



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Raphael de Mello Carpes

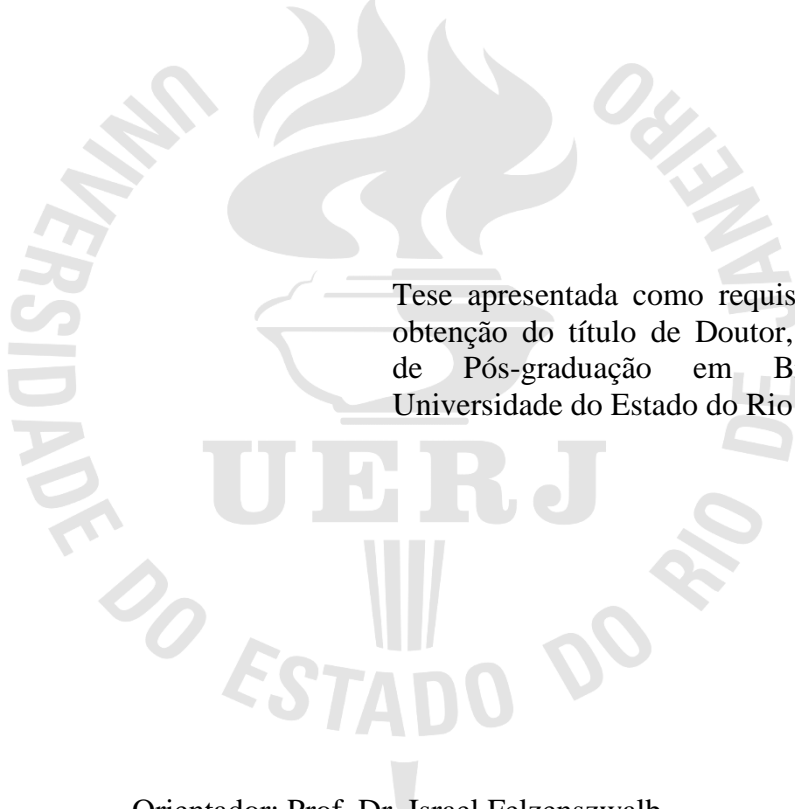
**Avaliação do potencial farmacológico dos corais invasores *Tubastraea*
coccinea e *Tubastraea tagusensis* (Scleractinia, Cnidaria)**

Rio de Janeiro

2018

Raphael de Mello Carpes

**Avaliação do potencial farmacológico dos corais invasores *Tubastraea coccinea* e
Tubastraea tagusensis (Scleractinia, Cnidaria)**



Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, pelo Programa
de Pós-graduação em Biociências, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Israel Felzenszwalb

Coorientadora: Prof.^a Dra. Beatriz Grosso Fleury

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C297 Carpes, Raphael de Mello.
Avaliação do potencial farmacológico dos corais invasores *Tubastraea coccinea* e *Tubastraea tagusensis* (Sleractinia, Cnidaria) / Raphael de Mello Carpes. – 2018.
175 f.

Orientador: Israel Felzenszwalb.
Coorientadora: Beatriz Grosso Fleury.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Corais – Teses. 2. Agentes anti-inflamatórios - Teses. 3. Toxicidade - Teses. 4. Testes de Mutagenicidade - Teses. I. Felzenszwalb, Israel. II. Fleury, Beatriz Grosso. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 593.6

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Raphael de Mello Carpes

**Avaliação do potencial farmacológico dos corais invasores *Tubastraea coccinea* e
Tubastraea tagusensis (Scleractinia, Cnidaria)**

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, pelo Programa
de Pós-graduação em Biociências, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 24 de agosto de 2018.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Beatriz Grosso Fleury (Coorientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Elisa Raquel Anastácio Ferraz

Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Lenize Fernandes Maia

Universidade Federal de Juiz de Fora

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmãos pelo modelo de disciplina, por se esforçarem tanto pela minha educação e pelos momentos de incentivo, afeto e diversão os quais foram essenciais para a conclusão deste trabalho. Amo vocês

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Israel Felzenszwalb pela orientação, confiança e oportunidade sem os quais este trabalho não se desenvolveria. Seus ensinamentos são valiosos na minha formação e para o meu futuro.

À Professora Dra. Beatriz Grosso Fleury pelas incontáveis horas de discussão, por todo o apoio nos momentos de dificuldades na execução das metodologias e pela enorme paciência. Sua dedicação para com seus alunos é uma referência na minha vida.

Ao Professor Dr. Joel Creed, ao belíssimo Projeto Coral-Sol, inserido institucionalmente sob a coordenação geral da Dra. Simone Oigman-Pszczol do Instituto Brasileiro de Biodiversidade (BrBio), e sua equipe que possibilitaram a execução desse trabalho, além de ser uma fonte de inspiração para as ideias que tive.

Aos meus colegas do LABMUT. Cada um de vocês me ajudou, de um jeito especial e único, e foram muito importantes para a realização deste trabalho. Em especial ao Chico e à Andreia, foram 10 anos de convivência nesse laboratório. Discutimos, rimos e brigamos. Ações que podem ser características de colegas de trabalho ou entre amigos.

À Dra. Silvia Siag Oigman e à Professora Dra. Lidilhone Hamerski pelas amostras de extratos brutos etanólicos.

