



***Avaliação do potencial biotecnológico da alga  
Asparagopsis armata e das suas bactérias epífitas:  
citotoxicidade e atividade antimicrobiana.***

**André Gustavo Cavadas da Horta**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos  
Marinhos

Dissertação de Mestrado realizado sob a orientação do Doutor Rui Filipe Pinto  
Pedrosa

2013



Título: Avaliação do potencial biotecnológico da alga *Asparagopsis armata* e das suas bactérias epífitas: citotoxicidade e atividade antimicrobiana.

Copyright© André Gustavo Cavadas da Horta

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2013

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



À minha Mãe,  
ao meu Irmão,  
aos meus avós,



## **Agradecimentos**

Todo o trabalho desenvolvido durante este ano que culminou nesta dissertação aqui apresentada, só foi possível com o empenho, dedicação e esforço de bastantes pessoas. Desta forma não poderia deixar de agradecer:

Ao Professor Rui Pedrosa por ter orientado todo este trabalho, mas sobretudo queria agradecer todo apoio e sugestões que me tem dado tanto ao nível profissional como pessoal. Contribuindo, em muito, para o crescimento científico e pessoal que tenho tido durante estes anos. Sem dúvida um exemplo a seguir.

Ao professor Américo Rodrigues por todo o apoio científico que sempre prestou.

À professora Susana Mendes, ao João Chambel, ao Francisco Avelas, ao professor Paulo Maranhão, ao professor Sérgio Leandro pelas palavras amigas sempre que foi necessário!

A todos os meus colegas e amigos do mestrado de BRM, por todos os momentos que me proporcionaram durante estes dois anos!

À Susete, ao Celso, à Joana e à Nádia e a todas as outras pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

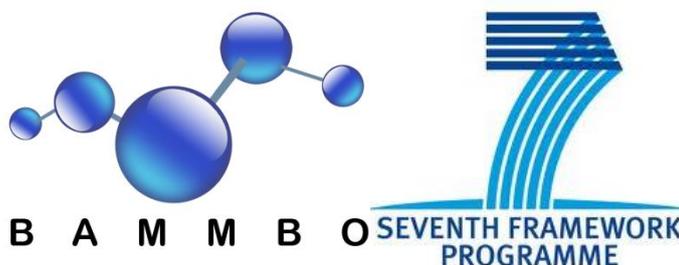
Aos técnicos Vera Severiano, Cristina Salas, Pedro Ramalho que foram incansáveis com todos os pedidos que lhes fiz!

A toda a minha família, mas em especial à minha mãe e ao meu irmão! Cujo as palavras não chegam para agradecer todo o esforço e sacrifício que eles fizeram e fazem para que tudo isto fosse possível! Muito obrigado Mãe e Mano!

A todos muito obrigado!!!!



O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto europeu BAMMBO suportado pelo 7º programa quadro (FP7). Todos os ensaios realizados neste trabalho foram financiados por este projeto.



Até ao momento, deste trabalho já resultou um artigo na revista científica “New Biotechnology”, e diferentes comunicações em congressos científicos:

Publicação:

- Patrick M. Murray, Siobhan Moane, Catherine Collins, Tanya Beletskaya, Olivier P. Thomas, Alysson W.F. Duarte, Fernando S. Nobre, Ifelaju O. Owoyemi, Fernando C. Pagnocca, L.D. Sette, Edward McHugh, Eric Causse, Paula Pérez-López, Gumersindo Feijoo, Ma.T. Moreira, Juan Rubiolo, Marta Leirós, Luis M. Botana, Susete Pinteus, Celso Alves, **André Horta**, Rui Pedrosa, Clayton Jeffryes, Spiros N. Agathos, Celine Allewaert, Annick Verween, Wim Vyverman, Ivan Laptev, Sergei Sineoky, Angela Bisio, Renata Manconi, Fabio Ledda, Mario Marchi, Roberto Pronzato, Daniel J. Walsh (2013). Sustainable production of biologically active molecules of marine based origin. *New Biotechnol* 30:839–850.

Comunicações em congressos científicos:

- **André Horta.**, Susete Pinteus., Celso Alves., Rui Pedrosa., (2013) Antitumor and Antimicrobial potential of the *Asparagopsis armata* epiphytic bacteria. 14th International Symposium on Marine Natural Products and the 8th European Congress on Marine Natural Products 2013. Galiza, Spain.
- **Horta A.**, Alves C., Pinteus S., Pedrosa R. (2012). *Asparagopsis armata* epiphytic bacteria as source for biotechnological screening. International Meeting on Marine Resources. Peniche, Portugal.



**Resumo**

---



Os organismos marinhos têm-se revelado como fonte de compostos bioativos com elevado potencial. As algas têm demonstrado que produzem moléculas pelo seu metabolismo secundário com aplicação farmacológica, entre outras. Contudo, as bactérias epífitas das macroalgas podem ter um papel importante na produção das moléculas com potencial biotecnológico encontrado nas macroalgas. O estudo das bactérias associadas a macroalgas são escassos e isto é ainda mais evidente no caso das algas da costa de Portugal. Neste trabalho, foi avaliado o potencial antimicrobiano e antitumoral da alga vermelha *Asparagopsis armata*, bem como das suas bactérias epífitas, de modo a perceber se o potencial biotecnológico da *A. armata* depende das suas bactérias epífitas. A avaliação da capacidade antimicrobiana foi realizada nos microrganismos *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. A avaliação da capacidade antitumoral foi realizada em células do carcinoma hepatocelular humano (HepG-2) e células provenientes do carcinoma mamário (MCF-7).

No presente trabalho foram isoladas 150 bactérias epífitas de *A. armata*. Das quais apenas 30 apresentavam características fenotipicamente diferentes, avaliando-se posteriormente o potencial biotecnológico destas. A extração dos compostos bioativos foi realizada com solventes de diferente polaridade (metanol e diclorometano). A avaliação da capacidade antimicrobiana foi realizada através de ensaios de inibição de crescimento dos microrganismos patogénicos por leituras espectrofotométricas. O potencial antitumoral dos extratos foi testado nas linhas MCF-7 e HepG-2 através de ensaios de citotoxicidade e proliferação celular. Os resultados foram obtidos pela realização de ensaios espectrofotométricos, método do 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5- diphenyl tetrazolium bromide (MTT).

O extrato de *A. armata* apresentou um excelente capacidade antimicrobiana inibindo em 100% o crescimento de todos os microrganismos patogénicos testados, à concentração de  $1\text{mgml}^{-1}$ , tendo um  $\text{IC}_{50}$  de  $83,7\ \mu\text{gml}^{-1}$  (49,6-141,5) para *B. subtilis*,  $613,8\ \mu\text{gml}^{-1}$  (267,1-1411,0) para *S. enteritidis*, de  $374,3\ \mu\text{gml}^{-1}$  (195,0-718,4) para *P. aeruginosa*, de  $540,6\ \mu\text{gml}^{-1}$  (260,2-1123,0) para *E. coli*, de  $528,6\ \mu\text{gml}^{-1}$  (248,0-1127,0) para *S. aureus*, de  $17,3\ \mu\text{gml}^{-1}$  (12,7-23,82) para *S. cerevisiae* e de  $419,0\ \mu\text{gml}^{-1}$  (241,0-728,6) para *C. albicans*.

Na avaliação antimicrobiana os extratos das bactérias ASP7, ASP26, ASP100 e ASP101 ( $1\text{mgml}^{-1}$ ) apresentaram uma inibição superior a 50% no crescimento de *B.subtilis*, com  $\text{IC}_{50}$  de  $188,5\ \mu\text{gml}^{-1}$  (106,4-334,1),  $151,1\ \mu\text{gml}^{-1}$  (85,7-266,1),  $1034,0\ \mu\text{gml}^{-1}$  (488,9-2186,9) e  $505,5\ \mu\text{gml}^{-1}$  (267,7-954,6), respetivamente. No crescimento de *S.aureus* os extratos ASP7, ASP26 e ASP101 apresentaram  $\text{IC}_{50}$  muito

semelhantes,  $384,0 \mu\text{gml}^{-1}$  (255,4-578,6),  $(346,8 \mu\text{gml}^{-1})$  (216,4-555,8) e  $546,1$  (357,6-834,1), respectivamente. Para todos os outros microrganismos testados, os extratos das bactérias marinhas não inibiram o seu crescimento.

Na atividade antitumoral muitos dos extratos das bactérias epífitas de *Asparagopsis armata*, tanto para a linha celular HepG-2 como para MCF-7, apresentaram algum efeito inibitório, quer na viabilidade, quer na proliferação celular. No entanto, a concentração de extrato necessária para reduzir 50% da viabilidade e/ou proliferação celular das linhas celulares estudadas foi sempre maior ou igual a  $1\text{mgml}^{-1}$ . O extrato de alga demonstrou uma capacidade superior a todos os extratos de bactérias, necessitando de concentrações inferiores a  $1\text{mgml}^{-1}$  para reduzir a viabilidade e proliferação celular em mais de 50%. Na proliferação e na viabilidade celular de MCF-7, o extrato induziu inibição com um  $\text{IC}_{50}$  de  $370,2 \mu\text{gml}^{-1}$  (270,0-507,5) e de  $625,0\mu\text{gml}^{-1}$  (431,1-906,2), respectivamente. Para HepG-2 o  $\text{IC}_{50}$  do extracto da alga na proliferação celular foi de  $788,2 \mu\text{gml}^{-1}$  (590,1-1053,0) e na viabilidade celular de  $821,1\mu\text{gml}^{-1}$  (627,1-1075,0). No entanto, apesar da pequena potência observada para os extratos das bactérias epífitas, alguns revelaram efeito anti-proliferativo para concentrações subtóxicas.

Conclui-se que as bactérias epífitas de *A. armata* têm um elevado potencial antimicrobiano, inibindo de um modo potente o crescimento das bactérias *B. subtilis* e *S. aureus*. Na capacidade antitumoral os extratos das bactérias epífitas apresentaram um potencial biotecnológico inferior, mas com indícios de que poderão existir moléculas na constituição do extrato com grandes potencialidades, já que se observaram efeitos inibitórios na proliferação celular para concentrações de extratos não citotóxicas.

Palavras-chave: Bactérias epífitas; *Asparagopsis armata*; Atividade antimicrobiana; Atividade antitumoral; Potencial biotecnológico.

**Abstract**

---



The marine environment has proven to be a rich source of bioactive compounds with biotechnology potential. Marine algae produce bioactive molecules, normally as secondary metabolites to defend themselves from ecology pressures. However, epiphytic bacteria of marine macro-algae and the bioactive chemicals produced have not been widely explored or documented. The surfaces of marine algae provide a unique habitat for colonizing microorganisms where competition between members of these communities and chemically mediated interactions with their host are thought to influence both microbial diversity and function. Those marine surface associated microorganisms have proven to be a rich source for novel bioactive molecules because of the necessity to evolve compounds capable of protecting the producer from the fierce competition that exists between microorganisms on the surfaces of marine eukaryotes. In this current study, the antimicrobial and antitumor potential of *Asparagopsis armata* collected in Peniche coast was evaluated, as well as its epiphytic bacteria.

The extraction of bioactive compounds was achieved with different polarities solvents namely, methanol and dichloromethane.

The antimicrobial activity was evaluated against *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. The antitumor activity was evaluated against two "in vitro" carcinoma model, the human hepatocellular cell line (HepG-2) and human breast adenocarcinoma cell line (MCF-7). Antitumor studies were performed according to the 3- [4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) method.

One hundred and fifty bacteria isolates were obtained from the surfaces of marine algae *A. armata*, of which thirty were selected by their phenotypic differences for the screening of their biotechnological potential.

*A. armata* extract presented the highest antimicrobial activity against *B. subtilis* with an  $IC_{50}$  of  $83,7 \mu\text{gml}^{-1}$  (49,6-141.5), followed by the antimicrobial activity against *S. enteritidis*, *P. aureginosa*, *E.coli*, *S.aureus*, *S.cerevisiae* and *C. albicans* with  $IC_{50}$  of  $613.8 \mu\text{gml}^{-1}$  (267.1-1411.0),  $374.3 \mu\text{gml}^{-1}$  (195.0-718.4),  $540.6 \mu\text{gml}^{-1}$  (260.2-1123.0),  $528.6 \mu\text{gml}^{-1}$  (248.0-1127.0),  $17.3 \mu\text{gml}^{-1}$  (12.7-23.82) and  $419.0 \mu\text{gml}^{-1}$  (241.0-728.6), respectively.

The epiphytic bacteria ASP7, ASP26, ASP100 and ASP101 presented the highest antimicrobial activity against *B. subtilis* growth with an  $IC_{50}$  of  $188.5 \mu\text{gml}^{-1}$  (106.4-334.1),  $151.1 \mu\text{gml}^{-1}$  (85.7-266.1),  $1034.0 \mu\text{gml}^{-1}$  (488.9-2186.9) and  $505.5 \mu\text{gml}^{-1}$  (267.7-954.6), respectively. Regarding *S. aureus*, epiphytic bacteria ASP7, ASP26 and ASP101 showed the highest growth inhibitory activity, with an  $IC_{50}$  of 384

$\mu\text{gml}^{-1}$  (255.4-578.6), (346.8  $\mu\text{gml}^{-1}$  (216.4-555.8) and 546.1 (357.6-834.1), respectively. The *A. armata* associate bacteria extracts did not inhibited all the other microorganism tested.

Concerning antitumor activity, in adenocarcinoma breast cell line, *A. armata* extract presented an  $\text{IC}_{50}$  of 370.2  $\mu\text{gml}^{-1}$  (270.0-507.5) and 625.0 $\mu\text{gml}^{-1}$  (431.1-906.2) for cell proliferation and cell viability, respectively. In human hepatocellular cell line, algae extracts presented an  $\text{IC}_{50}$  of 788.2  $\mu\text{gml}^{-1}$  (590.1-1053.0) and 821.1 $\mu\text{gml}^{-1}$  (627.1-1075.0) for cell proliferation and cell viability, respectively.

With this work we can conclude that *A. armata* epiphytic bacteria produce compounds with high antimicrobial activity, namely against *B. subtilis* and *S. aureus*. Moreover, the results obtained on antitumor screening indicate that these marine microorganisms produce molecules which can have great potential for the isolation and purification of new natural antitumor compounds, since they showed inhibition of cell proliferation without associated cytotoxicity.

Key words: Epiphytic bacteria, *Asparagopsis armata*, Antimicrobial activity, Antitumoral activity and biotechnological potential.

# Índice

---



	Página
Resumo	xiii
Abstract	xvii
1. Introdução	3
1.1 <i>Produtos de origem natural</i>	3
1.2 <i>Biodiversidade marinha: uma fonte de compostos bioativos</i>	3
1.3 <i>Algas como fonte de compostos bioativos</i>	4
1.4 <i>Bactérias Marinhas como fonte de compostos bioativos</i>	6
1.5 <i>Bactérias epífitas de macroalgas</i>	8
1.6 <i>Desenvolvimento de novos antimicrobianos</i>	9
1.7 <i>Desenvolvimento de novos fármacos: antitumorais</i>	11
2. Objetivos	17
2.1 <i>Objetivo geral</i>	17
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	17
3. Material e Métodos	21
3.1 <i>Recolha e preparação de amostras</i>	21
3.2 <i>Preparação da cultura bacteriana</i>	21
3.3 <i>Preparação de extratos</i>	21
3.4 <i>Avaliação da Capacidade antimicrobiana</i>	22
3.4.1 <i>Avaliação da capacidade antibacteriana</i>	22
3.4.2 <i>Avaliação da capacidade antifúngica</i>	23
3.5 <i>Avaliação do potencial citotóxico</i>	24
3.5.1 <i>Ensaio de proliferação celular e viabilidade celular nas células HepG-2 e MCF-7</i>	24
3.5.1.1 <i>Método de 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)</i>	24
3.6 <i>Análise Estatística</i>	26
4. Resultados	29
4.1 <i>Isolamento e crescimento das bactérias epífitas da alga Asparagopsis armata</i>	29

---

4.2 Avaliação da capacidade antimicrobiana	29
4.2.1 Capacidade antibacteriana do extrato da alga <i>Asparagopsis armata</i> e das suas bactérias associadas	31
4.2.1.1 Capacidade antibacteriana do extrato da alga <i>Asparagopsis armata</i>	31
4.2.1.2 Capacidade antibacteriana dos extratos das bactérias epífitas de <i>Asparagopsis armata</i>	33
4.2.2 Capacidade antifúngica do extrato da alga <i>Asparagopsis armata</i> e das suas bactérias simbiotes	38
4.2.2.1 Capacidade antifúngica do extrato de <i>Asparagopsis armata</i>	38
4.2.3 Capacidade antifúngica do extrato das bactérias epífitas da alga <i>Asparagopsis armata</i>	39
4.3 Avaliação da capacidade antitumoral	41
4.3.1 Avaliação da capacidade citotóxica do extrato de <i>Asparagopsis armata</i> e das suas bactérias epífitas	41
4.3.1.1 Efeito citotóxico do extrato de alga <i>Asparagopsis armata</i> nas linhas celulares HepG-2 e MCF-7	42
4.3.1.2 Efeito citotóxico do extrato das bactérias epífitas de <i>Asparagopsis armata</i> nas linhas celulares HepG-2 e MCF-7	43
4.3.2 Avaliação da capacidade anti-proliferativa do extrato de <i>Asparagopsis armata</i> e das suas bactérias epífitas	45
4.3.2.1 Efeito na proliferação celular do extrato de alga <i>Asparagopsis armata</i> nas linhas HepG-2 e MCF-7	45
4.3.2.2 Efeito na proliferação celular dos extratos das bactérias epífitas de <i>Asparagopsis armata</i> nas linhas HepG-2 e MCF-7	46
5. Discussão e conclusão	51
6. Perspetivas futuras	60
7. Referências Bibliográficas	65

## **Introdução**

---



### 1.1. *Produtos de origem natural.*

A história dos produtos bioativos naturais começou há mais de 100 anos. Na sua definição mais comum entende-se que estes são compostos químicos provenientes da natureza, ou seja, de organismos vivos como plantas, animais e microrganismos. Estes compostos derivam do metabolismo primário ou secundário destes organismos em resposta ao *stress* provocado pelo meio ambiente (Bérdy., 2005). Devido à sua diversidade química e ao seu potencial biotecnológico têm despertado o interesse de diversas indústrias, nomeadamente a indústria farmacêutica, cosmética e alimentar (Wael AL-Zereini., 2006).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial utiliza medicamentos tradicionais para a sua saúde primária (Wael AL-Zereini., 2006). Desde de 2600 aC. que existem registos da utilização deste tipo de medicinas, onde as plantas têm um destaque acentuado. Hoje em dia a utilização desses tratamentos ainda é bastante comum para tratar doenças mais usuais, como constipações, infeções parasitárias e inflamações (Newman, *et al.*, 2000). Desde a descoberta da penicilina em 1928 (Fleming., 1929), vários têm sido os estudos intensivos, principalmente sobre bactérias e fungos, que demonstram o potencial para a formação de novas substâncias bioativas, com estruturas químicas únicas, pelos microrganismos (Fenical., 1993). A penicilina foi o primeiro antibiótico de sucesso na história de produtos naturais de origem microbiana (Bentley., 2000).

### 1.2. *Biodiversidade marinha: uma fonte de compostos bioativos.*

A incrível diversidade biológica no ambiente marinho pode ser uma fonte promissora de compostos bioativos para o futuro. Os oceanos ocupam mais de 70% da superfície da terrestre (Fenical., 1993), possuindo uma variedade de espécies incomensurável. Nos oceanos estão presentes 34 dos 36 filos de vida e ainda assim acredita-se que só se conhece, apenas, 5% de todo o ecossistema marinho (Li e Qin., 2005; Ding *et al.*, 2011). Vivendo num ambiente altamente competitivo e desgastante, os organismos marinhos têm aperfeiçoado, ao longo do tempo, as suas técnicas de sobrevivência através da produção de metabolitos secundários (Vinothkumar e Parameswaran., 2013). Estes compostos têm despertado bastante interesse na comunidade científica; existindo, até à data, aproximadamente, 16 mil produtos isolados e 15,8 mil publicações. Com todos estes dados considera-se os oceanos, cada vez mais, como uma fonte de compostos bioativos com aplicabilidade industrial (Murray *et al.*, 2013).

Muitos dos compostos de origem marinha têm capacidades interessantes como antioxidantes, antimicrobianos, anti-inflamatórios, antitumorais entre outros (Blunt *et al.*, 2010, 2011, 2012; Mayer *et al.*, 2004, 2006, 2007, 2008a, 2008b, 2009, 2011; Murray *et al.*, 2013). Contudo, os rendimentos de produção natural e isolamento são, invariavelmente, tão reduzidos que as fontes naturais tornam-se incapazes de fornecer material suficiente para o estudo e desenvolvimento de novos produtos. No entanto, os recentes avanços de tecnologias como a utilização de cromatografias, ressonância magnética nuclear, técnicas de espectrometria de massa e difração de raios-X têm facilitado o processo de caracterização e isolamento de moléculas (Bhakuni e Rawat., 2005), permitindo, em determinados casos, uma posterior síntese química das moléculas com maior potencial. No entanto, algumas das moléculas têm estruturas complexas e únicas, tornando muito difícil a síntese química.

A importância dos recursos marinhos na pesquisa de novos compostos, com aplicação farmacêutica, pode ser constatada pelo facto de 50% dos fármacos aprovados pela FDA (Food and Drug Administration – USA) durante o período de 1981 a 2002 serem de origem marinha ou de análogos sintéticos (Vinothkumar e Parameswaran., 2013).

