uma dezena de compostos inéditos durante esse curto período de tempo, mostrando a importância desses corais na área da saúde. Esses resultados recentes descritos nesta revisão impulsionarão o P&D nesta área, considerando compostos potencialmente anticâncer contra diferentes tipos, antibiótico contra bactérias resistentes, e até contra doenças neurodegenerativas. Entretanto, os estudos ainda se encontram na fase de modelos pré-clínicos, mostrando-se promissor tanto *in silico*, quanto *in vitro*, até o momento, esperando-se novas perspectivas de avanço para os testes clínicos em breve.

Referências

- ABEYSINGHE, Nisangala et al. How success is evaluated in collaborative invasive species management: A systematic review. **Journal Environmental Manage.** 15;348:119272, 2023.
- ALVES, Celso. From Marine Origin to Therapeutics: The Antitumor Potential of Marine Algae-Derived Compounds. **Frontiers in Pharmacology.** 6;9:777, 2018.
- BASTOS, Natalia et al. Life history strategy of *Tubastraea* spp. corals in an upwelling area on the Southwest Atlantic: growth, fecundity, settlement, and recruitment. **PeerJ.** 31;12:e17829, 2024.
- BIANCO, Éverson Miguel et al. *Tubastraea coccinea*: A Non-Indigenous Coral (Cnidaria, Scleractinia) Collected at Arvoredo Island, South of Brazil with Potential MRSA and VRE Antimicrobial Activity. **Open Journal of Marine Science.** Vol.6 No.2, (2016).
- BRAGA, Andrade, et al. Retirement risks: Invasive coral on old oil platform on the Brazilian equatorial continental shelf. **Marine Pollution Bulletin.** 165:112156, (2021).
- CAIRNS, Stephen. A revision of the shallow-water azooxanthellate Scleractinia of the western Atlantic. **Studies of the Natural History of the Caribbean.** 75(1), 1=192, 2000.
- CAPEL, Katia Cristina, et al. Clone wars: asexual reproduction dominates in the invasive range of *Tubastraea* spp. (Anthozoa: Scleractinia) in the South-Atlantic Ocean. **PeerJ.** 5;5:e3873, 2017.
- Carletti, Isabelle, et al. Matemone, a new bioactive bromine-containing oxindole alkaloid from the indian ocean sponge *Iotrochota purpurea*. **Journal Natural Products.** 63(7):981-3, 2000.
- CARPES, Raphael de Melo, et al. Anti-inflammatory potential of invasive sun corals (Scleractinia: *Tubastraea* spp.) from Brazil: alternative use for management? **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 72(4), 633–647, 2020.
- CARPES, Raphael de Melo, et al. Mutagenic, genotoxic and cytotoxic studies of invasive corals *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*. **Journal Applied Toxicology.** 40(3):373-387, 2020.
- CRIVELLARO, Marcelo Sshueler et al. A tool for a race against time: Dispersal simulations to support ongoing monitoring program of the invasive coral *Tubastraea coccinea*. **Marine Pollution Bulletin.** 185(Pt B):114354, 2022.
- CREED, Joel Christofer, et al. The invasion of the azooxanthellate coral *Tubastraea* (Scleractinia: Dendrophylliidae) throughout the world: history, pathways and vectors. **Biological Invasions** 19: 283-305, 2017.

CREED, Joel Cristhofer, DE PAULA, Aline Figueira. Substratum preference during recruitment of two invasive alien corals onto shallow-subtidal tropical rocky shores. **Marine Ecology Progress Series**. 330, 101–111, 2007.

COELHO, Stella Correia Cesar, *et al.* Western boundary currents drive sun-coral (*Tubastraea spp.*) coastal invasion from oil platforms. **Scientific Reports**. 28;12(1):5286 (2022). doi: 10.1038/s41598-022-09269-8

EL-SAWY, Er *et al.* Synthetic Analogs of Marine Alkaloid Aplysinopsin Suppress Anti-Apoptotic Protein BCL2 in Prostate Cancer. **Molecules**. 23;28(1):109, 2022.

FUSETANI, N *et al.* Bioactive marine metabolites—XV. Isolation of aplysinopsin from the scleractinian coral *Tubastrea aurea* as an inhibitor of development of fertilized sea urchin eggs. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, 85(4), 845–846, 1986.

GOREAU, T F *et al.* Goreau, N. I., & YONGE, M. reef corals: autotrophs or heterotrophs? **The Biological Bulletin**. 141(2), 247–260, 1971.

HAYASHI-TAKANAKA, Yoko *et al.* Effect of mycalolides isolated from a marine sponge Mycale aff. nullarosette on actin in living cells. **Scientific Reports** 9, 7540, 2019.

IGIRIJA, Gowr *et al.* Microbiome variability in invasive coral (*Tubastraea aurea*) in response to diverse environmental stressors. **Frontiers in Marine Science**. 10, 1234137, 2023.

CREED, Joel Christopher, *et al.* The Sun-Coral Project: the first social-environmental initiative to manage the biological invasion of *Tubastraea spp.* in Brazil. **Management of Biological Invasions** 8.2 181, 2017.

KOH, L *et al.* Do Scleractinian Corals Engage in Chemical Warfare Against Microbes? **Journal of Chemical Ecology**, 23(2), 379–398, 1997.

KARIM, MRU *et al.* Bulbimidazoles A-C, Effect of mycalolides isolated from a marine sponge Mycale aff. nullarosette on actin in living cells. **Journal of Natural Products**. 24;83(4):1295-1299, 2020.

LOTUFO, Leticia *et al.* Veras, L. Marine organisms from Brazil as source of potential anticancer agents. **Advances in Phytomedicine** 2. 181-196, 2006.

LOPEZ, C *et al.* *Tubastraea spp.* and *Oculina patagonica* and other introduced scleractinians corals in the Santa Cruz de Tenerife (Canary Islands) harbor: ecology and potential risks. **Regional Studies in Marine Science**. 29, 100713, 2020.

LUZ, Bruna Loise Pereira *et al.* High regenerative capacity is a general feature within colonial dendrophylliid corals (Anthozoa, Scleractinia). **Journal of Experimental Zoology-B-Molecular and Developmental Evolution**. 336(3):281-292, 2021.

MAIA, Lenize *et al.* Raman Spectroscopic study of antioxidant pigments from cup corals *Tubastraea spp.* **Journal of Physical Chemistry**. 15;118(19):3429-37, 2014.

MANTELLATO, Marcelo; CREED, Joel Christofer. Non-indigenous sun corals invade mussel beds in Brazil. **Marine Biodiversity**. 45, 605–606, 2015.

MANTELLATO, Marcelo Checoli et al. Marine litter and wood debris as habitat and vector for the range expansion of invasive corals (*Tubastraea* spp.). **Marine Pollution Bulletin**. 160, 111659, 2020.

MERZ, Eva; Kitahara, Marcelo; Flores, Augusto. A legacy of invasive sun corals: Distinct mobile invertebrate assemblages at near-reef coral-dominated rubble. **Marine Environmental Research**. 188:105974, 2023.

MIRANDA, Ricardo et al. Effects of the alien coral *Tubastraea tagusensis* on native coral assemblages in a southwestern Atlantic coral reef. **Marine Biology**. 163, 45, 2016.

MIZRAHI, Damian et al. Sun coral larval release following mechanical removal: a 2-year study on the southeast Brazilian coast. **Marine Biology**, 170(11), 141, 2023.

MOREE, Wilna et al. Microbiota of healthy corals are active against fungi in a light-dependent manner. **ACS Chemical Biology**. 17;9(10):2300-8, 2014.

MOSTAFA, O et al. Al-Shehri, M., Moustafa, M., Al-Emam, A., Cnidarians as a potential source of antiparasitic drugs. **Parasitology Research**. 121(1):35-48, 2021.

Savio, Lucca et al. Sun coral management effectiveness in a wildlife refuge from south-eastern Brazil. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems** 31(10), 2830-2841, 2021.

DA SILVA, Amand Guilherme et al. Living with an enemy: Invasive sun-coral (*Tubastraea* spp.) competing against sponges *Desmapsamma anchorata* in southeastern Brazil. **Marine Environment Resoure**. 174:105559, 2022.

LAGES, Bruno et al. Chemical composition and release in situ due to injury of the invasive coral *tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia). **Brazilian Journal of Oceanography**. 58(spe4), 47–56, 2010.

LUZ, Bruna et al. Life-history traits of *Tubastraea coccinea*: Reproduction, development, and larval competence. **Ecology Evolution journal**. 19;10(13):6223-6238, 2020.

MAIA, Lenize et al. Raman Spectroscopic Study of Antioxidant Pigments from Cup Corals *Tubastraea* spp. **The Journal of Physical Chemistry**. 118(19), 3429–3437, 2014.

MANTELATTO, Marcelo Checoli et al. Marine litter and wood debris as habitat and vector for the range expansion of invasive corals (*Tubastraea* spp.). **Marine Pollution Bulletin**. 160:111659, 2020.

MEYER, Michele et al. An antiplasmodial new (bis)indole alkaloid from the hard coral *Tubastraeasp*. **Natural Product Research**. 23(2), 178–182, 2009.

RASHID, Ma et al. Mycalolides D and E, New Cytotoxic Macrolides from a Collection of the Stony Coral *Tubastrea faulkneri*. **Journal of Natural Products**. 58(7), 1120–1125, 1995.

MR. Boyd, in: Current Therapy in Oncology. Ed. by J.E. Niederhuber, B.C. Decker, Inc., Philadelphia, pp. 11- 34 (1993).

MR. Boyd and K.D. Paull, Dnrg **Developmental Research**. 34, 91 (1995).

ROMANELLI, M et al. Tempone AG. Mitochondrial Imbalance of *Trypanosoma cruzi* Induced by the Marine Alkaloid 6-Bromo-2'-de-*N*-Methylaplysinopsin. **ACS Omega**. 4;7(32):28561-28570, 2022.

SAMMARCO, P et al. A new coral species introduced into the Atlantic Ocean – *Tubastraea micranthus* (Ehrenberg 1834) (Cnidaria, Anthozoa, Scleractinia): an invasive threat?. **Aquatic Invasions**. 5 (2):131–140, 2010.

SANTOS, Dayana Agnes et al. Saturated Iso-Type Fatty Acids from the Marine Bacterium *Mesoflavibacter zeaxanthinifaciens* with Anti-Trypanosomal Potential. **Pharmaceuticals (Basel)**. 13;17(4):499, 2024.

VANÇATO, Yolanda Carolina et al. Community structure of shallow tropical reefs undergoing invasion by *Tubastraea spp.* in a Brazilian Marine Protected Area. **Aquatic Invasions** 18(1): 39-57, 2023.

WRATTEN, Stephen. Wolfe, M., Andersen, R., Faulkner, D. Antibiotic Metabolites from a Marine Pseudomonad. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 11(3), 411–414, 1977.

OLGUIN-URIBE, G et al. 6-Bromoindole-3-Carbaldehyde, from an Acinetobacter Sp. Bacterium Associated with the Ascidian Stomozoa murrayi. **Journal of Chemical Ecology**. 23(11), 2507–2521, 1997.

LI, HONG-YU., Shigeki, Matsunaga., Nobuhiro, Fusetani. Simple antifungal metabolites from a marine sponge, *Halichondria* sp. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry** 107.2 261-264, 1994.

MUNEKATA, Paulo et al. Pateiro, M.; Conte-Junior, A.; Domínguez, R.; Nawaz, A.; Walayat, N.; Movilla Fierro, E.; Lorenzo, J.M. Marine Alkaloids: Compounds with *In Vivo* Activity and Chemical Synthesis. *Marine Drugs*, 19, 374, 2021.

PEREIRA, Leticia et al. Diversity and antimicrobial activity of bacteria isolated from different Brazilian coral species. **FEMS Microbiol Letters**. 1;364(16), 2017.

SANTOS, Vanessa Gomes. Estudo da atividade anti-inflamatória e toxicológica em extratos de corais do gênero *Tubastraea*. 2013. 77 f. **Dissertação (Mestrado em Biociências Nucleares; Ecologia)** - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SILVA, Amanda et al. Tubastrine, an antioxidant molecule from *Tubastraea tagusensis* sun coral, in the reversion of oxidative stress and neuron's death induced by Aβ42. **J Cell Mol Med**. 28(24):e70165, 2024.

WANG, Chao et al. Cytotoxic compounds from *Laminaria japonica*. **Chemistry of Natural Compounds**, 49(4), 699–701, 2013.

YIU, Sam King et al. Three New Species of the Sun Coral Genus *Tubastraea* (Scleractinia: Dendrophylliidae) from Hong Kong, China. **Zoological Studies**. 12;61:e45, 2022.

YIU, Sam King et al. A new species of the sun coral genus *Tubastraea* (Scleractinia: Dendrophylliidae) from Hong Kong. **Zootaxa**. 28;5047(1):1-16, 2021.

ZANOTTI, Aline Aparecida et al. The microbial profile of a tissue necrosis affecting the Atlantic invasive coral *Tubastraea tagusensis*. **Scientific Reports**. 10;11(1): 9828, 2021.

SILVA, Amanda Guilherme. Living with an enemy: Invasive sun-coral (*Tubastraea spp.*) competing against sponges *Desmapsamma anchorata* in southeastern Brazil. **Marine Environmental Research**. 174, 105559, ISSN 0141-1136, 2022.

VAUGHAN, Thomas; Wells, Jhon. Revision of the Suborders Families, and Genera of the Scleractinia. **Geological Society of America**. Vol 44, 1943.

CREED, Joel Christofer et al. The invasion of the azooxanthellate coral *Tubastraea* (Scleractinia: Dendrophylliidae) throughout the world: history, pathways and vectors. **Biological Invasions**. 19, 283–305, 2017.

CAPÍTULO 02: ALCALOIDE MARINHO DO EXTRATO DE *Tubastraea spp.* COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA EM TUMOR CEREBRAL

Danielle da Silva Fraga Gomes^{1,2}; Bruno Miranda^{1,3}; Daniel Schulz^{1,3}; Roberta da Costa Escaleira^{1,3}; Giselle Pinto de Faria Lopes^{1,2}

¹Programa associado de Pós-graduação em Biotecnologia Marinha, Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM) e Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFF), Rua Daniel Barreto s/n, Prédio Amazônia Azul, Praia dos Anjos, Arraial do Cabo, RJ, 28.930-000, Brazil

²Divisão de Bioprodutos, Departamento de Biotecnologia Marinha, Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM), Rua Kioto 253, Praia dos Anjos, Arraial do Cabo, RJ, 28.930-000, Brazil.

³Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB), Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD), Rua: Cézar Zama, 185, Lins de Vasconcelos, Rio de Janeiro, RJ, 20.725-090, Brazil.

RESUMO

O hexacoral *Tubastraea spp.* corresponde a espécies não-nativas, fonte de variadas moléculas, incluindo alcaloides. No seu extrato bruto foram identificados alcaloides que já são conhecidos por possuírem atividades farmacológicas. Os glioblastomas são os tumores mais agressivos do sistema nervoso central e estudos tem sido realizados com alcaloides como estratégia terapêutica para essa doença. Esse estudo tem como objetivo verificar o potencial antitumoral e a toxicidade do alcaloide 6-bromoindol-3-carboxaldeído, identificado no extrato de *Tubastraea spp.*, em células de GBM *in vitro*, através de cultura 2D e 3D, e verificar toxicidade do alcaloide em fases embrionárias do peixe-zebra. O alcaloide demonstrou efeito citotóxico em duas linhagens de GBM, no modelo 2D e 3D. Nos ensaios de toxicidade em embrião de peixe o alcaloide causou coagulação dos

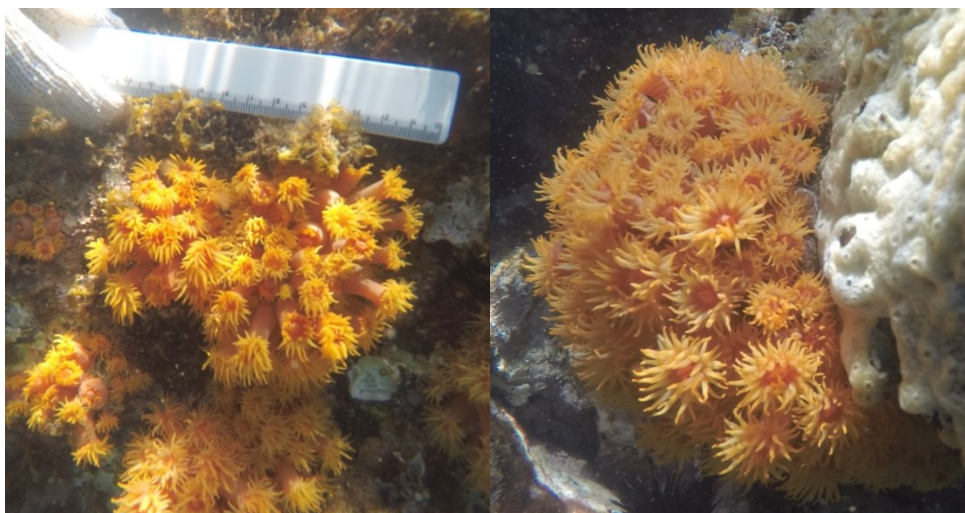
embriões nas concentrações mais altas nos tempos de exposição mais próximos a fertilização. De acordo com os resultados o alcaloide testado pode ser um futuro candidato a biofármaco no tratamento do GBM.

Palavras-chaves: GBM, espécie não-nativa, antitumoral, estratégia terapêutica.