À Professora Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho e à Dra. Daniele Corrêa Fernandes do Laboratório de Bioquímica Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais, do Departamento de Bioquímica (IBRAG) por toda a ajuda em análises de resultados, discussões e pela colaboração nos ensaios da atividade anti-inflamatória.

À Professora Dra. Maria de Nazaré Correia Soeiro e à Ma. Aline Nefertite do Laboratório de Biologia Celular no Instituto Oswaldo Cruz pela colaboração nos ensaios da atividade tripanocida.

À Professora Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva, à Ma. Rafaella de Miranda Villarim Meira e à aluna de iniciação científica Thainá Pereira de Souza, do Laboratório de Imunofarmacologia Parasitária, da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ, pela colaboração nos ensaios da atividade leishmanicida.

À Professora Dra. Ana Claudia de Paula Rosa Ignacio e ao Dr. Thiago José de Souza Barboza do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, da Faculdade de Ciências da UERJ, pela colaboração nos ensaios da atividade antimicrobiana.

Ao técnico Eduardo Matos do Centro de Espectrometria de Massas de Biomoléculas (CEMBIO) da UFRJ pelas contribuições e discussões das análises químicas.

Ao Departamento de Bioquímica (IBRAG), em especial ao Paulo, à Shirlei e ao Velozo por sempre estarem dispostos a ajudar.

Às instituições de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ/PensaRio

Aos meus amigos pelo entendimento e compreensão da minha ausência nos momentos de festa, mas principalmente por me levantarem e acreditarem em mim.

Aos amigos e familiares que partiram, pela motivação.

À UERJ, minha casa, que luta, resiste e ensina!

Sem a diversidade de opiniões, a descoberta da verdade é impossível.

Alexander von Humboldt

RESUMO

CARPES, Raphael de Mello. **Avaliação do potencial farmacológico dos corais invasores *Tubastraea coccinea* e *Tubastraea tagusensis* (Scleractinia, Cnidaria)**. 2018 175f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A grande diversidade de espécies no ambiente marinho dá origem a compostos com padrões estruturais únicos não encontrados em produtos naturais de outra natureza com um grande potencial para uso farmacológico, cosmético, nutricional, entre outros. Os corais pertencentes à ordem Scleractinia foram ignorados como fontes de produtos naturais por muitos anos, pois não eram associados à produção de metabólitos secundários como uma estratégia de defesa nesses corais duros. O gênero *Tubastraea* (Classe Anthozoa, Ordem Scleractinia, Família Dendrophylliidae) é caracterizado como corais duros sem a presença de zooxantelas, porém espécies desse gênero apresentam compostos com valor farmacológico. Este gênero foi primeiramente registrado, na costa brasileira, no início do século XXI. A introdução desses organismos, também conhecidos como coral sol, ocorreu através de sua incrustação em plataformas de petróleo e gás na Bacia de Campos, região norte do estado do Rio de Janeiro. As espécies invasoras identificadas como *Tubastraea coccinea* e *Tubastraea tagusensis* obtiveram sucesso no seu processo de expansão no litoral brasileiro. Ambas as espécies representam ameaça a organismos endêmicos das regiões invadidas. Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram que extratos metanólicos desses corais apresentaram atividade anti-inflamatória em ensaios de edema induzido por carragenina em patas de camundongo e atividade citotóxica e mutagênica para linhagens de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Este trabalho tem como objetivo analisar o potencial tóxico e farmacológico de amostras dos corais invasores *T. coccinea* e *T. tagusensis*. Para isso, extratos metanólicos, etanólicos e substância sintetizada oriundos desses corais foram avaliados quanto a sua capacidade anti-inflamatória, mutagênica, genotóxica, citotóxica, antiparasitária e antimicrobiana, assim como, suas composições foram elucidadas através de análises químicas. Os dados de cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massas e cromatografia a gás sugerem a presença de derivados de aplisinopsina, substância pertencente a classe dos alcaloides. Não foram observados efeitos mutagênicos e genotóxicos em todas as amostras nas concentrações avaliadas. Respostas citotóxicas foram observadas para células eucarióticas em todas as amostras nas duas maiores concentrações (500 e 5000 µg/mL). A atividade anti-inflamatória foi observada em todas as amostras avaliadas nos ensaios *in vivo*, com destaque para a espécie *T. coccinea*, cuja fração de acetato de etila demonstrou maior eficácia *in vitro*. As amostras testadas para toxicidade em *Trypanosoma cruzi* não apresentaram tal efeito em nenhuma forma do parasita. Entretanto, os extratos metanólicos demonstraram ação tóxica para o parasita *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Para a atividade antimicrobiana, os extratos metanólicos demonstraram resultados interessantes, apresentando citotoxicidade para a linhagem *Streptococcus pyogenes* (8668) e sendo capazes de interferir na formação de biofilme da linhagem *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Palavras-chave: *Tubastraea coccinea*. *Tubastraea tagusensis*. Produtos naturais marinhos. Alcaloide. Toxicidade. Mutagenicidade. Anti-inflamatório. Antiparasitário. Antimicrobiano.