Muitos são os fármacos de sucesso com origem marinha que estão disponíveis no mercado. Incluindo o Ara-C (citarabina, antitumoral), Ara-A (antiviral), *ziconotide* (analgésico), *Trabectedin* (antitumoral), entre outros. Para além destes, outros compostos, tais como, *bryostatin*, *didehydrodidemnin*, *dolastatins*, *kahalalide F*, KRN 7000, *squalamine*, entre outros estão em diferentes etapas de ensaios clínicos (Mayer *et al.*, 2010). Para além destas moléculas de 2008 a 2012 mais de 3.079 compostos foram isolados (Blunt *et al.*, 2010; Blunt *et al.*, 2011; Blunt *et al.*, 2012). Desta forma, comprova-se que os mecanismos utilizados pelos organismos marinhos para produzir metabolitos secundários são fascinantes, podendo estes ser moléculas bioativas, o seu estudo é cada vez mais oportuno (Vinothkumar e Parameswaran., 2013).

### 1.3. Algas como fonte de compostos bioativos

As algas são dos organismos mais abundantes e ao mesmo tempo mais resistentes dos ecossistemas marinhos sendo, por esta razão, alvo de vários estudos nos quais têm revelado ser fonte dos mais variados metabolitos secundários. Tal facto está relacionado com o facto de ficarem sempre submetidas a rápidas variações de intensidade de luz, bem como diferentes concentrações de oxigénio (O<sub>2</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) ao longo da coluna de água, obrigando o seu metabolismo a ter uma resposta eficiente a estas pressões (Kang *et al.*, 2003; Plaza *et al.*, 2010; Potin *et al.*,

2002; Takeshi *et al.*, 2005). Deste modo, estes organismos podem representar uma importante fonte de novos compostos bioativos com capacidade antimicrobiana e/ou antitumoral, que poderão ser importantes para o desenvolvimento de novas moléculas com interesse, quer para a indústria alimentar, quer para a indústria farmacêutica, entre outras (Pinteus., 2011; Murray *et al.*, 2013).

Existem mais de 5000 espécies de algas, desde algas microscópicas a algas gigantes que podem atingir os 60 metros de comprimento. A sua estrutura celular, o arranjo celular para formar corpos multicelulares e os seus pigmentos fotossintéticos variam significativamente de espécie para espécie (Sze., 1998). Podem ser planctónicas, como a maioria das espécies unicelulares e viverem suspensas na coluna de água, ou até mesmo por baixo de gelo nas zonas polares. Podem também ser bentónicas, fixas ao sedimento. São limitadas a áreas de pouca profundidade devido à dispersão da luz com a profundidade. A maior profundidade a que foi encontrada uma alga foi a 268 m, uma alga vermelha-púrpura onde a luz se torna verde-azulada e a sua intensidade é apenas 0,0005% da luz solar à superfície. A esta profundidade a zona vermelha do espectro solar é filtrada através da coluna de água, o que não permite obtenção de energia suficiente para a realização de fotossíntese. Estas algas conseguem sobreviver a estas profundidades porque possuem pigmentos acessórios que absorvem luz em diferentes regiões do espectro de absorvância. Por outro lado, as algas que vivem em zonas bastante iluminadas, tipicamente possuem pigmentos que as protegem contra os danos causados por excessiva luminosidade (Pinteus., 2011).

É esta diversidade da composição e quantidade de pigmentos que confere às algas a grande variedade de cores que as caracterizam e as classifica por grupos Rhodophyta (algas vermelhas), Heterokontophyta (algas castanhas) e Chlorophyta (algas verdes). Adicionalmente, as algas produzem também uma vasta gama de moléculas que podem ser utilizadas pelo Homem na área da Biomédica, Cosmética, Indústria alimentar e Farmacêutica, o que faz destes organismos marinhos um alvo de estudo muito interessante em termos biotecnológicos (Barsanti and Gualtieri 2006). As indústrias que exercem atividade nas áreas referidas anteriormente, focam os seus esforços na descoberta de novas substâncias naturais, que sejam mais eficientes e menos nocivas. Na indústria alimentar as algas representam um alimento natural que fornece um elevado valor nutritivo, baixo em calorias. Possuem muitos minerais, proteínas com todos os aminoácidos essenciais, vitaminas incluindo a vitamina B12 (ausente nos vegetais superiores), fibras e baixo conteúdo em gorduras (Barsanti e Gualtieri, 2006).

Desde dos tempos ancestrais que as algas são utilizadas como fonte de compostos bioativos de uma forma empírica, no entanto só mais recentemente, com o desenvolvimento da tecnologia se conseguiu perceber que substâncias benéficas estariam presentes (Scheper *et al.*, 2005). Já foram isolados, a partir de algas, agentes terapêuticos naturais que incluem classes de compostos como terpenóides, ácido ribonucleico, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, entre outros (Fusetani., 2000) com as mais diversas atividades biológicas, tais como antibacterianas, antioxidantes, antifúngicas, antimaláricas, antitumorais, anti-inflamatórias entre outras (Mayer *et al.*, 2009).

#### 1.4. Bactérias Marinhas como fonte de compostos bioativos

De facto, os oceanos são imensamente complexos constituídos por diversos conjuntos de organismos com diferentes formas de vida. A coluna de água dos oceanos contém cerca de  $10^6$  células bacterianas por ml (Hagström *et al.*, 2002). As bactérias marinhas e outros microrganismos marinhos desenvolvem capacidades metabólicas e fisiológicas específicas. Estas capacidades permitem-lhes sobreviver em habitats extremos, produzindo compostos que os seus homólogos terrestres não conseguem desenvolver.

Desde 1990, o número de moléculas bioativas provenientes de bactérias marinhas aumentou exponencialmente (Fenical., 1993;Wael AL-Zereini., 2006;Mayer e Gustafson., 2004; Mayer e Gustafson., 2006).

A pesquisa de novos compostos bioativos a partir de bactérias marinhas tem sido de tal forma interessante que se encontram isolados, aproximadamente, 10,000 metabolitos (Wael AL-Zereini., 2006), muitos dos quais com potencial biomédico.

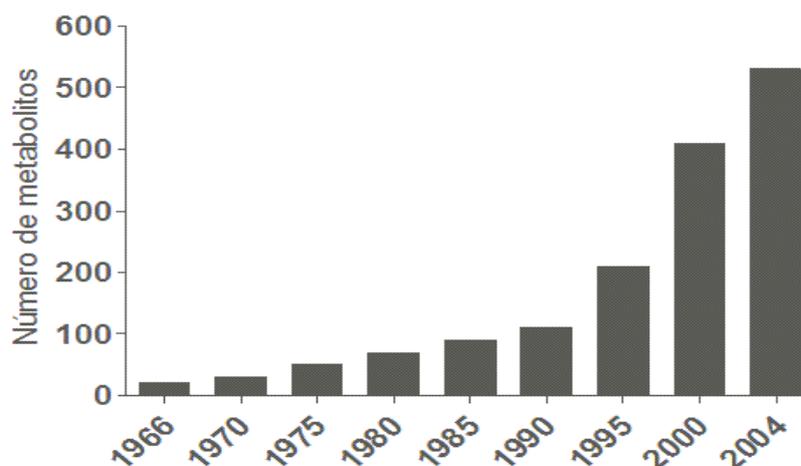


Figura 1 - Número de metabolitos secundários produzidos e isolados de bactérias marinhas desde 1966 a 2004 (Adaptado de Wael AL-Zereini 2006)

Os Gêneros *Streptomyces*, *Altermonas* / *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Pseudomonas* e *Cytophaga* têm sido amplamente estudados e identificados no ambiente marinho, retirando destes a grande parte das moléculas já isoladas e identificadas (Figura 2). Esses microrganismos foram isolados a partir de água do mar, sedimento marinho e invertebrados marinhos.

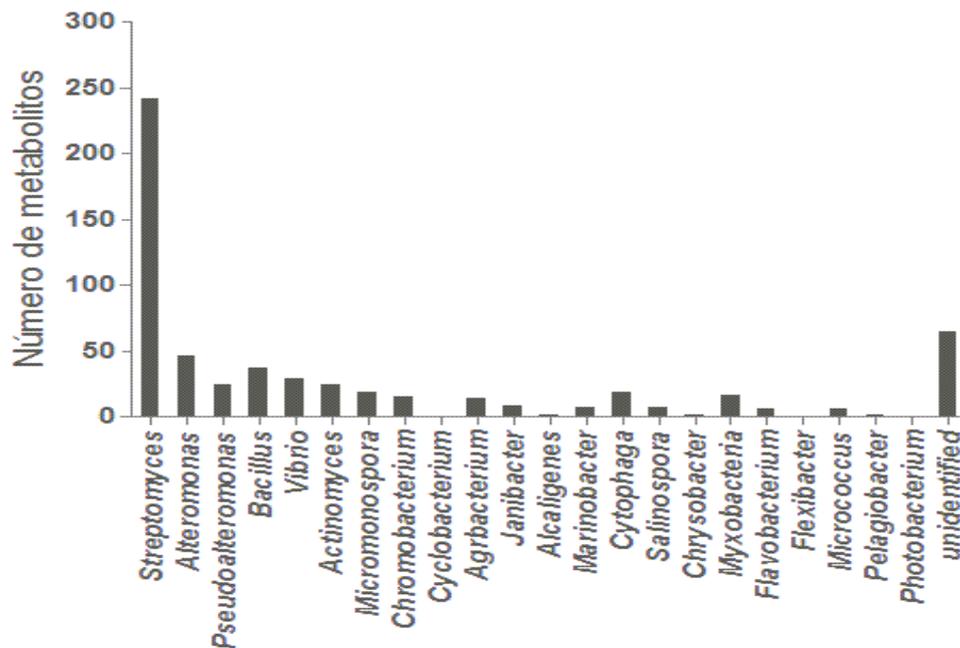


Figura 2 - Número de metabolitos secundários produzidos e isolados de bactérias marinhas, de acordo com o seu gênero, desde 1966 a 2004 (Adaptado de Wael AL-Zereini 2006).

Muitos dos compostos isolados provenientes deste tipo de organismos são de grupos moleculares amplamente estudados e com elevado interesse biotecnológico, como as quinonas, polienos macrólidos, alcalóides, peptídeos e, em menor quantidade, terpenóides.

Muitos são os exemplos de metabolitos marinhos isolados a partir de bactérias marinhas. O antibiótico Pirrol apresenta capacidade inibitória do crescimento de bactérias gram-positivas. Inicialmente a sua biossíntese apresentou alguns entraves devido à sua complexidade, mas com o trabalho desenvolvido por Laatsch e colaboradores (1995), produzindo este composto por uma via metabólica de *Alteromonas luteoviolaceus*, permitiu uma exploração industrial (Laatsch H *et al.*, 1995). Outro metabolito com elevado potencial é o 3,2- indolinediona. Este composto é produzido por uma bactéria epífita de embriões de camarão *Palaemon Macroductylus* e protege os ovos contra fungos patogênicos (Wael AL-Zereini., 2006). Uma bactéria, não identificada, de mar profundo foi descrita como produtora de um metabolito (macrolactina A) com atividade antibacteriana, antiviral e citotóxica, (Laatsch H *et al.*,

1995). A salinamida é outra molécula com capacidade antimicrobiana, isolada a partir de uma bactéria do género *Streptomyces* que habita a superfície da medusa *Cassiopeia xamachana* (Wael AL-Zereini., 2006).

### 1.5. Bactérias epífitas de macroalgas

O ambiente marinho, como já foi referido, é um ecossistema complexo e consequentemente constituído por uma enorme pluralidade de formas de vida que estão associadas entre si. As associações mais comuns desenvolvem-se entre os organismos eucarióticos e microrganismos procariontes (Egan *et al.*, 2008). A superfície de todos os organismos eucariontes é revestida por microrganismos que aderem e desenvolvem comunidades frequentemente imersas numa matriz ou formando uma dupla camada (Pérez-Matos *et al.*, 2007). Para além disto, a especificidade do organismo hóspede tem sido demonstrada por alguns estudos onde se constata a presença de apenas comunidades aderentes estáveis para os organismos da mesma espécie, mesmo estando localizados em regiões geograficamente distantes (Webster e Bourne., 2007).

Nos últimos anos, as propriedades bioativas, tanto das algas como dos microrganismos marinhos epífitos têm sido analisadas, e em ambos os casos, foram obtidos resultados interessantes. A maioria das espécies de macroalgas está em simbiose com microrganismos, onde estes utilizam as substâncias orgânicas excretadas pelas algas como seu alimento. Por outro lado tem-se observado que diversas espécies de algas apresentam um maior crescimento na presença de bactérias epífitas do que na sua ausência. Algumas espécies de algas precisam de vitaminas para o seu crescimento e, possivelmente, as bactérias são parcialmente responsáveis pela produção dessas substâncias, sendo que algumas das bactérias produzem antibióticos, que podem ser importantes no desenvolvimento de uma defesa eficaz contra outros microrganismos patogénicos para a alga (Jasti *et al.*, 2005; Penesyan *et al.*, 2010).

De facto, esta simbiose entre bactérias e macroalgas promove o desenvolvimento de vias metabólicas, nomeadamente nas bactérias, que podem trazer uma nova fonte de metabolitos. Prova disso, são já algumas moléculas isoladas, como por exemplo a *Asporyzin C* (isolada a partir da bactéria epífita *A. oryzae* da alga *H. japonica*, com atividade antibacteriana), a 8-Hidroxisclerosporina (isolada a partir da bactéria epífita *C. malorum* da alga *Enteromorpha sp.*, com atividade citotóxica para com as células tumorais 3T3-L1) e a *Cytoglobosins C* (isolada a partir da bactéria epífita *Chaetomium sp.* da alga *Ulva pertusa* com atividade citotóxica na linha celular tumoral A-549) (Jimenez *et al.*, 2009; Qiao *et al.*, 2010; Blunt *et al.*, 2012).

Zhuang e colaboradores (2003) demonstraram que bactérias do género *Micrococcus* estão associadas à alga *Egrella menziessi*. Estas bactérias conseguem degradar de forma eficaz substratos incomuns como piridinas, herbicidas e óleos. A bactéria *Kocuria palustris* está presente, exclusivamente, na alga castanha *Sargassum muticum* que é considerada uma espécie invasora em muitos países. Esta estirpe tem aplicações industriais na degradação de matéria orgânica (Kovács *et al.*, 1999). Algumas espécies do género *Alcaligenes* são encontradas em simbiose com a alga *Endarachne binghamiae*, são utilizadas para a produção industrial de aminoácidos (Madigan *et al.*, 2009). Finalmente, estirpes de bactérias do género *Alteromonas*, foram associadas de forma exclusiva a alga *Laurencia pacifica*.

Diversas estirpes bacterianas epífitas das algas estudadas apresentam características importantes para a relação de simbiose que mantém com a alga, contudo essas mesmas características podem ter aplicação industrial. Neste âmbito torna-se necessário estudar as bactérias epífitas e os seus metabolitos secundários (Murray *et al.*, 2013).

#### 1.6. Desenvolvimento de novos antimicrobianos.

O desenvolvimento de novos fármacos ao longo dos anos tem tido base num pequeno número de moléculas e a grande maioria destas são de origem natural (Cragg e Newman., 2005). Os recursos naturais têm-nos revelado o caminho para novas abordagens terapêuticas, têm contribuído para a compreensão de inúmeras vias metabólicas e têm estado constantemente presentes como ferramentas na química biológica e molecular, bem como na compreensão da biologia celular (Scheper *et al.*, 2005).

Apesar dos muitos avanços terapêuticos, a constante evolução dos microrganismos tem sido um grande desafio para a medicina. O sucesso dos medicamentos antimicrobianos contra bactérias patogénicas encontra-se entre os maiores feitos da medicina moderna, no entanto, após mais de cinquenta anos de uso generalizado, muitos antimicrobianos já não são tão eficazes. Mais de 50% dos fármacos disponíveis nos mercados são extraídos ou são quimicamente sintetizados, como são exemplo o taxol, morfina, aspirina, penicilina, ciclosporina entre outros (Balandrin *et al.*, 1993). Como tal, a grande maioria dos antimicrobianos existentes hoje em dia não são efetivamente compostos novos, mas sim alterações na molécula original, de modo a tentar ultrapassar a resistência dos microrganismos. A resistência aos medicamentos é um problema particularmente grave quando se trata de hospitais

que albergam doentes em estado crítico, sendo estes menos capazes de combater uma infecção sem a ajuda de antibióticos.

Quando exposto a um antimicrobiano, o microrganismo tenta defender-se de várias formas, sendo uma das mais comuns, a criação de mutações no seu genoma. Com uma capacidade de multiplicação incrível, estas mutações passam de geração em geração levando à criação de populações microbianas resistentes. Para além disto, as bactérias têm a capacidade de transferir estas resistências para bactérias de espécies diferentes, através de diversos mecanismos (Maurine *et al.*, 2002).

O aumento do aparecimento de microrganismos multi-resistentes com poucas opções de tratamento e muitas vezes ineficazes, como *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina, *Enterococcus* resistentes a vancomicina e *Bacillus* resistentes a  $\beta$ -lactamases de largo espectro, são alvo de grande preocupação pelos responsáveis de saúde pública. *Staphylococcus aureus* é talvez o patogénico que suscita mais preocupações, pois possui virulência intrínseca e uma elevada capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, o que lhe confere a possibilidade de provocar as mais diferentes infeções, como infeções urinárias, mastites, flebites, osteomielites, meningites, entre outras (Al-haj *et al.*, 2010).

Apesar de fazer parte da microflora natural humana, algumas estirpes de *S. aureus* têm a capacidade de produzir toxinas muito estáveis a altas temperaturas, provocando uma série de doenças em humanos. Pode também multiplicar-se na comida mantida à temperatura ambiente e produzir enterotoxinas que são resistentes ao calor, temperaturas de refrigeração e mesmo ao congelamento, causando gastroenterites ou inflamação no trato intestinal (Le Loir *et al.*, 2003).

Para além das doenças provocadas por bactérias, as doenças provocadas por fungos desde sempre que são problemáticas na sua terapêutica. A principal característica dos fungos, que os torna potenciais patogénicos é possuírem dimorfismo, ou seja, existem na forma de micélios no ambiente mas convertem-se em fungo com o aumento da temperatura do hospedeiro humano (Klein e Tebbets., 2007). Estas patologias podem incluir mais do que uma simples micose mas também reações alérgicas complicadas, nomeadamente devido a toxinas que podem ser libertadas pelos fungos (Gad., 2005). As micoses são as doenças mais comuns. Estas podem ser cutâneas ou sistémicas. Nas sistémicas, os esporos entram geralmente por inalação e conseqüentemente alcançam o sistema circulatório, podendo causar infeções graves e até mesmo levar à morte. As micoses cutâneas são as mais comuns infeções fúngicas nos humanos e são causadas por fungos denominados dermatófitos que possuem a capacidade de utilizar a queratina da pele, do cabelo ou das unhas

segregando uma enzima, a queratinase. O nome mais vulgar para este tipo de infeção é denominado por “pé de atleta” (Gad., 2005).

As micoses sistémicas são muito mais graves e incluem condições como a histoplasnose e a blastomicose. Estas são provocadas por um fungo denominado de *Histoplasma capsulatum*. Quando a infeção é localizada apenas nos pulmões, normalmente com a terapêutica adequada acaba por desaparecer com o tempo, no entanto, se se dissemina para outros locais do organismo como o coração ou sistema nervoso, pode ser fatal (Black., 2011; Pinteus., 2011).

*Candida albicans* é um exemplo de um patogénico oportunista que está presente na microflora humana não exibindo patogenicidade, no entanto pode ser perigoso em indivíduos que apresentem o seu sistema imunitário debilitado provocando a aparecimento de candidíase (Black., 2011). A ocorrência de micoses oportunistas tem aumentado substancialmente desde a utilização de antimicrobianos de largo espectro. Uma vez que estes podem causar efeitos adversos não só para os agentes patogénicos, mas também sobre a flora intestinal natural. Desta forma, quando os microrganismos constituintes da microflora natural são perturbados, os microrganismos patogénicos mais resistentes, têm capacidade de proliferarem rapidamente provocando graves infeções (Black., 2011).

Desta forma, nos últimos anos, um dos principais objetivos de muitos investigadores tem sido a procura de novas moléculas eficazes, potenciais fármacos, especialmente nos casos em que os atuais não tenham a eficácia necessária.

### 1.7. *Desenvolvimento de novos fármacos: antitumorais.*

Há evidências de cancro em seres humanos na literatura médica desde a antiguidade, que remonta aos tempos dos faraós do antigo Egito e do mundo clássico. Embora seja difícil interpretar o diagnóstico dos médicos que viveram há muitos séculos atrás, pode-se supor que muitas das suas descrições são relacionadas com casos de cancro (Nobili *et al.*, 2009). Atualmente o quotidiano da população mundial é afetado por inúmeras patologias, entre as quais o cancro se destaca, quer pelo impacto social, quer pelo impacto económico que tem em todas as sociedades. Representa uma das maiores ameaças à saúde humana, sendo diagnosticado milhões de novos casos todos os anos (Yaacob *et al.*, 2010). Nos seres humanos o que é vulgarmente designado de “cancro”, na realidade compreende mais de 200 patologias diferentes, mas que têm um facto em comum, resultam de uma desordem celular formando uma massa de células anormais (Knowles e Selby., 2005; Schulz, W., 2007). Tumor ou neoplasia são termos utilizados, indiscriminadamente, para descrever um

grupo diversificado de condições associadas à replicação celular descontrolada. A massa de tecido é normalmente controlada de uma forma rígida, mas “fina” para responder às necessidades do organismo. Este controlo é realizado através do equilíbrio de vários processos celulares, como por exemplo a morte celular (apoptose e necrose) e a replicação celular (mitose). A perturbação do equilíbrio destes processos resulta no aparecimento de patologias. Se a perda de células for superior à renovação, ocorre um processo de degeneração, enquanto o inverso resulta num processo de expansão do tecido, hiperplasia ou neoplasia. Se a expansão no número de células se limita localmente, é descrita como “benigna”, se a replicação celular for acompanhada por invasão de tecidos vizinhos ou se propagar para locais distantes (metástases), então é descrita como “maligna” (Knowles e Selby, 2005).