1. INTRODUÇÃO

O ambiente marinho é um local que compreende uma variedade de organismos, esses são capazes de produzir compostos únicos com atividades biológicas potentes (Almeida *et al.*, 2021). Organismos marinhos, principalmente sésseis, são capazes de produzir metabólitos utilizados para afugentar predadores ou competir com espécies nativas quando são invasores, estes impactam a biodiversidade local e os serviços ecossistêmicos. Os corais *Tubastraea coccinea* e *Tubastraea tagusensis* popularmente conhecidos como corais-sol, invadiram habitats de recifes ao longo da costa brasileira, reduzindo drasticamente a diversidade de invertebrados e macroalgas incrustantes bentônicos, em locais onde as colônias ocupavam grandes frações do espaço disponível (Silva *et al.*, 2019). Os corais *Tubastraea* possuem diversas moléculas que já foram rastreadas e algumas testadas com relação a atividades biológicas.

Figura I: Fotos de *Tubastraea spp.* coletadas em Arraial do Cabo.



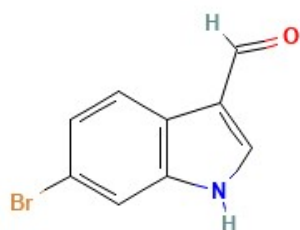
Fonte: Fraga, D., Mirra, B., Cardoso, N.

Os produtos naturais marinhos têm sido reconhecidos até agora como a fonte mais importante de substâncias bioativas de medicamentos (Walli, 2019). Produtos naturais de microrganismos e invertebrados marinhos serviram de inspiração para o design de vários medicamentos aprovados

pela FDA (Romanelli *et al.*, 2022). Wu *et al.* (2018), afirmaram que comparados aos indivíduos terrestres, os organismos marinhos oferecem um enorme potencial para a descoberta de novos alcaloides devido ao seu ambiente de alta pressão, alto teor de sal e capacidade de suportar grandes diferenciais de temperatura. Isso porque as populações marinhas representam reservatórios de novos metabólitos com diversos grupos de estruturas químicas (Khalifa *et al.*, 2019). (Altmann, 2017), esclarece que mais de 1.000 novos produtos naturais marinhos foram isolados por ano durante a última década, e afirma que ainda assim o conjunto de estruturas novas e únicas está longe de estar esgotado. Dentre os produtos naturais voltados para a área da farmacologia já descobertos inclui-se atividades antibióticas, antifúngicas, antivirais, antiparasitárias, antiinflamatórias, antioxidantes, imunomoduladoras e antitumorais significativas (Abdelmohsen *et al.*, 2017). Mais especificamente, os produtos naturais desempenham hoje um papel relevante na terapia do câncer, visto que mais de 60% dos medicamentos anticâncer atuais se originaram de fontes naturais, plantas terrestres, microorganismos ou animais marinhos (Asma *et al.*, 2022). Os produtos farmacêuticos de origem marinha começaram a impactar a farmacologia moderna e diferentes medicamentos anticancerígenos derivados de alcaloides marinhos já foram aprovados para uso clínico, tais como: citarabina, vidarabina, neverabina (pró-fármaco de ara-G), fosfato de fludarabina (pró-fármaco de ara-A), trabectedina, mesilato de eribulina, brentuximabe vedotina, polatuzumabe vedotina, enfortumabe vedotina, belantamabe mafodotina, plitidepsina e lurbinectedina (Barreca *et al.*, 2020). Um grande desafio para o desenvolvimento de terapias efetivas são os tumores do sistema nervoso central. O GBM é o tumor cerebral primário mais comum e agressivo em adultos (Wirsching *et al.*, 2016), sendo um tumor primário do cérebro definido por sua letalidade, uma vasta diversidade de estados celulares, composição de células e características fenotípicas, essas características tornam difícil encontrar terapias eficazes, (Miska; Chandel, 2023; Eisenbarth; Wang, 2024). Até o momento poucos medicamentos são aprovados pela FDA para o tratamento do GBM, o uso da temozolomida (TMZ) à terapia padrão aumenta a sobrevida média em apenas 2,5 meses,

oferecendo um baixo benefício ao paciente (Vengogi *et al.*, 2018). Devido ao seu crescimento maligno e invasão no parênquima cerebral, juntamente com a resistência à terapia, os GBMs estão entre os mais mortais de todos os cânceres, apresentando uma característica que dificulta a eficácia de terapias, por serem altamente heterogêneos tanto em níveis moleculares quanto histológicos (Chen *et al.*, 2018). Um produto natural de origem marinha atualmente em fase de teste em ensaios clínicos contra o GBM, é o Marizomibe, um inibidor de proteassoma (clinicaltrials.gov: NCT03345095). Estudos pré-clínicos demonstraram que o marizomibe pode atravessar a barreira hematoencefálica e inibir a atividade do proteassoma no cérebro de roedores e primatas não humanos e provocar um efeito antitumoral significativo em um modelo intracraniano de glioma maligno em roedores (Di K *et al.*, 2015). O alcaloide utilizado nessa pesquisa, o 6-bromoindol-3-carbaldeído, presente no extrato do coral sol, já foi anteriormente identificado em vários organismos marinhos, Carletti *et al.* (2000), como esponjas, ascídias, e bactérias (Stephen *et al.*, 1977; Rasmussen *et al.*, 1993; Liya *et al.*, 2003; Moubaxet *et al.* 2001). Os alcaloides, são compostos que incluem uma variedade de moléculas com estruturas e atividades biológicas distintas, essa grande classe de compostos possuem um átomo de nitrogênio básico, Cushnie *et al.* (2014), geralmente com um ou mais anéis heterocíclicos (heteroátomo: n) e caráter alcalino.

Figura II: Fórmula molecular do 6-bromoindol-3-carboxaldeído (C_9H_6BrNO).



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6-Bromoindole-3-carboxaldehyde>

O 6-Bromoindol-3-carboxaldeído é um composto químico com a fórmula molecular C_9H_6BrNO , sendo derivado do indol, é um composto orgânico aromático heterocíclico. O núcleo indol é um motivo estrutural comum em muitos produtos naturais e farmacêuticos, tornando derivados como este compostos significativos em vários campos de pesquisa e indústria (<https://www.benchchem.com/product/b099375>). Os alcaloides indólicos possuem uma estrutura bicíclica, que consiste em um anel benzênico (6 carbonos) acoplado a um anel de pirrol (anel de 5 membros com um nitrogênio) que são os dois anéis presentes na molécula, pode-se observar também que no anel de 6 carbonos a molécula possui um bromo na posição 6 do anel indólico o que nomeia a molécula como (6-bromoindol), na posição 3 do segundo anel indólico temos o grupo carboxaldeído que é caracterizado pela presença da carbonila ($C=O$) na extremidade do composto, sendo assim temos um 6-bromoindole-3-carboxaldehydo.

O objetivo desse estudo é utilizar um alcalóide de origem marinha já identificado no extrato bruto da *Tubastraea spp.*, um coral invasor conhecido como coral-sol, para verificar possível potencial citotóxico e antitumoral contra células de GBM nos modelos *in vitro*.

Glioma é o tipo mais comum de tumor cerebral primário, é responsável por > 70% dos tumores malignos intracranianos (Qin *et al.*, 2021). Os gliomas são caracterizados por extensa heterogeneidade nos níveis celular e molecular (Zhang *et al.*, 2013). O GBM é a forma mais comum de câncer cerebral primário em adultos, sendo uma doença de prognóstico sério. Embora um grande progresso tenha sido feito nas características moleculares, nenhum grande avanço no tratamento foi alcançado por muitos anos (Schipmann-Miletic *et al.*, 2023). Até o momento, nenhum método moderno de tratamento permite superar com eficiência o potencial maligno de neoplasias gliais e aumentando significativamente a sobrevivência dos pacientes (Belyashova *et al.*, 2022).

Nos modelos *in vitro* utilizamos duas linhagens celulares de GBM, a T98G e a U251, em modelo bidimensional e modelo tridimensional, considerando que modelos biológicos de esferóides tumorais servem como sistemas intermediários entre a cultura celular 2D tradicional e modelos

complexos *in vivo*, Oraipoulou *et al.* (2019); utilizamos o modelo 2D, menos complexo e o modelo tridimensional para verificar possível efeito de toxicidade em linhagens tumorais de GBM.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção da *Tubastraea spp.* e preparo do extrato bruto

O extrato de *Tubastraea* foi obtido em um estudo anterior do grupo de pesquisa (NOREYNI NDYAIÉ GREGO, 2019), através de mergulho, no município de Arraial do Cabo (42° 01' 40" W - 22° 57' 58" S) situado no estado do Rio de Janeiro. As coletas foram realizadas em 4 pontos diferentes na região, 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. Foram coletadas 5 indivíduos do gênero *Tubastraea spp.* 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. Após o descongelamento das amostras, 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. 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 (Jimenez *et al.*, 2003; Palanisamy *et al.*, 2016). Após a obtenção do extrato bruto o material foi armazenado a -20° para posterior uso.

2.2 Escolha do composto do extrato bruto de *Tubastraea spp.*

Em pesquisa anterior, Noyreni Grego, 2015; o extrato de Tubastraea sp. obtido em Arraial do Cabo foi testado em células de glioblastoma (U251 e T98G), apresentando efeito de toxicidade nas duas linhagens testadas. Com o mesmo extrato foi realizado também teste de toxicidade em células saudáveis de fibroblasto, no qual o extrato não foi capaz de causar toxicidade, apresentando assim um efeito seletivo. Em continuidade ao estudo realizado anteriormente, com a intenção de refinamento da pesquisa, um bioativo presente no extrato de *Tubastraea* foi escolhido para as análises apresentadas nesse estudo.

O bioativo marinho presente no extrato da *Tubastraea* spp. foi identificado e escolhido através de revisão bibliográfica de compostos já descritos neste organismo, de acordo com características favoráveis ao seu uso na pesquisa. Alguns alcaloide anteriormente descritos no organismo marinho foram submetidos aos testes. A seleção do composto foi realizada através da predição de parâmetros ADMET *in silico*, utilizando as plataformas: SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>), admetSAR (<https://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1/predict/?smiles=C1%3DCC2%3DC%28C%3DC1Br%29NC%3DC2C%3DO++&action>) e pkCSM (https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsM/prediction_single/adme_1734529562.22).

A pesquisa metodológica se baseia em investigações teóricas através de plataformas digitais *in silico*, que fornecem dados como características do composto de acordo com propriedades farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), assim como parâmetros físico-químicos. O smile da molécula foi obtido através do site de busca PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=6-Bromoindole-3-carboxaldehyde>), após a obtenção do código, este foi inserido na área de busca de propriedades farmacocinéticas nas respectivas plataformas, que forneceram as informações correspondentes a .

2.3 Obtenção do alcaloide (composto)

O alcaloide 6-bromoindol-3-carboxaldeído foi obtido comercialmente através de compra na Sigma Aldrich-666416 (nº CAS 17826-04-9).

2.4 Identificação do alcaloide marinho no extrato bruto de *Tubastraea* spp. por cromatografia

A presença do alcaloide marinho 6-bromoindol-3-carboxaldeído (**Sigma Aldrich**), no extrato bruto da *Tubastraea* spp. (Faria-Lopes *et al*, *manuscript*) foi realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O sistema utilizado foi um HPLC modular Jasco com bomba quaternária PU-2089S plus, amostrador automático AS-2059 plus, termostato de coluna CO-2060 plus, interface LC-NET II/ADC e MD-2018 plus detector de arranjo de fotodiodos (PDA), controlado pelo software ChromNAV (Jasco Corporation, Japão). As separações foram realizadas utilizando coluna Hyper Clone 250 X 4,6 mm, 5 µm, ODS (C18) 120 LC (Phenomenex, EUA), fluxo de 1 mL/min, termostato da coluna ajustado para 40 °C, 5 µL de volume de injeção e PDA ajustado para monitorar em λ : 266nm. O sistema de fase móvel consistia em água e acetonitrila. A análise iniciou com 30% de acetonitrila em condição isocrática por 0,5 min e em seguida iniciou-se um gradiente linear, atingindo 90% de acetonitrila em 40 min.

2.5 Cultura celular em modelo 2D e 3D

Para o modelo 2D, foram utilizadas as células T98G e U251 de GBMs humanos. As linhagens 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. 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). Foram então semeadas em placas de 96 poços na densidade de 4×10^3 / poço e incubadas a 37°C por 24 horas em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂. Após 24 horas as células foram cultivadas com concentrações crescentes de 6-bromoindol-3-carboxaldeído (1, 10, 100 e 1000 µM) por 72 horas. O alcaloide foi dissolvido anteriormente aos testes, em uma solução estoque em 100% de dms, no

dia dos testes as concentrações eram preparadas utilizando meio DMEM/F-12 (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco - Gibco para a diluição, mantendo a concentração final de 0,5% de DMSO, o controle foi constituído de células incubadas apenas com o veículo DMSO na concentração de 0,5%.

Para o modelo 3D foram utilizadas as mesmas culturas de células, cultivadas e preparadas da mesma forma, porém no modelo de esferoide as células destacadas foram distribuídas em placas de 96 poços contendo 1% de agarose na densidade de 4×10^3 / poço. Após 3 dias, os esferoides formados foram tratados com concentrações crescentes de 6-bromoindol-3-carboxaldeído (1,10,100 e 1000 μ M) por 96 horas.

2.6 Ensaio da fosfatase ácida em modelo 3D

Para ensaio de citotoxicidade em modelo 3D utilizamos a técnica da dosagem da atividade da fosfatase ácida por espectrofotometria (Friedrich *et al.*, 2007). Após 96h de incubação com 6-bromoindol-3carboxaldeído, os esferóides foram lavados duas vezes com PBS. Em seguida, o tampão contendo acetato de sódio 0,1 M, Triton-X-100 a 0,1%, e o fosfato de p-nitrofenil(Sigma-Aldrich), foram adicionados por poço e incubados por 90min a 37 ° C. Após a incubação, 10 μ L de NaOH foram adicionados em cada poço e após 10 minutos a densidade ótica foi mensurada a 405nm através de espectrofotometria. A atividade da fosfatase ácida foi convertida em porcentagem, considerando a densidade ótica das células controle como 100%. A morfologia celular em cada condição experimental foi fotografada através de microscópio ótico em contraste de fase (Zeiss, PrimoVert 99C). Foram realizados 3 experimentos independentes feitos com cinco réplicas.

2.7 Ensaio de atividade mitocondrial em modelo 2D

Para o ensaio de citotoxicidade em modelo 2D utilizamos a técnica de dosagem da atividade mitocondrial convertendo o sal brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT)(5mg/mL) em cristal de formazan (Mosmann, 1983). Ao término da incubação de 72h com 6-bromoindol-

3carboxaldeído, foi retirado todo o meio de cultura da placa, os poços foram lavados 2 vezes com pbs estéril à 37° e adicionado 100µl de MTT(0,5mg/mL) por poço, as placas foram incubadas na estufa durante 2hrs. Após o término do tempo de incubação com o alcaloide, as células foram lavadas com DMSO (100µl), e a densidade ótica foi mensurada a 570 nm no espectrofotômetro (ThermoFisher). A atividade mitocondrial foi convertida em porcentagem, considerando a densidade ótica das células controle como 100%. A morfologia celular em cada condição experimental foi fotografada através de microscópio ótico em contraste de fase (Zeiss, PrimoVert 99C). Foram realizados 3 experimentos independentes feitos com cinco réplicas.

2.8 Ensaio dos fluorocromos DCFHDA, laranja de acridina e 7-AAD em modelo 2D

O método de quantificação de espécies reativas de oxigênio através do fluoróforo diacetil-diclorofluoresceína (DCFHDA, 35845, Sigma-Aldrich), é baseado na oxidação de diacetil-dicloro-fluoresceína não fluorescente a um composto fluorescente por peróxido de hidrogênio e peroxidase. Este fluoróforo emite fluorescência quando oxidado pelo peróxido de hidrogênio, resultando na formação de diclorofluoresceína (KESTON *et al.*, 1965). Laranja de acridina (AO), é um fluoróforo verde permeável a células que pode ser protonado e preso em organelas vesiculares ácidas (AVOs), medindo autofagia. Sua mudança metacromática para fluorescência vermelha é dependente da concentração e, portanto, laranja de acridina fluoresce vermelho em AVOs, como autolisossomos (Thomé *et al.*, 2016). 7-AAD (7-aminoactinomycin D), é um agente fluorescente de ligação de DNA (intercalante entre bases de citosina e guanina), usado para estudar células apoptóticas, excitado a 488 nm, normalmente usado para detectar fluorescência vermelha. (Gaforio, *et al.*, 2002). 7-AAD é impermeável às membranas de células vivas, penetra em células mortas ou danificadas, se ligando ao DNA fita dupla com alta afinidade por intercalação entre pares de bases GC, quando usado com detergente (tween), pode ser utilizado como um marcador de proliferação celular (Murata *et al.*, 2001). Para os ensaios de fluorocromos utilizamos as células T98G, no modelo 2D, na

concentração de 200uM de 6-bromoindol-3-carboxaldeído, em 24h de tratamento. Foram plaqueadas 750mil células em duas placas de petri com 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, as placas foram incubadas em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂ por 24h estufa à 37° por 24h. Após 24h, o meio das placas foi trocado e uma das placas recebeu o tratamento com o 6-bromoindol-carboxaldeído diluído com 0,5% de dmso, a placa controle recebeu o meio de cultura com 0,5% de dmso, as placas foram incubadas novamente por 24h. Após o tratamento, as células eram destacadas das placas, lavando-se com tampão fosfato (PBS - Sigma-Aldrich) e utilizando-se uma solução de 0,25% de tripsina/EDTA 2mM (Sigma-Aldrich) por 3 minutos à 37°. As células após centrifugação foram resuspendidas em 600uL de pbs e distribuídas em 5 ependorfs diferentes, cada um contendo 100 mil células, com: 50uM de DCF, o qual foi incubado à 37° por 30 minutos, e a intensidade da fluorescência foi medida em quintuplicata com filtro de excitação de 475nm e de emissão de 550-550nm (verde). 5mg/mL de LA, incubado à 37° por 30 minutos, e a intensidade da fluorescência foi medida em quintuplicata com filtro de excitação de excitação de 475nm e emissão de 500-550 para células viáveis (verde) e filtro de excitação 475nm e emissão de 580-640 para células acidificadas (vermelho). 10ug/mL de 7AAD, com 0,1% de detergente tween, incubado à 37° por 30 minutos, e a intensidade da fluorescência foi medida em quintuplicata com filtro de excitação de 475nn e emissão de 580-640nm (vermelho). Todas as leituras foram realizadas utilizando o espectrofluorímetro Glomax (Invitrogen). Amostras sem a adição dos fluoróforos foram empregadas como controle de autofluorescência, os resultados foram expressos em Intensidade de Fluorescência (IF). Todas as amostras foram semeadas em lâminas para fotografia e análise da fluorescência em microscópio de fluorescência Olympus, BX51.Foi realizado 1 experimento independente em quintuplicata.