ABSTRACT

CARPES, Raphael de Mello. **Pharmacological potential evaluation of the invading corals *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis* (Scleractinia, Cnidaria)**. 2018 175f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The great diversity of species in the marine environment gives rise to compounds with unique structural patterns not found in natural products of another nature with great potential for pharmacological, cosmetic and nutritional use, among others. Corals belonging to the order Scleractinia were ignored as sources of natural products for many years, since it was not associated with the production of secondary metabolites as a defense strategy in these hard corals. The genus *Tubastraea* (Class Anthozoa, Order Scleractinia, Family Dendrophylliidae) is characterized as hard corals without the presence of zooxanthellae, but species of this genus present compounds with pharmacological value. This genus was first recorded on Brazilian coast at the beginning of the 21st century. The introduction of these organisms, also known as sun coral, occurred through their fouling on oil and gas platforms in Campos Basin, northern region of Rio de Janeiro state. The invasive species identified as *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis* were successful in their expansion process in Brazilian coast. Both species are a threat to endemic organisms from invaded regions. Recent studies of our research group have demonstrated that methanolic extracts of these corals showed anti-inflammatory activity in carrageenan-induced edema tests in mouse paws and cytotoxic and mutagenic activity for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains. The objective of this work was to analyze the toxic and pharmacological potential of *T. coccinea* and *T. tagusensis* samples. For this purpose, methanolic, ethanolic extracts and synthesized compound from these corals were evaluated for their anti-inflammatory, mutagenic, genotoxic, cytotoxic, antiparasitic and antimicrobial ability, as well as their compositions were elucidated through chemical analysis. The high performance liquid chromatography, mass spectrometry and gas chromatography data suggest the presence of aplysinopsin analogues, a substance belonging to alkaloids class. The mutagenic and genotoxic effects were not observed in any sample tested for any concentration. Cytotoxic responses were observed for eukaryotic cells in all samples at high concentrations (500 e 5000 µg/mL). Anti-inflammatory activity was observed in all samples tested for *in vivo* assays, with emphasis on *T. coccinea* species. The ethyl acetate fraction from this sample demonstrated greater efficacy *in vitro* assays for anti-inflammatory activity. Samples tested for *Trypanosoma cruzi* toxicity showed no effect in any form of the parasite. However, the methanolic extracts showed a toxic action for the parasite *Leishmania (Viannia) braziliensis*. For the antimicrobial activity, the methanolic extracts showed interesting results, presenting cytotoxicity for *Streptococcus pyogenes* strain (8668) and being able to interfere in the biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strain (ATCC 25923).

Keywords: *Tubastraea coccinea*. *Tubastraea tagusensis*. Marine natural products. Alkaloid.

Toxicity. Mutagenicity. Anti-inflammatory. Antiparasitic. Antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Relação de número de publicações de produtos naturais marinhos por filo no período de 1963 a 2013.....	25
Figura 2 –	Disposição dos tecidos e estruturas das formas polipoide (A) e medusoide (B).....	26
Figura 3 –	Esquemas de dois cnidócitos. Nematocisto (A) e Espirocisto (B).....	28
Figura 4 –	Parte de colônia coralina. Presença de pólipos contraídos e outros expandidos.....	29
Figura 5 –	Estrutura da palitoxina.....	31
Figura 6 –	A: <i>T. coccinea</i> e B: <i>T. tagusensis</i>	45
Figura 7 –	a: Contato entre <i>M. hispida</i> (Mh) e <i>T. tagusensis</i> (Tt). b: Contato entre <i>M. hispida</i> (Mh) e <i>T. coccinea</i> (Tc). Barra de escala = 5 cm.....	46
Figura 8 –	Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> e suas formas evolutivas.....	54
Figura 9 –	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp. e suas formas evolutivas.....	56
Figura 10 –	A: Mapa da região da Ilha Grande; B: Colônia de <i>T. tagusensis</i> ; C: Colônia de <i>T. coccinea</i> ; D: Área de coleta.....	62
Figura 11 –	Placas cromatográficas com as amostras EbMTc e EbMTt com os reveladores sulfato cérico (1), vanilina (2) e NP-PEG (3) no sistema 1 (DCM).....	88
Figura 12 –	Placas cromatográficas com as amostras EbMTc e EbMTt com os reveladores sulfato cérico (1), vanilina (2) e NP-PEG (3) no sistema 2 (DCM / AcOEt; 1:1 v/v).....	89
Figura 13 –	Placas cromatográficas com as amostras EbMTc e EbMTt com os reveladores sulfato cérico (1), vanilina (2) e NP-PEG (3) no sistema 3 (DCM / AcOEt; 1:2 v/v).....	90
Figura 14 –	Placas cromatográficas com as amostras EbMTc e EbMTt com os reveladores sulfato cérico (1), vanilina (2) e NP-PEG (3) no sistema 4 (DCM / AcOEt; 2:1 v/v).....	91
Figura 15 –	Placas cromatográficas com as amostras EbMTc e EbMTt com os reveladores sulfato cérico (1), vanilina (2) e iodo (3) no sistema 5 (MeOH / DCM / AcOEt; 1:2:0,5 v/v).....	92