Nas células existe um balanço controlado entre a promoção e a repressão do crescimento celular. Este balanço pode variar quando um aumento do número de células é necessário, por exemplo durante a cicatrização de feridas ou durante a renovação natural dos tecidos. A proliferação e a diferenciação de células durante estes processos ocorrem de uma forma ordenada e cessa quando já não é necessária. Esta coordenação resulta do correto funcionamento dos mecanismos que regulam o ciclo celular que nas células tumorais encontra-se alterado. O ciclo celular, ou o ciclo de divisão celular, consiste numa série de eventos que levam à replicação de uma célula, podendo ser dividido em duas fases: interfase e a mitose. A interfase é constituída pelas fases G1, S e G2 e caracteriza-se essencialmente pelo crescimento da célula e pela replicação do ADN, por sua vez a mitose é uma sucessão de eventos durante os quais a célula se divide em duas. O processo de divisão celular é regulado de modo a que não interfira com as atividades das outras células ou com o organismo. Durante o ciclo celular são feitos *checkpoints* de modo a determinar se as células estão preparadas para avançar com a divisão celular. Nestes “postos de controlo” as células utilizam proteínas para avaliar a sua saúde genética, a sua localização no corpo e se existe necessidade de mais células. São fatores geralmente interpretados como sinais para o bloqueio da divisão celular, alterações genéticas, localização errada das células ou se não existirem necessidades celulares. Por outro lado, se a saúde genética for boa, a localização das células for correta ou se existir défice celular, estes fatores são interpretados como sinais para prosseguir com a divisão celular. As células expressam muitas proteínas cuja principal função é controlar a divisão celular. Estas proteínas são expressas por duas classes de genes, os oncogenes, que codificam para proteínas que promovem a divisão celular e os genes supressores-tumorais, que codificam para proteínas que fornecem sinais que inibem a divisão celular. Uma célula “saudável” recebe sinais de ambos os grupos de proteínas

sobre o quanto é apropriado dividir-se. O equilíbrio das informações fornecidas por esses dois grupos de proteínas permite a divisão celular controlada. Um dos genes supressores-tumorais que tem um papel central na proliferação celular é o p53. Perto do fim da fase G1 do ciclo celular a proteína p53 é expressa por este gene, regulando o processo. Se não existirem mutações no ADN, a p53 “permite” que a célula se divida. Se forem detetadas mutações no ADN, a proteína p53 ativa outras proteínas de modo a que se efetuem as reparações das mutações. No entanto, se o dano for demasiado extenso para reparar, a proteína p53 desencadeia uma resposta que visa a autodestruição da célula (apoptose), impedindo que as células mutantes continuem a crescer. Por outro lado, outras células serão submetidas ao processo de divisão celular para substituir a perda anterior. Outro grupo de proteínas importantes na regulação da apoptose é a família das proteínas Bcl-2. Membros desta família incluem proteínas anti-apoptóticas (bcl-2, bcl-xl, bcl-w, bfl-l, brag-l, mcl-l e Al) e pró-apoptóticas (bax, bad, bak, bcl-xS, bid, bik e HrK). As suas ações podem ser independentes ou em competição umas com as outras. Quando a proteína Bax está em excesso, os homodímeros predominam favorecendo a apoptose, por sua vez quando existe um excesso da proteína bcl-2, esta conduz a formação do heterodímero bcl-2/bax que inibe a apoptose, estimulando a proliferação celular descontrolada (Pelengaris *et al.*, 2006; Sa e Das., 2008; Knowles e Selby., 2005). Estes são alguns exemplos dos mecanismos que ocorrem durante o ciclo celular, sendo que mutações nos genes que codificam para estas proteínas estão associadas a patologias. Quando múltiplas mutações ocorrem nos genes responsáveis por desencadear a divisão celular, a probabilidade da célula controlar este processo de forma adequada é menor (Sa e Das., 2008; Barakat *et al.*, 2013). A perturbação do equilíbrio destes mecanismos num organismo poderá consequentemente levar à génese de um tumor. Existem diversos fatores que podem desencadear o desenvolvimento desta patologia, tais como, a dieta alimentar, hereditariedade, tabaco, consumo de álcool em excesso, obesidade, sedentarismo e infeções (Kwabi-Addo e Lindstrom., 2011).

De facto, os tumores malignos são uma das maiores causas de morte em humanos, sendo mesmo a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda causa de morte nos países em desenvolvimento, tornando-se de extrema importância o desenvolvimento de novos fármacos (Jemal *et al.*, 2011). De entre os vários carcinomas que ocorrem no ser humano, o cancro da mama, estômago, fígado, cólon e pulmão são responsáveis pela maioria das mortes provocadas por esta doença.

O cancro da mama é um problema de saúde pública, apesar de não ser dos mais letais, têm uma alta incidência e uma alta mortalidade, sobretudo na mulher

(apenas 1% se desenvolvem no homem). Atualmente em Portugal com uma população feminina de 5 milhões, surgem 4.500 novos casos de cancro da mama por ano, ou seja 11 novos casos por dia, morrendo por diariamente 4 mulheres com esta doença. No que diz respeito ao carcinoma hepatocelular, a maioria dos casos ocorre na Ásia e na África Subsaariana, onde o maior fator de risco é a infeção crónica pelo vírus da hepatite B ou C. Apesar da maioria dos casos ocorrer em países asiáticos e africanos em desenvolvimento, o predomínio do cancro do fígado aumentou consideravelmente no Japão, na Europa Ocidental e nos Estados Unidos da América. Neste último aumentou mais de 70% nos últimos 25 anos (Jemal *et al.*, 2011).

Deste modo, a pesquisa de novos agentes antitumorais torna-se imprescindível, podendo o ambiente marinho ser uma fonte importante de novos fármacos com elevado potencial.

## **Objetivos**

---



### 2.1. Objetivo Geral

Os organismos marinhos ao longo dos últimos anos têm-se revelado uma fonte única de moléculas com elevado interesse biotecnológico, fornecendo novos compostos com as mais diversas propriedades farmacológicas. Nessa linha, o grupo de investigação em recursos marinhos (GIRM), no qual este trabalho foi realizado, demonstrou anteriormente que as algas da costa de Peniche apresentam potencial biotecnológico (Alves., 2011; Pinteus., 2011; Murray., *et al.* 2013; Rodrigues *et al.*, 2013). Nomeadamente, *A. armata* que apresentou elevada capacidade antimicrobiana e antitumoral. No entanto, e em conformidade a maioria dos trabalhos disponíveis, não se avaliou qual o papel das bactérias epífitas nesse potencial.

Deste modo, o objetivo deste trabalho consistiu na avaliação do potencial biotecnológico de bactérias epífitas da alga *Asparagopsis armata* (Filo Rhodophyta) e da própria alga, relativamente à sua capacidade antimicrobiana e à sua citotoxicidade nas linhas celulares tumorais humanas MCF-7 (carcinoma mamário Humano) e HepG-2 (carcinoma hepatocelular Humano).

### 2.2. Objetivos Específicos

Neste trabalho pretendeu-se extrair compostos bioativos da alga e das bactérias epífitas com recurso a solventes orgânicos, efetuando-se os extratos recorrendo a dois solventes orgânicos, o metanol e diclorometano . Deste modo, os objetivos específicos foram:

1. Isolar bactérias epífitas da alga *A. armata*;
2. Avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos da alga *A. armata* e das suas bactérias epífitas através de estudos espectrofotométricos de crescimento nos microrganismos patogénicos (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*) e não patogénicos (*Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae*) . Todos os ensaios experimentais foram testados “*in vitro*” para a concentração de  $1\text{mgml}^{-1}$  nos microrganismos referidos anteriormente;
3. Realizar ensaios de dose-resposta para determinação do  $\text{IC}_{50}$  dos extratos que exibirem maiores efeitos no crescimento dos microrganismos;
4. Avaliar o potencial citotóxico dos extratos através de estudos de viabilidade celular e de proliferação celular por método espectrofotométrico (redução do MTT). Todos os ensaios experimentais foram testados “*in vitro*” na concentração de  $1\text{mgml}^{-1}$  durante 24 horas nos modelos “*in vitro*” referidos anteriormente.

5. Realizar ensaios de dose-resposta para determinação do  $IC_{50}$  nas frações que exibirem maiores efeitos na viabilidade e na proliferação celular das linhas tumorais em estudo.

## **Material e Métodos**

---



### 3.1. *Recolha e preparação de amostras.*

As amostras da alga *Asparagopsis armata* foram recolhidas na praia da Gamboa e Quebrado, Peniche, Portugal. Após a sua recolha todas as algas foram introduzidas em sacos devidamente esterilizados para garantir a não contaminação das amostras por microrganismos que não estejam presentes naturalmente em simbiose com a alga.

As diferentes amostras foram lavadas 3 vezes em laboratório com água do mar estéril, de modo a remover areias, detritos e os microrganismos que não estivessem em associação de modo definitivo e natural as algas. Após as lavagens passou-se uma zaragatoa em toda a superfície da alga de modo a recolher todas as bactérias epífitas presentes nas amostras. Depois de garantir a recolha das bactérias presentes na superfície da alga fez-se um espalhamento numa placa de cultura microbiana cujo meio era constituído por 5 g/L de peptona, 1 g/L de extrato de levedura, 0,1g/L de FePO<sub>4</sub>, 15g/L de agar-agar dissolvido em água do mar e com um de pH 7,2-7,6.

Após uma incubação durante 7 dias à temperatura de 20°C, unidades formadoras de colónias (UFC's) com diferente morfologia e pigmentação foram recolhidas individualmente para uma nova placa de cultura. Para garantir o isolamento absoluto de todas as bactérias procedeu-se por seis vezes à técnica do riscado.

As amostras de alga após o processamento para isolar as bactérias foram pesadas, embaladas e congeladas a -80°C (Thermo, Electron Corporation), para posterior liofilização e extração.

### 3.2. *Preparação da cultura bacteriana*

As bactérias marinhas foram crescidas em 500ml de meio (5 g/L de peptona, 1 g/L de extracto de levedura, 0,1g/L de FePO<sub>4</sub> dissolvido em água do mar e com um de pH 7,2-7,6) em balões com arejamento durante 3 dias à temperatura de 20°C. No fim do período de crescimento bacteriano procedeu-se à separação das células do meio recorrendo a uma centrifugação (5min a 9000g). No fim deste processo de separação as células foram congeladas a -80°C para posteriormente se proceder à liofilização das amostras.

### 3.3. *Preparação de extratos*

Na preparação dos extratos utilizou-se 1,50g de bactéria liofilizada à qual foi adicionado uma mistura de solventes com diferentes polaridades, nomeadamente metanol e diclorometano (1:1): a amostra liofilizada foi colocada num gobelé contendo 150 ml da mistura de solventes (> 99%, Fisher Scientific, U.K.) durante 16 horas, com agitação constante sendo posteriormente filtrado (whatman N°4).

Os extratos obtidos após a filtração foram concentrados através da utilização de um rotavapor Laborota 4000 (Heidolph) a 40°C, obtendo-se no final a biomassa dos compostos produzidos pelas bactérias epífitas da alga *Asparagopsis armata*. Para garantir a total evaporação de vestígios dos solventes orgânicos todos os extratos passaram por uma corrente de azoto, posteriormente foram dissolvidos em DMSO ( $\geq 99.9\%$ , Dimetilsulfóxido) (Sigma, Steinheim, Germany) e mantidos a -20°C até posterior utilização.

O mesmo procedimento foi realizado para a extração dos compostos bioativos da alga.

### 3.4. Avaliação da Capacidade antimicrobiana

#### 3.4.1. Avaliação da capacidade antibacteriana

Previamente à averiguação da capacidade dos extratos, tanto das bactérias epífitas como da própria alga, para inibir o crescimento de bactérias patogénicas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600) e de um modelo bacteriano não patogénico (*Bacillus subtilis* ATCC 6633), foi necessário proceder à monitorização da curva de crescimento individual, destes mesmos microrganismos, para determinar os tempos dos testes posteriores.

Desta forma, a partir de um stock conservado a -80°C (Thermo, Electron Corporation) retirou-se 5  $\mu\text{l}$  de inóculo para um poço de uma placa de 96 poços com 195  $\mu\text{l}$  de meio LB, exceto para *S.aureus* em que o meio de crescimento adequado e utilizado foi a mistura de TSB (Tryptic Soy Broth) com extrato de levedura (3g/L), perfazendo um volume final de 200  $\mu\text{l}$ . As amostras foram incubadas a 37°C com 200 rpm, durante 48 horas, sendo efetuadas leituras a diferentes horas do crescimento. Os resultados foram obtidos espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 600 nm (Guo *et al.*, 2008). Todos os ensaios foram realizados em quadruplicado.

Todos os extratos foram testados a uma concentração de 1mgml<sup>-1</sup>. Para os extratos com elevada capacidade antibacteriana foram realizados ensaios de dose-resposta.

Como controlo positivo utilizou-se Clorofenicol, Ampicilina, Bacitracina e Oxitetraciclina (Sigma, St. Louis, MO, USA), para estes antibióticos a concentração máxima testada foi de 300 $\mu\text{gml}^{-1}$ .

As amostras foram incubadas a 37°C a 200 rpm, e as leituras foram efectuadas às 7h para *E.coli* e *S.aureus*, 5h para *S. enteritidis* e 10h para *B. subtilis* e *P.*

*aureginosa*. Os tempos foram definidos para a fase linear de crescimento dos microrganismos, após análises das curvas de crescimento dos mesmos.

Os resultados foram obtidos espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 600 nm (Guo *et al.*, 2008). Todos os ensaios foram realizados em quadruplicado.

A capacidade antibacteriana foi calculada pela redução do crescimento (% do controlo) através da seguinte equação:

$$\text{Redução do crescimento (\% Controlo)} = [(Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}}) / Abs_{\text{controlo}}] \times 100$$

Onde:

$Abs_{\text{controlo}}$  → Absorvância do crescimento do microrganismo, em meio;

$Abs_{\text{amostra}}$  → Absorvância do crescimento do microrganismo na presença dos extratos;

$Abs_{\text{branco}}$  → Absorvância dos extratos no meio.

### 3.4.2. Avaliação da capacidade antifúngica

Antes de se efetuar os testes com os extratos sobre os microrganismos teste, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) e o fungo patogénico *Candida albicans* (ATCC 10231), foi necessário proceder à monitorização da sua curva de crescimento. A partir de um stock conservado a -80°C (Thermo, Electron Corporation) 5 µl de inóculo para um poço de uma placa de 96 poços com 195 µl de meio YPD, perfazendo um volume final de 200 µl. As amostras foram incubadas a 30°C com 200 rpm, durante 48 horas, sendo efetuadas leituras a diferentes horas do crescimento.

Os resultados foram obtidos espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 600 nm (Guo *et al.*, 2008). Todos os ensaios foram realizados em quadruplicado.

Todos os extratos foram testados a uma concentração de 1mgml<sup>-1</sup>. Para os extratos com elevada capacidade antibacteriana foram realizados ensaios de dose-resposta.

Como controlo positivo utilizou-se Anfotericina B e Flumequina (Sigma, St. Louis, MO, USA), para estas soluções a concentração máxima testada foi de 300µgml<sup>-1</sup>.

As amostras foram incubadas a 30°C a 400 rpm, e as leituras foram efetuadas às 20 horas de crescimento para *S. cerevisiae* (ATCC 9763) e 7 horas para *C. albicans* (ATCC 10231). Os tempos foram definidos para a fase de crescimento exponencial, após análises das curvas de crescimento. Os resultados foram obtidos espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 600 nm (Guo *et al.*, 2008). Todos os ensaios foram realizados em quadruplicado.

A capacidade antifúngica foi calculada pela redução do crescimento (% do controlo) através da seguinte equação:

$$\text{Redução do crescimento (\% Controlo)} = [(Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}}) / Abs_{\text{controlo}}] \times 100$$

Onde:

$Abs_{\text{controlo}}$  → Absorvância do crescimento do microrganismo, em meio YPD;

$Abs_{\text{amostra}}$  → Absorvância do crescimento do microrganismo na presença dos extratos;

$Abs_{\text{branco}}$  → Absorvância dos extratos no meio YPD.

### 3.5. Avaliação do potencial citotóxico

A avaliação do potencial citotóxico (proliferação celular e toxicidade) dos diferentes extratos foi testada em duas linhas celulares tumorais humanas, as células HepG-2 e as células MCF-7. O modelo celular proveniente de carcinoma hepatocelular de fígado humano (células HepG-2) (ATCC number: HTB-37) foi cultivado em meio RPMI 1640 (Sigma, U.S.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, U.S.A) e 1% de antibiótico/ antimicótico (Sigma, U.S.A). O modelo celular proveniente de carcinoma mamário (células MCF-7) (DSMZ number: ACC 115) foi cultivado em meio RPMI 1640 (Sigma, U.S.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, U.S.A), 1% de antibiótico/ antimicótico (Sigma, U.S.A), 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma, U.S.A), 1mM de Piruvato de Sódio (Sigma, U.S.A) e  $10\mu\text{gml}^{-1}$  de Insulina Humana (Sigma, U.S.A). O meio de cultura foi sempre mudado 12 horas após as células serem semeadas. De dois em dois dias o meio de cultura foi mudado em ambas as linhas celulares.

As células foram mantidas em cultura numa incubadora de  $\text{CO}_2$  ( $\text{CO}_2$  Unitherm) com 5% de  $\text{CO}_2$ , 95% de humidade e a uma temperatura constante de  $37^\circ\text{C}$ .

#### 3.5.1. Ensaio de proliferação celular e viabilidade celular nas células HepG-2 e MCF-7.

A avaliação do efeito dos extratos da alga *A. armata* e das bactérias associadas com a *A. armata* sobre a proliferação celular e viabilidade celular das células HepG-2 e MCF-7 foi adaptado do método realizado por Yuan e Walsh (2006). As células MCF-7 e HepG-2 foram semeadas em placas de  $25\text{ cm}^2$  com meio específico supracitado, demorando cinco/seis dias até atingir a confluência total das placas. Após este período de tempo, as células presentes nas placas de  $25\text{ cm}^2$  foram levantadas com tripsina (Sigma, U.S.A) e semeadas em placas de 96 poços, adicionando-se  $20\mu\text{L}$  de suspensão celular e  $180\mu\text{L}$  de meio com soro em cada poço.

Para testar o efeito dos extratos na proliferação celular das linhas celulares em estudo, os extratos (dissolvidos em DMSO) foram preparados em meio de cultura sem

FBS e filtrados esterilmente (0,2 µm, Whatman, U.K.). Após 36h das células serem semeadas em placas de 96 poços, removeu-se o meio destas e adicionou-se 100 µL de meio com FBS (para assegurar o crescimento celular) e 100 µL de meio sem FBS com o extrato. Todos os extratos testados foram incubados à concentração de 1mgml<sup>-1</sup> durante 24 horas.

Para avaliar o efeito dos extratos sobre a viabilidade celular das linhas celulares em estudo foi necessário esperar cerca de 5/6 dias até as placas de 96 poços atingirem a confluência total. Os extratos (dissolvidos em DMSO) foram dissolvidos em meio sem FBS e filtrados esterilmente (0,2µm, Whatman, U.K.). Após as placas atingirem a confluência total em todos os poços, removeu-se o meio e de seguida adicionou-se 200 µl da solução anteriormente preparada (meio sem soro + extrato). Todos os extratos foram testados à concentração de 1mgml<sup>-1</sup> e incubados durante 24 horas.

O efeito das diferentes frações sobre as linhas celulares em estudo foi revelado pelo método de MTT.

### 3.5.1.1. Método de 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)

Este método baseia-se na redução de sais tetrazólicos de MTT por desidrogenases mitocondriais metabolicamente ativas (células viáveis) em cristais de formazan. Posteriormente, estes cristais são dissolvidos num solvente orgânico de modo a serem medidos espectrofotometricamente, permitindo uma relação com o número de células viáveis, pois quanto maior a quantidade de células viáveis maior o número de cristais formados (Pelengaris S. e Khan, 2006; Rotter, *et al* 1993).

Neste trabalho experimental o método de MTT foi adaptado do trabalho realizado por Yuan e Walsh (2006). Após o período de experiência definido, aspirou-se o meio contendo os extratos de algas e lavou-se as células com 200µl de tampão Hank's. Após esta lavagem adicionou-se 100µl de MTT (1,2mM) (Sigma, Germany), previamente dissolvido em tampão Hank's (composição de meio em mM: NaCl 137, KCl 5, MgSO<sub>4</sub> 0,8, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,33, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44, CaCl<sub>2</sub> 0,25; MgCl<sub>2</sub> 1,0; Tris HCl 0,15 e butirato de sódio 1,0; pH=7.4) e filtrado esterilmente (0,2 µm, Whatman, U.K.) de modo a determinar o efeito provocado na proliferação celular e na viabilidade celular. De seguida, as células foram incubadas 4 horas a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub>, em atmosfera humidificada (95%). Para solubilizar os cristais de formazan resultantes da reação, adicionou-se a todos os poços 100 µL de isopropanol (Panreac, Espanha) contendo 0,04M HCl, homogeneizando com o auxílio de uma micropipeta (processo realizado em gelo). Posteriormente as células foram incubadas 1 hora, à temperatura ambiente,

protegidas da luz. Finalmente, os resultados foram obtidos espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 570 nm. Este tipo de metodologia permite de um modo rápido, perceber qual o efeito dos extratos sobre as linhas celulares em estudo.