2.9 Ensaio de toxicidade *in vivo*

O teste de toxicidade aguda em embrião de peixe zebra (FET,

adaptado de OECD-Test No. 236: *Fish Embryo Acute Toxicity Test*), foi realizado utilizando embriões em diferentes tempos após a fertilização para comparação de possíveis diferenças na sensibilidade dos embriões submetidos em momentos diferentes do desenvolvimento. Foram utilizados 15 embriões por condição, com 2-4, 4-6, 8-10 e 12 horas pós fertilização(hpf), foram tratados com 6-bromoindol-3carboxaldeído, alcaloide marinho, em crescentes concentrações (1, 10, 100 e 1000 μ M) durante 24h e 48 horas pós-tratamento (hpt). Os controles foram constituídos de água do aquário, e água do aquário com veículo DMSO a 0,5%, foram utilizados nos grupos controle a mesma quantidade de embriões dos grupos que receberam tratamento, e os embriões dos grupos controle foram comparados com os grupos tratados. Todos os embriões mortos durante o experimento foram eliminados da placa a fim de evitar contaminação. As alterações foram identificadas em relação aos embriões em meio controle, foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata cada. As concentrações utilizadas para o ensaio FET foram as mesmas utilizadas nas células de GBM para o ensaio *in vitro* e *in vivo*. As seguintes análises morfológicas foram realizadas através de observação e obtenção de imagens por condição experimental, em microscópio invertido (Zeiss, PrimoVert99C), em 24 e 48h após o tempo de tratamento. Análises das características que definem pontos letais: Coagulação do embrião, cauda não separada, sem formação de somitos, sem batimentos cardíacos. Características que definem pontos de desenvolvimento subletais: Conclusão da gástrula, formação de somitos, desenvolvimento dos olhos, movimento espontâneo, batimento cardíaco/circulação sanguínea, frequência dos batimentos cardíacos, pigmentação, formação de edema. Características que definem pontos de teratogenicidade são: Malformação da cabeça, malformação de sáculos/otólitos, má-formação da cauda, má-formação do coração, escoliose, raquitismo, deformação do vitelo, retardo geral de crescimento, comprimento da cauda (Lammer *et al.*, 2009).

2.10 Análises estatísticas

Os dados de toxicidade foram inicialmente analisados quanto à normalidade através dos testes de Shapiro-Wilk, D' Agostino & Pearson, Kolmogorov-Smirnov e Anderson-Darling. Os resultados com valores não-paramétricos foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn relativo ao controle e representados através da mediana (min-max). Esses testes e a concentração inibitória média (IC50) do 6-bromoindol-3-carboxaldeído nas células foi calculada através do *software GraphPad Prism 9.0*. Os resultados foram considerados significativos quando o valor de P foi $\leq 0,05$. Os dados da análise dos fluorocromos foram analisados quanto a normalidade através dos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov, os resultados com valores paramétricos foram analisados através de teste T com correlação de Welch's.

3. RESULTADOS

3.1 Escolha do composto presente no extrato bruto de *Tubastraea spp.*

A revisão bibliográfica mostrou atividade antiincrustante, antioxidante e anfúngica do composto identificadas previamente.

As análises *in silico* apontaram para características importantes relativas a propriedades físico-químicas e farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade). Algumas características foram apresentadas por mais de uma ferramenta. A tabela abaixo (Tab.1) mostra algumas características características do composto analisadas em três plataformas diferentes:

Tabela I: Características físico-químicas e propriedades farmacocinéticas apresentadas pelas plataformas SwissADME, admetSAR e pkCSM.

	SwissADME	admetSAR	pkCSM
Propriedades físico-químicas			
Massa molecular			
Aceptores de hidrogênio			
Doadores de			
	Aprovado/Lipinski		

hidrogênio

Lipofilicidade

Refratividade molar

Lipossolubilidade Aprovado

Tamanho Aprovado

Insolubilidade Aprovado

Polaridade Aprovado

Flexibilidade Aprovado

Insaturação Reprovado

**Propriedades
farmacocinéticas**

Absorção	Alta absorção gastrointestinal (GI)	Alta absorção gastrointestinal (GI)	Alta absorção gastrointestinal (GI)
	Não substrato glicoproteína P (P-gp)	Não substrato glicoproteína P (P-gp)	Não substrato glicoproteína P (P-gp)

Distribuição	Permeável a BHE	Permeável a BHE
---------------------	-----------------	-----------------

	Inibidor CYP 1A2	Inibidor CYP 1A2
Metabolismo	Não inibidor CYP 1A2, C19, 2C9, 2D6, 3A4	Não inibidor CYP 1A2, C19, 2C9, 2D6, 3A4

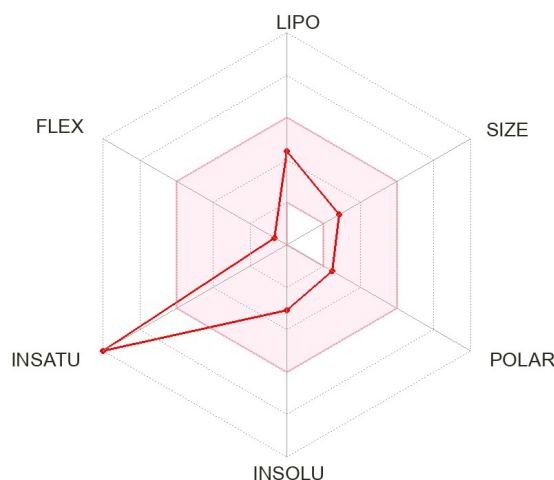
Toxicidade	Negativo teste AMES
	Não carcionogênico

Fonte: Autoria própria.

O filtro de Lipinski foi utilizado através da ferramenta SwissADME que prevê semelhança do composto com possíveis fármacos através de propriedades farmacocinéticas (físico-químicas) específicas. 5 parâmetros são avaliados: como massa molecular, número de aceptores de ligação de hidrogênio (ALH), número de doadores de ligação hidrogênio (DLH), alta lipofilicidade e a refratividade molar. O 6-bromoindol-3-carboxaldeído não violou os parâmetros do filtro de Lipinski, o que sugere uma boa biodisponibilidade oral do composto.

O gráfico abaixo foi gerado pela ferramenta SwissADME. O 6-bromoindol-3-carboxaldeído quando analisado através do gráfico radar de biodisponibilidade (bioavailability radar), apresentou-se dentro dos valores esperados para 5 parâmetros, estes podem ser observados pela linha delimitada dentro da área rosa, são esses (lipossolubilidade entre -0,7 e 5, volume molar (tamanho) entre 150 e 500g/mol, área de superfície polar (PSA) (polaridade) entre 20 e 130 $\text{\AA}^2$), Log S (insolubilidade) entre 0 e 6 e flexibilidade (número de rotâmeros entre 0 e 9) e insaturação, que prevê a quantidade de insaturações ideais da molécula (entre 0,25 e 1), para insaturação o composto ficou fora do valor ideal, representado pela linha vermelha na área branca do gráfico (Figura 3).

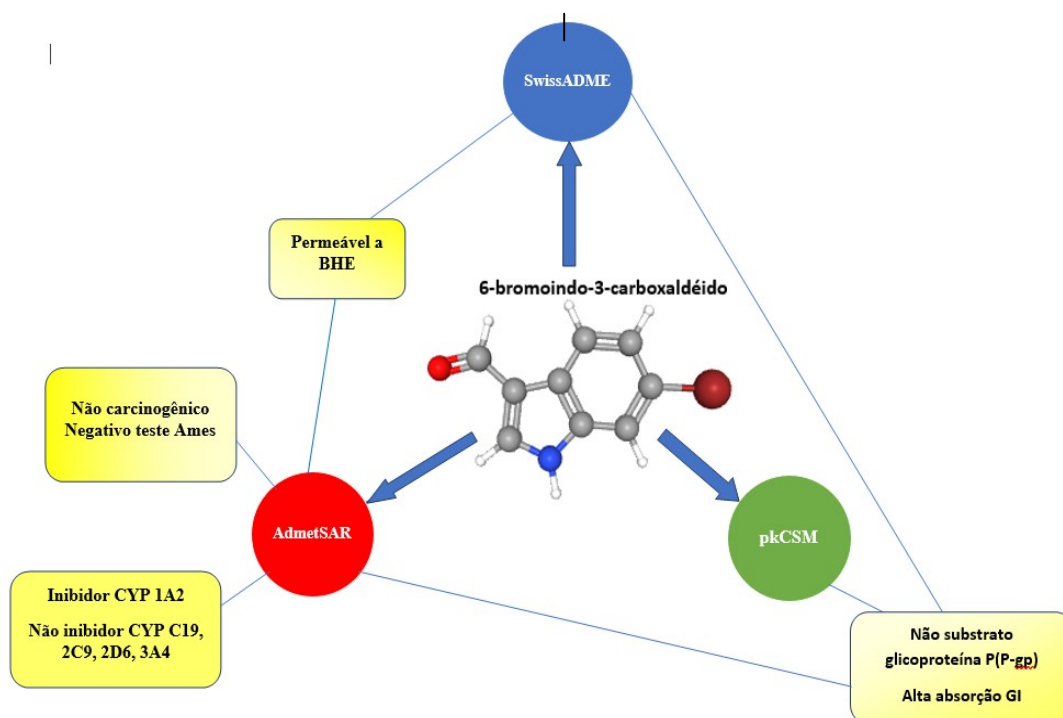
Figura III: Gráfico radar de biodisponibilidade gerado pela ferramenta de análise *in silico* SwissADME.



Fonte: <http://www.swissadme.ch/index.php>

Com relação a propriedades farmacocinéticas, as três plataformas apontaram o 6-bromoindol-3-carboxaldeído como não constituindo um substrato para a glicoproteína P(p-gp), e apresentando-se com alta absorção gastrointestinal (GI). SwissADME e admetSAR apontaram o composto como permeável a BHE (Fig. 5). Das três ferramentas utilizadas, a ferramenta pkCSM apresenta apenas parâmetros relativos a absorção. Com relação a metabolização de moléculas pela família de enzimas do citocromo P450 (CYP), as plataformas SwissADME e admetSAR, indicaram que o 6-bromo indol-3-carboxaldeído é capaz de inibir apenas 1 (CYP 1A2), das 5 enzimas (CYP 1A2, C19, 2C9, 2D6, 3A4) do citocromo. A plataforma admetSAR indicou sobre a toxicidade mostrando que o composto é negativo para o teste Ames e não carcinogênico (Figura 4).

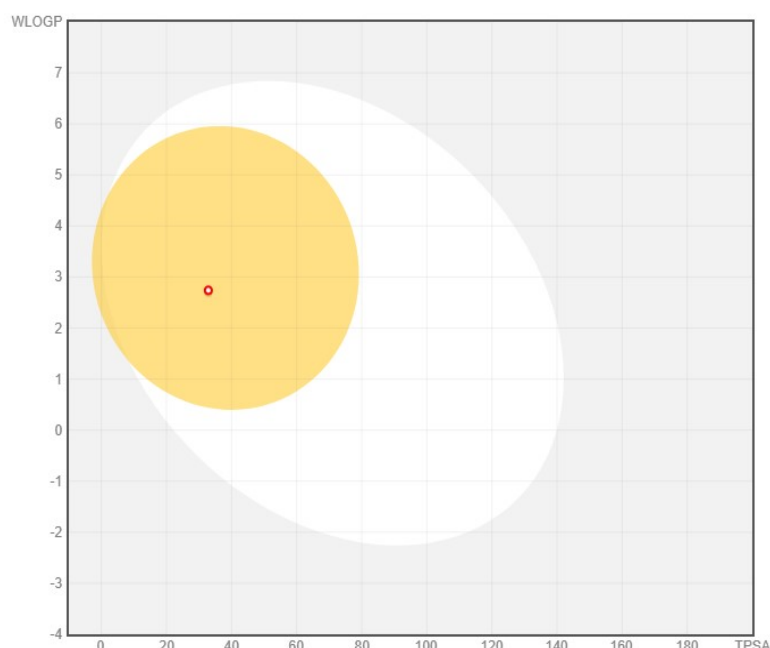
Figura IV: Fluxograma exibindo as características farmacocinéticas relativas ao 6-bromoindol-3-carboxaldeído, apresentadas por três plataformas de ferramentas de dados *in silico*: SwissADME, admetSAR e pkCSM.



Fonte: <http://www.swissadme.ch/index.php>

O modelo de gráfico ovo cozido (boiled-egg), na ferramenta SwissADME prevê a absorção gastrointestinal passiva (GI) e a permeação da barreira hematoencefálica (BHE). Esse modelo preditivo, é capaz de realizar estas previsões a partir de cálculos de correlação entre os valores de área de superfície polar (PSA) e coeficiente de partição (LogP). A área branca do gráfico indica a absorção gastrointestinal passiva e a área amarela indica permeação cerebral, as moléculas previstas como não absorvidas pelo GI e BBB não permeáveis estão localizadas na área cinza ou ainda mais fora do intervalo do gráfico. O 6-bromoindol-3-carboxaldeído se apresentou dentro da área de conjunto branca e amarela (gema), demonstrado pelo ponto vermelho, indicando que a molécula possui uma alta probabilidade de cruzamento da BHE e absorção GI (Figura 5).

Figura V: Gráfico de ovo cozido (boiled-egg), gerado pela ferramenta de análise *in silico* SwissADME.



Fonte: <http://www.swissadme.ch/index.php>

3.2. Identificação do 6-bromoindol-3-carboxaldeído no extrato bruto de *Tubastraea* spp.

Para comprovação da presença do alcaloide marinho no extrato de coral sol que possuíamos e que fora obtido para pesquisa anterior do grupo no qual testou-se o extrato em células de GBM, realizamos uma análise de HPLC fornecendo o 6-bromoindol-3-carboxaldeído como padrão. Dentre os picos apresentados no cromatograma, o extrato de *Tubastraea* spp. apresentou pico eluindo no mesmo tempo de retenção (TR) do padrão 6-bromoindol-3-carboxaldeído, o espectro ultravioleta (UV) desses picos também apresentou o mesmo formato (Figura 6).

A análise de HPLC mostrou que o extrato bruto do coral-sol através do comparativo com o padrão (6-bromoindol-3-carboxaldeído) apresentou o mesmo espectro do comprimento de onda (em 266nm), assim como o tempo de retenção próximo de 10 minutos nas duas amostras foi próximo, indicando a presença do alcaloide marinho no extrato fornecido na análise.