Figura 16 –	Placas cromatográficas com as amostras EbMTc e EbMTt com os reveladores sulfato cérico (1), vanilina (2) e iodo (3) no sistema 6 (MeOH / DCM / AcOEt / ácido acético; 1:2:1:0,5 v/v).....	94
Figura 17 –	Cromatogramas sobrepostos da molécula 3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina (azul) nas amostras (vermelho) de EbMTc (A), EbMTt (B) e f-AcOEt (C).....	99
Figura 18 –	Cromatogramas sobrepostos da molécula 6-bromo-3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina (azul) nas amostras (vermelho) de EbMTc (A), EbMTt (B) e f-AcOEt (C).....	100
Figura 19 –	Cromatogramas sobrepostos da molécula tubastrina (azul) nas amostras (vermelho) de EbMTc (A) e f-AcOEt(B).....	101
Figura 20 –	Cromatogramas sobrepostos da molécula APL01 (azul) nas amostras (vermelho) de EbMTc (A) e f-AcOEt (B).....	102
Figura 21 –	Cromatogramas sobrepostos da molécula 6-bromo-3'-deimino-2',4'-bis(demetil)-3'-oxoaplisinopsina (azul) nas amostras (vermelho) de EbMTc (A) e f-AcOEt (B).....	103
Figura 22 –	Cromatogramas sobrepostos da molécula de 2'-de-N-metilaplisinopsina (azul) na amostra (vermelho) de EbMTc.....	104
Figura 23 –	Resultados da avaliação mutagênica usando a linhagem TA97 para as amostras de EbMTc, EbMTt, EbETc, EbETt e APL01 na ausência de metabolização exógena.....	105
Figura 24 –	Resultados da avaliação mutagênica usando a linhagem TA98 para as amostras de EbMTc, EbMTt, EbETc, EbETt e APL01 na ausência de metabolização exógena.....	106
Figura 25 –	Resultados da avaliação mutagênica usando a linhagem TA100 para as amostras de EbMTc, EbMTt, EbETc, EbETt e APL01 na ausência de metabolização exógena.....	107
Figura 26 –	Resultados da avaliação mutagênica usando a linhagem TA102 para as amostras de EbMTc, EbMTt, EbETc, EbETt e APL01 na ausência de metabolização exógena.....	108
Figura 27 –	Resultados da avaliação mutagênica usando a linhagem TA104 para as amostras de EbMTc, EbMTt, EbETc, EbETt e APL01 na ausência de metabolização exógena.....	109

Figura 28 –	Proliferação celular pelo teste colorimétrico WST-1 das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de EbMTc.....	110
Figura 29 –	Proliferação celular pelo teste colorimétrico WST-1 das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de EbMTt.....	111
Figura 30 –	Proliferação celular pelo teste colorimétrico WST-1 das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de EbETc.....	112
Figura 31 –	Proliferação celular pelo teste colorimétrico WST-1 das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de EbETt.....	113
Figura 32 –	Proliferação celular pelo teste colorimétrico WST-1 das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de APL01.....	114
Figura 33 –	Proliferação celular pelo teste colorimétrico WST-1 das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de f-AcOEt.....	115
Figura 34 –	Citotoxicidade celular avaliada pelo teste colorimétrico LDH das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de EbMTc.....	116
Figura 35 –	Citotoxicidade celular avaliada pelo teste colorimétrico LDH das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de EbMTt	117
Figura 36 –	Citotoxicidade celular avaliada pelo teste colorimétrico LDH das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de EbETc.....	118
Figura 37 –	Citotoxicidade celular avaliada pelo teste colorimétrico LDH das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de EbETt.....	119
Figura 38 –	Citotoxicidade celular avaliada pelo teste colorimétrico LDH das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de APL01.....	118
Figura 39 –	Citotoxicidade celular avaliada pelo teste colorimétrico LDH das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de f-AcOEt.....	120
Figura 40 –	Avaliação da atividade de EbMTc no modelo de edema de pata induzida por injeção intraplantar de carragenina.....	123
Figura 41 –	Avaliação da atividade de EbMTt no modelo de edema de pata induzida por injeção intraplantar de carragenina.....	124

Figura 42 –	Avaliação da atividade de APL01 no modelo de edema de pata induzida por injeção intraplantar de carragenina.....	125
Figura 43 –	Concentração de nitrito gerado por macrófagos estimulados por LPS e sobrevivência, respectivamente, na presença de extratos brutos e alcaloide sintetizado (A e B) e frações derivadas de EbMTc (C e D).....	126
Figura 44 –	Avaliação da viabilidade de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> tratadas com EbMTc (A) e EbMTt (B).....	130
Figura 45 –	Avaliação da viabilidade de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> tratadas com EbMTc durante 48 h (A) e 72 h (B), e citotoxicidade em monócitos (C).....	130
Figura 46 –	Viabilidade celular pelo teste colorimétrico MTT das linhagens celulares HepG2 (A) e Caco-2 (B) na presença das amostras EbMTc e EbMTt.....	131
Figura 47 –	Atividade antimicrobiana em macrodiluição das amostras EbMTc, EbMTt e APL01.....	134
Figura 48 –	Atividade antimicrobiana em microdiluição das amostras EbMTc e EbMTt para <i>S. pyogenes</i> (8668).....	135
Figura 49 –	Inibição da formação de biofilme em <i>S. aureus</i> das amostras EbMTc, EbMTt e APL01 após 18 h de cultivo à 37°C.....	137