### 3.6. *Análise Estatística*

Com o objetivo de avaliar a capacidade antimicrobiana e a citotoxicidade dos extratos de *A. armata* e das suas bactérias epífitas, procedeu-se à análise de variância (ANOVA) com um fator (de efeitos fixos) (Zar, 2010) . Para tal, todos os pressupostos (nomeadamente, homogeneidade de variâncias e normalidade dos dados) foram devidamente validados. Sempre que adequado, foi realizado o teste de comparações múltiplas de *Dunnett*, por forma a averiguar as diferenças estatisticamente significativas com o controlo (Zar, 2010). Os valores de  $IC_{50}$  e os correspondentes limites de confiança a 95% foram determinados pelo método de análise de *probit* (Finney, 1971). Sempre que adequado, os resultados são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Em todos os resultados obtidos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância de 0,05 ou 0,01 (isto é, sempre que  $p < 0,05$  ou  $p < 0,01$ , respetivamente). Todos os cálculos foram realizados mediante a utilização do *software* GraphPad InStat .

## **Resultados**

---



### 4.1. *Isolamento e crescimento das bactérias epífitas da alga Asparagopsis armata*

Do isolamento de bactérias em placa, como referido na secção de material e métodos, resultaram 150 unidades formadoras de colónias (UFC's) que cresceram durante 7 dias à temperatura de 20°C. Contudo, apenas 30 dessas UFC's apresentavam características fenóticas diferentes, nomeadamente, a morfologia e pigmentação.

Uma vez isoladas, as bactérias fenotipicamente diferentes foram colocadas em crescimento em meio líquido (500ml) durante 3 dias, como referido anteriormente, obtendo-se uma biomassa seca com, aproximadamente, 2 a 3 gramas. A biomassa resultante de cada bactéria, fenotipicamente diferente, foi submetida ao processo de extração para posterior estudo.

### 4.2. *Avaliação da capacidade antimicrobiana*

A capacidade antimicrobiana dos diferentes extratos (alga e bactérias epífitas) foi avaliada pela competência que estes possam ter em inibir o crescimento dos microrganismos patogénicos. Para tal, foi necessário traçar o perfil de crescimento para as diferentes bactérias e fungos, na ausência dos extratos.

Os perfis de crescimento encontram-se representados na Figura 3. Como se pode observar pela análise das curvas, todos os microrganismos apresentam diferentes perfis de crescimento. Por esta razão optou-se por seleccionar um ponto no início da fase exponencial (início de crescimento) individual como ponto de referência para o crescimento de cada microrganismo. Desta forma, foi possível averiguar se na presença dos extratos os microrganismos cresciam de igual modo. Assim, para *C. albicans*, *E.coli* e *S.aureus* o tempo de incubação utilizado para avaliação da capacidade inibitória dos extratos foi às 7 horas de crescimento, 5 horas para *S. enteritidis*, 10 horas para *B. subtilis*, 12 horas para *P. aureginosa* e 20 horas para *S. cerevisiae*.

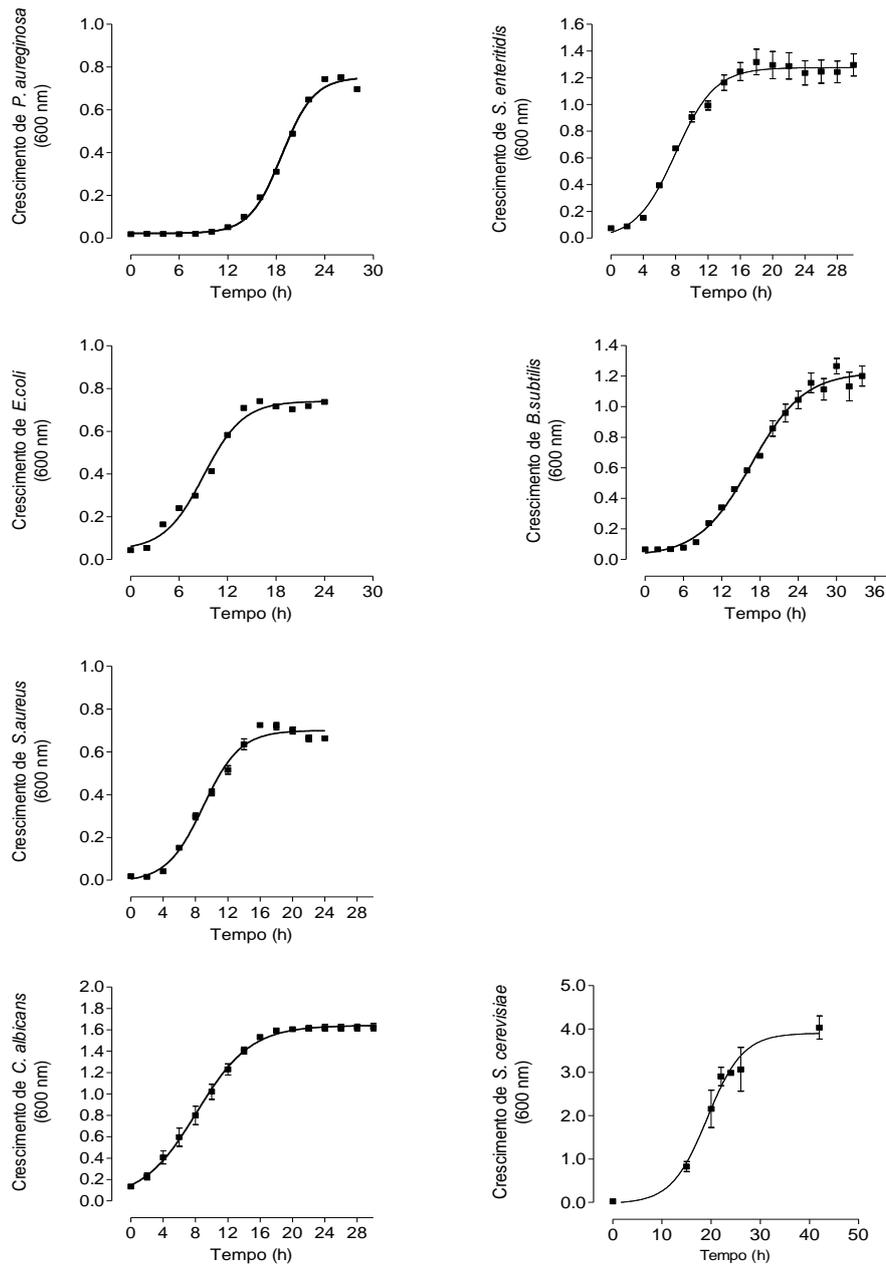


Figura 3 - Curvas de crescimento microbiano de todos os microrganismos testados, *E.coli*, *S.aureus*, *S. enteritidis*, *B. subtilis*, *P. aurescens*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Os valores correspondem à média  $\pm$  SEM (n=4).

### 4.2.1. Capacidade antibacteriana do extrato da alga *Asparagopsis armata* e das suas bactérias associadas

#### 4.2.1.1. Capacidade antibacteriana do extrato da alga *Asparagopsis armata*.

Avaliação da capacidade antibacteriana do extrato de *A. armata* foi realizada inicialmente à concentração de  $1\text{mgml}^{-1}$  para todas as bactérias utilizadas em estudo. Pelos resultados observados, foi possível concluir que, o extrato da alga em estudo inibiu o crescimento de todos os microrganismos por completo, tendo sido detetadas diferenças estatisticamente significativas para todas as bactérias, quando comparadas com o controlo, (ANOVA, teste de *Dunnett*;  $p < 0,01$ ) (Figura 4).

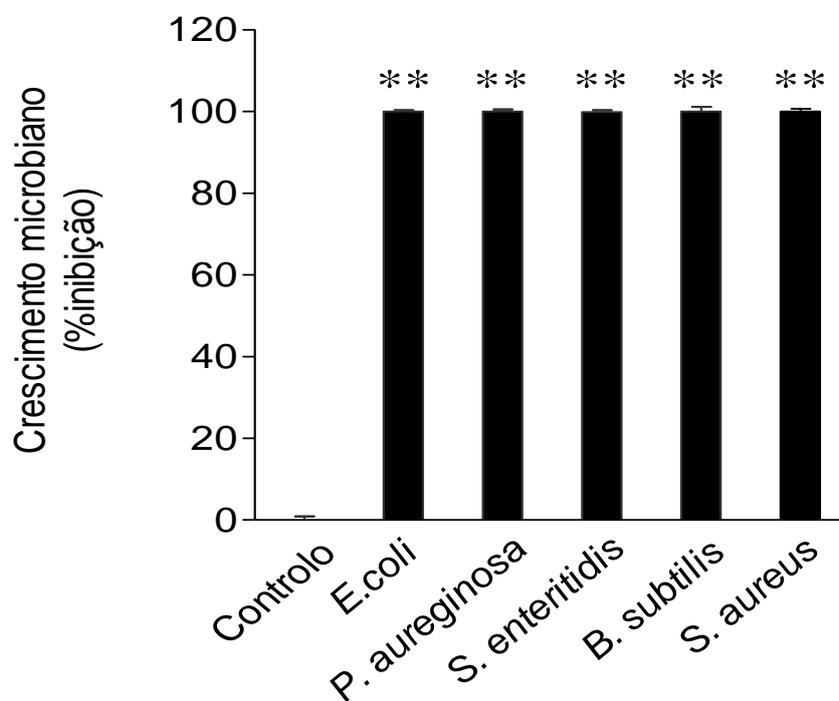


Figura 4 - Efeito do extrato de *Asparagopsis armata* ( $1\text{mgml}^{-1}$ ), no crescimento das bactérias, *E.coli*, *S.aureus*, *S. enteritidis*, *B. subtilis* e *P. aureginosa*. Os valores correspondem à média  $\pm$  SEM (n=4). \*\*p <0,01 representa diferenças estatisticamente significativas comparativamente com o controlo.

Uma vez que os resultados à concentração máxima demonstraram que seria necessária uma concentração de extrato de alga inferior a  $1\text{mgml}^{-1}$  para inibir menos de 50% do crescimento das bactérias, procedeu-se à realização de ensaios dose-resposta. Para todos os ensaios foi possível observar um efeito dependente da concentração testada, tal como pode ser verificado na Figura 5.

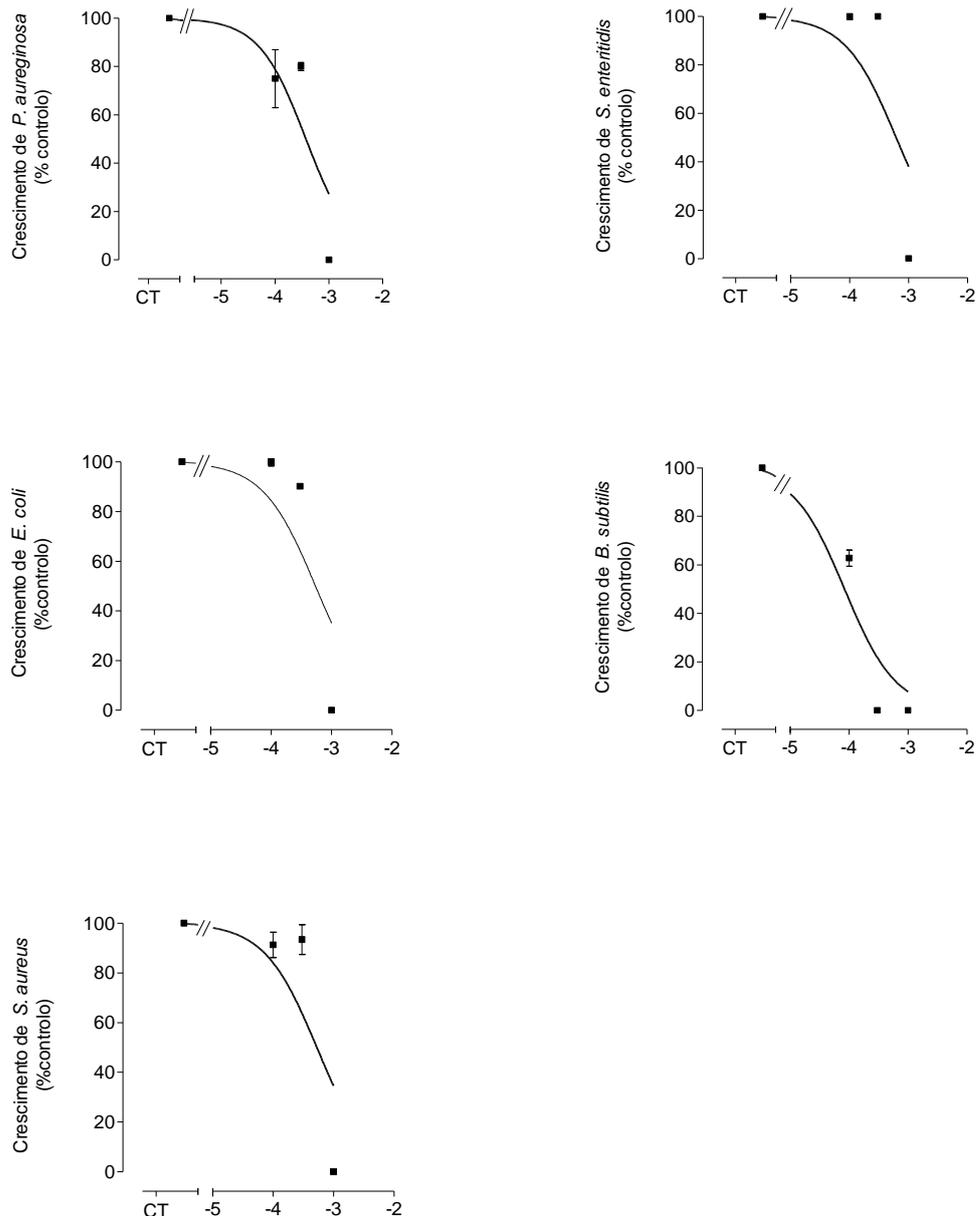


Figura 5 - Efeito de diferentes concentrações (10 – 1000 $\mu\text{gml}^{-1}$ ) do extrato de *Asparagopsis armata* no crescimento das bactérias *E.coli*, *S.aureus*, *S. enteritidis*, *B. subtilis* e *P. aureginosa*. Os símbolos correspondem à média  $\pm$  SEM (n=4).

Após o cálculo do  $\text{IC}_{50}$  do extrato para cada microrganismo, foi possível observar que o maior potencial em inibir o crescimento bacteriano foi obtido para *B. subtilis*, apresentando um  $\text{IC}_{50}$  de 83,7  $\mu\text{gml}^{-1}$  (49,6-141,5). Para as restantes bactérias patogênicas o extrato apresentou um potencial inibitório inferior. Por conseguinte, o  $\text{IC}_{50}$  de 613,8  $\mu\text{gml}^{-1}$  (267,1-1411,0) para *S. enteritidis*, de 374,3  $\mu\text{gml}^{-1}$  (195,0-718,4) para *P. aureginosa*, de 540,6  $\mu\text{gml}^{-1}$  (260,2-1123,0) para *E.coli* e de 528,6  $\mu\text{gml}^{-1}$  (248,0-1127,0) para *S.aureus*.

## 4.2.1.2. Capacidade antibacteriana dos extratos das bactérias epífitas de *Asparagopsis armata*

As relações de simbioses entre bactérias e macroalgas podem ser de facto bastante importantes para os organismos envolvidos, ao ponto de não conseguirem sobreviver de uma forma solitária. Como já foi referido anteriormente, os microrganismos epífitos podem ser cruciais nos mecanismos de defesa da macroalga, podendo produzir, de forma autónoma, compostos com essa finalidade. Por esta razão, a capacidade antibacteriana encontrada no extrato de alga, poderá ser resultante de moléculas produzidas pelas suas bactérias epífitas. Neste sentido, uma análise dos compostos produzidos por estes microrganismos torna-se essencial.

Para avaliar a capacidade antibacteriana dos extratos das bactérias epífitas, utilizou-se a mesma metodologia que se desenvolveu para o extrato de *A. armata*. Por conseguinte, todos os ensaios foram inicializados com uma concentração máxima de extrato de  $1\text{mgml}^{-1}$ .

Para todas as bactérias testadas, os extratos apenas demonstraram efeitos inibitórios no crescimento microbiano, em relação ao controlo, para as estirpes *B.subtilis* (ANOVA, teste de *Dunnett*,  $p < 0,01$  ou  $p < 0,05$ ) e *S.aureus* (ANOVA, teste de *Dunnett*,  $p < 0,01$ ).

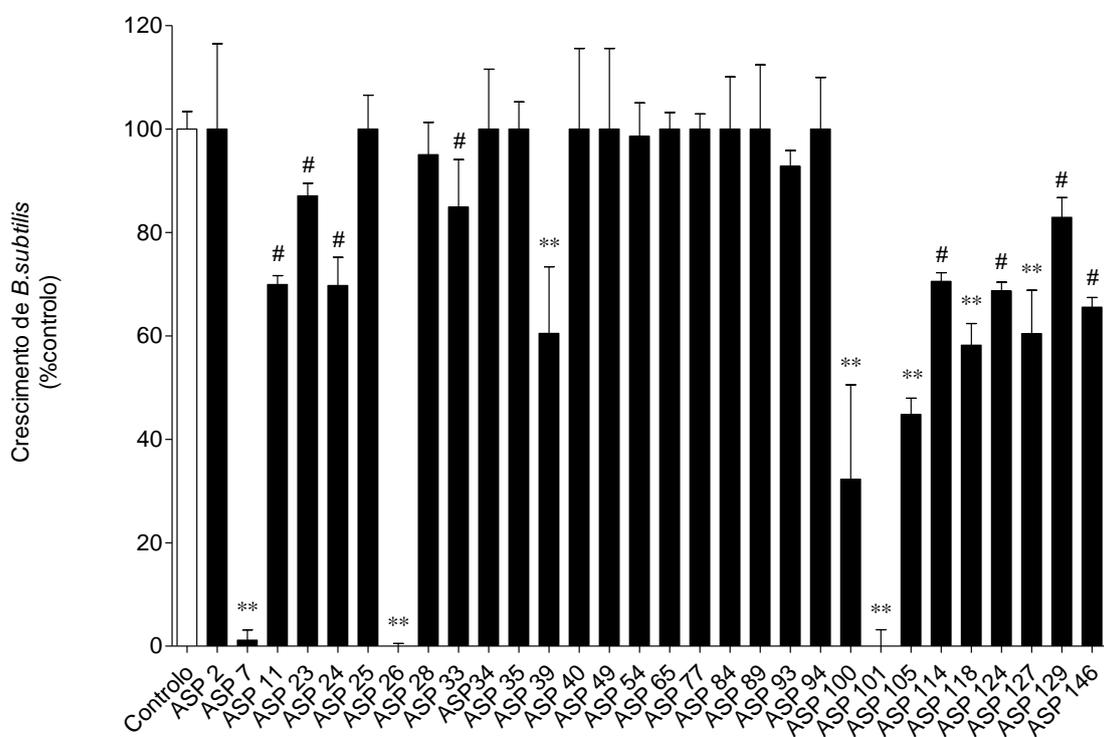


Figura 6 - Efeito do extrato das bactérias associadas à *Asparagopsis armata* ( $1\text{mgml}^{-1}$ ) no crescimento de *B. subtilis*. Os valores correspondem à média  $\pm$  SEM ( $n=4$ ). \*\* $p < 0,01$  e # $p < 0,05$  representam diferenças estatisticamente significativas comparativamente com o controlo.

Pela análise da Figura 6, é possível verificar que os extratos das bactérias epífitas ASP2, ASP7, ASP11, ASP23, ASP24, ASP26, ASP33, ASP39, ASP100, ASP101, ASP105, ASP114, ASP118, ASP124, ASP127, ASP129 e ASP146 apresentaram inibição do crescimento de *B.subtilis*. Tal como, os extratos ASP 11, ASP 24, ASP 39, ASP 105, ASP 124 e ASP 127 que também exibiram diferenças estatísticas quando comparados com o controlo. Contudo, essa redução não foi superior a 50% apresentando desta forma um IC<sub>50</sub> igual ou superior a 1mgml<sup>-1</sup>. Na concentração máxima estudada, os extratos ASP7, ASP26, ASP100 e ASP101 foram os que exibiram uma inibição superior a 50% no crescimento da bactéria em análise. Neste sentido, estes foram submetidos a ensaios dose-resposta com o objetivo de calcular a concentração necessária para inibir 50% do crescimento microbiano. Para todos, foi verificado que o crescimento da bactéria *B. subtilis* foi inibido de um modo dependente da concentração (Figura 7).