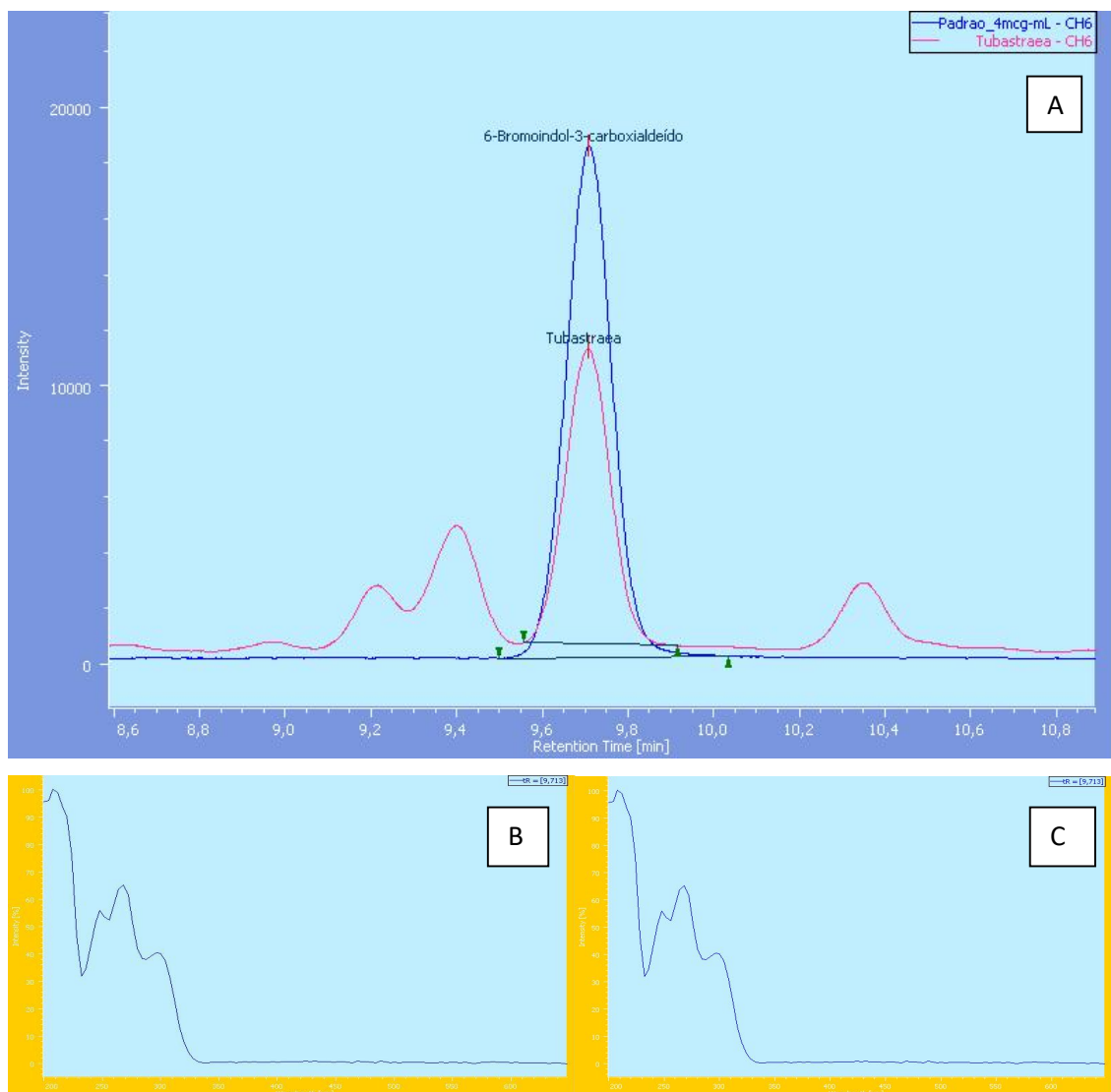


Figura 6. Análises cromatográficas do extrato de *Tubastraeaspp.*(a) Tempo de retenção do padrão (6-bromoindol-3-carboxaldeído) e da amostra do extrato de *Tubastraeaspp.* em $\cong 10$ minutos. Tempo de retenção do padrão (6-bromoindol-3-carboxaldeído 0,5mg/mL-266nm por cromatografia líquida. E Análise por cromatografia líquida de alta eficiência,demonstrando espectro do comprimento de onda em 266nm (b) do padrão (6-bromoindol-3-carboxaldeído) e do (c) extrato bruto de *Tubastraea spp.*

3.3 Potencial citotóxico do 6-bromoindol-3-carboxaldeído em modelo 2D de GBM

Investigamos o potencial do 6-bromoindol-3-carboxaldeído com relação a possível potencial citotóxico em modelos de cultura celular 2D. O tratamento das células com 6-bromoindol-3-carboxaldeído foi testado nas linhagens T98G e U251 nas concentrações crescentes: controle, 1, 10, 100 e 1000 μ M. Após 72 horas de tratamento, foi observada uma resposta de IC50

na atividade mitocondrial das células T98G=139 μ M (Fig. 7a), e diferença significativa entre o controle e a concentração de 1000 μ M. A figura 7 (b,c,d,e,f), mostraram as alterações morfológicas de maneira dose dependente observadas através de microscopia de contraste de fase em que nas concentrações de 100 μ M e 1000 μ M foram observadas células mortas e suspensas (Fig.7 e,f).

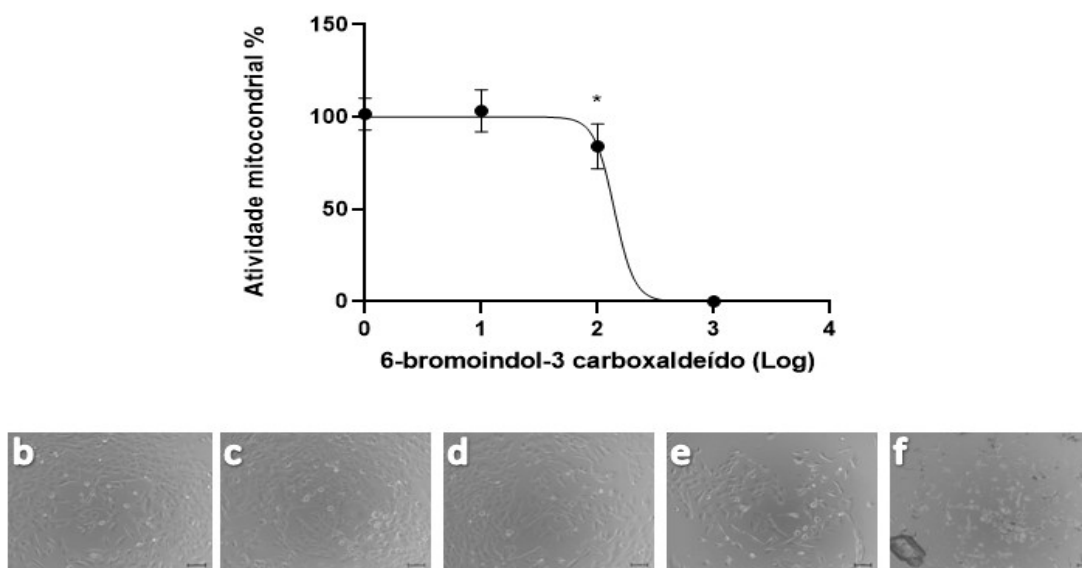


Figura 7. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica do 6-bromoindol-3-carboxaldeído em células T98G in modelo 2D. Morfologia do contraste de fase e viabilidade de células de GBM, (a) IC50 (139 μ M), (b)controle, (c)1 μ M, (d)10 μ M (e)100 μ M e (f)1000 μ M, cultura de células tratadas com 6-bromoindol-3-carboxaldeído após 72 horas de tratamento através do método MTT. Cada gráfico é representativo de 3 experimentos independentes feito em quintuplicata, sendo a mediana $\pm$ distribuição (min-max). Estatística realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis* com pós teste de Dunn relativo ao controle; * $P \leq 0,05$. Fotografia em microscópio de contraste de fase. Magnificação: 4x.

Após 72 horas de tratamento, foi observada uma resposta de IC50 na atividade mitocondrial das células U251=359 μ M (Fig.8a), porém não foi apresentado diferença significativa entre o controle e a concentração de 1000 μ M. A figura 8 (b,c,d,e,f) mostrou as alterações morfológicas de maneira dose-dependente observadas através de microscopia de contraste de fase em que nas concentrações de 100 μ M e 1000 μ M foram observadas células mortas e suspensas (Fig.8 e,f).

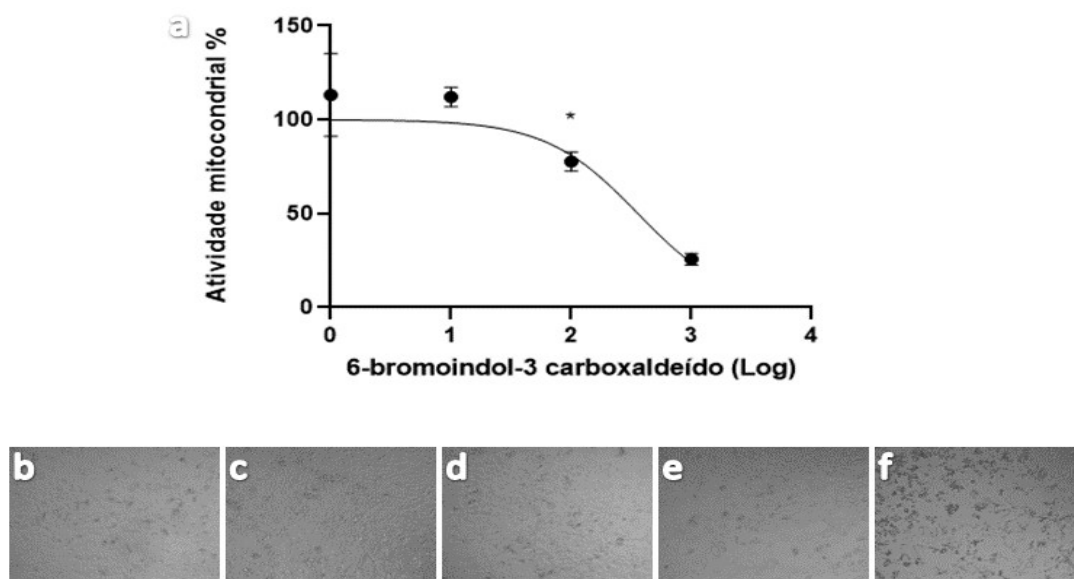


Figura 8. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica do 6-bromoindol-3-carboxaldeído em células U251 in modelo 2D. Morfologia do contraste de fase e viabilidade de células de GBM, (a) IC50 (359μM), (b), (c), (d), (e) e (f) cultura de células tratadas com 6-bromoindol-3-carboxaldeído após 72 horas de tratamento através do método MTT. Cada gráfico é representativo de 3 experimento independentes feito em quintuplicata, sendo a mediana $\pm$ distribuição (min-max). Estatística realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis* com pós teste de Dunn relativo ao controle; * $P \leq 0,05$. Fotografia em microscópio de contraste de fase. Magnificação: 4x.

Após 72 horas de tratamento, foi observada uma resposta de inibição nas duas linhagens, T98G de 139μM, e nas células U251 a IC50 apresentada foi de 359μM. Alterações morfológicas de maneira dose-dependente foram observadas através de microscopia de contraste de fase nas duas linhagens celulares, em que nas concentrações de 100μM e 1000μM foram observadas menor concentração de células vivas e aderidas se comparadas ao controle. Observou-se que o tratamento causou uma redução significativa na atividade mitocondrial de ambas as linhagens celulares com IC50 entre 100 e 1000μM, porém com valor mais altos na linhagem U251.

3.4 Potencial citotóxico do 6-bromoindol-3-carboxaldeído em modelo 3D de GBM.

Investigamos o potencial do 6-bromoindol-3-carboxaldeído com relação a possível potencial citotóxico em modelos de cultura celular 3D. O tratamento de esferoides de GBM com 6-bromoindol-3-carboxaldeído foi

testado nas linhagens T98G e U251 nas concentrações crescentes: controle, 1, 10, 100 e 1000 μM . O alcaloide marinho causou uma redução significativa na atividade da fosfatase ácida detectada através da leitura de espectrofotometria.

Após 96 horas de tratamento, foi observada uma resposta na atividade da fosfatase ácida (Figura 9), dos esferoides T98G, que apresentaram uma IC_{50} de $479 \pm (264-1067) \mu\text{M}$, e diferença significativa entre o controle e a concentração de 1000 μM .

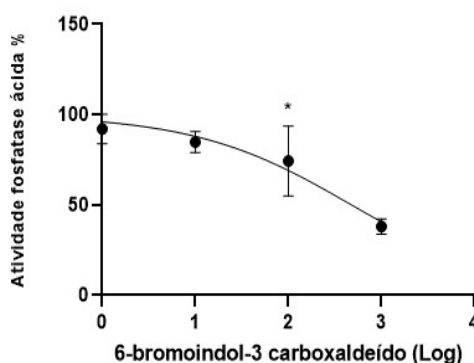


Figura 9. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica do 6-bromoindol-3-carboxaldeído em células T98G em modelo 3D. Viabilidade de células de GBM tratadas em concentrações crescentes (Controle, 1, 10, 100 e 1000 μM) após 96 horas de tratamento através da dosagem da atividade da fosfatase ácida. IC_{50} da atividade da fosfatase ácida ($479 \mu\text{M}$) (198 ± 650). Os gráficos são representativos de 3 experimentos independentes feitos em quintuplicata, sendo a mediana $\pm$ faixa (distribuição min-max). Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn relativo ao controle; * $P \leq 0,05$.

Os esferoides da linhagem U251 foram submetidos às mesmas concentrações das células T98G e após 96 horas de tratamento, foi observada uma resposta na atividade da fosfatase ácida (Figura 10), os esferóides U251 apresentaram IC_{50} de $1000 \pm (872-1956) \mu\text{M}$ e diferença significativa entre o controle e a concentração de 1000 μM .

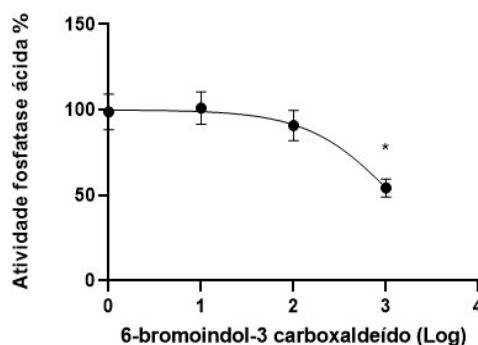


Figura 10. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica do 6-bromoindol-3-carboxaldeído em células U251 em modelo 3D. Viabilidade de células de GBM tratadas em concentrações crescentes (controle, 1, 10, 100 e 1000 μ M) após 96 horas de tratamento através da dosagem da atividade da fosfatase ácida. (a) IC₅₀ da atividade da fosfatase ácida (1000 μ M) (872 $\pm$ 1956). Os gráficos são representativos de 3 experimentos independentes feitos em quintuplicata, sendo a mediana $\pm$ faixa (distribuição min-max). Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn relativo ao controle; * $P \leq 0,05$.

As duas linhagens (T98G e U251) mostraram IC₅₀ entre 100 e 1000 μ M, a linhagem das células T98G se mostrou mais sensível ao teste com um valor de IC₅₀ menor. O teste de Kruskal wallis com pós teste Dunn's apresentou diferença significativa nas duas linhagens, entre o controle e a maior concentração.

3.5 Avaliação de espécies reativas de oxigênio através do fluorocromo DCFHDA.

Na quantificação de EROs nas células através do fluorocromo DCFHDA, o tratamento das células de GBM *in vitro* no modelo 2D foi testado na linhagem T98G com 6-bromoindol-3-carboxaldeído na concentração controle (0 μ M), comparada ao tratado 200 μ M, após 24h de tratamento. O alcaloide marinho causou um aumento significativo nas EROs nas células tratadas, detectada através do aumento da fluorescência por espectrofluorimetria (** $p < 0,01$).

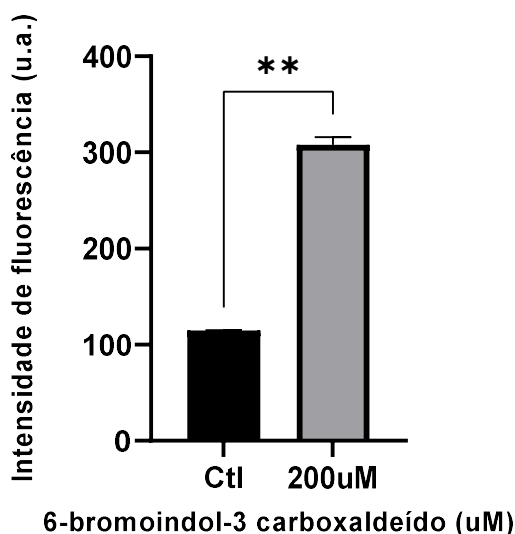


Figura 11. Avaliação *in vitro* do estresse oxidativo (EROs), das células T98G expostas ao 6-bromoindol-3-carboxaldeído, em modelo 2D. Células de GBM controle (0uM) e tratadas (200uM) após 24 horas de tratamento através da quantificação de EROs por espectrofluorimetria. Intensidade de fluorescência (u.a.), excitação de 470nm e emissão de 550-550nm (verde). O gráfico é representativo de 1 experimento independente feito em quintuplicata. Dados representados pela media $\pm$ desvio padrão através do teste t com correlação de Welch's, **p<0,01.

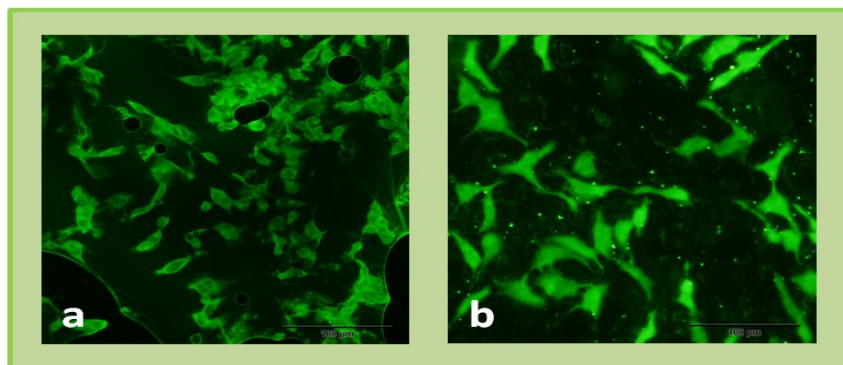


Figura 12. Fotografia das células T98G expostas ao 6-bromoindol-3-carboxaldeído, em modelo 2D (EROs). Identificação de EROs por espectrofluorimetria, fluorocromo DCFHA. (a) células de GBM controle, (b) células de GBM tratadas (200uM), após 24h de tratamento. Intensidade de fluorescência (u.a.), excitação de 470nm e emissão de 550-550nm (verde). Os gráfico é representativos de 1 experimento independente feito em quintuplicata. Microscópio de fluorescência Olympus, BX51, aumento de 20x.

3.6 Avaliação da proliferação celular através do fluorocromo 7-AAD

Na avaliação do fluoróforo 7-AAD, que permite a marcação da proliferação celular, o tratamento das células de GBM *in vitro* no modelo 2d foi testado na linhagem T98G com 6-bromoindol-3-carboxaldeído na

concentração controle (0uM), comparada ao tratado (200μM), após 24h de tratamento. O alcaloide marinho causou uma diminuição significativa da proliferação celular nas células tratadas, detectada através da diminuição da fluorescência através da espectrofluorimetria(** $p < 0,001$).