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Características genóticas e fenóticas das cepas padrão derivadas de <i>S. enterica</i> LT2 sugeridas para os testes qualitativos e quantitativos de mutagenicidade e citotoxicidade.....	68
Quadro 2 –	Cepas utilizadas para avaliar o potencial antimicrobiano das amostras de EbMTt e EbMTt e do alcaloide sintetizado APL01.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Estruturas moleculares das substâncias isoladas do gênero <i>Tubastraea</i>	36
Tabela 2 –	Relação de substâncias detectadas em <i>T. coccinea</i> e <i>T. tagusensis</i>	47
Tabela 3 –	Gradiente de corrida em relação à fase móvel B.....	66
Tabela 4 –	Valores de Rf das bandas de EbMTc e EbMTt obtidas por CCD no sistema 1 (DCM).....	88
Tabela 5 –	Valores de Rf das bandas de EbMTc e EbMTt obtidas por CCD no sistema 2 (DCM / AcOEt; 1:1 v/v).....	89
Tabela 6 –	Valores de Rf das bandas de EbMTc e EbMTt obtidas por CCD no sistema 3 (DCM / AcOEt; 1:2 v/v).....	90
Tabela 7 –	Valores de Rf das bandas de EbMTc e EbMTt obtidas por CCD no sistema 4 (DCM / AcOEt; 2:1 v/v).....	91
Tabela 8 –	Valores de Rf das bandas de EbMTc e EbMTt obtidas por CCD no sistema 5 (MeOH / DCM / AcOEt; 1:2:0,5 v/v).....	93
Tabela 9 –	Valores de Rf das bandas de EbMTc e EbMTt obtidas por CCD no sistema 6 (MeOH / DCM / AcOEt / ácido acético; 1:2:1:0,5 v/v).....	94
Tabela 10 –	Composição das frações oriundas de EbMTc pela análise de CG/EM/EMAR.....	96
Tabela 11 –	Indução de formação de micronúcleo em linhagens celulares pelas amostras de EbMTc, EbMTt, EbETc, EbETt e APL01.....	122
Tabela 12 –	Atividade <i>in vitro</i> de EbMTc, EbMTt e BZ nas formas tripomastigotas da linhagem Y e cultura de células cardíacas.....	128
Tabela 13 –	Atividade (EC ₅₀) e IS de EbMTc, EbMTt e BZ em linhagens celulares L929 infectadas com <i>T. cruzi</i> (linhagem Tulahuen transfectada com gene da β-galactosidase) após 96 h de infecção.....	128
Tabela 14 –	Atividade <i>in vitro</i> das amostras de EbMTc, EbMTt em formas amastigotas da linhagem Y.....	128
Tabela 15 –	Crescimento bacteriano na presença de EbMTc, EbMTt e APL01.....	133
Tabela 16 –	Resultados de mutagenicidade e sobrevivência para amostras de EbM	

Tabela 17 –	de <i>T. coccinea</i> e <i>T. tagusensis</i> na ausência de metabolização exógena. Resultados de mutagenicidade e sobrevivência para amostras de EbE	173
Tabela 18 –	de <i>T. coccinea</i> e <i>T. tagusensis</i> na ausência de metabolização exógena. Resultados de mutagenicidade e sobrevivência para APL01 na ausência de metabolização exógena.....	174 175

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-NQO –	4-nitroquinolina-1-óxido
A –	Adenina
AcOEt –	Acetato de etila
APL01 –	3'-deimino-2',4'-bis(demetil)-3'-oxoaplisinopsina
AS –	Azida sódica
BuOH –	Butanol
BZ –	Benzonidazol
C –	Citosina
CCD –	Cromatografia em camada delgada
CG/EM –	Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas
CLAE –	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCM –	Diclorometano
DMEM –	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DMSO –	Dimetilsulfóxido
DNA –	Ácido desoxirribonucleico
DP –	Desvio padrão
EbE –	Extrato bruto etanólico
EbETc –	Extrato bruto etanólico de <i>T. coccinea</i>
EbETt –	Extrato bruto etanólico de <i>T. tagusensis</i>
EbM –	Extrato bruto metanólico
EbMTc –	Extrato bruto metanólico de <i>T. coccinea</i>
EbMTt –	Extrato bruto metanólico de <i>T. tagusensis</i>
EC ₅₀ –	Concentração efetiva de redução a 50% do efeito máximo
f-AcOET –	Fração de acetato de etila
f-BuOH –	Fração butanólica
f-DCM –	Fração de diclorometano
f-Hex –	Fração hexânica
f-Residual –	Fração residual
G –	Guanina
Hex –	Hexano