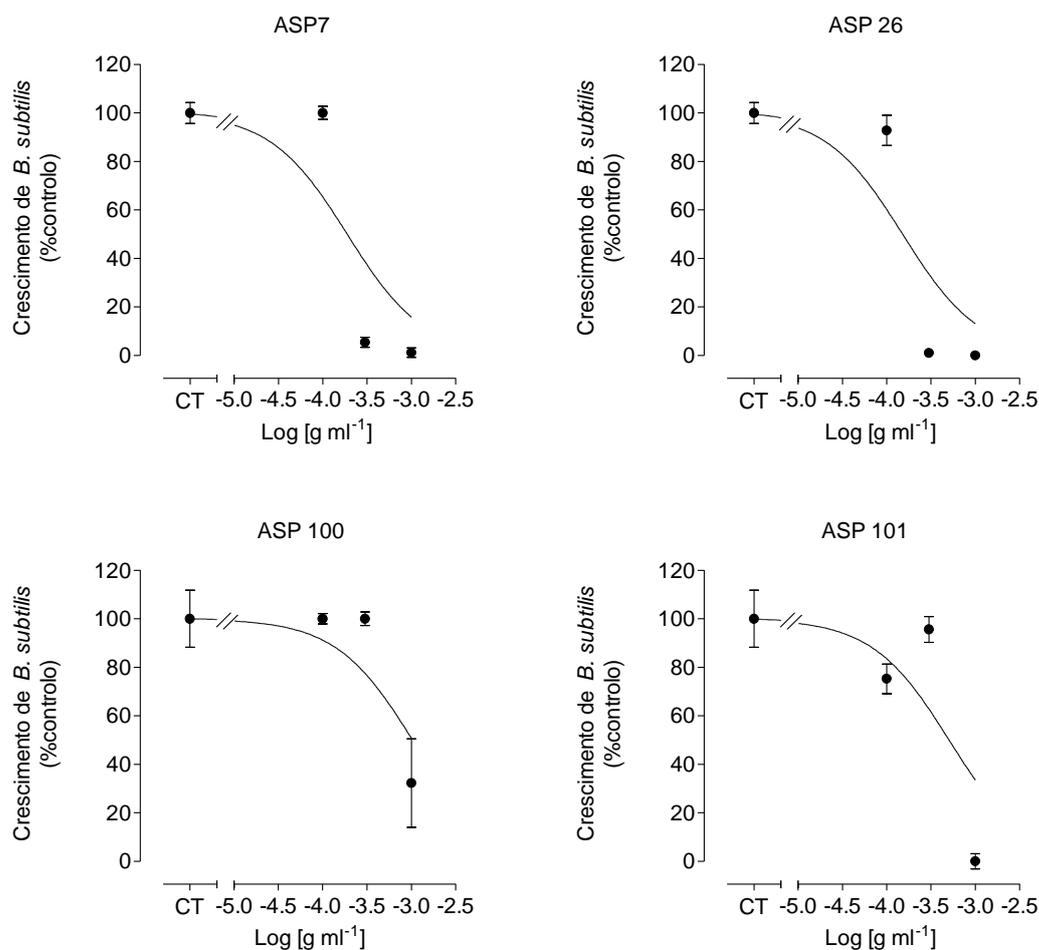


Figura 7 - Efeito de diferentes concentrações (100 – 1000µgml<sup>-1</sup>) do extrato das bactérias marinhas ASP7, ASP26, ASP100 e ASP101, associadas de *Asparagopsis armata* no crescimento de *B.subtilis*. Os símbolos correspondem à média ± SEM (n=4).

Dos extratos testados nos ensaios dose-resposta, a bactéria ASP 26 foi a mais potente, com um valor de  $IC_{50}$  de  $151,1 \mu\text{gml}^{-1}$  (85,7-266,1). Os extratos ASP 7, ASP 100 e ASP 101 apresentaram um  $IC_{50}$  de  $188,5 \mu\text{gml}^{-1}$  (106,4-334,1),  $1034,0 \mu\text{gml}^{-1}$  (488,9-2186,9) e  $505,5 \mu\text{gml}^{-1}$  (267,7-954,6) respetivamente.

Na avaliação da capacidade antibacteriana contra *S.aureus* os extratos ASP2, ASP7, ASP11, ASP23, ASP24, ASP25, ASP26, ASP28, ASP34, ASP94, ASP100, ASP101, ASP105, ASP124, ASP127 e ASP146 (correspondentes a extratos das bactérias epífitas de *Asparagopsis armata*) apresentaram inibição do crescimento bacteriano, com diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo (ANOVA, teste de *Dunnnett*  $p < 0,01$ ). Contudo, os extratos ASP7, ASP26 e ASP101 foram os que apresentaram uma maior redução no crescimento de *S.aureus* (superior a 50%). Todos os restantes extratos não apresentaram uma inibição superior a 40% necessitando por isto uma concentração superior a  $1\text{mgml}^{-1}$  para inibir 50% do crescimento de *S.aureus* (Figura 8).

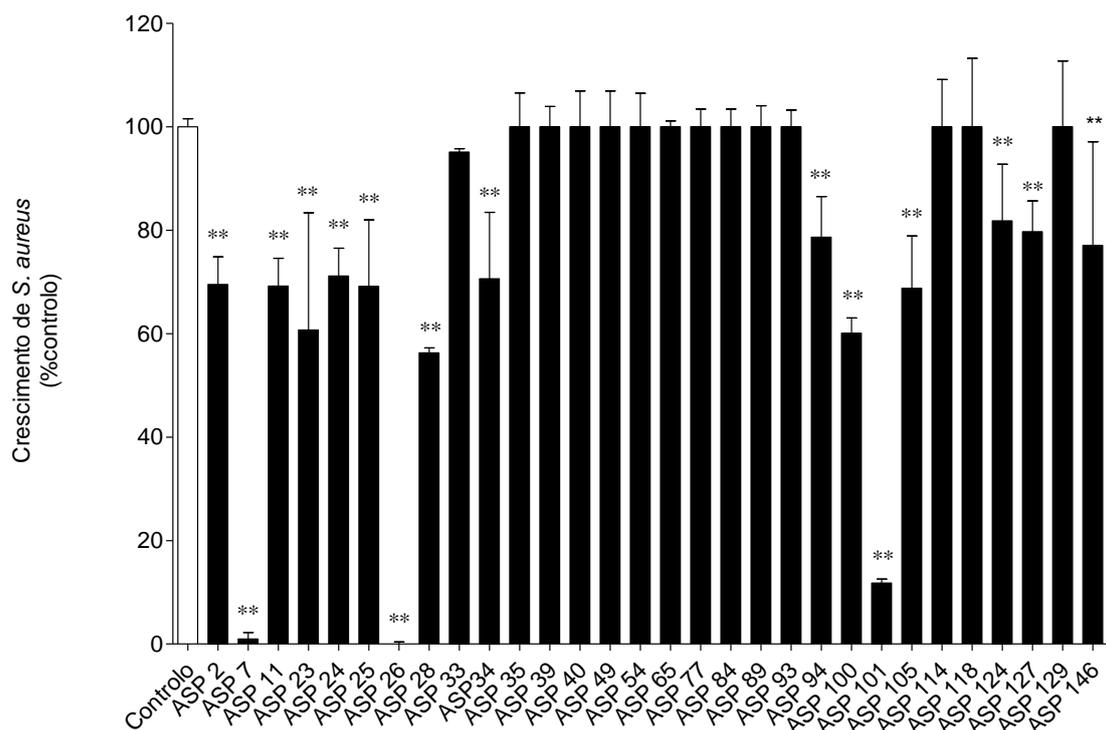


Figura 8 - Efeito do extrato das bactérias associadas à alga *Asparagopsis armata* ( $1\text{mgml}^{-1}$ ), no crescimento de *S. aureus*. Os valores correspondem à média  $\pm$  SEM ( $n=4$ ). \*\* $p < 0,01$  representa diferenças estatisticamente significativas comparativamente com o controlo.

Na mesma linha dos ensaios realizados para *B. subtilis*, para os extratos mais potentes foram realizados ensaios dose-resposta. Para todos, foi verificado que o crescimento da bactéria *S. aureus* foi inibido de um modo dependente da concentração (Figura 9).

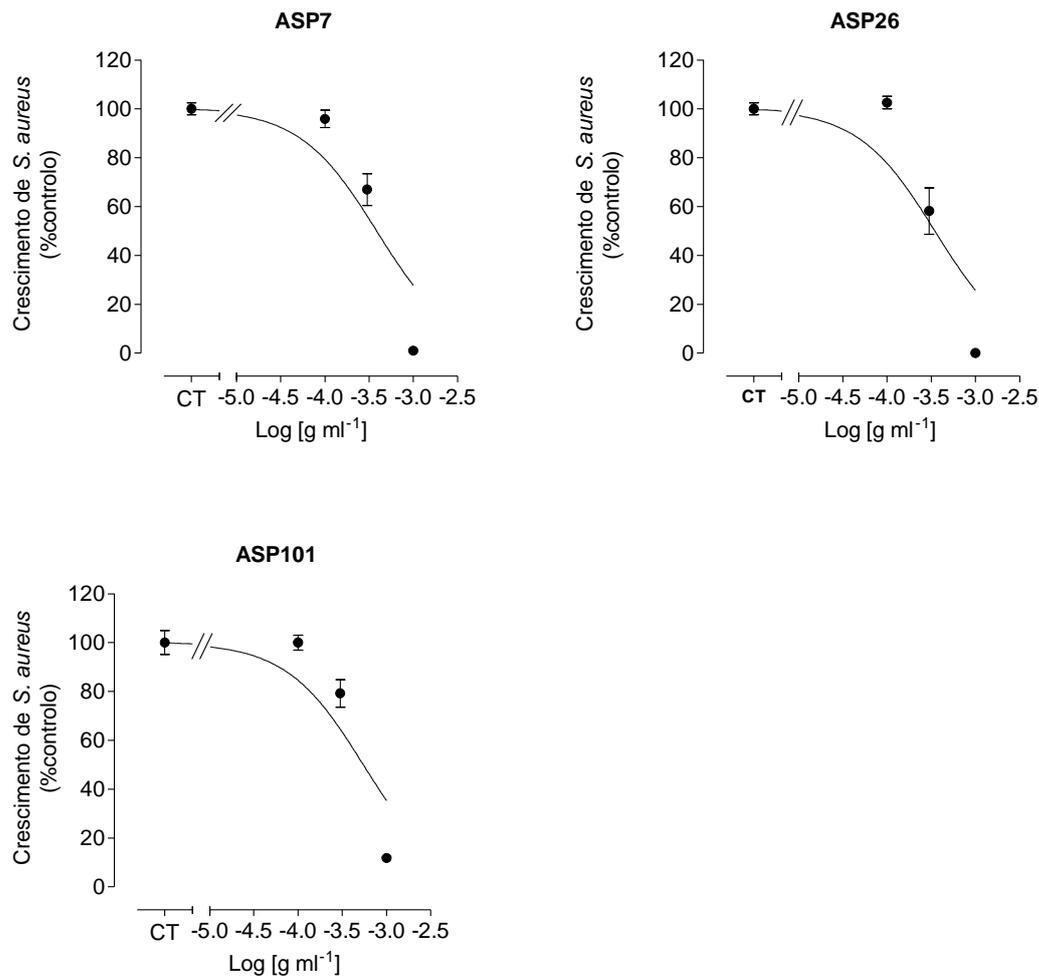


Figura 9 - Efeito de diferentes concentrações (100 – 1000 $\mu\text{gml}^{-1}$ ) dos extratos das bactérias associadas à *Asparagopsis armata* ASP7, ASP26 e ASP101 no crescimento de *S. aureus*. Os símbolos correspondem à média  $\pm$  SEM (n=4).

Os ensaios dose-resposta dos extratos ASP7, ASP26 e ASP101 para *S. aureus* revelaram  $\text{IC}_{50}$  semelhantes, 384,0  $\mu\text{gml}^{-1}$  (255,4-578,6), 346,8  $\mu\text{gml}^{-1}$  (216,4-555,8) e 546,1  $\mu\text{gml}^{-1}$  (357,6-834,1), respetivamente.

Em paralelo com os ensaios de avaliação da capacidade antibacteriana dos extratos, foram sempre utilizados controlos positivos. Estes antibióticos foram usados para garantir a equidade dos ensaios desenvolvidos para os extratos, tanto da alga como das bactérias epífitas. Na Tabela I é possível analisar os resultados de  $\text{IC}_{50}$  dos controlos positivos utilizados, Bacitracina, Oxitetraciclina, Ampicilina e Clorofenicol, no crescimento de todas as bactérias estudadas.

Tabela I - Valores de IC<sub>50</sub> dos antibióticos padrão (Bacitracina, Oxitetraciclina, Ampicilina e Clorofenicol) para as bactérias estudadas. Os resultados expressam a média de 8 experiências independentes, utilizando diferentes concentrações de antibióticos (0,01 – 300µgml<sup>-1</sup>).

	IC <sub>50</sub> (µgml <sup>-1</sup> )			
	Bacitracina	Oxitetraciclina	Ampicilina	Clorofenicol
<i>E. coli</i>	-	0,51 (0,296±0,886)	2,24 (0,648±7,76)	81,72 (46,09±144,9)
<i>S. entertidis</i>	-	1,89 (1,26±2,83)	2,53 (0,716±8,95)	70,92 (46,7±107,6)
<i>S. aureus</i>	4,05 (3,35±4,90)	0,403 (0,265±0,614)	0,038 (0,028±0,050)	26,01 (19,06±35,5)
<i>B. subtilis</i>	4,092 (3,30±5,06)	0,159 (0,128±0,197)	0,162 (0,124±0,211)	48,140 (33,73±68,71)
<i>P. aureginosa</i>	-	0,981 (0,760±1,26)	-	-

Da análise da Tabela I é possível verificar que o antibiótico Oxitetraciclina é o composto com maior capacidade de inibir o crescimento bacteriano, porque de uma forma geral é o antibiótico que necessita de uma menor concentração para inibir 50% do crescimento bacteriano. Em contrapartida a Bacitracina é o composto com menor capacidade antibacteriana. Este composto não conseguiu inibir o crescimento de *S.entertidis* em nenhuma concentração igual ou inferior a 300µgml<sup>-1</sup>. A bactéria patogénica *P. aureginosa* demonstrou ser a mais resistente, sendo inibido o seu crescimento apenas pelo composto Oxitetraciclina à concentração máxima estudada (300µgml<sup>-1</sup>).

### 4.2.2. Capacidade antifúngica do extracto da alga *Asparagopsis armata* e das suas bactérias simbiontes:

#### 4.2.2.1. Capacidade antifúngica do extrato de *Asparagopsis armata*

A avaliação da capacidade antifúngica do extrato de alga foi realizada nos mesmos moldes que a capacidade antibacteriana. Assim, inicialmente foram realizados ensaios à concentração máxima estuda ( $1\text{mgml}^{-1}$ ). Neste primeiro ensaio, o extrato demonstrou uma elevada capacidade inibitória no crescimento de *C.albicans* e *S.cerevisae*, tendo sido as diferenças observadas estatisticamente significativas (ANOVA, teste de *Dunnett*;  $p < 0,01$ )(Figura 10).

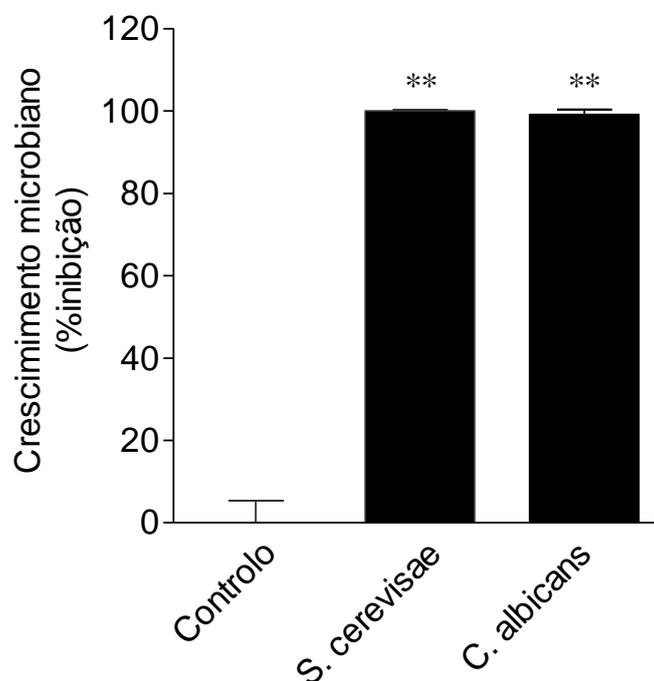


Figura 10 - Efeito do extrato de *Asparagopsis armata* ( $1\text{mgml}^{-1}$ ), no crescimento de *S.cerevisae* e *C. albicans*. Os valores correspondem à média  $\pm$  SEM ( $n=4$ ). \*\* $p < 0.01$  representa diferenças estatisticamente significativas comparativamente com o controlo.

Pelos resultados alcançados é possível verificar que o extrato de alga inibiu em 100% o crescimento dos dois microrganismos estudados (Figura 10). Neste sentido, e para perceber qual o  $\text{IC}_{50}$  do extrato, tanto para *S.cerevisae* como para *C. albicans*, recorreu-se a ensaios dose-resposta (Figura 11).

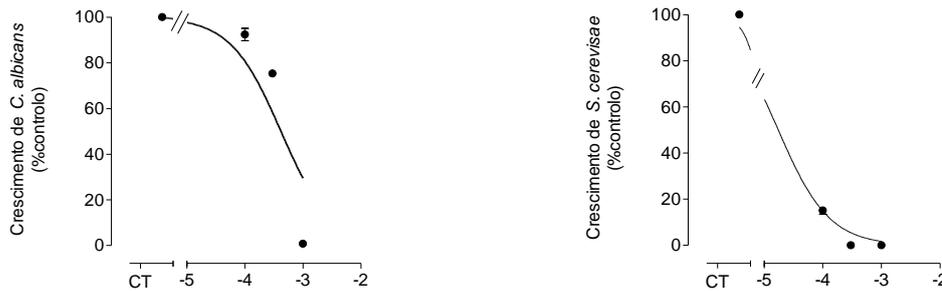


Figura 11 - Efeito de diferentes concentrações ( $10 - 1000 \mu\text{gml}^{-1}$ ) do extrato de *Asparagopsis armata* no crescimento do fungo *C. albicans* e da levedura *S. cerevisiae*. Os símbolos correspondem à média  $\pm$  SEM (n=4).

O ensaio de dose-resposta revelou que o extrato apresenta maior potência para *S.cerevisiae* do que para *C.albicans*, com um  $\text{IC}_{50}$  de  $17,3 \mu\text{gml}^{-1}$  (12,7-23,82) e de  $419,0 \mu\text{gml}^{-1}$  (241,0-728,6), respetivamente.

#### 4.2.3 Capacidade antifúngica do extrato das bactérias epífitas da alga *Asparagopsis armata*

Conhecendo as possíveis vantagens da relação simbiote dos organismos estudados neste trabalho, a avaliação da capacidade antifúngica, tal como para a capacidade antibacteriana, das bactérias epífitas de *A. armata* torna-se essencial. Desta forma foi possível entender se a capacidade antifúngica encontrada no extrato de alga é ou não proveniente dos microrganismos epífitos.

Numa primeira análise, os extratos ASP2, ASP24, ASP25, ASP26, ASP28, ASP34, ASP39, ASP49, ASP54, ASP65, ASP77, ASP84, ASP89, 101, ASP105, ASP114, ASP118, ASP124, ASP127, ASP129 e ASP146 das bactérias epífitas revelaram capacidade inibitória no crescimento de *S.cerevisiae* (ANOVA, teste de *Dunnett*,  $p < 0,01$  ou  $p < 0,05$ ). Contudo, nenhum dos extratos conseguiu inibir o crescimento da levedura em análise, em mais de 50% à concentração máxima estudada ( $1 \text{ mgml}^{-1}$ ) (Figura 12).

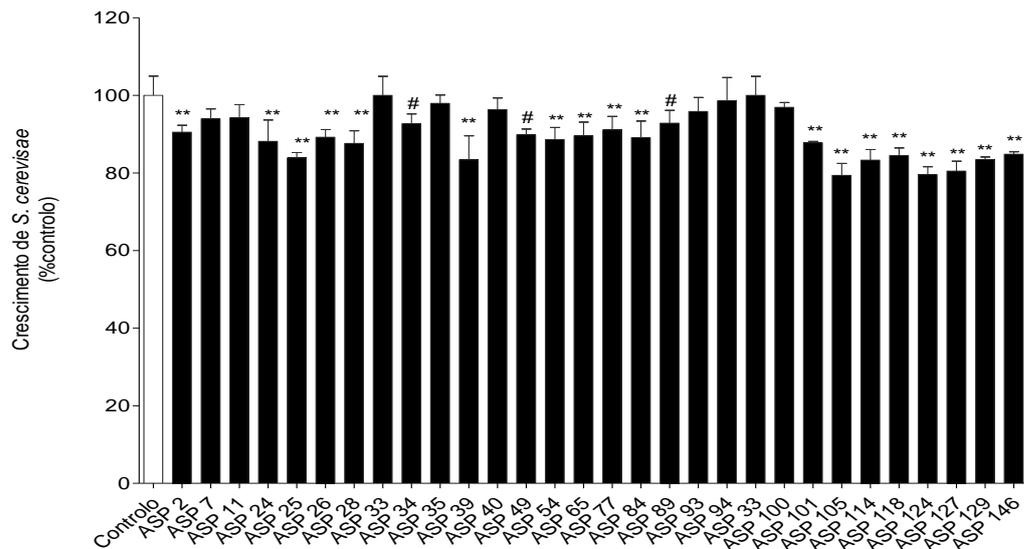


Figura 12 - Efeito dos extratos das bactérias associadas com a alga *Asparagopsis armata* ( $1\text{mgml}^{-1}$ ) no crescimento de *S.cerevisiae*. Os valores correspondem à média  $\pm$  SEM (n=4). \*\* $p < 0,01$  e # $p < 0,05$  representam diferenças estatisticamente significativas comparativamente com o controle.

Na avaliação da capacidade antifúngica, utilizando o patogénico *C. albicans*, os extratos ASP2 e ASP100 foram os únicos que revelaram inibição no crescimento do fungo, em que ASP2 foi o que apresentou um maior potencial (ANOVA, teste de *Dunnett*,  $p < 0,01$ ). No entanto, nenhum dos extratos analisados conseguiu inibir em mais de 50% o crescimento deste patogénico (Figura 13). Por esta razão, não foram realizados ensaios dose-resposta.