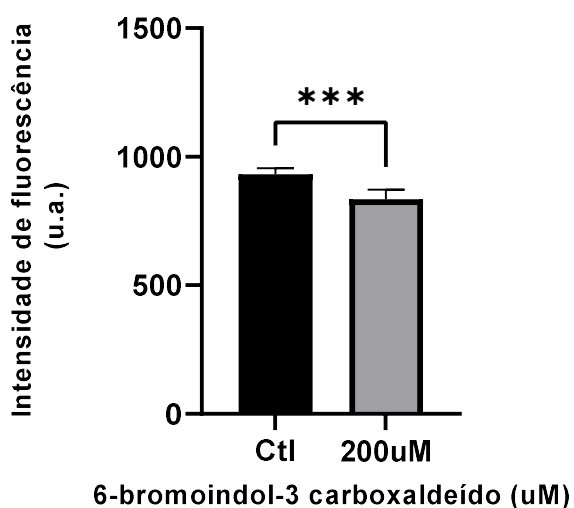


Figura 13. Avaliação *in vitro* da proliferação celular, das células T98G expostas ao 6-bromoindol-3-carboxaldeído, em modelo 2D. Células de GBM controle (0uM) e tratadas na concentração de 200uM após 24 horas de tratamento, quantificação da proliferação celular através da fluorescência por espectrofluorimetria, 475nm e emissão de 580-640nm (vermelho). Intensidade de fluorescência (u.a.). O gráfico é representativo de 1 experimento independente feito em quintuplicata. Dados representados pela media $\pm$ desvio padrão através do teste t com correlação de Welch's, *** $p < 0,001$.

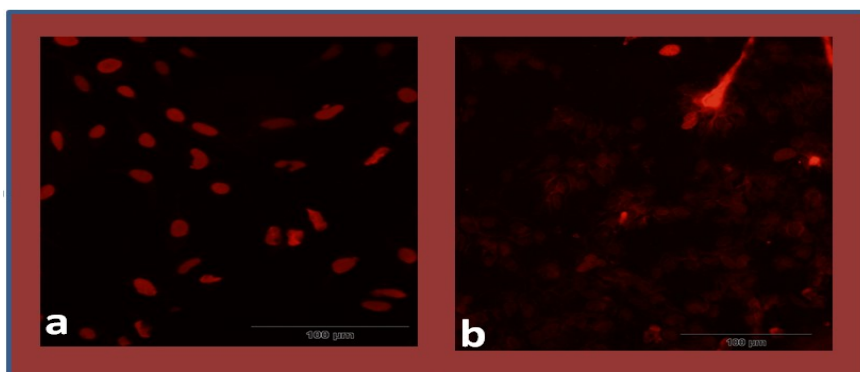


Figura 14. Fotografia das células T98G expostas ao 6-bromoindol-3-carboxaldeído em modelo 2D. Proliferação celular marcada por fluorocromo 7AAD, leitura por espectrofluorimetria. (a) Células de GBM controle, (b) células de GBM tratadas (200uM), após 24h de tratamento. Intensidade de fluorescência, 475nm e emissão de 580-640nm (vermelho). O gráfico é representativo de 1 experimento independente feito em quintuplicata. Microscópio de fluorescência Olympus, BX51, aumento de 20x.

3.7 Avaliação da autofagia e viabilidade celular através do fluorocromo laranja de acridina

Na avaliação do fluoróforo AO (laranja de acridina), que mede autofagia, o tratamento das células de GBM *in vitro* no modelo 2D, foi testado na linhagem T98G com 6-bromoindol-3-carboxaldeído na concentração controle (0uM), comparada ao tratado (200μM), após 24h de tratamento. O alcaloide marinho não causou alteração significativa da acidificação e autofagia nas células tratadas.

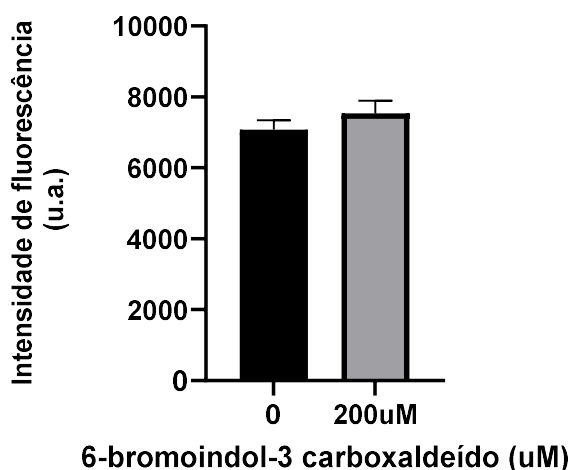


Figura 15. Avaliação *in vitro* da autofagia celular, das células T98G expostas ao 6-bromoindol-3-carboxaldeído, em modelo 2D. Células de GBM controle (0uM) e tratadas na concentração de 200uM após 24 horas de tratamento, quantificação da acidificação celular através da fluorescência por espectrofluorimetria, excitação de 580 a 640nm (vermelho). Intensidade de fluorescência (u.a.). O gráfico é representativo de 1 experimento independente feito em quintuplicata. Dados representados pela média±desvio padrão através do teste t com correlação de Welch's.

Na avaliação do fluoróforo AO (laranja de acridina), que detecta células viáveis, o tratamento das células de GBM *in vitro* no modelo 2D foi testado na linhagem T98G com 6-bromoindol-3-carboxaldeído na concentração controle (0uM), comparada ao tratado (200μM), após 24h de tratamento. O alcaloide marinho não causou diferença significativa entre células do controle e do tratamento.

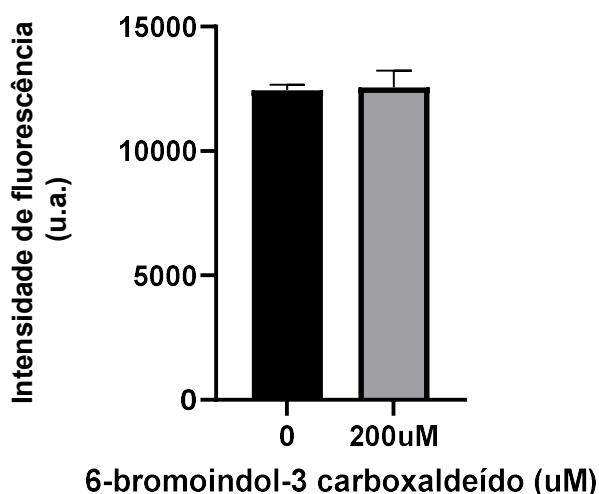


Figura 16. Avaliação *in vitro* da viabilidade celular, das células T98G expostas ao 6-bromoindol-3-carboxaldeído, em modelo 2D. Células de GBM controle (0uM) e tratadas na concentração de 200uM após 24 horas de tratamento, quantificação da viabilidade celular através da fluorescência por espectrofluorimetria, filtro de excitação de 500-550nm para células viáveis (verde), através do fluorocromo laranja de acridina. Intensidade de fluorescência. O gráfico é representativo de 1 experimento independente feito em quintuplicata. Dados representados pela media $\pm$ desvio padrão através do teste t com correlação de Welch's.

Nos testes realizados com os fluorocromos foram utilizados somente as células T98G. O 6-bromoindol-3-carboxaldeído, causou um aumento significativo nas espécies reativas de oxigênio nas células T98G, detectado através da quantificação do fluoróforo (DCFHDA) na concentração de 200uM, quando comparado ao controle (0uM) (Fig.11), com nível de significância de ($p < 0,01$). Na fotografia das células onde é possível visualizá-las através da fluorescência verde, as células do controle (Fig.12a) aparecem em menor quantidade e com a fluorescência de menor intensidade, aparentemente algumas estruturas da lâminas também parecem fluorescer na imagem. As células da concentração tratada (Fig.12b), aparecem mais definidas e brilhantes, indicando que houve o aumento nas ROS e consequente fluorescência como indica o gráfico quantitativo. O 6-bromoindol-3-carboxaldeído causou a diminuição da proliferação celular na concentração de 200uM quando comparado ao controle (Fig. 13), após 24h de tratamento, detectado através da quantificação da fluorescência do fluorocromo 7AAD, com nível de significância de ($***p < 0,001$). Na fotografia das células, onde é possível visualizá-las através da fluorescência vermelha, as células do controle

(Fig.14a) aparecem em maior quantidade e bem definidas pela marcação do fluorocromo, nas células tratadas (Fig.14b) é possível visualizar poucas células marcadas em vermelho. Nos testes nos quais foram utilizados o fluorocromo AO, a quantificação não apresentou diferença significativa entre o controle e o tratado, nem para células acidificadas (Fig.15), nem para células viáveis (Fig.16). Obs: As fotografias da fluorescência de AO, não apresentaram resultado satisfatório, portanto não foram apresentadas neste documento.

3.8 Teste de toxicidade em embrião de peixe zebra

No teste de toxicidade em embriões de peixe-zebra, os embriões foram submetidos às concentrações em diferentes tempos após a fertilização. Na figura abaixo (Fig.17), vemos os embriões expostos ao alcaloide no tempo de 2-4hpf, a(controle), b(controle+dms), c(1 μ M), d(10 μ M) e (100 μ M), f(1000) μ M, foram fotografados com 24h após o tratamento. Os embriões g(Controle), h(controle+dms), i(1 μ M), j(10 μ M) que aparecem nas imagens são os mesmos embriões porém foram fotografados 48h pós tratamento. Os embriões submetidos às concentrações de 100 e 1000 μ M morreram/coagularam, nas primeiras 24h de experimento, apresentando características de letalidade nessas concentrações. Os embriões nas concentrações de 1 e 10 μ M foram comparados com o controle, e com o controle+dms e não apresentaram deformidades morfológicas em até 48h após o tratamento.

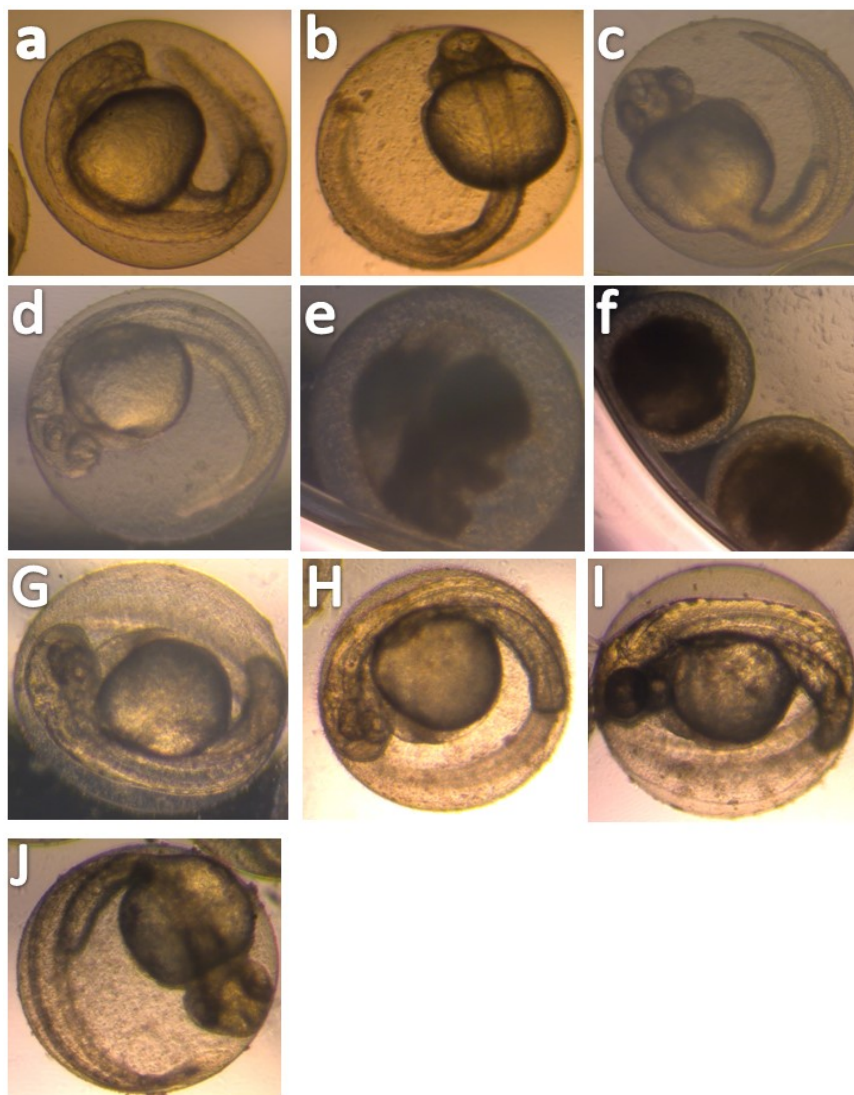


Figura 17. Embriões de Peixe-zebra, a(Controle), b(controle+dmso), c(1 μ M), d(10 μ M) e(100 μ M), f(1000 μ M) expostos às concentrações no tempo de 2-4hpf e fotografados com 24h pós tratamento. Embriões g(Controle), h(controle+dmso), i(1 μ M), j(10 μ M) fotografados 48 hpt. Os embriões foram fotografados em microscópio invertido Zeiss, PrimoVert 99C, com aumento de 4x. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata, totalizando 15 embriões por experimento.

Na figura abaixo (Fig18), vemos os embriões expostos às concentrações no tempo de 4-6hpf e fotografados com 24h após o tratamento. Os embriões g(Controle), h(controle+dmso), i(1 μ M), j(10 μ M) foram fotografados 48h pós-tratamento. Os embriões submetidos às concentrações de 100 e 1000 μ M morreram/coagularam nas primeiras 24h de experimento, assim como os embriões submetidos no tempo de 2-4hpf. Os embriões nas concentrações de 1 e 10 μ M foram comparados com o controle e com o controle+dmso e não apresentaram deformidades morfológicas em até 48h pós-tratamento.

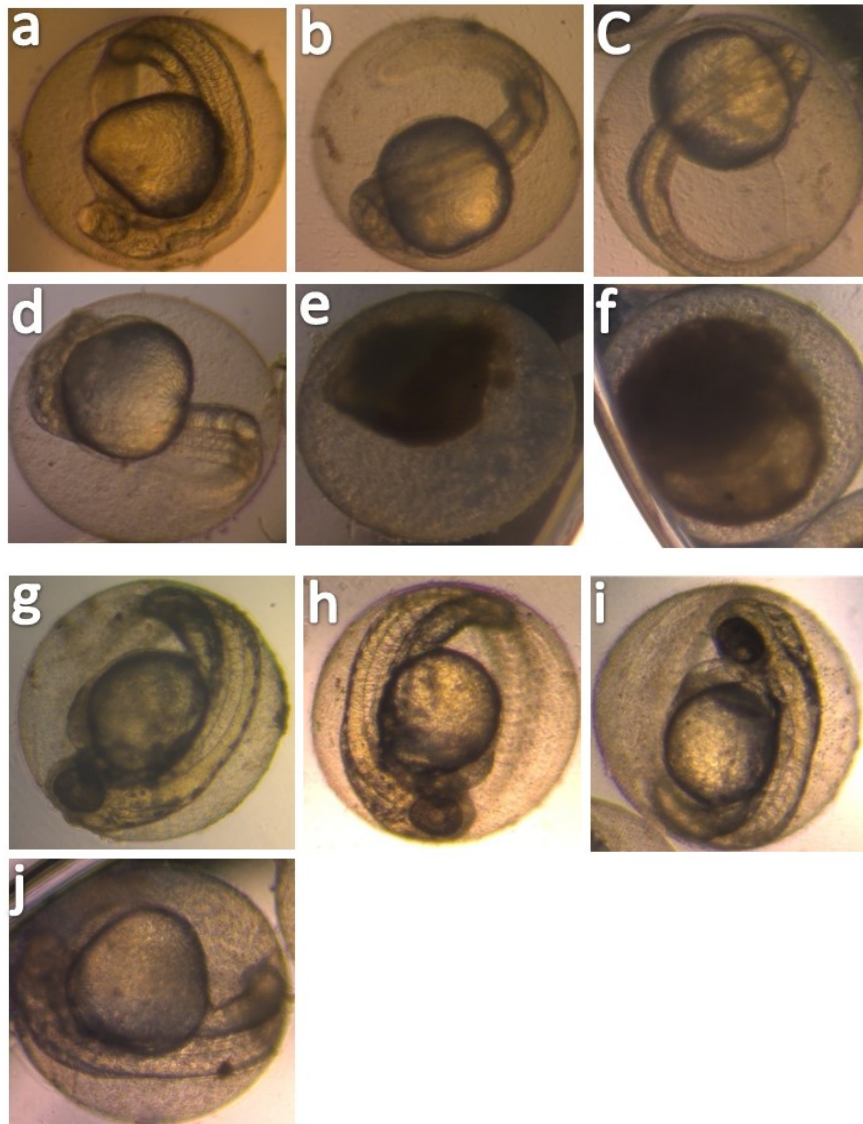


Figura 18. Embriões de Peixe zebra, a(Controle), b(controle+dmso), c(1 μ M), d(10 μ M) e(100 μ M), f(1000 μ M) expostos às concentrações no tempo de 4-6hpf e fotografados com 24ht tratamento. Embriões g(Controle), h(controle+dmso), i(1 μ M), j(10 μ M) fotografados 48hpt. Os embriões foram fotografados em microscópio invertido Zeiss, PrimoVert 99C, com aumento de 4x. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata totalizando 15 embriões por experimento.