<i>his</i> –	Gene responsável pela biossíntese de histidina
IC ₅₀ –	Concentração inibitória a 50% do crescimento
I.M. –	Índice de mutagenicidade
IS –	Índice de seletividade
LC ₅₀ –	Concentração letal a 50% das células hospedeiras
LDH –	Enzima lactato desidrogenase
LPS –	Lipopolissacarídeo
<i>L. (V.) braziliensis</i> –	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>
MBC –	Concentração bactericida mínima
Meio LB –	Meio lisogênico
MEM –	Meio de cultura Minimum Essential Medium Eagle
MeOH –	Metanol
MHA –	Meio de cultivo sólido Mueller-Hinton ágar
MHB –	Meio Mueller-Hinton Broth
MIC –	Concentração inibitória mínima
MitC –	Mitomicina C
MNNG –	<i>N</i> -metil- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidina
NO –	Óxido nítrico
NOS –	Óxido nítrico sintase
NP –	Ácido difenilbórico aminoetiléster
PBS –	Solução salina tamponada com fosfato
PEG –	Polietileno glicol
Rf –	Mobilidade relativa
RPMI –	Meio Roswell Park Memorial Institute
S9 –	Metabolização exógena
<i>S. aureus</i> –	<i>Staphylococcus aureus</i>
SFB –	Soro fetal bovino
<i>S. pyogenes</i> –	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>S. enterica</i> –	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium
T –	Timina
<i>T. coccinea</i> –	<i>Tubastraea coccinea</i>
<i>T. cruzi</i> –	<i>Tripanosoma cruzi</i>
<i>T. tagusensis</i> –	<i>Tubastraea tagusensis</i>

TR – Tempo de retenção
UV – Ultravioleta
WST-1 – *Water soluble tetrazolium salt*

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	22
1	OBJETIVOS	59
1.1	Objetivo geral	59
1.2	Objetivos específicos	59
2	METODOLOGIA	61
2.1	Coleta	61
2.2	Extração	62
2.3	Estudos da composição química	63
2.3.1	<u>Cromatografia em camada delgada (CCD)</u>	65
2.3.2	<u>Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM)</u>	65
2.3.3	<u>Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas</u>	65
2.4	Estudos toxicológicos	67
2.4.1	<u>Ensaio de mutação reversa bacteriana (<i>Salmonella</i>/microsoma)</u>	67
2.4.1.1	Linhagens bacterianas.....	67
2.4.1.2	Ensaio quantitativo de mutação reversa bacteriana e sobrevivência.....	68
2.4.2	<u>Ensaio de viabilidade celular através de testes colorimétricos em cultura de células permanentes</u>	70
2.4.2.1	Cultura de linhagens celulares permanentes.....	70
2.4.2.2	Ensaio da viabilidade celular pelo teste colorimétrico WST-1.....	71
2.4.2.3	Ensaio da viabilidade celular pelo teste colorimétrico de liberação de LDH..	72
2.4.2.4	Ensaio da viabilidade celular pelo teste colorimétrico com MTT.....	74
2.4.3	<u>Ensaio de formação de micronúcleo em linhagens celulares</u>	74
2.5	Estudos da atividade anti-inflamatória	75
2.5.1	<u>Ensaio de indução de edema em pata de camundongo</u>	76
2.5.1.1	Animais.....	76
2.5.1.2	Modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	76
2.5.2	<u>Liberação de óxido nítrico (NO) por linhagem de macrófago RAW 264,7</u>	77
2.6	Estudos da atividade tripanocida	78
2.6.1	<u>Extratos</u>	79
2.6.2	<u>Parasitas</u>	79

2.6.3	<u>Cultura de células.....</u>	79
2.6.4	<u>Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>.....</u>	79
2.6.5	<u>Ensaio de atividade tripanocida.....</u>	80
2.7	Estudos da atividade leishmanicida.....	81
2.7.1	<u>Extratos.....</u>	81
2.7.2	<u>Obtenção e manutenção dos parasitos.....</u>	81
2.7.3	<u>Ensaio sobre a viabilidade de formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>.....</u>	82
2.7.4	<u>Ensaio sobre a viabilidade de monócitos.....</u>	83
2.8	Estudos da atividade antimicrobiana.....	83
2.8.1	<u>Isolamento de cepas.....</u>	83
2.8.2	<u>Avaliação qualitativa e quantitativa.....</u>	84
2.8.3	<u>Avaliação do potencial de inibição na formação de biofilmes de <i>Staphylococcus aureus</i>.....</u>	85
2.9	Análises estatísticas.....	86
3	RESULTADOS.....	87
3.1	Resultados de coleta e extração.....	87
3.2	Análises da composição química.....	87
3.2.1	<u>Resultados de CCD.....</u>	87
3.2.2	<u>Resultados de CG/EM.....</u>	95
3.2.3	<u>Resultados de CLAE e espectrometria de massas.....</u>	99
3.3	Análises toxicológicas.....	104
3.3.1	<u>Resultados de mutação reversa bacteriana (<i>Salmonella</i>/microsoma).....</u>	104
3.3.2	<u>Resultados da viabilidade celular através de testes colorimétricos em cultura de células permanentes.....</u>	109
3.3.2.1	<u>Proliferação celular no teste colorimétrico WST-1.....</u>	109
3.3.2.2	<u>Viabilidade celular no teste colorimétrico LDH.....</u>	116
3.3.3	<u>Resultados da formação de micronúcleo em linhagens celulares.....</u>	121
3.4	Análises da atividade anti-inflamatória.....	123
3.4.1	<u>Resultados do potencial anti-inflamatório pelo modelo de indução de edema em pata de camundongo.....</u>	123
3.4.2	<u>Resultados da liberação de NO por linhagem de macrófago RAW 264,7.....</u>	125
3.5	Análises da atividade tripanocida.....	127
3.6	Análises da atividade leishmanicida.....	129