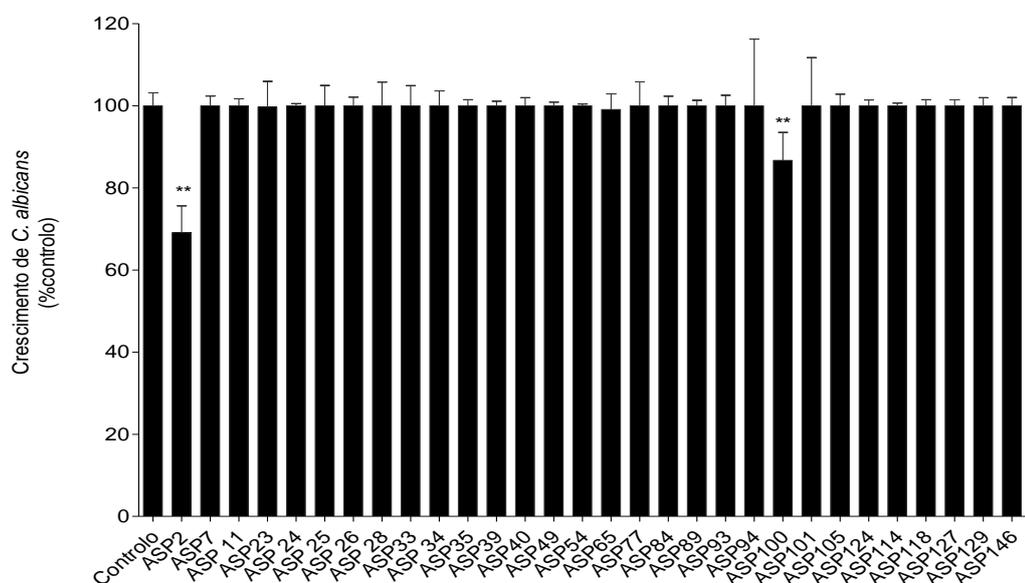


Figura 13 - Efeito dos extratos das bactérias associadas com a *Asparagopsis armata* ( $1\text{mgml}^{-1}$ ), no crescimento de *C. albicans*. Os valores correspondem à média  $\pm$  (SEM) (n=4). \*\* $p < 0.01$  representa diferenças estatisticamente significativas comparativamente com o controle.

Em paralelo com os ensaios de avaliação da capacidade antibacteriana dos extratos, foram sempre utilizados controlos positivos, antifúngicos padrão, de forma a garantir a equidade dos ensaios desenvolvidos para os extratos, tanto da alga como das bactérias epífitas. Na Tabela II é possível analisar os resultados de IC<sub>50</sub> dos controlos positivos utilizados, Anfotericina B e Flumequina, no crescimento dos microrganismos estudados.

Pela observação dos resultados obtidos (Tabela II) é possível verificar que o antifúngico Anfotericina B é o único que consegue inibir em mais de 50% crescimento dos dois microrganismos estudados à concentração máxima estudada (300 µgml<sup>-1</sup>). Para *S. cerevisiae* apresenta um IC<sub>50</sub> de 17,86 µgml<sup>-1</sup> (12,08-26,4) e para o patogénico *C. albicans* tem a concentração de 119,3 µgml<sup>-1</sup> (89,4-158,5) como IC<sub>50</sub>. O antifúngico Flumequina apresentou um valor de IC<sub>50</sub> igual a 0,464 µgml<sup>-1</sup> (0,314-0,684) para *S. cerevisiae*. Contudo, este mesmo antifúngico não conseguiu, à concentração máxima estudada (300µgml<sup>-1</sup>) inibir o crescimento de *C. albicans*.

Tabela II - Valores de IC<sub>50</sub> (µgml<sup>-1</sup>) dos antifúngicos padrão (Anfotericina B e Flumequina) para os microrganismos estudados. Os resultados expressam a média de 8 experiências independentes, utilizando diferentes concentrações de teste (0,1 – 300µgml<sup>-1</sup>).

	IC <sub>50</sub> (µgml <sup>-1</sup> )	
	Anfotericina B	Flumequina
<i>S. cerevisiae</i>	17,86 (12,08±26,4)	0,464 (0,314±0,684)
<i>C. albicans</i>	119,3 (89,4±158,5)	-

### 4.3. Avaliação da capacidade antitumoral

#### 4.3.1. Avaliação da capacidade citotóxica do extrato de *Asparagopsis armata* e das suas bactérias epífitas

O efeito citotóxico dos extratos das bactérias epífitas e da alga *Asparagopsis armata* foi avaliado na linha celular tumoral hepática (HepG-2) e numa linha celular do cancro da mama (MCF-7) à concentração máxima de 1mgml<sup>-1</sup> (24 horas). Tal como foi referido na secção material e métodos, todos ensaios foram realizados pelo método colorimétrico MTT, de forma aferir a capacidade antitumoral.

### 4.3.1.1. Efeito citotóxico do extrato de alga *Asparagopsis armata* nas linhas celulares HepG-2 e MCF-7

O extrato de *A.armata* revelou elevada toxicidade, que se traduziu numa grande diminuição da viabilidade das linhas celulares HepG-2 e MCF-7 (ANOVA, teste de *Dunnett*;  $p < 0,01$ ) (Figura 14). Na concentração máxima testado neste trabalho ( $1 \text{mgml}^{-1}$ ) o extrato diminui a viabilidade celular em mais de 90% para MCF-7 e em mais de 75% para HepG-2.

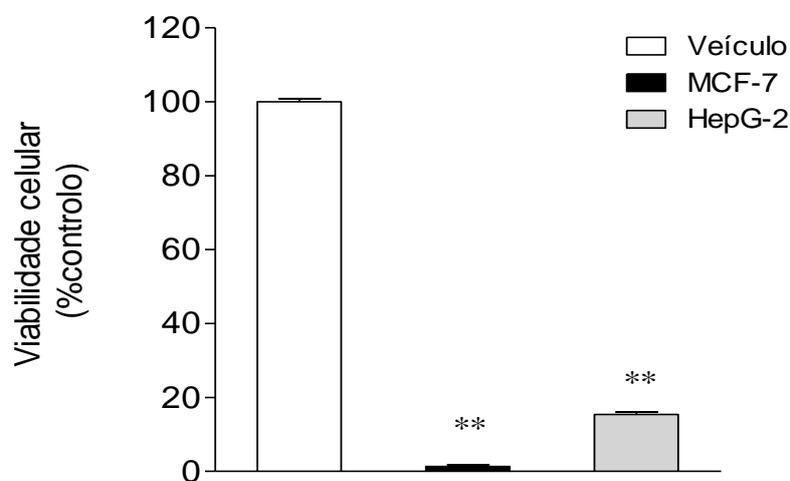


Figura 14 - Efeito de citotoxicidade do extrato de *Asparagopsis armata* ( $1 \text{mgml}^{-1}$ ) nas linhas celulares HepG-2 e MCF-7 (% controlo) após 24 horas de incubação. Os valores correspondem à média  $\pm$  SEM ( $n=4$ ). \*\* $p < 0.01$  representa diferenças estatisticamente significativas comparativamente com o veículo.

Uma vez que o extrato apresentou, à concentração de  $1 \text{mgml}^{-1}$ , uma tão elevada capacidade citotóxica para ambas as linhas celulares, foram realizados ensaios de dose-resposta (Figura 15).

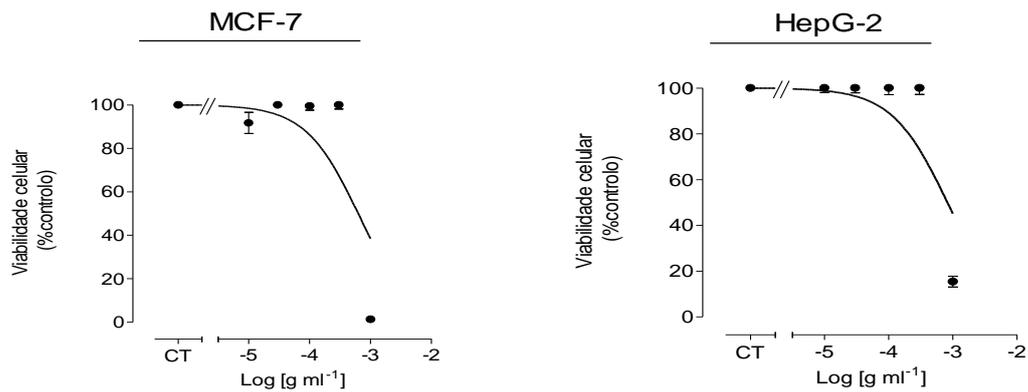


Figura 15 - Efeito de diferentes concentrações (10 – 1000 $\mu\text{gml}^{-1}$ ) do extracto de *Asparagopsis armata* na viabilidade celular das linhas MCF-7 e HepG-2. Os símbolos correspondem à média  $\pm$  SEM (n=4).

Pela análise dos resultados (Figura 15) é perceptível observar que tanto para a linha celular hepática, como para linha celular do cancro da mama, o extrato apresenta uma elevada citotoxicidade apenas para concentrações elevadas. Apresentando valores de citotoxicidade inferiores para as concentrações mais reduzidas utilizadas (10, 30, 100 e 300  $\mu\text{gml}^{-1}$ ). A partir deste ensaio foi possível calcular o  $\text{IC}_{50}$  do extrato para as duas linhas celulares. Desta forma, o extrato apresentou um  $\text{IC}_{50}$  de 625,0 $\mu\text{gml}^{-1}$  (431,1-906,2) e 821,1 $\mu\text{gml}^{-1}$  (627,1-1075,0) para MCF-7 e HepG-2, respetivamente.

#### 4.3.1.2. Efeito citotóxico do extrato das bactérias epífitas de *Asparagopsis armata* nas linhas celulares HEPG-2 e MCF-7

A descoberta de novos fármacos com potencial antitumoral é cada vez mais necessária e oportuna. Por outro lado, neste âmbito, conhecendo o potencial do extrato de alga torna-se interessante perceber se as bactérias epífitas têm alguma relação com esta atividade. Podendo ser uma fonte promissora de compostos com estas características.

Nas Figuras 16 e 17 encontram-se os resultados dos ensaios de citotoxicidade dos extratos nas linhas celulares HepG-2 e MCF-7. É notório que muitos dos extratos das bactérias associadas da *Asparagopsis armata*, quer para a linha celular HepG-2, quer para MCF-7 apresentaram algum efeito na viabilidade celular, tendo diferenças estatísticas em relação ao controlo. Contudo, uma análise dos resultados indica que todos os extratos necessitam de uma concentração superior a 1 $\text{mgml}^{-1}$  de forma a reduzir 50% da viabilidade celular.

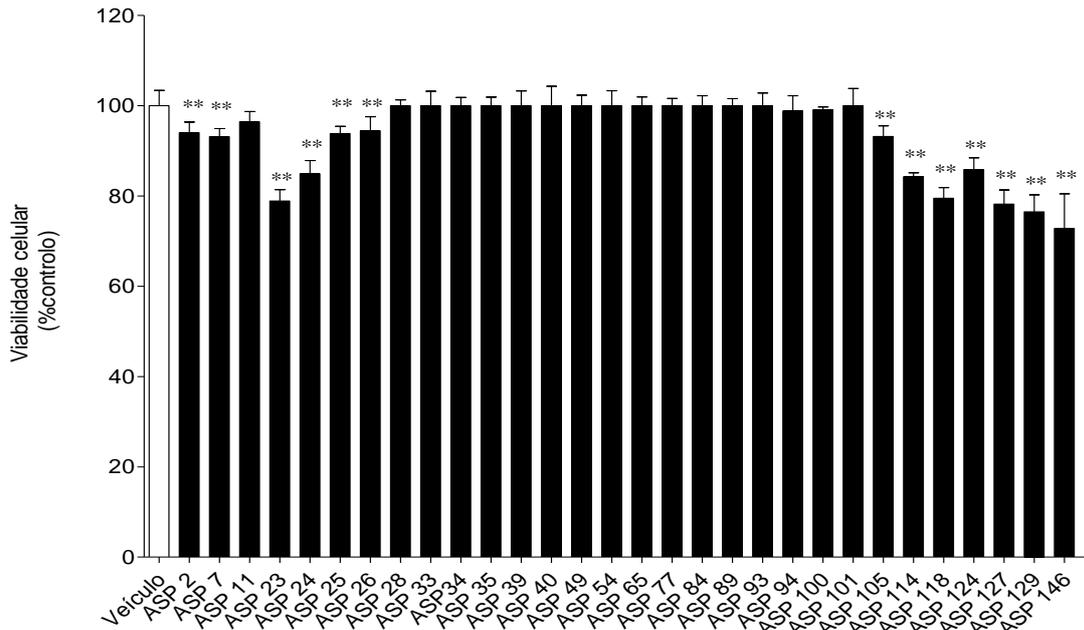


Figura 16 - Efeito dos extratos das bactérias epifitas (1mg/ml) na viabilidade celular das células MCF-7 (% controle) após 24 horas de incubação. Os valores correspondem à média  $\pm$  SEM (n=4). \*\*p<0,01 representa diferenças estatisticamente significativas comparativamente com o veículo.

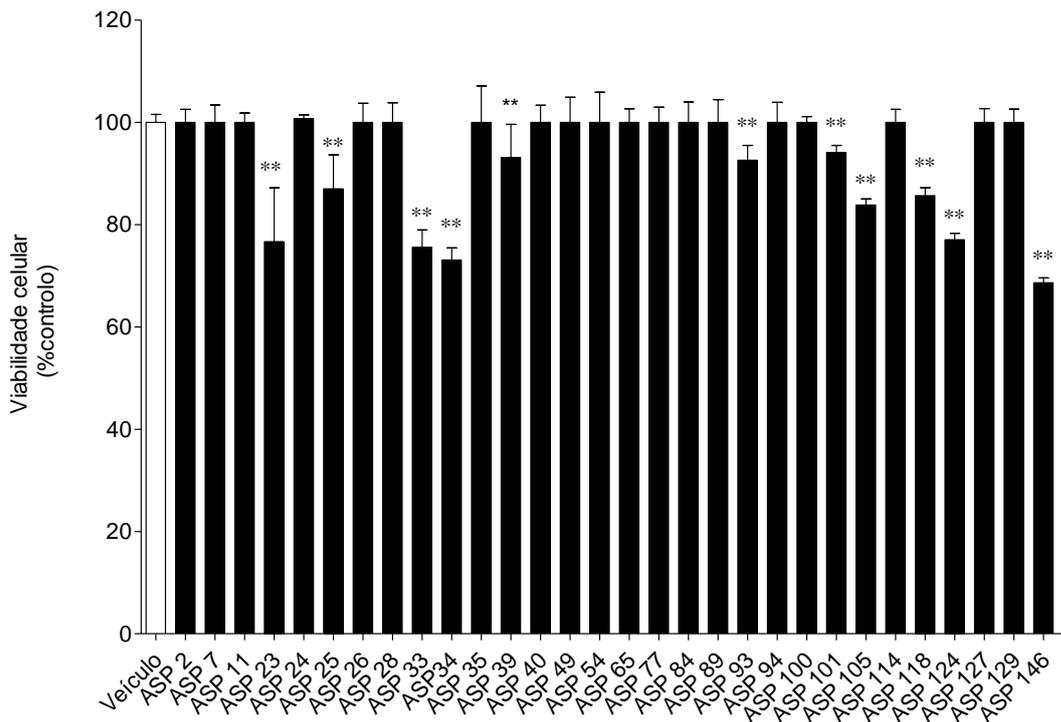


Figura 17 - Efeito dos extratos das bactérias epifitas (1mg/ml) na viabilidade celular das células HepG-2 (% controle) após 24 horas de incubação. Os valores correspondem à média  $\pm$  SEM (n=4). \*\*p<0,01 representa diferenças estatisticamente significativas comparativamente com o veículo.

## 4.3.2. Avaliação da capacidade anti-proliferativa do extrato de *Asparagopsis armata* e das suas bactérias epífitas

### 4.3.2.1. Efeito na proliferação celular do extrato de alga *Asparagopsis armata* nas linhas HepG-2 e MCF-7

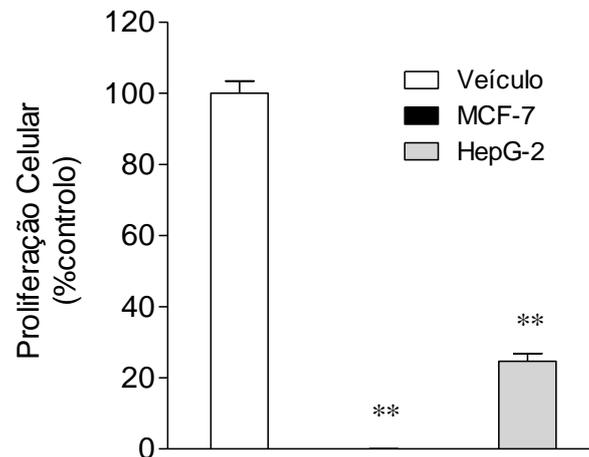


Figura 18 - Efeito sobre a proliferação celular do extrato de *Asparagopsis armata* ( $1\text{mgml}^{-1}$ ) nas linhas celular MCF-7 (% controle) e HepG-2 após 24 horas de incubação. Os valores correspondem à média  $\pm$  SEM (n=4). \*\*p<0,01 representa diferenças estatisticamente significativas comparativamente com o veículo.

Pela análise das Figuras 18 e 19 é perceptível a capacidade que o extrato da alga tem para inibir a proliferação celular. Para a linha celular do cancro da mama a inibição foi total ( $100\% \pm 3.41$ ) e nas células tumorais hepáticas a inibição foi também muito notória ( $75.33\% \pm 2.15$ ). O  $\text{IC}_{50}$  do extrato foi de  $788,2 \mu\text{gml}^{-1}$  ( $590,1-1053,0$ ) para HepG-2 e de  $370,2 \mu\text{gml}^{-1}$  ( $270,0-507,5$ ) para MCF-7.

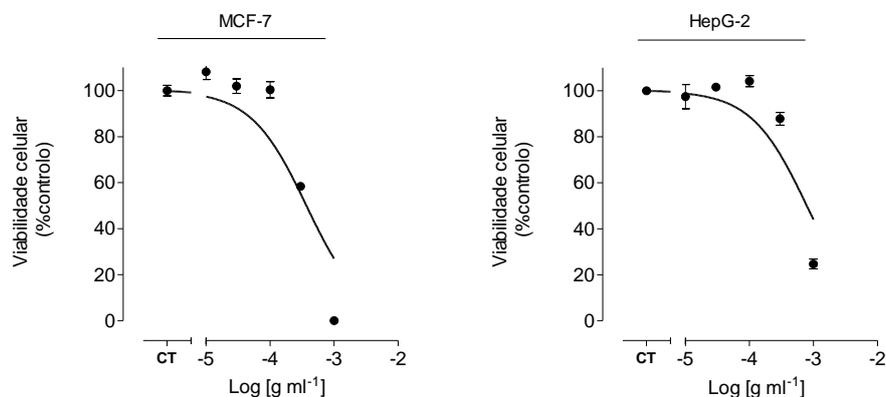


Figura 19 - Efeito de diferentes concentrações ( $10 - 1000\mu\text{gml}^{-1}$ ) do extrato de *Asparagopsis armata* na proliferação celular das linhas MCF-7 e HepG-2. Os símbolos correspondem à média  $\pm$  SEM (n=4).

## 4.3.2.2. Efeito na proliferação celular dos extratos das bactérias epífitas de *Asparagopsis armata* nas linhas HepG-2 e MCF-7

Em concordância com os resultados obtidos para o efeito citotóxico, na capacidade de inibição da proliferação celular, grande parte dos extratos das bactérias epífitas demonstraram capacidade de afetar a proliferação celular, comparativamente com o controlo (ANOVA, teste de *Dunnett*;  $p < 0,01$  ou  $p < 0,05$ ). Uma vez que nenhum dos extratos bacterianos conseguiu inibir mais de 50% a proliferação celular nas duas linhas testadas (Figura 20 e 21) subentende-se que estes têm um  $IC_{50}$  igual ou superior a  $1\text{mgml}^{-1}$ .

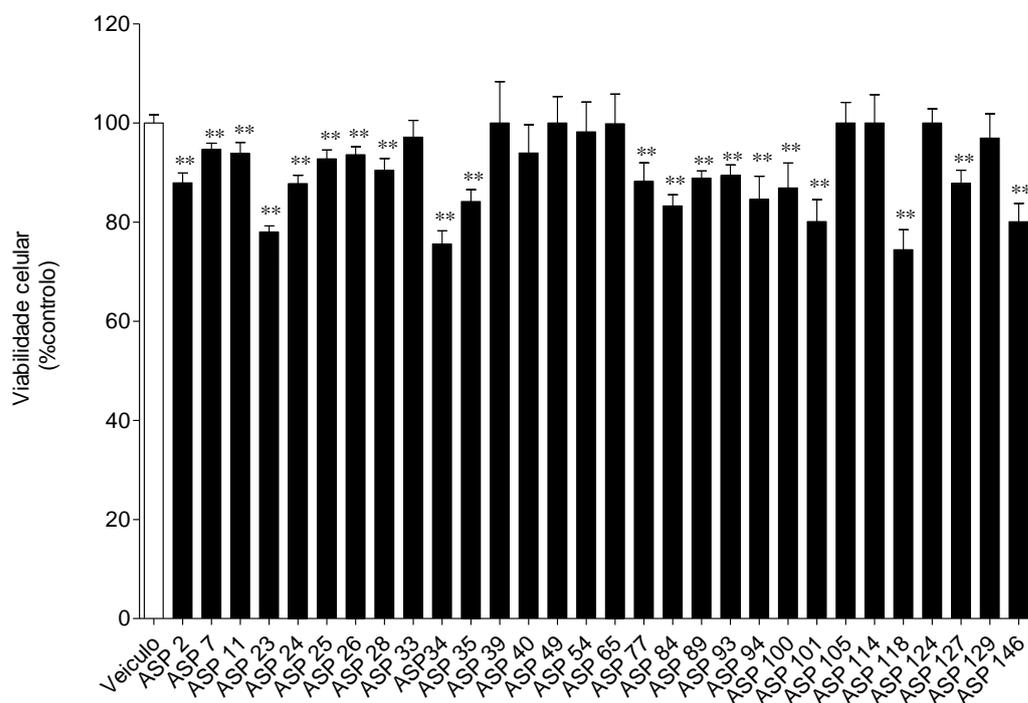


Figura 20 - Efeito dos extratos das bactérias epífitas ( $1\text{mgml}^{-1}$ ) na proliferação celular das células MCF-7 (% controlo) após 24 horas de incubação. Os valores correspondem à média  $\pm$  SEM (n=4). \*\* $p < 0,01$  representa diferenças estatisticamente significativas comparativamente com o veículo.