Na figura abaixo (Fig.19), vemos os embriões expostos às concentrações no tempo de 8-10hpf e fotografados com 24h pós-tratamento. Os embriões g(Controle), h(controle+dmso), i(1 μ M), j(10 μ M) foram fotografados 48h pós-tratamento. Os embriões submetidos às concentrações de 1000 μ M morreram/coagularam nas primeiras 24h de experimento, alguns coagulados, alguns com atraso. Os embriões da concentração de 100 μ M não morreram nas primeiras 24 horas, apresentando um início de desenvolvimento e uma morte mais tardia, em até 48 horas.

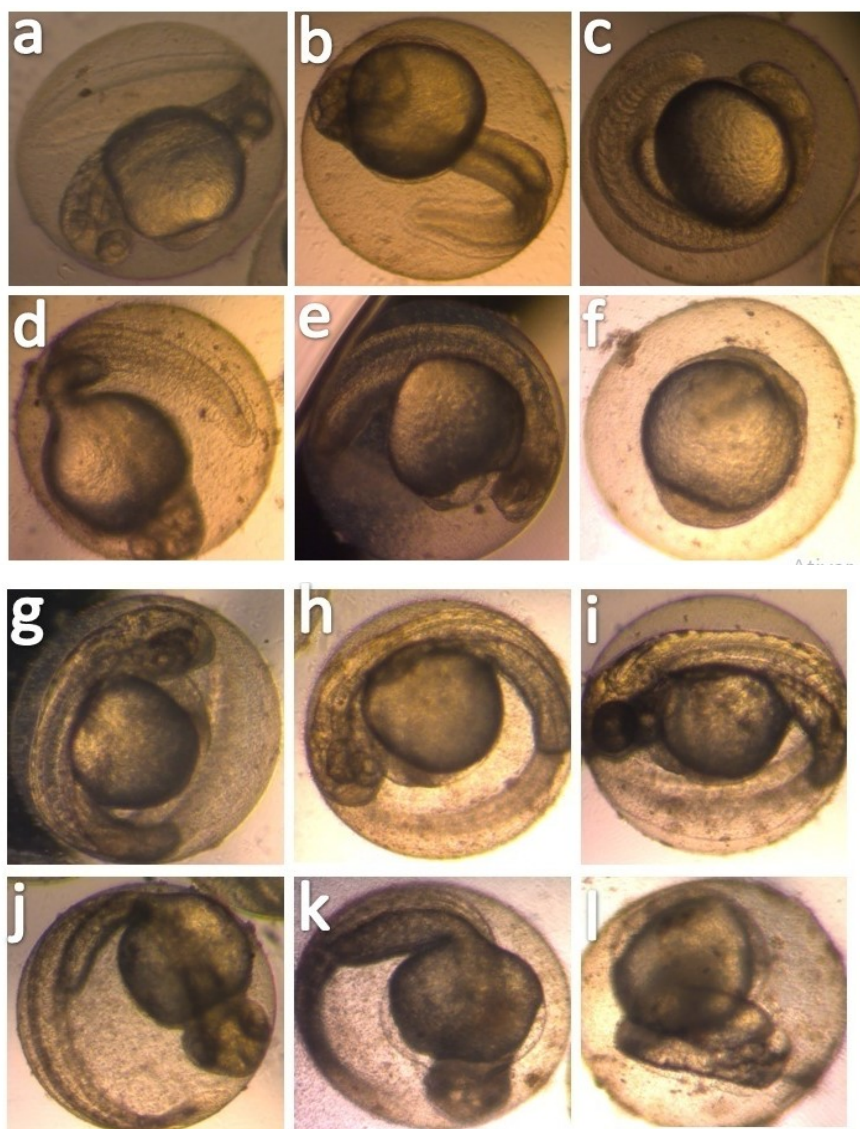


Figura 19. Embriões de Peixe zebra, a(Controle), b(controle+dmso), c(1 μ M), d(10 μ M) e(100 μ M), f(1000 μ M) expostos às concentrações no tempo de 8-10hpf e fotografados com 24h pós tratamento. Embriões g(Controle), h(controle+dmso), i(1 μ M), j(10 μ M), k(100 μ M) e l(1000 μ M) fotografados 48hpt. Os embriões foram fotografados em microscópio invertido Zeiss, PrimoVert 99C com aumento de 4x. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata, totalizando 15 embriões por experimento.

Na figura abaixo (Fig. 20), vemos os embriões expostos às concentrações no tempo de 12hpf e fotografados com 24h pós-tratamento. Os embriões g(Controle), h(controle+dmso), i(1 μ M), j(10 μ M) foram fotografados 48h pós-tratamento. Os embriões submetidos às concentrações de 1000 μ M morreram/coagularam nas primeiras 24h de experimento, os submetidos as concentração de 100 μ M demoraram um tempo maior para morrer, sendo esse um resultado parecido com o do tempo de 8-10hpf.

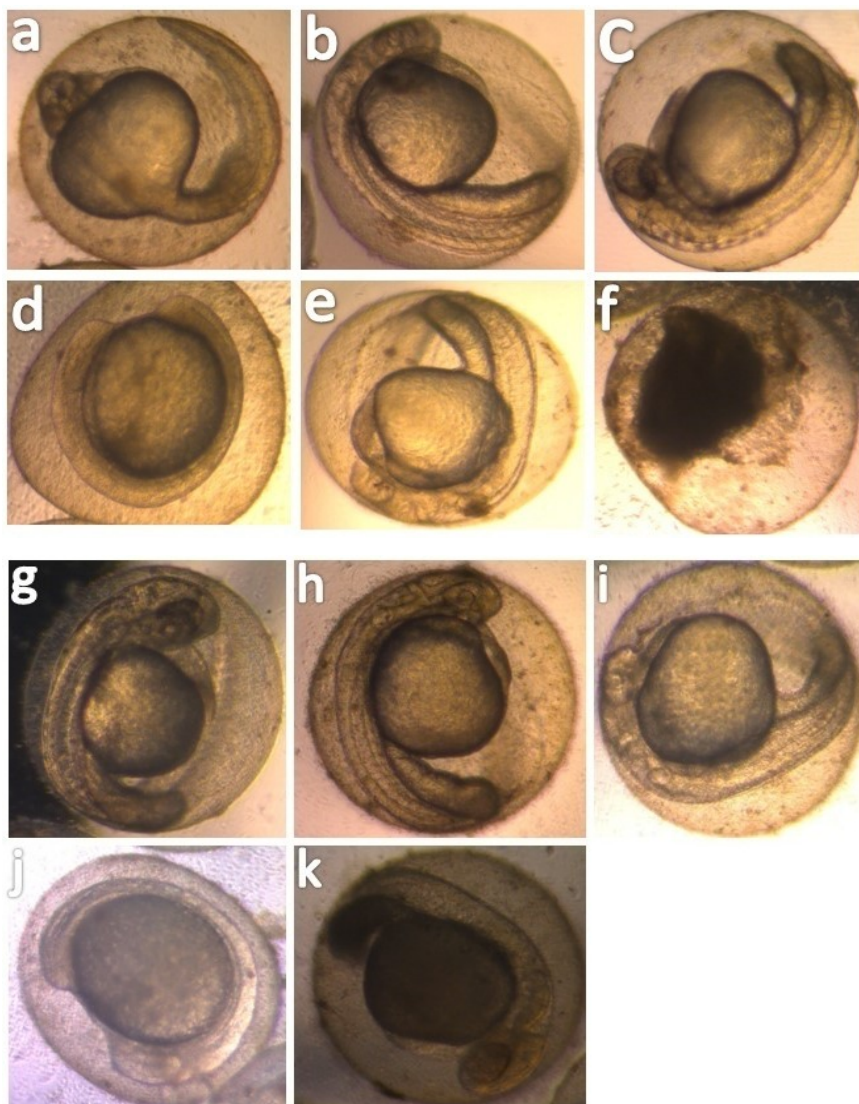


Figura 20. Embriões de Peixe zebra, a(Controle), b(controle+dmsO), c(1 μ M), d(10 μ M) e(100 μ M), f(1000 μ M) expostos às concentrações no tempo de 10 à 12hpf e fotografados com 24h pós tratamento. Embriões g(Controle), h(controle+dmsO), i(1 μ M), j(10 μ M) e k(100 μ M) fotografados 48hpt. Os embriões foram fotografados em microscópio invertido Zeiss, PrimoVert 99C, com aumento de 4x. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata, totalizando 15 embriões por experimento.

Os embriões submetidos no tempo de 2-4hpf apresentaram apenas características de letalidade, Lammer *et al.*(2009), como morte por coagulação do embrião, isso nas concentrações mais altas (100 e 1000 μ M), logo no tempo de 24hpt. As concentrações de 1,10 e controle+controle com dmsO, continuaram a ser acompanhadas até as 48h pós-tratamento, porém não apresentaram outras quaisquer características que indicassem letalidade, subletalidade ou teratogenicidade desenvolvendo-se de maneira esperada como o controle. Os embriões submetidos no tempo mais próximo a fertilização 2-4h, apresentaram um resultado similar aos embriões

submetidos no tempo de 4-6hpf, com os mesmos efeitos de letalidade nas maiores concentrações em 24h(100 e 1000 μ M) e sem apresentarem alterações morfológicas nas outras concentrações testadas (1 e 10 μ M).

Os embriões submetidos no tempo de 8-10hpf e 12hpf apresentaram um resultado diferente dos que foram submetidos em tempos mais precoces. No tempo de 8-10hpf a taxa de mortalidade dos embriões na concentração de 1000 μ M é de 100% em 24h, na concentração de 100 μ M a maioria dos embriões conseguem se formar e estão vivos no tempo de 24hpf, porém morrem em até 48h após o tratamento. Na figura 3.9 é possível ver um embrião da concentração de 1000 μ M que chega a se formar, porém no tempo de 24h apresenta atraso no seu desenvolvimento (desenvolvimento referente a 8h de desenvolvimento) (Kimmelet *et al.*, 1995). No tempo de 12hpf o resultado se mostra mais parecido com o tempo de 8-10hpf, os embriões na concentração de 1000 μ M morreram até as primeiras 24h após o tratamento, os embriões da concentração de 100 μ M boa parte chegam a se desenvolver durante as primeiras 24hrs porém em até 48h do tratamento eles não sobrevivem. O alcaloide não foi capaz de induzir outras alterações que indicassem, subletalidade ou teratogenicidade como: alteração na formação de somitos, formação de edema e alteração na pigmentação.

4. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, esforços consideráveis têm acontecido para desvendar as bases metabólicas do GBM a fim de encontrar novos caminhos terapêuticos para o tratamento (Chen Z *et al.*, 2018). Novos produtos a partir de compostos naturais são sugeridos como possíveis soluções para o tratamento do GBM e medicamentos e moléculas sintéticas baseadas em produtos naturais representaram mais de 50% dos novos medicamentos (Newman *et al.*, 2020).

Das dezenas de espécies diferentes do gênero *Tubastraea* identificadas até o momento, 4 dessas foram descobertas recentemente, e algumas espécies descritas anteriormente já foram relacionadas a possíveis

aplicações farmacológicas, seja através do extrato bruto do organismo, através de organismos que vivem associados a esses indivíduos ou por compostos isolados e seus derivados sintéticos.

Oliveira *et al.* (2022) sugeriram que a ocorrência generalizada da *Tubastraea* podia ser associada à sua produção de metabólitos secundários contra predadores e competidores. A produção e liberação dessas substâncias químicas protetoras podem ser usadas contra consumidores e competidores de espécies não-nativas como estratégia para colonização de uma nova área (Lages *et al.*, 2010). Espécies do gênero *Tubastraea* são fontes de ácidos graxos, esteróis, macrólidos de polioxazol seus derivados, e alcaloides (Maia *et al.*, 2014). Os corais produzem substâncias inéditas com novas estruturas resultando na descoberta de importantes bioativos e novos mecanismos biológicos (Zhang *et al.*, 2019). Não somente extratos retirados desses organismos têm sido usados para investigação de propriedades biotecnológicas, assim como compostos isolados, sintetizados ou oriundos da microbiota associada a esses corais.

De acordo com Behl T *et al.* (2021), os produtos naturais protegem as células gliais reduzindo o estresse oxidativo e a neuroinflamação, inibindo a proliferação, induzindo a apoptose, inibindo eventos pró-oncogênicos e intensificando as potentes terapias antitumorais. Os compostos heterocíclicos, contendo pelo menos um heteroátomo, como oxigênio, nitrogênio ou enxofre, podem ser aceitadores e doadores de ligações de hidrogênio, podendo se ligar a vários alvos moleculares, provocando diversos efeitos farmacológicos (Dhiman A, Sharma R, Singh RK, 2022; Gevorgyan V, 2012), por esse motivo tem se mostrado promissores na indústria farmacêutica. Dentre esses compostos, o indol é considerado um dos compostos mais privilegiados na química heterocíclica, por isso pode servir como uma sonda eficaz para o desenvolvimento de novos candidatos a medicamentos contra doenças desafiadoras como tipos de câncer, incluindo o GBM (Salerno *et al.*, 2023). O 6-bromoindol-3-carboxaldeído, já foi identificado em algumas espécies do gênero *Tubastraea spp.*, e em estudos, já apresentou efeito citostático, inibindo a divisão de ovos de ouriço do mar, quando isolado da esponja marinha *Iotrochota purpurea* (Carletti *et*

al., 2000), exibiu citotoxicidade contra linhagens celulares de tumor de próstata (PC-3M e LNCAP (Wang *et al.*, 2013), atividade antibiótica e antiincrustante quando isolado da bactéria *Acinetobacter* sp. associada à ascidia *Stomozoa Murray* (Olgin *et al.*, 1997). E atividade anti-fúngica contra o fungo de solo *Mortierella ramannianus*, quando isolado da esponja *Halichondria* sp. (Hong-yu *et al.*, 1994). Embora o mecanismo molecular exato de ação do 6-bromoindol-3-carboxaldeído, ainda não tenha sido definido, acredita-se que a bromação aumente significativamente a potência dos carboxaldeídos indólicos. E isso poderia implicar que este composto exerça seus efeitos no nível molecular por meio de interações de ligação com biomoléculas, inibição ou ativação de enzimas e alterações na expressão genética (<https://www.benchchem.com/product/b099375>). Alguns medicamentos anticancerígenos de alcaloides contendo indol já tem sido utilizados como vincristina e vinblastina, e existe uma procura e pesquisa por novos compostos com possível efeito antitumoral. Lu JJ *et al.* (2012); Isah T. (2016), afirmam que esses compostos (alcaloides) induzem danos ao DNA, parada do ciclo celular, apoptose e autofagia, e simultaneamente inibem a angiogênese e a proliferação em células tumorais. Apesar do alcaloide marinho 6-bromoindol-3-carboxaldeído já tenha sido testado e comprovado com relação a algumas atividades farmacológicas, há poucos estudos em que fora usado para teste em atividade antitumoral. Neste cenário, ferramentas computacionais podem oferecer um grande auxílio a descoberta de moléculas com características favoráveis a se tornarem potenciais fármacos, essas plataformas permitem a predição do desempenho de moléculas no modelo *in silico* e são capazes de fornecer informações importantes e cruciais para o levantamento de dados a respeito do composto que se deseja investigar. As ferramentas tecnológicas *in silico* têm sido utilizadas também como uma alternativa de avaliação das propriedades ADMET pelo fato dos estudos *in vivo* e *in vitro* serem mais custosos e demandarem mais tempo, tecnologias de ferramentas computacionais *in silico* são utilizadas desde 1980 no processo de descoberta de novos medicamentos (Shen *et al.*, 2010). Além de propriedades ADMET, também são fornecidos dados físico-químicos. A ferramenta de análise utilizada SwissADME, fornece acesso a cinco filtros diferentes baseados em regras e

parâmetros específicos. Estes filtros projetados por grandes farmacêuticas visam aumentar a excelência das suas bibliotecas de compostos. O filtro mais utilizado para guiar essas análises e o primeiro como tentativa de guiar o design de compostos de boa disponibilidade oral, consiste na regra dos 5 de Lipinski, que ajuda a distinguir entre moléculas semelhantes ou não a medicamentos (Pillai *et al.*, 2001). Ele prevê alta probabilidade de sucesso ou fracasso devido à semelhança com medicamentos, para moléculas que cumprem 2 ou mais das seguintes regras: Massa molecular menor que 500 Dalton, número de aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) inferior ou igual a 10, número de doadores de ligação hidrogênio (DLH) menor ou igual a 5; alta lipofilicidade (expressa como LogP menor que 5) e refratividade molar deve estar entre 40-130. O 6-bromoindol-3-carboxaldeído foi aprovado de acordo com as regras de Lipinski, sugerindo assim uma boa disponibilidade oral do composto através do uso da plataforma SwissADME (Tab.1). Dois gráficos são apresentados pela ferramenta SwissADME para representação de dados. O gráfico de radar de biodisponibilidade (Fig.3), apresenta um conjunto de propriedades favoráveis que indicam uma excelente biodisponibilidade oral e perfil de semelhança com fármacos, chamamos essas moléculas de druglikenes: molécula que contenha propriedades físico-químicas semelhantes à maioria dos fármacos conhecidos, a ferramenta compara valores experimentais de referência obtidos de estudos das propriedades físico-químicas dos principais medicamentos desenvolvidos (De Lima *et al.*, 2020). A análise é baseada nas propriedades: lipofilicidade, tamanho, polaridade, insolubilidade, flexibilidade e insaturação. Para um perfil ideal de biodisponibilidade as linhas do gráfico precisam estar dentro da área rosa (Magalhães *et al.*, 2022). O alcaloide apresentou 1, dos 6 parâmetros fora da margem, o que indica que ele não é adequado com relação ao parâmetro insaturação, porém se mostrou de acordo com os outros 5 parâmetros analisados, apresentando lipofilicidade, flexibilidade, insolubilidade, polaridade e tamanho da molécula adequados aos valores esperados de um fármaco. Quando se trata de candidatos a fármacos, Kadam *et al.* (2007), reforça que avaliar as características químicas versus propriedades biológicas é essencial para obter um composto druglikeness, e logo grande probabilidade de ser, biologicamente, ativo apresentando