3.7	Análises da atividade antimicrobiana.....	131
3.7.1	<u>Resultados de citotoxicidade com teste colorimétrico com MTT.....</u>	131
3.7.2	<u>Resultados da avaliação qualitativa e quantitativa.....</u>	132
3.7.3	<u>Resultados do potencial de inibição na formação de biofilmes de <i>S. aureus</i>...</u>	136
4	DISCUSSÃO.....	138
	CONCLUSÕES.....	154
	REFERÊNCIAS.....	155
	APÊNDICE – Ensaio preliminares para citotoxicidade e mutagenicidade para linhagens padrão de <i>S. enterica</i>.....	173

INTRODUÇÃO

Produtos naturais: um breve histórico

O interesse e a fascinação que o homem tem em relação à natureza são tão antigos quanto à própria ciência do homem em si. Tais estímulos não eram somente decorrentes da adoração das forças da natureza, mas também da necessidade de sobrevivência do homem sobre o nosso planeta. Desde muito cedo e de forma rudimentar, a espécie humana utilizou produtos naturais na caça, na alimentação, na medicina e etc. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas podem ter sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; LOBO; LOURENÇO, 2007).

No Brasil, o uso de produtos naturais é datado desde a chegada dos portugueses. No primeiro documento escrito da História do Brasil, a carta de Pero Vaz de Caminha ao rei D. Manoel, o autor descreve as características da nova terra, inicialmente batizada de Ilha de Vera Cruz, chamando a atenção sobre a nudez das índias e de suas pinturas. Uma particularidade desse documento é o relato da entrega de “ouriços” que os índios levam aos portugueses como presentes. Estes ouriços eram na verdade a bixácea (*Bixa orellana*), conhecida como urucu ou urucum. A tintura dos indígenas era oriunda das sementes dessa planta, cujo principal corante é o norcarotenoide bixina, primeiro *cis*-polieno reconhecido na natureza. A seiva do fruto de jenipapo (*Genipa americana*) também era utilizada como tinta. A substância responsável pelas cores pretas das tatuagens dos indígenas era o iridoide conhecido como genipina, após reação com proteínas da pele. A ibirapitanga foi uma espécie vegetal bastante explorada pelos portugueses a partir do início do século XVI. Dela extraía-se um corante vermelho usado para tingir roupas ou como tinta para escrever. O gênero *Cesalpinia* já era explorado desde a Idade Média e, no Brasil, a espécie *C. echinata* ficou comumente conhecida como pau-brasil, de onde extraía-se a brazileína (BARBER et al., 1961; DJERASSI et al., 1961; MORSINGH; ROBINSON, 1970; PINTO, 1995).

Outro costume que os índios apresentam até os dias atuais é o uso de flechas envenenadas com curare para a caça. O curare é extraído de árvores dos gêneros *Strychnos* e *Chondodendron*, cujas substâncias responsáveis por abater a caça são a d-tubocurarina e a toxiferina. Gottlieb e Mors (1978) expressam o curare com sendo “... veneno, inócuo por via

oral, do qual uma gota, injetada, permitia prostar a caça em fração de segundos” (DUCKE, 1995; PINTO, 1995).

Há na literatura extensas revisões sobre o uso de plantas para fins medicinais. Brito e Brito (1993) realizaram uma revisão de 40 anos (1949 a 1989) de pesquisa de plantas medicinais brasileiras. Os autores mostraram que 402 espécies diferentes de plantas estão associadas a mais de 14 atividades biológicas de interesse farmacológico, como anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral, analgésica, tóxica e etc. Agra e colaboradores (2008), também realizaram um levantamento de plantas medicinais usadas na região Nordeste do Brasil. Este grupo de pesquisa registrou um total de 650 espécies, dos quais a maioria não possui suas atividades biológicas e/ou constituintes químicos elucidados, embora sejam amplamente usadas pela população da região para fins medicinais. Sob esta perspectiva, uma avaliação toxicológica de plantas medicinais e/ou produtos naturais torna-se necessária a fim de se estabelecer parâmetros de segurança para o uso desses compostos pela população. Em Sponchiado e colaboradores (2016), coloca-se a importância dos ensaios de avaliação genotóxica para plantas medicinais. Das 2289 publicações nesta área no período de 2000 a fevereiro de 2015, 458 artigos são colocados para a análise segundo critérios adotados pelo grupo de pesquisa. Os testes adotados nesses artigos foram capazes de identificar indução de mutação, efeitos clastogênicos e aneugênicos e anomalias cromossômicas estruturais, ou seja, cobriram todas as possibilidades de danos ao DNA e, dessa forma, forneceram maior segurança ao uso de determinadas plantas medicinais.