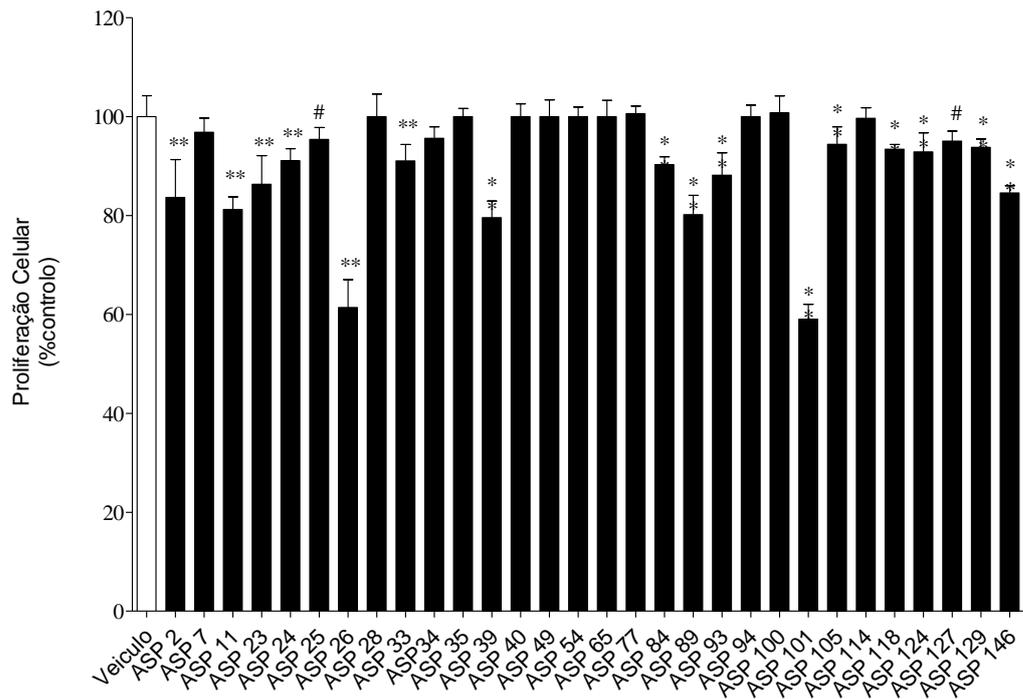


Figura 21 - Efeito dos extratos das bactérias epífitas ( $1\text{mgml}^{-1}$ ) sobre a proliferação celular das células HepG-2 (% controle) após 24 horas de incubação. Os valores correspondem à média  $\pm$  SEM ( $n=4$ ). \*\* $p<0,01$  e # $p<0,05$  representam diferenças estatisticamente significativas comparativamente com o veículo.



## **Discussão e Conclusão**

---



*Asparagopsis armata* e as suas bactérias epífitas têm como habitat natural a zona intertidal marinha, deste modo, necessitam de uma adaptação que lhes permita sobreviver ao *stress* provocado pelas marés, assim como à ação mecânica das ondas, a ação de organismos competidores, bactérias patogénica, entre outros. Estes fatores são preponderantes na produção de novas moléculas com atividade antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, entre outras (Bianco *et al.*, 2010). Este facto foi comprovado pelos nossos resultados, que revelaram uma elevada capacidade antimicrobiana e antitumoral no extrato da alga, bem como da atividade antimicrobiana demonstrada pelos extratos de diferentes bactérias epífitas isoladas da *Asparagopsis armata*.

A capacidade antimicrobiana avaliada neste trabalho demonstrou resultados positivos associados ao extrato de *Asparagopsis armata* para todos os microrganismos patogénicos e não patogénicos testados, nomeadamente *B. subtilis*, *S. enteritidis*, *P. aureginosa*, *E.coli*, *C. albicans* e *S.cerevisae*. Por outro lado, nos extratos das bactérias epífitas isoladas da *A. armata* apenas foram obtidos resultados positivos contra *S.aureus* e *B.subtilis*.

Alguns dos antibióticos comercializados na atualidade podem exercer sob o organismo humano alguns problemas nefastos. Nomeadamente os antibióticos de largo espectro, uma vez que estes não só afetam o desenvolvimento de microrganismos patogénicos mas também a microflora natural (Black., 2011). Desta forma se o efeito do antibiótico for excessivo na microflora, os microrganismos patogénicos, como os que foram estudados neste trabalho, podem proliferar rapidamente provocando uma superinfecção (Black., 2011). O uso excessivo de antibióticos pode ainda causar outros problemas, como a resistência dos organismos patogénicos a estes compostos. Os microrganismos geralmente adquirem resistências aos antibióticos por alterações genéticas, contudo alterações de membrana celular e da sua permeabilidade pode também ser um mecanismo de resistência. Black (2011) afirma que a utilização dos mesmos antibióticos durante muitas décadas, para além de induzirem mutações, criam ambientes que favorecem a sobrevivência de microrganismos patogénicos mutantes e resistentes. Desta forma, a pesquisa de novas moléculas com capacidade inibitória da proliferação de microrganismos patogénicos é cada vez mais oportuna, tornando-se uma necessidade clínica com o passar do tempo (Al-haj *et al.*, 2010). Neste contexto, os organismos marinhos têm tido um papel preponderante na pesquisa de novos compostos (Ely *et al.*, 2004; Salvador *et al.*, 2007; Al-haj *et al.*, 2010; Vijayavel e Martinez., 2010; Murray *et al.*, 2013).

Embora existam um número incomensurável de publicações sobre o potencial das moléculas produzidas pelas macroalgas, poucos são os estudos que se debruçam sobre os organismos epífitas destas (Egan *et al.*, 2008). Do ponto de vista biotecnológico, a produção de toxinas, moléculas de sinalização e outros metabolitos secundários, produzidos para desenvolver uma competição eficaz e estratégias de defesa por parte dos microrganismos epífitas, constituem uma fonte sem paralelo para a descoberta de novos agentes terapêuticos e de novas moléculas bioativas, com potenciais aplicações na indústria, nomeadamente na cosmética, alimentar e farmacêutica (Devi *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2005; Perino *et al.*, 2013). A descoberta de microrganismos epífitas com capacidade de produzir moléculas com interesse farmacológico é uma oportunidade comparativamente com as algas, se atentarmos principalmente à capacidade de produção industrial associada ao cultivo e crescimento em reator dos microrganismos. Apesar desta oportunidade biotecnológica, e das características aparentemente únicas inerentes aos organismos epífitas das macroalgas, nem a sua diversidade filogenética, nem as suas propriedades químicas e outras características funcionais foram bem exploradas (Egan *et al.*, 2008). Neste contexto este estudo torna-se primordial nesta área.

Diversos trabalhos têm demonstrado que as macroalgas produzem compostos com uma atividade antimicrobiana bastante interessante (Ely *et al.*, 2004; Salvador *et al.*, 2007; Al-haj *et al.*, 2010; Taskin *et al.*, 2010; Plaza *et al.*, 2010; Blunt *et al.*, 2011; Edziri *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2013), contudo as macroalgas do Filo Rhodophyta apresentam um maior potencial neste âmbito (Manilal *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2013).

Vários estudos com algas vermelhas demonstraram atividade antimicrobiana, facto que se encontra de acordo com os resultados obtidos neste trabalho (Padmakumar e Ayyakkannu., 1997; Mayer *et al.*, 2007). Num trabalho desenvolvido por Vairappan e colaboradores (2004) foram isolados diferentes compostos halogenados de algas vermelhas e todos eles com capacidade antibacteriana contra microrganismos gram-positivos. A alga vermelha *Asparagopsis armata*, por ser uma macroalga com uma capacidade de proliferação bastante elevada, sendo atualmente catalogada como um organismo invasor na costa portuguesa, torna-se extremamente aliciante enquanto alvo de estudo.

O trabalho realizado por Pinteus (2011), desenvolvido no nosso grupo de investigação, demonstrou que *Asparagopsis armata* tem a capacidade de inibir a proliferação de bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis*) e de leveduras (*S. cerevisiae*), o que está em concordância com os resultados obtidos neste trabalho. Contudo, no presente trabalho a mesma alga apresentou também capacidade para

inibir o crescimento de outro tipo de bactérias (gram-negativas), como *E. coli*, *P.aureginosa* e *Salmonella sp.* Esta desigualdade de resultados pode dever-se à diferente metodologia adotada no presente trabalho, nomeadamente no que diz respeito ao processo de elaboração de extratos, onde foi acrescentado a etapa de liofilização da alga. O processo de liofilização tem demonstrado ao longo do tempo ser uma etapa crucial neste tipo de estudo, uma vez que ao desidratar a amostra recorrendo a este método, consegue-se obter uma concentração de moléculas no extrato final em maior concentração e melhor conservadas. Por outro lado, Vijayavel e Martinez (2010) avaliaram a atividade antibacteriana de *Gracilaria salicornia* e *Ulva fasciata* contra algumas bactérias distintas, tais como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* (gram-positivas) e a *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium* (gram-negativas) verificando-se, claramente, que a alga verde tem um maior potencial. No entanto, Villarreal-Gómez e colaboradores (2010) demonstraram que as algas vermelhas *Laurencia pacifica* e *Centroceras clavulatum* apresentam uma maior capacidade de inibição do crescimento de *S.aureus* do que as algas *Codium fragile* (filo *Chlorophyta*), *Sargassum muticum*, *Endarachne binghamiae* e *Egregia menziesii* (filo *Phaeophyta*). Corroborando, de alguma forma, com os resultados obtidos no presente trabalho. Esta diversificada panóplia de resultados pode explicar-se pelas diferentes condições ambientais de região para região, que podem estimular diferentes respostas das diferentes algas (embora do mesmo filo) (Blunt *et al.*, 2010).

Desde o final de 1980, mais de 50.000 produtos naturais foram descobertos a partir de microrganismos marinhos. Mais de 10 mil apresentaram bioatividades interessantes, entre eles, 8.000 demonstraram ter atividade antimicrobiana e antitumoral (Betina., 1983). As bactérias marinhas, como já foi referido, em simbiose com outros macro-organismos, podem produzir substâncias essenciais para a relação com o hospedeiro (Villarreal-Gómez *et al.*, 2010). Sendo deste modo crucial o estudo das bactérias simbiotes de organismos com potencial biotecnológico identificado, tal como a alga *Asparagopsis armata*.

Atualmente existem poucos estudos onde foi avaliado o potencial biotecnológico de bactérias epífitas de organismos marinhos, nomeadamente macroalgas (Almeida *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2010; Flewelling *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2011; Qiao *et al.*, 2010). No entanto, já se isolaram moléculas destes microrganismos simbiotes com capacidade antimicrobiana (Blunt *et al.*, 2012). Também no nosso trabalho este potencial foi demonstrado. Todavia, a capacidade de inibir a proliferação de bactérias foi verificada apenas para as do tipo gram-positivo, *S.aureus* e *B.subtilis*. Este tipo de resultados é bastante comum, mesmo para compostos/extratos com outras origens, onde geralmente a atividade contra gram-positivas é mais frequente

que para gram-negativas (Ballantine *et al.*, 1987; Ibtissam *et al.*, 2009). As bactérias gram-negativas, como a *E. coli*, possuem uma membrana celular externa e um espaço periplasmático, inexistente nas bactérias gram-positivas, como o *Bacillus subtilis* (Black., 2011). Para além da membrana externa das bactérias gram-negativas, que por si só já é uma barreira eficiente, o espaço periplasmático contém diversas enzimas capazes de degradar um vasto leque de moléculas, consistindo assim uma forte defesa contra muitos antibióticos ou outras moléculas estranhas (Lambert., 2002; Black., 2011).

Villarreal-Gómez e colaboradores (2010) desenvolveram um estudo idêntico com bactérias epífitas de cinco diferentes algas. Nesse estudo, catorze extratos de bactérias, dos trinta e cinco estudados, apresentaram atividade antimicrobiana contra *Proteus mirabilis* (bactéria gram-negativa). Embora, estes resultados não sejam concordantes com os que se obtiveram neste trabalho, no que diz respeito ao tipo aos patogénicos onde se verificou capacidade antibacteriana, as diferenças podem ser explicadas pelas bactérias terem sido recolhidas de algas diferentes e de regiões diferentes, comparativamente às que foram analisadas neste estudo; podendo ainda afirmar-se que o organismo patogénico utilizado para o teste (*Proteus mirabilis*) foi diferente de todos os utilizados neste trabalho, podendo apresentar mecanismos de defesa diferentes. Estes resultados revelam ainda que apesar das bactérias se classificarem, no que diz respeito ao tipo de membrana, em gram-positivo e gram-negativo apresentam diferentes sensibilidades e diferentes respostas. Este dado pode ser bastante interessante para trabalhos futuros com outros patogénicos. Nomeadamente bactérias que afetem prejudicialmente organismos produzidos em aquacultura, como *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio tapetis*, entre outras (Austin., 2010; Daskalov., 2006; Gauthier e Rhodes., 2009). Isto porque as bactérias epífitas estudadas, como já foi referido, podem produzir moléculas com capacidades antimicrobianas contra competidores entre outros. Deste modo, estas moléculas ativas podem ser, de alguma forma, específicas para microrganismos que se desenvolvam no mesmo habitat (Penesyán *et al.*, 2009). Nesta linha de raciocínio, poderá ser ainda mais interessante avaliar a capacidade antibacteriana em microrganismos patogénicos de origem marinha, podendo-se encontrar metabolitos secundários, produzidos pelas bactérias epífitas, com elevada aplicabilidade em aquaculturas ou nouro tipo de culturas que envolva organismos marinhos.

Neste trabalho pôde-se ainda constatar que o potencial dos extratos, tanto da alga como das bactérias epífitas, não se demonstraram tão eficazes quanto os antibióticos padrão utilizados. Na realidade, e de uma forma geral, todos os extratos apresentaram IC<sub>50</sub> superiores aos antibióticos testados. Este resultado não é surpreendente visto que

todos os antibióticos padrão são substâncias ativas e purificadas com uma elevada toxicidade (Greenwood *et al.*, 2007), enquanto os extratos de *A. armata* e das bactérias epífitas são uma complexa mistura de compostos, sendo que a porção ativa desta mistura provavelmente será extremamente baixa. Reforçando este facto, grande parte dos extratos das bactérias epífitas apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controlo no crescimento dos patogénicos utilizados, o que pode ser um indício de que os extratos terão algumas moléculas com potencial antibacteriano, mas em baixas concentrações. Contudo, é de referenciar o facto de que o extrato bruto de alga conseguiu inibir o crescimento de *P. aureginosa*, ao contrário dos controlos positivos, Bacitracina, Ampicilina e Clorofenicol.

Como já foi referido, muitos dos antibióticos utilizados são prejudiciais à saúde, podendo os metabolitos produzidos tanto pela alga como pelas bactérias epífitas ser uma excelente alternativa, tornando-se uma opção ainda mais evidente como metabolitos naturais que são. Os metabolitos produzidos pelas bactérias epífitas podem ganhar ainda mais interesse, nomeadamente por todos os testes possíveis que se podem elaborar, uma vez que as bactérias podem ser consideradas uma fonte inesgotável de compostos de interesse, quando produzidas em reator.

A atividade antifúngica dos extratos foi avaliada em dois microrganismos modelo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e o patogénico *Candida albicans*. Para determinar o efeito dos extratos perante o crescimento de *S. cerevisiae* e *C. albicans*, o seu crescimento foi analisado em vários tempos, comparando com o veículo. Após este procedimento, a análise da atividade antifúngica foi avaliada às 20 horas de crescimento para *S. cerevisiae* e 8h para *C. albicans*, tempos da fase exponencial.

Os resultados dos extratos de bactérias demonstraram maior potencial para *S. cerevisiae*, tendo-se obtido uma maior conjunto de extratos com capacidade inibitória. Para *C. albicans* apenas dois extratos apresentaram diferenças em relação ao controlo. Destes resultados subentende-se que os extratos brutos obtidos das bactérias epífitas poderão conter metabolitos com potencial neste âmbito, no entanto nestes extratos estão em concentrações bastante reduzidas.

Para o extrato de *A. armata* os resultados foram extremamente positivos. O extrato de alga demonstrou ter uma capacidade inibitória bastante elevada. No crescimento de *S. cerevisiae*, o extrato de alga apresenta um IC<sub>50</sub> (17,3 µgml<sup>-1</sup> (12,7-23,8)) semelhante ao controlo positivo (17,86 µgml<sup>-1</sup> (12,08-26,4) (Anfotericina B). Por outro lado, para o patogénico *C. albicans* o extrato de alga conseguiu inibir o crescimento deste microrganismo (apresentado um IC<sub>50</sub> de 419.0 µgml<sup>-1</sup> (241.0-728.6)), ao contrário do antifúngico Flumequina que não conseguiu inibir o crescimento deste, à concentração máxima estudada (300µgml<sup>-1</sup>). Estes resultados podem indicar

a presença de um ou mais metabolitos presentes no extrato de alga com um potencial bastante elevado. Uma vez que se o extrato bruto contém esta bioatividade, é expectável que ao isolar as moléculas ativas se encontrará uma ou mais moléculas com uma atividade ainda superior.

A avaliação da viabilidade celular revelou um potente efeito citotóxico associado ao extrato de alga, verificando-se um potencial mais ténue nos extratos das bactérias epífitas. Estes resultados foram observados de igual modo nas duas linhas celulares testadas.

Como foi já mencionado, as moléculas com citotoxicidade podem exercer atividade por mecanismos de indução de morte celular, por necrose ou apoptose, ou por bloqueio do ciclo celular. Deste modo, é fundamental tentar perceber não só a viabilidade celular, mas também os efeitos dos extratos de algas na proliferação celular. Os resultados referentes à proliferação celular revelaram-se concordantes com os efeitos observados nos ensaios de viabilidade celular, para ambas as linhas celulares.

Os resultados obtidos no extrato de *A. armata* não são de todo surpreendentes uma vez que já existem trabalhos que evidenciam este mesmo potencial, não só para esta alga (Alves., 2011), como para outras algas do Filo Rhodophyta (Zubia *et al.*, 2009). Como já foi referido anteriormente, as algas vermelhas são produtoras de uma variedade de metabolitos secundários com elevado interesse, como por exemplo mono e diterpenos halogenados, esteróis, alcaloides, polifenóis e açúcares sulfatados (Allmendinger *et al.*, 2010). Neste sentido existem vários estudos que evidenciam atividade deste tipo de algas sobre linhas celulares hepáticas. A alga *Gloiopeltis furcata* demonstrou suprimir o crescimento de células HepG-2 através da indução do bloqueio da fase G2/M do ciclo celular (Bae e Choi, 2007). De igual modo, compostos bromofenólicos isolados a partir da alga *Rhodomela confervoides* exibiram atividade citotóxica na linha celular hepática humana Bel7402 (Lijun *et al.*, 2005). O monoterpeneo penta-halogenado, halomon, que se encontra em fase de ensaios pré-clínicos, foi isolado a partir da alga vermelha *Portieria hornemanniie* demonstrou possuir citotoxicidade contra várias linhas celulares tumorais, nomeadamente do cólon (Jha, R. e Zi-rong., 2004; Zubia *et al.*, 2009). Tendo por base estes estudos, observa-se que diferentes espécies de algas do Filo Rhodophyta têm capacidade de produzir moléculas com atividade citotóxica contra várias linhas celulares, entre as quais hepáticas e mamárias.

A avaliação da capacidade antitumoral dos extratos das bactérias epífitas revelou resultados bastante interessantes e de alguma forma promissores. Isto porque apesar de não nenhum dos extratos apresentar uma toxicidade superior a 50% ou

inibir em 50% a proliferação celular, à concentração máxima testada, muitos extratos apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controlo tanto nos ensaios de viabilidade celular como nos ensaios de proliferação celular.

Os extratos relativos às bactérias ASP 23, ASP 118, ASP 124, ASP146 apresentaram alguma citotoxicidade tanto para a linha celular HepG-2 como para MCF-7. Contudo outros extratos, como por exemplo, ASP 24 e ASP 129, apresentaram cerca de 20% de toxicidade para as células MCF-7 mas para a linha celular hepática essa toxicidade já não se manifestou. Os extratos das bactérias ASP 33 e ASP 34 também apresentaram resultados semelhantes mas apenas para a linha celular hepática. Estes resultados são particularmente interessantes, pois sugerem que os extratos podem conter moléculas que medeiam efeitos seletivos e diferenciadores entre as linhas tumorais. Outro argumento que favorece esta multiplicidade de mecanismos está associado ao facto de alguns extratos de algas não mostrarem qualquer tipo de redução da viabilidade celular, apesar de inibirem a proliferação celular ou vice-versa. Alguns destes exemplos são os das bactérias ASP 34, ASP 35, ASP 101 que apresentam uma inibição da proliferação das células do tumor mamário de aproximadamente 20% mas não apresentam qualquer citotoxicidade para esta mesma linha celular. Na linha celular tumoral hepática este tipo de resultados são ainda mais marcantes para os extratos das bactérias ASP 25 e ASP 101 que inibem, aproximadamente, 40% da proliferação celular mas não apresentam uma citotoxicidade tão relevante. Os processos fundamentais de proliferação celular são regulados finamente pelo ciclo celular e pela apoptose, envolvendo uma interação coordenada e complexa de várias famílias de proteínas. Estes processos são distintos, no entanto estão intimamente relacionados, facto que é evidenciado pelo papel central da proteína p53, quer no controlo do ciclo celular, quer na indução da apoptose (Sa e Das, 2008). Tudo isto aponta que alguns dos resultados possam estar associados a mecanismos diferentes, isto é, os extratos testados podem estar apenas a bloquear o ciclo celular, apenas a induzir apoptose ou a promoverem estes mecanismos em simultâneo.