potencial terapêutico (Kadam *et al.*, 2007). As propriedades ADMET desempenham papéis importantes na descoberta/desenvolvimento de produtos de consumo, medicamentos, produtos químicos industriais e até pesticidas. Essas informações são especialmente úteis para conduzir avaliações de risco ambiental e humano (Cheng *et al.*, 2019). É sabido que nas fases iniciais da descoberta de medicamentos, as análises *in silico* que indicam propriedades semelhantes a medicamentos, tem sido amplamente utilizadas como uma triagem para selecionar compostos candidatos a fármacos, e parâmetros farmacocinéticos como distribuição são cruciais para a entrega do fármaco ao seu alvo (Romanelli *et al.*, 2022). O autor também ressalta que perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos (PK/PD) ruins são as principais razões para falhas de candidatos em ensaios clínicos do fármaco em um sistema vivo. Um fator favorável ao uso do alcaloide 6-bromoindol-3-carboxaldeído com relação a atividade antitumoral é a capacidade que ele apresentou de atravessar BHE, identificada em análise através da plataforma SwissADME (Tabela 1). A BHE funciona como um filtro capaz de impedir a passagem de muitas moléculas até o cérebro, dificultando a passagem de xenobióticos. Zhai K *et al.* (2021) enfatiza que a eficácia das substâncias naturais no GBM acaba sendo limitada pela sua biodisponibilidade e permeabilidade da barreira hematoencefálica e várias formulações químicas são propostas para melhorar suas propriedades farmacológicas, sendo esse um fator que limita o sucesso e a evolução de alguns testes. Uma maneira intuitiva de avaliar dois parâmetros principais das propriedades ADME é através do gráfico boiled-egg. A análise do composto em relação a propriedade de permeação através das barreiras GI e BHE, foi analisada através da plataforma SwissADME e demonstrada pelo gráfico (Fig. 5), o alcaloide se encontra pontualmente posicionado em cima da área amarela, esta, acima da área branca do gráfico, indicando que este possui características que indicam alta probabilidade de permeabilidade a BHE e absorção GI, em se tratando de um fármaco que precisaria ser entregue ao seu alvo na região cerebral, essa propriedade constitui uma característica altamente vantajosa. A alta absorção intestinal, indicada pelas três plataformas utilizadas, também aparece como uma característica positiva em se tratando do desenvolvimento de um fármaco de

administração oral. Uma outra característica que se relaciona diretamente a entrega do composto ao alvo na região cerebral, é o fato dele não se apresentar como substrato para a glicoproteína P (P-gp), indicada também pelas três plataformas analisadas. A glicoproteína-p é uma proteína transmembrana transportadora de medicamentos quimioterápicos para o interior das células, esta funciona como uma barreira de xenobióticos em mamíferos, está relacionada ao desenvolvimento de resistência de células cancerígenas a múltiplos medicamentos quimioterápicos (Syed *et al.*, 2017). A resistência a múltiplos fármacos (RMD) promovida pela glicoproteína-P é a forma de resistência mais estudada *in vitro*, *in vivo* e clinicamente, a expressão aumentada dessa proteína é um fator de resistência que oferece um grande problema a moléculas que necessitam atravessar a BHE e chegar até o cérebro. O fenômeno de ausência de resposta ao tratamento de neoplasias envolvendo o fenômeno RMD chega a cerca de 90% dos casos de câncer metastático (Huber *et al.*, 2010). Um parâmetro analisado relacionado ao metabolismo do alcaloide e à metabolização de moléculas do citocromo P450 (CYP). Esta família de isoenzimas é responsável pela eliminação de fármacos como resultado da biotransformação metabólica. O CYP tem cinco isoformas principais que interagem com mais de 90% dos fármacos aprovados, ou seja, CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4. A inibição das enzimas da família CYP permite que compostos químicos possam induzir efeitos adversos e toxicidade devido ao acúmulo nas células ou no sangue. As plataformas SwissADME e admetSAR, indicaram que o 6-bromo indol-3-carboxaldeído é capaz de inibir apenas 1 (CYP 1A2), das 5 enzimas (CYP 1A2, C19, 2C9, 2D6, 3A4) do citocromo. Desta forma entende-se que o alcaloide se caracteriza apresentando um comportamento molecular de baixa promiscuidade inibitória. Com relação ao parâmetro toxicidade, o composto também apresentou resultado negativo no teste de Ames, o teste de Ames é um ensaio biológico que analisa se uma substância química pode causar mutações no DNA, ser genotóxico, mutagênico ou carcinogênico, esse teste é usado mundialmente como uma triagem inicial para determinar o potencial mutagênico de novos produtos químicos e medicamentos (Tejs & Sebastian., 2008). Este é sem dúvida o principal e mais importante teste de pré-triagem de carcinógenos no

desenvolvimento de vários produtos químicos e comerciais que passam por aprovação regulatória, assim como produtos industriais, agrícolas, farmacêuticos e produtos aditivos (Zeiger *et al.*, 2019).

Nos resultados dos testes do alcaloide em modelos *in vitro* de GBM, o composto causou citotoxicidade no modelo 2D e no modelo 3D. Os resultados da CI50 encontrados para as duas linhagens seguiram a mesma proporção, sendo no modelo 2D, com um valor de CI50 menor T98G(139uM) (Fig.7a), e U251 (359uM) (Fig.8a), e aumentando cerca de três vezes mais, no modelo 3D, T98G(479uM) (Fig.9) e U251(1000uM) (Fig.10), como o modelo 3D é mais complexo e reflete melhor o tumor no ambiente original já era esperado que fosse necessário uma concentração mais alta do composto para causar efeitos de toxicidade observada no modelo 2D. Calori *et al.* (2022), destaca que, a nível de representatividade, os esferoides de GBM se apresentam como uma plataforma de teste alternativa promissora para modelos *in vivo* de câncer cerebral, considerando ainda o princípio dos 3Rs do uso animal em ensaios pré-clínicos. Tanto no modelo 2D quanto no 3D, o alcaloide marinho apresentou um valor de citotoxicidade mais baixo nas células T98G do que nas células U251, sendo efeito modelo e tipo celular dependente. Sendo assim as células T98G se mostraram mais sensíveis ao tratamento nos dois modelos testados. A linhagem celular T98G é intimamente representativa dos fenótipos proliferativos e invasivos mais comuns do GB em estudos, *in vitro* e *in vivo* (Oraiopoulou., *et al* 2019). Esta sustenta as principais características dos GBM e, portanto, podem servir como objetos de pesquisa na investigação desse tipo de neoplasia (Kiseleva *et al.*, 2016). É sabido que diferentes linhagens de GBM podem apresentar diferentes perfis moleculares, e diferentes respostas ao mesmo tratamento, um exemplo é a resposta de algumas linhagens de GBM ao TMZ, as células T98g LN-18, T98G e U138 são resistentes ao medicamento, e em contrapartida outras células de GBM como A172, U87, U251 e U373 são sensíveis a TMZ (Lee *et al.*, 2016). Portanto, diferentes respostas ao mesmo tratamento não é incomum, devido a heterogeneidade do tumor. No modelo 2D é possível ver que as células se encontram soltas do fundo da placa e em menor quantidade conforme a concentração do composto

aumenta. As células soltas de acordo com o aumento da concentração, reforçam a resposta de citotoxicidade apresentada pelo ensaio MTT. Segundo literatura analisada, o 6-bromoindol-3-carboxaldeído parece ter sido testado pela primeira vez em células de GBM. Alguns medicamentos a base de indol estão em fase de testes clínicos e pré-clínicos, e outros já são utilizados para tratamento anticancer. Como o mecanismo de tumorigênese do GBM ainda não é totalmente conhecido, muitos pacientes sofrem recaídas após a ineficácia dos tratamentos disponíveis (Zhang *et al.*, 2020). Dados correlacionais da literatura sugerem que subtipos de GBM molecularmente distintos exibem diferenças em seu microambiente, desta forma podem responder de maneira diferente ao mesmo tipo de tratamento. Sem dúvida um dos grandes desafios para o desenvolvimento de uma terapia eficaz para o GBM continua sendo a heterogeneidade desse tipo de tumor. Além da incapacidade de tratar GBM de forma eficaz, que se deve em parte à mecanismo de angiogênese, com capacidade das células de se infiltrarem e colonizarem o tecido cerebral normal, tornando quase impossível a remoção cirúrgica total das células malignas (Quereda *et al.*, 2018). Os medicamentos a base de indol que estão nos estágios de desenvolvimento contra GBM, e apresentaram avanços nos últimos anos, atuam nos principais mecanismos de ação subjacentes à sua eficácia anti-GBM, como proteína quinase, tubulina e inibição da via p53. Essas pesquisas tem sido baseadas na evidência de que a desregulamentação de três vias principais foram destacadas no GBM, a via das tirosina quinases receptoras (RTKs)/Ras/PI3K (alterada em 88% dos pacientes com GBM), a via p53 (alterada em 87% dos pacientes com GBM) e a via da proteína do retinoblastoma (RB) (alterada em 78% dos pacientes com GBM (Cancer genome atlas., 2008). O medicamento temozolomida (utilizada na terapia contra a doença), atua induzindo quebras na dupla fita de DNA, com o objetivo de causar apoptose celular, e a terapia padrão para GBM recorrente são drogas alquilantes de DNA, como lomustina, carmustina, e bevacizumabe (Salerno *et al.*, 2023). A aprovação e o uso de alcaloides contendo indol, como vincristina e vinblastina, tem inspirado os pesquisadores a projetarem e sintetizarem outros compostos à base de indol, a fim de obterem pistas estruturalmente diferentes com mecanismos

distintos de ação antitumoral. Embora muitos esforços estejam ocorrendo na tentativa de encontrar uma opção eficaz para o tratamento do GBM o que existe no momento é apenas uma eficácia anticâncer modesta; portanto, ainda há necessidade da continuidade de estudos para o desenvolvimento de novas terapias eficazes para o GBM.

Os resultados relativos aos testes dos fluorocromos, podem esclarecer o fenômeno de toxicidade causado pelo alcaloide nas células de GBM. O 6-bromoindol-3-carboxaldeído causou aumento da produção de (EROs) nas células T98G tratadas com diferença significativa comparado ao controle após 24h, identificado no teste através do aumento da fluorescência (Fig. 11). A citotoxicidade nas células, pode ter sido causada pelo aumento das espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo é resultado de um desequilíbrio entre antioxidantes e oxidantes, em favor dos oxidantes. As mitocôndrias são os principais locais de produção e redução de ROS, e a medição dos níveis de ROS podem ajudar a determinar se a integridade funcional mitocondrial foi comprometida (Sarasija *et al.*, 2018). ROS são gerados pelas células em níveis mínimos durante a produção de ATP nas mitocôndrias, quando não são eliminados, os níveis de ROS se elevam e podem se acumular, causando lesões no DNA, proteínas e lipídios, e consequentemente morte celular. O ROS gerado pelas mitocôndrias gerando uma regulação negativa pode resultar em autofagia e afetar a proliferação e a diferenciação celular (Romanelli *et al.*, 2022). Outro parâmetro alterado, causado pelo alcaloide, foi a diminuição da proliferação celular, identificada através do fluorocromo 7-AAD (Fig.13). O alcaloide marinho causou uma diminuição significativa da proliferação celular nas células T98G, detectada através da diminuição da fluorescência através da espectrofluorimetria. Tanto a produção de espécies reativas de oxigênio quanto a diminuição da proliferação celular puderam ser visualizadas através das imagens das células tratadas com os fluorocromos. A morte celular e conseqüente diminuição da proliferação pode ter sido causada pelo acúmulo de EROs, presentes no ambiente celular, causada pelo alcaloide. As células que produziram ROS se apresentaram com uma fluorescência mais brilhante em verde, comparadas ao controle, as células com o fluorocromo 7-AAD,

apresentam menor fluorescência quando o grupo tratado foi comparado ao grupo controle, em fluorescência vermelha. Em um estudo realizado com um alcaloide, conhecido como Iperlongumina, este foi capaz de causar a morte de células de GBM em três linhagens diferentes (LN229, U87 e 8MG), na concentração de 20uM, através do acúmulo de espécies EROs (Liu *et al.*, 2013). O autor do estudo, explica que células GBM contém variadas mutações genéticas, e essas mutações são responsáveis por induzirem a transformação em astrócitos para se tornarem cancerosos, de acordo com o autor, essa malignidade derivada das mutações torna as células mais sensíveis a EROs do que as células saudáveis, sendo a terapia que medeia a homeostase uma estratégia promissora para o tratamento de tumores. Trachootham *et al.* (2009), o aumento da produção de ROS, já estavam sendo observados há tempos em células cancerígenas, e em tumores em estágio avançado, frequentemente exibem múltiplas alterações e alto estresse oxidativo, sugerindo que pode ser possível eliminar preferencialmente essas células por estratégias farmacológicas de ROS (Trachootham *et al.*, 2009). O fluorocromo laranja de acridina, foi usado para quantificação do processo de autofagia nas células, a autofagia é um processo celular vital para a sobrevivência da células, esta funciona como um processo natural para degradar e reciclar organelas danificadas em metabólitos básicos. A interrupção da autofagia tem sido associada a muitas doenças, como distúrbios neurodegenerativos e câncer, porém quando regulada positivamente além de um certo limite, ela começa a inibir a proliferação celular e induzir a morte das células tumorais (Chen *et al.*, 2023). Pesquisas mostraram que as células de glioma exibem uma maior responsividade ao tratamento por meio da autofagia quando comparada à apoptose, portanto o mecanismo da autofagia parece ser um alvo atraente nos tratamentos GBM (Jiang *et al.*, 2009). AO pode ser usado para medir a autofagia nas células de GBM, este é um corante fluorescente verde que se acumula em organelas ácidas, como lisossomos e autolisossomos, quando excitado com luz azul, AO faz com que o citoplasma e os nucléolos fluoresçam em verde, enquanto os compartimentos ácidos (indicativos de autofagia) fluorescem em vermelho ou vermelho alaranjado, as medidas foram feitas através do espectrofluorímetro. Nossos resultados não

mostraram nenhuma diferença significativa identificada através do fluoróforo AO (Fig.15), entre as células tratadas com o alcaloide e o controle. Desta forma não indicando que ocorreu um processo de autofagia mediado pela exposição ao alcaloide. A fluorescência também não indicou diferença com relação à viabilidade celular das células tratadas (Fig. 16). Um fator que poderia explicar a ausência desses mecanismos é o tempo da análise, que ocorreu após 24h da exposição. Apesar do aumento da resposta de EROs e da inibição da proliferação celular estar ocorrendo, o tempo de exposição pode não ter sido suficiente para que ocorresse autofagia e morte celular identificada através da alteração da viabilidade.

O peixe-zebra, também conhecido como paulistinha no Brasil, tem sido cada vez mais utilizado para estudos em diversas áreas da ciência por apresentarem características biológicas excepcionais. Entre elas pode-se destacar, grande número de embriões por acasalamento (cerca de 100 a 200 ovos), ciclo de vida curto (cerca de 2 anos), desenvolvimento rápido (60 a 90 dias para ter todos os órgãos e sistemas completamente maduros), genoma sequenciado, fácil reprodução e baixo custo de manutenção (Santiago *et al.*, 2024). Além disso os ovos e embriões do peixe-zebra são transparentes, permitindo a visualização antes das fases de alimentação livre, e visualização de malformações causadas por compostos testados sejam identificadas visualmente, ainda durante o período do desenvolvimento embrionário (Bauer *et al.*, 2021). Lammer *et al.* (2009), esclarece sobre os pontos de análises das características que podem ser visualizadas nos embriões, que definem pontos letais: Coagulação do embrião, não detecção de batimentos cardíacos, cauda não formada, não formação de somitos e ausência de batimentos cardíacos (de 48 a 96h). Características que definem pontos de desenvolvimento subletais: Conclusão da gástrula, formação de somitos, desenvolvimento dos olhos, movimento espontâneo, batimento cardíaco/circulação sanguínea, frequência dos batimentos cardíacos, pigmentação, formação de edema (de 48 a 96h). Características que definem pontos de teratogenicidade são: Malformação da cabeça, malformação dos olhos, malformação da cauda, malformação do coração, escoliose, raquitismo, deformações do vitelo,

retardo geral de crescimento, comprimento da cauda. No teste de toxicidade em embriões de peixe zebra, a característica causada pelo alcaloide marinho nos embriões, apareceu apenas nas maiores concentrações (100 e 1000mM), esta foi a característica de letalidade por coagulação do embrião. A maior parte dos estudos considera submeter o embrião de peixe ao produto testado antes de 4hpf, que se caracteriza por pelo período de formação da blástula, quando o embrião apresenta uma maior sensibilidade ao composto e está mais suscetível a reagir a exposição. Massei *et al.* (2015), esclarece que a sensibilidade química diferenciada ocasionalmente observada nas fases embrionárias da vida dos peixes (quando se submete em diferentes estágios), ainda é pouco compreendida porém pode representar uma questão importante para a compreensão do curso temporal da toxicidade e dos modos de ação tóxicos dos produtos químicos, o autor sugere que a toxicidade diferencial pode estar relacionada a diferentes propriedades tóxicocinéticas entre os estágios embrionários. Ao submetermos os embriões em diferentes tempos após a fertilização podemos verificar que não houve uma diferença muito grande no resultado total das alterações causadas pelo alcaloide. Embora quanto mais precoce o tratamento, o efeito de causar letalidade nos embriões nas concentrações mais altas foi mais rápido e igual para nos tempos mais precoces, os embriões submetidos no tempo de 8-10hpf(Fig.19) e 10-12hpf(Fig.20), demoraram um pouco mais para sofrer o efeito de letalidade, porém todos morreram em até 48h após o tratamento. Os embriões não apresentaram características de sub-letalidade ou teratogenicidade. Em um estudo de Kammann *et al.* (2006) no qual investigou-se o efeito tóxico de alguns compostos indóis bromados em embriões de peixe-zebra, verificou-se que o 6-bromoindol (um outro alcaloide indólico), foi capaz de causar alterações sub-letais (CI50), como má formação espinhal em 54% dos embriões e edema do saco vitelínico em 87% deles na concentrações de 9mg/L e 7,4mg/L. O autor chama atenção para o uso e preocupação de produtos usados ultimamente do tipo organobromínicos, e esclarece que esses tem sido o foco de crescente atenção no ambiente marinho nos últimos anos, como retardadores de chamas, como éteres difenílicos bromados, têm sido produzidos industrialmente em grandes quantidades como poluentes

orgânicos persistentes, e enfatiza que essas substâncias estão presentes em várias partes do ambiente marinho. Não foram encontrados estudos utilizando o 6-bromoindol-3-carboxaldeído para investigação de efeitos de toxicidade, em nosso estudo o alcaloide não causou nenhum efeito de toxicidade nas menores concentrações, de 1 e 10Mm. Podemos destacar o principal objetivo da pesquisa de toxicidade com embriões de peixe-zebra, que é prever a toxicidade humana por meio de testes rápidos e precisos de substâncias, determinando a toxicidade de amostras em ensaios de triagem iniciais (Chahardehi *et al.*, 2020). O ensaio apresentou uma abordagem relativa a um composto alcaloide indólico, presente em espécies do gênero *Tubastraea*, não testado anteriormente em embriões de peixe-zebra. As concentrações crescentes foram as mesmas testadas nas células de glioma, que foram capazes de causar apenas efeito de letalidade nas maiores concentrações, sem efeitos de subletalidade ou teratogenicidade em nenhum dos embriões testados, mostrando-se seguro em concentrações mais baixas.

5. CONCLUSÃO

O alcaloide marinho 6-bromoindol-3-carboxaldeído se mostrou tóxico para as células de GBM humano nos 2 modelos *in vitro* testados (2D e 3D). No modelo de previsão *in silico* o composto apresentou características físico-químicas e farmacocinéticas favoráveis ao seu uso como potencial fármaco. Com relação aos testes com embriões de zebrafish, o alcaloide se mostrou seguro nas concentrações mais baixas, sem indícios de efeitos teratogênicos, apresentando letalidade apenas nas concentrações maiores. Os ensaios com fluorocromos mostraram que o alcaloide induziu a produção de ROS, e diminuição da proliferação celular. Estudos complementares são indicados para continuidade e melhor esclarecimento das propriedades desse alcaloide.

REFERÊNCIAS

ABDELMOHSEN, Usama Ramadan et al. Potential of marine natural products against drug-resistant fungal, viral, and parasitic infections. **Lancet Infectious Diseases**. 17(2):e30-e41, 2017.

ALVES, Samara Rodrigues et al. Characterization of glioblastoma spheroid models for drug screening and phototherapy assays. **OpenNano**. 9, 100116, 2023.

ALVES, Celso et al. From Marine Origin to Therapeutics: The Antitumor Potential of Marine Algae-Derived Compounds. **Frontiers in Pharmacology**. 6;9:777, 2018.

ALMEIDA, Mariana et al. Tryptophan derived natural marine alkaloids and synthetic derivatives as promising antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 209, 112945, 2021.

ALTMANN, Karl Heinz. Drugs from the Oceans: Marine Natural Products as Leads for Drug Discovery. **Chimia(Aarau)**. 25;71(10):646-652, 2017.

ASMA, Sidea Tasmia et al. Natural Products/Bioactive Compounds as a Source of Anticancer Drugs. **Cancers (Basel)**.15;14(24):6203, 2022.

BARRECA, Marilia et al. Marine anticancer agents: An overview with a particular focus on their chemical classes. **Marine Drugs**. 18(12), 2020.

BAUER, Benedikt et al. Zebrafish Embryos and Larvae as Alternative Animal Models for Toxicity Testing. **International Journal of Molecular Science**. 14;22(24):13417, 2021.

BEHL, Taphan et al. Current Perspective on the Natural Compounds and Drug Delivery Techniques in Glioblastoma Multiforme. **Cancers (Basel)**. 2;13(11):2765, 2021.

BELYASHOVA, A et al. Cell cultures in assessing radioresistance of glioblastomas. **Zh Vopr Neirokhir Im N N Burdenko**. 86(5):126-132, 2022.

BIBAK, B., Shakeri, F., Keshavarzi, Z., Mollazadeh, H., Javid, H., Jalili-Nik, M., Sathyapalan, T., Afshari, AR., Sahebkar A. Anticancer Mechanisms of Berberine: A Good Choice for Glioblastoma Multiforme Therapy. **Currency Medicinal Chemistry**. 29(26):4507-4528, 2022.

MCLENDON, Roger et al. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**. 23;455(7216):1061-8 (2008). Epub 2008 Sep 4. Erratum in: **Nature**. 28;494(7438):506 (2013).

CARLETTI, Isabelle et al. Matemone, a new bioactive bromine-containing oxindole alkaloid from the indian ocean sponge *Iotrochota purpurea*. **Journal**

of Natural Products. 63(7), 981–983, 2000.

CHAHARDEHI, Chahardehi et al. Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. **Plants (Basel).** 12;9(10):1345, 2020.

CHENG, Feixiong et al. AdmetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. **Journal of Chemical Information and Modeling.** 26;52(11):3099-105, 2012. Epub 2012 Nov 1. Erratum in: J Chem Inf Model. 25;59(11):4959 (2019).

CHEN, Zhihong; HAMBARDZUMYAN, Dolores. Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. **Frontiers in Immunology.** 8;9:1004 (2018).

CHEN, Johnny et al. Autophagy Modulation and Its Implications on Glioblastoma Treatment. **Current Issues in Molecular Biology.** 29;45(11):8687-8703, 2023.

CUSHNIE, Tim. Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. **International Journal of Antimicrobial Agents.** 44(5):377-86, 2014.

DI, Kaijum et al. Marizomib activity as a single agent in malignant gliomas: ability to cross the blood-brain barrier. **Neuro Oncology.** 18(6):840-8 (2016).

DE LIMA, João Alberto, et al. Avaliação teórica das propriedades farmacocinéticas, físico-químicas e farmacodinâmicas do composto isolado de Valeriana Officinalis em transtorno de ansiedade. **Brazilian Journal of Development.** 6.10: 74751-74762, 2020.

DHIMAN, Ashima et al. Target-based anticancer indole derivatives and insight into structure–activity relationship: A mechanistic review update (2018-2021). **Acta Pharmacologica SinicaB.** 12(7):3006-3027, 2022.

FRIEDRICH, Juergen. A Reliable Tool to Determine Cell Viability in Complex 3-D Culture: The Acid Phosphatase Assay. **Journal of Biomolecular Screening,** 12(7), 925–937, 2007.

GAFORIO, J et al. Phagocytosis of apoptotic cells assessed by flow cytometry using 7-Aminoactinomycin D. **Cytometry,** 49(1), 8–11, 2002.

GEVORGYAN, Vladimir. Chemistry of heterocyclic compounds: a Renaissance. **Chemistry of Heterocyclic Compounds.** 48(1), 1–1, 2012.

HUBER, Paula. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova,** 33(10), 2148-2154, 2010.

ISAH, Tasiu. Anticancer Alkaloids from Trees: Development into Drugs. **Pharmacognosy Reviews.** 10(20):90-99, 2016.

JIANG, Hong. Autophagy pathways in glioblastoma. **Methods Enzymology**. 453:273-86, 2009.

KADAM, R. Recent trends in drug-likeness prediction: a comprehensive review of *in silico* methods. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences** 69.5 609, 2007.

BISELLI, Scarlet et al. Bioassay-directed fractionation of organic extracts of marine surface sediments from the North and Baltic Sea-Part II: Results of the biotest battery and development of a biotest index. *Journal of Soils and Sediments*, 2005.

KAMMANN, Ulrike et al. Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. **Archives Environmental Contamination Toxicology**. 51(1):97-102, 2006.

KESTON, Albert; BRANDT, Richard. The Fluorometric Analysis of Ultramicro Quantities of Hydrogen Peroxide. *Anal Biochem*. 11:1-5, 1965.

KISELEVA, L et al. Characteristics of a 172 and T98G Cell Lines. **Tsitologiia**. 58(5):349-55, 2016.

KHALIFA, Shaden et al. Marine Natural Products: A Source of Novel Anticancer Drugs. **Marine Drugs**. 23;17(9):491, 2019.

KIMMEL, Charles et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**. 203(3):253-310, 1995.

LAMMER, E et al. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**. 149(2), 196–209, 2009.

LEE, Sang et al. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis*. 11;3(3):198-210, 2016.

LI, Hong Yu et al. Simple antifungal metabolites from a marine sponge, *Halichondria* sp. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 107(2), 261–264 (1994). doi.org/10.1016/0305-0491(94)90048-5

LI, Liya et al. Chemical constituents from the marine sponge *Iotrochota birotulata*. *Pharmazie*. 58(9):680-1, 2003.

LI, Hong-yu et al. Simple antifungal metabolites from a marine sponge, *Halichondria* sp. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry** 107.2 261-264, 1994.

LU, Jin-Jian et al. Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. 2012:485042, 2012.

MAIA, L., Ferreira, G., Costa, R., Lucas, N., Teixeira, R., Fleury, B., De Oliveira, L. Raman Spectroscopic study of antioxidant pigments from cup corals *Tubastraea* spp. **Journal of Physical Chemistry**, 2014.

MASSEI, Ricardo et al. Differential sensitivity in embryonic stages of the zebrafish (*Danio rerio*): The role of toxicokinetics for stage-specific susceptibility for azinphos-methyl lethal effects. **Aquatic Toxicology**. 166:36-41, 2015.

MAGALHÃES, Carla Brígida et al. "Avaliação in silico da atividade ansiolítica de compostos do extrato de camomila (*Matricaria recutita*) nos receptores GABA_A humanos." **Journal of Health & Biological Sciences** 10.1: 1-8, 2022.

MISKA, Jason et al. Targeting fatty acid metabolism in glioblastoma. **The Journal of Clinical Investigation**. 3;133(1):e163448, 2023.

MOUBAX, Isabelle et al. Structure-activity relationship for bromoindole carbaldehydes: effects on the sea urchin embryo cell cycle. **Environmental Toxicology Chemistry**. 20(3):589-96, 2001.

MURATA, Shin-ichi et al. Texture analysis of fluorescence lifetime images of AT-and GC-rich regions in nuclei. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 49(11):1443-51, 2001.

Newman, David et al. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**. 27;83(3):770-803, 2001.

OLGUIN-URIBE, G et al. 6- bromoindole-3-carbaldehyde, from an *Acinetobacter* Sp. Bacterium associated with the ascidian *Stomozoa murrayi*. **Journal of Chemical Ecology**, 23(11), 2507–2521, 1997.

ORAIPOULOU, Mariam-Eleni et al. A 3D tumor spheroid model for the T98G Glioblastoma cell line phenotypic characterization. **Tissue and Cell**. 59:39-43, 2019.

OSTROM, Quinn et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. **Neuro Oncology**. 16 Suppl 4(Suppl 4):iv1-63, 2014.

OKUDA, Roy et al. Marine natural products: the past twenty years and beyond. **Pure and Applied Chemistry**, 54(10), 1907–1914, 1982.

PILLAI, Omathanu et al. Drug delivery: an odyssey of 100 years. *Curr Opin Chem Biol*. 5(4):439-46, 2001.

SANTIAGO, Magda Regina et al. "Bioethical and practical aspects of experimentation with zebrafish embryos and adults. *Arquivos do Instituto Biológico* 91: e00012024, 2024.

SILVA, Rodrigo et al. Sun coral invasion of shallow rocky reefs: effects on mobile invertebrate assemblages in Southeastern Brazil. **Biological Invasions**. 1339-1350, 2019.

QUEREDA, Victor et al. A Cytotoxic Three-Dimensional-Spheroid, High-Throughput Assay Using Patient-Derived Glioma Stem Cells. **SLAS Discovery**.23(8):842-849 (2018).

QU, Huiling et al. Berberine reduces temozolomide resistance by inducing autophagy via the ERK1/2 signaling pathway in glioblastoma. **Cancer cell international**, v. 20, p. 1-13, 2020.

QIN, Xianyun et al. Corilagin induces human glioblastoma U251 cell apoptosis by impeding activity of (immuno) proteasome. **Oncology Reports**, v. 45, n. 4, p. 34, 2021.

GRECO, Gaia Raffaella; CINQUEGRANI, Marco. The global market for marine biotechnology: The underwater world of marine biotech firms. **Grand Challenges in Marine Biotechnology**, p. 261-316, 2018.

RASMUSSEN, Thomas et al. Structure and synthesis of bromoindoles from the marine sponge *Pseudosuberites hyalinus*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 9, p. 1553-1558, 1993.

ROMANELLI, Maiara M. et al. Mitochondrial Imbalance of *Trypanosoma cruzi* Induced by the marine alkaloid 6-bromo-2'-de-N-methylaplysinopsin. **ACS omega**, v. 7, n. 32, p. 28561-28570, 2022.

SARASIJA, Shaarika; NORMAN, Kenneth R. Measurement of ROS in *Caenorhabditis elegans* using a reduced form of fluorescein. **Bio-protocol**, v. 8, n. 7, p. e2800-e2800, 2018.

SALERNO, Silvia et al. Target-based anticancer indole derivatives for the development of anti-glioblastoma agents. **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 2587, 2023.

SCHIPMANN-MILETIC, S. et al. Glioblastom hos voksne [Glioblastoma in adults]. **Tidsskr Nor Lægeforen**, 2023.

SYED, S.B., Arya, H., Fu, IH. *et al.* Targeting P-glycoprotein: Investigation of piperine analogs for overcoming drug resistance in cancer. **Science Reporter** 7, 7972, 2017.

SILVA, Rodrigo et al. Sun coral invasion of shallow rocky reefs: effects on mobile invertebrate assemblages in Southeastern Brazil. **Biological Invasions**, v. 21, p. 1339-1350, 2019.

TEJS, Sebastian. The Ames test: a methodological short review. **Environmental Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 7-14, 2008.

THOMÉ, Marcos P. et al. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **Journal of cell science**, v. 129, n. 24, p. 4622-4632, 2016.

TRACHOOTHAM, Duniyaporn; ALEXANDRE, Jerome; HUANG, Peng. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?. **Nature reviews Drug discovery**, v. 8, n. 7, p. 579-591, 2009.

VARGO, Mary. Brain tumor rehabilitation. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 90, n. 5, p. S50-S62, 2011.

XIE, Yuan et al. The human glioblastoma cell culture resource: validated cell models representing all molecular subtypes. **EBioMedicine**, v. 2, n. 10, p. 1351-1363, 2015.

WALI, Adil Farooq et al. Natural products against cancer: Review on phytochemicals from marine sources in preventing cancer. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 6, p. 767-777, 2019.

Wratten, S.J., Wolfe, M.S., Andersen, R.J., Faulkner, D.J. Antibiotic metabolites from a marine pseudomonad. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 11(3):411-4 (1977). doi: 10.1128/AAC.11.3.411

WIRSCHING, Hans George et al. Glioblastoma. **Handbook of Clinical Neurology**. 134:381-97, 2016.

WANG, Chao et al. Cytotoxic compounds from *Laminaria japonica*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 49, p. 699-701, 2013.

WU, Zong-Ze et al. Anticancer activity of anthopleura anjunae oligopeptides in prostate cancer DU-145 cells. **Marine drugs**, v. 16, n. 4, p. 125, 2018.

ZHAI, Kevin et al. Natural compounds in glioblastoma therapy: Preclinical insights, mechanistic pathways, and outlook. **Cancers**, v. 13, n. 10, p. 2317, 2021.

VENGOJI, Raghupathy et al. Natural products: A hope for glioblastoma patients. **Oncotarget**, v. 9, n. 31, p. 22194, 2018.

ZEIGER, Errol. The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 841, p. 43-48, 2019.

ZHANG, Suojun et al. Identification of U251 glioma stem cells and their heterogeneous stem-like phenotypes. **Oncology letters**, v. 6, n. 6, p. 1649-1655, 2013.

ZHANG, Pei et al. Current opinion on molecular characterization for GBM classification in guiding clinical diagnosis, prognosis, and therapy. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 7, p. 562798, 2020.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Capítulo 01

- O coral *Tubastraea* tem apresentado resultados significativos, para moléculas bioativas testadas *in vitro* na área farmacológica, e chama-se atenção para novas espécies que foram descobertas e ainda não foram exploradas, porém ainda são necessários estudos com modelos pré-clínicos para avançar na escala de P&D.

Capítulo 02

- O 6-bromoindol-3-carboxaldeído, identificado no extrato da *Tubastraea* spp. possui características *in silico* que possibilitariam seu uso como um agente farmacológico apresentando significativa citotoxicidade em células de GBM com diferentes perfis moleculares.