Tal como o verificado neste trabalho, Villarreal-Gómez e colaboradores (2010) demonstraram que algumas das bactérias epífitas de duas diferentes algas vermelhas (*Centroceras clavulatum* e *Laurencia pacifica*) apresentam atividade citotóxica para células tumorais do cólon (HCT-116). Tal facto pode indicar que as bactérias epífitas podem eventualmente produzir moléculas com potencial antitumoral bastante elevado, não só para as linhas tumorais testadas neste trabalho, como para outras linhas celulares. O que se torna bastante interessante para ensaios futuros com outras linhas celulares importantes.

Concluindo, os organismos marinhos têm-se revelado uma fonte de novos compostos com múltiplas propriedades farmacológicas (Montaser e Luesch, 2012). No caso específico da alga *Asparagopsis armata* e das suas bactérias epífitas, poucos são os estudos que se debruçam especificamente sobre estes organismos em questão, embora o seu estudo seja bastante pertinente. Através do presente trabalho demonstrou-se claramente que a alga produz uma panóplia de compostos bastante interessantes no que diz respeito às bioatividades testadas. Por outro lado, as bactérias epífitas podem tornar-se uma fonte compostos com um potencial ainda maior. Uma vez que a diversidade de testes possíveis de fazer com todas as bactérias isoladas de *Asparagopsis armata* é incomensurável. E a aplicabilidade industrial de compostos de origem bacteriana é mais evoluída e relativamente mais económica.

Neste trabalho desenvolveu-se um enorme bio-Banco de bactérias epífitas apenas de uma macroalga da costa de Peniche, com bastante interesse biotecnológico, que futuramente permitiram elaborar outros ensaios, que certamente, confirmarão as bactérias epífitas como uma fonte natural promissora de moléculas com elevado potencial.

**Perspetivas Futuras**

---



O trabalho realizado e os resultados obtidos realçam ainda mais o potencial biotecnológico dos recursos marinhos da costa de Peniche, nomeadamente a macroalga *Asparagopsis armata* e as suas bactérias epífitas. No entanto, estes foram os primeiros ensaios de um longo percurso de estudos onde se poderá comprovar a aplicabilidade das moléculas/extratos produzidos por estes organismos marinhos.

Um dos primeiros passos importantíssimos a realizar futuramente é a identificação das bactérias epífitas com as quais se trabalhou, para que de algum modo se perceba que espécie de bactérias se tem e se estas já foram identificadas e estudadas noutros projetos de investigação. Neste âmbito poderá recorrer-se à sequenciação do 16sRNA, esta técnica está bastante consolidada para este tipo de trabalhos.

Por outro lado será necessário perceber que moléculas são produzidas por estes organismos marinhos, nomeadamente as bactérias. Neste campo de trabalho poderá ser interessante começar por elaborar técnicas de cromatografia simples que fracionem os extratos brutos obtidos em grupos de moléculas mais reduzidos. Esta etapa inicial pode ser concretizada pela realização de uma cromatografia líquida em vácuo (VLC), onde são utilizados solventes orgânicos com diferentes polaridades que ao passar por uma coluna de cromatografia, com características específicas (por exemplo sílica gel 60), irá eluir um grupo específico de compostos. Numa fase mais adiantada técnicas analíticas como por exemplo a cromatografia líquida (LC) e/ou gasosa (GC), ressonância magnética nuclear (NMR) e espectrometria de massa (MS) poderão ser essenciais para identificar de forma específica molécula a molécula.

Futuramente poderá ser também interessante abordar questões de *stress* no crescimento das bactérias epífitas como uma fonte de produção de novas e diferentes moléculas, com uma possível aplicabilidade ainda maior. Condições, como temperatura, pH, salinidade, luminosidade, constituição de meio, oxigénio dissolvido no meio, arejamento, entre outras são crucias para o desenvolvimento microbiano, e a sua alteração pode provocar uma diferente produção de moléculas. Neste sentido, e como já foi referido, as bactérias epífitas são uma fonte inesgotável de moléculas com potencial biotecnológico.

No que diz respeito a atividade antimicrobiana, será essencial perceber-se de que forma é que os extratos atuam/inibem no crescimento microbiano, e por outro lado continuar a realizar novos testes com outros patogénicos de elevado interesse.

Ao nível antitumoral muitos ensaios ficam ainda por fazer, nomeadamente o mecanismo celular que os extratos afetam. Numa fase preliminar será interessante perceber de que forma é que os extratos atuam na viabilidade celular e como atuam na proliferação celular das linhas MCF-7 e HepG-2. Na viabilidade celular será

interessante perceber se a redução verificada se deve ou não ao desencadeamento do processo de apoptose. Isto poderá ser avaliado através da realização de Western-blots, verificando os níveis de expressão da proteína p53 ou bcl-2, através da atividade da caspase 3 ou pela análise da fragmentação de ADN. Por sua vez para os extratos que demonstraram maiores efeitos de inibição sobre a proliferação celular será interessante analisar o ciclo celular, determinando a sua distribuição por análise de citometria de fluxo. Numa fase mais adiantada, e se os resultados das moléculas se verificarem poderá continuar-se com os testes em modelos vivos.

Tendo por base os resultados obtidos, faz todo o sentido prosseguir com estudo dos extratos que exibiram os efeitos mais marcantes nas atividades antimicrobiana e antitumoral. Será, provavelmente, um bom desafio futuro, mas também uma janela de oportunidade para desenvolver trabalho científico relevante e de elevada qualidade.

## **Referências Bibliográficas**

---



## Referências Bibliográficas

---

- Al-haj NA, Mashan NI, Shamsudin MN, Mohamad H, Vairappan CS, Sekawi Z, Box PO, Terengganu K, Kinabalu K (2010) Antibacterial Activity of Marine Source Extracts Against Multidrug Resistance Organisms. *Am J Pharmacol Toxicol* 5:95–102.
- Allmendinger A, Spavieri J, Kaiser M, Casey R, Hingley-Wilson S, Lalvani A, Guiry M, Blunden G, Tasdemir D (2010) Antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic potential of twenty-three British and Irish red algae. *Phyther Res* 24:1099–103.
- Almeida C, Ekaterina E, Kehraus S, Siering C, König GM (2010) Hydroxylated Sclerosporin Derivatives from the Marine-derived Fungus *Cadophora malorum*. *J Nat Prod* 73:476–478.
- Alves C (2011) Avaliação da capacidade citotóxica de macroalgas da costa de Peniche (Portugal) em células tumorais humanas. Tese de Mestrado: pp. 88. Instituto Politécnico de Leiria.
- Austin B (2010) Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet Microbiol* 140:310–317.
- Bae SJ, Choi YH (2007) Methanol Extract of the Seaweed *Gloiopeltis furcata* Induces G2/M Arrest and Inhibits Cyclooxygenase-2 Activity in Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells. *Phyther Res* 57:52–57.
- Balandrin MF, Kinghorn DA, Farnsworth NR (1993) Plant-Derived Natural Products in Drug Discovery and Development - An Overview. *Am Chem Soc* 534:2–12.
- Ballantine DL, Gerwick WH, Velez SM, Alexander E, Guevara P (1987) Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. *Hydrobiologia* 151-152:463–469.
- Barakat R, Berchuck A, Markman M, Randall ME (2013) Principles and Practice of Gynecologic Oncology, 1<sup>th</sup> ed. 1118.
- Barsanti L, Gualtieri P (2006) Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. *J Phycol* 43:412–414.
- Bentley R (2000) Mycophenolic Acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. *Chem Rev* 100:3801–26.
- Bérdy J (2005) Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* 58:1–26.
- Betina V (1983) Chemistry and Biology of Antibiotics. 590.

## Referências Bibliográficas

---

- Bhakuni DS, Rawat DS (2005) *Bioactive Marine Natural Products*, 1<sup>th</sup> ed. Library (Lond)
- Bianco ÉM, Teixeira VL, Pereira RC (2010) Chemical Defenses of the Tropical Marine seaweed *Canistrocarpus cervicornis* against herbivory by Sea Urchin. *Brazilian J Oceanogr* 58:213–218.
- Black JG (2011) *Microbiology Principles and Explorations*, 8th ed.
- Blunt JW, Copp BR, Keyzers R, Munro MHG, Prinsep MR (2012) Marine natural products. *Nat Prod Rep* 29:144–222.
- Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR (2010) Marine natural products. *Nat Prod Rep* 27:165–237.
- Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR (2011) Marine natural products. *Nat Prod Rep* 28:196–268.
- Cragg GM, Newman DJ (2005) Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure Appl Chem* 77:7–24.
- Dai J, Krohn K, Flörke U, Pescitelli G, Kerti G, Papp T, Kövér KE, Bényei AC, Draeger S, Schulz B, Kurtán T (2010) Curvularin-Type Metabolites from the Fungus *Curvularia* sp. Isolated from a Marine Alga. *European J Org Chem* 2010:6928–6937.
- Daskalov H (2006) The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control* 17:474–483.
- Devi NKA, Rajendran R, Sundaram SK (2011) Isolation and characterization of bioactive compounds from marine bacteria. *Indian J Nat Prod Resour* 2:59–64.
- Ding B, Yin Y, Zhang F, Li Z (2011) Recovery and phylogenetic diversity of culturable fungi associated with marine sponges *Clathrina luteoculcitella* and *Holoxea* sp. in the South China Sea. *Mar Biotechnol (NY)* 13:713–21.
- Edziri HL, Smach MA, Ammar S, Mahjoub MA, Mighri Z, Aouni M, Mastouri M (2011) Antioxidant, antibacterial, and antiviral effects of *Lactuca sativa* extracts. *Ind Crops Prod* 34:1182–1185.
- Egan S, Thomas T, Kjelleberg S (2008) Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. *Curr Opin Microbiol* 11:219–25.

## Referências Bibliográficas

---

- Ely R, Supriya T, Naik CG (2004) Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East India. *J Exp Mar Bio Ecol* 309:121–127.
- Fenical W (1993) Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chem Rev* 93:1673–1683.
- Finney DJ (1971) Probit Analysis. *J Pharm Sci* 60:1432–1432.
- Fleming A (1929) On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 10:226.
- Flewelling AJ, Johnson J a., Gray C a. (2013) Isolation and bioassay screening of fungal endophytes from North Atlantic marine macroalgae. *Bot Mar* 56:287–297.
- Fusetani N (2000) *Drugs from the Sea*, 1th ed.
- Gad SC (2005) *Drug Discovery Handbook*, 1th ed.
- Gao S-S, Li X-M, Du F-Y, Li C-S, Proksch P, Wang B-G (2011) Secondary metabolites from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. *Mar Drugs* 9:59–70.
- Gauthier DT, Rhodes MW (2009) Mycobacteriosis in fishes : A review. *Vet J* 180:33–47.
- Greenwood D, Finch R, Davey P, Wilcox M (2007) *Antimicrobial Chemotherapy*. 495.
- Guo N, Yu L, Meng R, Fan J, Wang D, Sun G, Deng X (2008) Global gene expression profile of *Saccharomyces cerevisiae* induced by dictamnine. *Yeast* 25:631–41.
- Hagström A, Pommier T, Rohwer F, Simu K, Stolte W, Svensson D, Zweifel UL (2002) Use of 16S ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species. *Appl Environ Microbiol* 68:3628–33.
- Ibtissam C, Hassane R, José M, Seglar D, Francisco J, Vidal G, Antonio J, Hassan B, Mohamed K (2009) Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. *African J Biotechnol Vol* 8:1258–1262.
- Jasti S, Sieracki ME, Poulton N, Giewat MW, J.N. R-V (2005) Phylogenetic diversity and specificity of bacteria closely associated with *Alexandrium spp.* and other phytoplankton. *Appl Environ Microbiol* 71:3483–3494.

- Jemal A, Bray F, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin* 61:69–90.
- Jha, R., Zi-rong X (2004) Biomedical Compounds from Marine organisms. *Mar Drugs* 2:123–146.
- Jimenez JT, Šturdíková M, Šturdík E (2009) Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta Chim Slovaca* 2:63–74.
- Kang K, Park Y, Hwang HJ, Kim SH, Lee JG, Shin H-C (2003) Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agents against vascular risk factors. *Arch Pharm Res* 26:286–93.
- Klein BS, Tebbets B (2007) Dimorphism and virulence in fungi. *Curr Opin Microbiol* 10:314–9.
- Knowles M, Selby P (2005) Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer, 5<sup>th</sup> ed.
- Kovács G, Burghardt J, Pradella S, Schumann P, Stackebrandt E, Máriaigetzi K (1999) *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 1:167–73.
- Kwabi-Addo B, Lindstrom TL (2011) Cancer Causes and Controversies: Understanding Risk Reduction and Prevention, 1<sup>th</sup> ed. 241.
- Laatsch H, Renneberg B, Hanefeld U, Kellner M, Pudleiner H, Hamprecht G, Kraemer H, Anke H (1995) Structure-activity relationships of phenyl- and benzoylpyrroles. *Chem Pharm Bull* 43:537–546.
- Lambert P a (2002) Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 46S–54S.
- Li X, Qin L (2005) Metagenomics-based drug discovery and marine microbial diversity. *Trends Biotechnol* 23:539–43.
- Lijun H, Nianjun X, Jiangong S, Xiaojun Y, Chengkui Z (2005) Isolation and pharmacological activities of bromophenols from *Rhodomela confervoides*. *Chinese J Oceanol Limnol* 23:226–229.
- Le Loir Y, Baron F, Gautier M (2003) Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genet Mol Res* 2:63–76.

## Referências Bibliográficas

---

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap P V., Clark DP (2009) Brock Biology of Microorganisms, 10th ed. 1168.

Manilal A, Selvin J, George S (2012) In vivo therapeutic potentiality of red seaweed, *Asparagopsis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) in the treatment of Vibriosis in *Penaeus monodon* Fabricius. Saudi J Biol Sci 19:165–75.

Maurine A, Leverstein-van H, Adrienne TAB, Blok HEM, Paauw A, Fluit C, Verhoef J (2002) Evidence of extensive interspecies transfer of integron-mediated antimicrobial resistance genes among multidrug-resistant Enterobacteriaceae in a clinical setting. J Infect Dis 186:49–56.

Mayer AMS, Glaser KB, Cuevas C, Jacobs RS, Kem W, Little RD, McIntosh JM, Newman DJ, Potts BC, Shuster DE (2010) The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. Trends Pharmacol Sci 31:255–65.

Mayer AMS, Gustafson KR (2004) Marine pharmacology in 2001-2: antitumour and cytotoxic compounds. Eur J Cancer 40:2676–704.

Mayer AMS, Gustafson KR (2006) Marine pharmacology in 2003-2004: anti-tumour and cytotoxic compounds. Eur J Cancer 42:2241–70.

Mayer AMS, Gustafson KR (2008a) Marine pharmacology in 2005-2006: antitumour and cytotoxic compounds. Eur J Cancer 44:2357–87.

Mayer AMS, Gustafson KR (2008b) Marine pharmacology in 2005-2006: antitumour and cytotoxic compounds. Eur J Cancer 44:2357–87.

Mayer AMS, Rodríguez AD, Berlinck RGS, Fusetani N (2011) Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mec. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 153:191–222.

Mayer AMS, Rodríguez AD, Berlinck RGS, Hamann MT (2007) Marine pharmacology in 2003-4: marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 145:553–81.

## Referências Bibliográficas

---

Mayer AMS, Rodríguez AD, Berlinck RGS, Hamann MT (2009) Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1790:283–308.

Montaser R, Luesch H (2012) Marine natural products : a new wave of drugs ? *Future Med Chem* 3:1475–1489.

Murray PM, Moane S, Collins C, Beletskaya T, Thomas OP, Duarte AWF, Nobre FS, Owoyemi IO, Pagnocca FC, Sette LD, McHugh E, Causse E, Pérez-López P, Feijoo G, Moreira MT, Rubiolo J, Leirós M, Botana LM, Pinteus S, et al. (2013) Sustainable production of biologically active molecules of marine based origin. *New Biotechnol* 30:839–850.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM (2000) The influence of natural products upon drug discovery (Antiquity to late 1999). *Nat Prod Rep* 17:215–234.

Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, Capaccioli S (2009) Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res* 59:365–78.

Padmakumar K, Ayyakkannu K (1997) Seasonal Variation of Antibacterial and Antifungal Activities of the Extracts of Marine Algae from Southern Coasts of India : *Botanica Marina*. *Bot Mar* 40:507–515.

Pelengaris S, Khan M, Steward W, Blasco M, Yee C, Shima D, Streuli C, Wit NCJ de, Rudd N, Ruhrberg C, Thomas A, Waterhouse E, Roussel M (2006) *The Molecular Biology of Cancer*, 1th ed.

Penesyan A, Kjelleberg S, Egan S (2010) Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. *Mar Drugs* 8:438–59.

Penesyan A, Marshall-Jones Z, Holmstrom C, Kjelleberg S, Egan S (2009) Antimicrobial activity observed among cultured marine epiphytic bacteria reflects their potential as a source of new drugs. *FEMS Microbiol Ecol* 69:113–24.

Pérez-Matos AE, Rosado W, Govind NS (2007) Bacterial diversity associated with the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 92:155–64.

## Referências Bibliográficas

---

- Perino E, Horta A, Manconi R, Pronzato R, Pedrosa R (2013) Antimicrobial activities in *Sarcotragus spinosulus* and *Crambe crambe* (Porifera, Demospongiae) associated bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 24:S50–S51.
- Pinteus S (2011) Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana em algas da costa de Peniche (Portugal): identificação de compostos bioativos com elevado potencial biotecnológico. Tese de Mestrado: pp. 88. Instituto Politécnico de Leiria.
- Plaza M, Santoyo S, Jaime L, García-Blairsy Reina G, Herrero M, Señoráns FJ, Ibáñez E (2010) Screening for bioactive compounds from algae. *J Pharm Biomed Anal* 51:450–5.
- Potin P, Bouarab K, Salaün J-P, Pohnert G, Kloareg B (2002) Biotic interactions of marine algae. *Curr Opin Plant Biol* 5:308–317.
- Qiao M-F, Ji N-Y, Liu X-H, Li K, Zhu Q-M, Xue Q-Z (2010) Indoloditerpenes from an algicolous isolate of *Aspergillus oryzae*. *Bioorg Med Chem Lett* 20:5677–80.
- Rodrigues D, Alves C, Horta A, Thomas OP, Pedrosa R (2013) Antibacterial and antitumor activity of isolated fractions of *Sphaerococcus coronopifolius* extracts. *Curr Opin Biotechnol* 24:S115–S116.
- Rotter BA, Thompson BK, Clarkin S, Owen TC (1993) Rapid colorimetric bioassay for screening of *Fusarium mycotoxins*. *Nat Toxins* 1:303–7.
- Sa G, Das T (2008) Anti-cancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell Div* 3:14.
- Salvador N, Garreta AG, Lavelli L, Ribera MA (2007) Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Sci Mar* 71:101–113.
- Scheper T, Gal YL, Ulber (2005) *Marine Biotechnology*, 1<sup>th</sup> ed.
- Schulz WA (2007) *Molecular Biology of Human Cancers - An Advanced Student's Textbook*, 1<sup>th</sup> ed.
- Sze P (1998) *A Biology of the algae*, 3<sup>th</sup> ed.
- Takeshi S, Yumiko Y-S, Joko S (2005) Mineral components and anti-oxidant activities of tropical seaweeds. *J Ocean Univ China* 4:205–208.

## Referências Bibliográficas

---

- Taskin E, Caki Z, Ozturk M (2010) Assessment of in vitro antitumoral and antimicrobial activities of marine algae harvested from the eastern Mediterranean sea. *African J Biotechnol* 9:4272–4277.
- Vairappan CS, Kawamoto T, Miwa H, Suzuki M (2004) Potent antibacterial activity of halogenated compounds against antibiotic-resistant bacteria. *Planta Med* 70:1087–90.
- Vijayavel K, Martinez J a (2010) In vitro antioxidant and antimicrobial activities of two Hawaiian marine Limu: *Ulva fasciata* (Chlorophyta) and *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta). *J Med Food* 13:1494–9.
- Villarreal-Gómez LJ, Soria-Mercado IE, Guerra-Rivas G, Ayala-Sánchez NE (2010) Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface. *Rev Biol Mar Oceanogr* 45:267–275.
- Vinothkumar S, Parameswaran PS (2013) Recent advances in marine drug research. *Biotechnol Adv* 38:1826–1845.
- Wael AL-Zereini MS (2006) Natural products from marine bacteria. 180.
- Webster NS, Bourne D (2007) Bacterial community structure associated with the Antarctic soft coral, *Alcyonium antarcticum*. *FEMS Microbiol Ecol* 59:81–94.
- Yaacob NS, Hamzah N, Nik Mohamed Kamal NN, Zainal Abidin SA, Lai CS, Navaratnam V, Norazmi MN (2010) Anticancer activity of a sub-fraction of dichloromethane extract of *Strobilanthes crispus* on human breast and prostate cancer cells in vitro. *BMC Complement Altern Med* 10:42.
- Yuan Y V, Walsh N a (2006) Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food Chem Toxicol* 44:1144–50.
- Zar JH (2010) *Biostatistical Analysis, Books a la Carte Edition*, 5<sup>th</sup> ed.
- Zheng L, Han X, Chen H, Lin W, Yan X (2005) Marine bacteria associated with marine macroorganisms : the potential antimicrobial resources. *Ann Microbiol* 55:119–124.
- Zhuang W-Q, Tay J-H, Maszenan AM, Krumholz LR, Tay ST-L (2003) Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. *Lett Appl Microbiol* 36:251–7.

## Referências Bibliográficas

---

Zubia M, Fabre MS, Kerjean V, Lann K Le, Stiger-Pouvreau V, Fauchon M, Deslandes E (2009) Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chem* 116:693 – 701.