Os produtos naturais são substâncias frequentemente constituídas por estruturas químicas complexas e com uma orientação espacial bem definida. Esses compostos são característicos e, às vezes, exclusivos para determinados grupos de organismos, cuja função é interagir com eficácia com seus alvos biológicos (FELÍCIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012). Essas substâncias desempenham papel importante como ferramenta nos processos de desenvolvimento de medicamentos. Câncer e infecções são as duas áreas terapêuticas predominantes cujo programa de descoberta de drogas baseia-se em produtos naturais, mas muitas outras áreas terapêuticas também são abordadas, tais como neuro-farmacológica, cardiovascular, gastrointestinal, inflamação, metabólicas e etc. A capacidade de desenvolvimento da química combinatória como um meio para a otimização estrutural, uma vez que uma estrutura básica ativa é identificada, aumentou o número de amostras para possíveis fármacos. Exemplos clássicos de fármacos sintéticos podem ser citados como o ácido acetil salicílico, o barbital, a epinefrina e a indometacina. Entretanto, a química combinatória não conseguiu atingir seu objetivo de ser uma fonte primária de expressiva

diversidade química, a qual asseguraria a descoberta de numerosas moléculas ativas capazes de representarem, efetivamente, novos candidatos a fármacos inovadores. Mesmo assim, pesquisas envolvidas na modificação de estruturas químicas básicas de produtos naturais continuam sendo conduzidas e levam a novos agentes. Por conseguinte, a busca de novas moléculas amplia-se, englobando os meios marinhos e microbianos (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001; MONTANARI; BOLZANI, 2001; KATIYAR et al., 2012; NEWMAN; CRAGG, 2012; BLUNT et al., 2018).

Produtos naturais marinhos

Os oceanos cobrem mais de 70% da superfície da Terra e contém mais de 240.000 espécies marinhas descritas e aceitas de seres vivos. Ao longo dos anos, esses organismos se adaptaram a todas as regiões dos oceanos, incluindo as áreas polares, temperadas, tropicais e subtropicais. A diversidade de espécies é rica em recifes de corais, nos quais existem cerca de 1.000 espécies por m² em algumas áreas, com o Oceano Indo-Pacífico tendo a maior biodiversidade marinha tropical (POMPONI, 1999; JIMENO, 2002; WORMS, 2018).

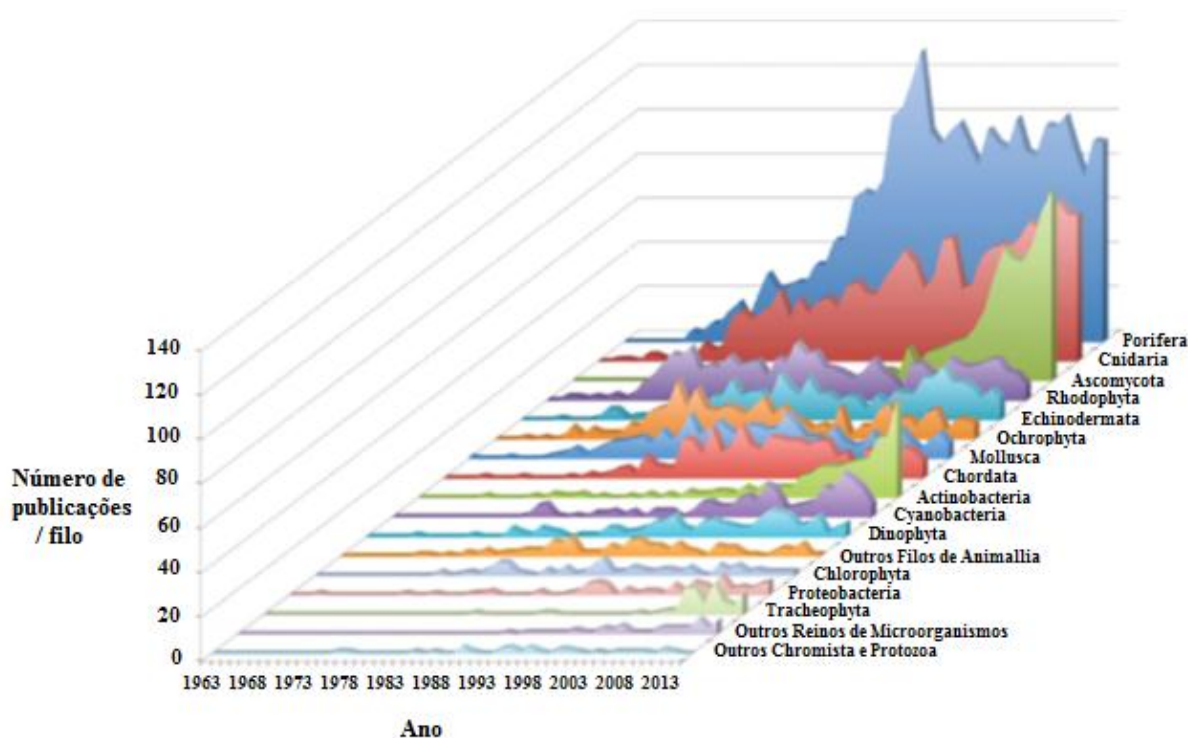
Esta grande diversidade dá origem a compostos com padrões estruturais únicos não encontrados em produtos naturais de outra natureza, com um grande potencial para uso farmacológico, cosmético, nutricional, entre outros (KIJJOA; SAWANGWONG, 2004). Extensas revisões forneceram um grande número de produtos naturais marinhos descobertos, sendo os compostos mais promissores aqueles produzidos por invertebrados marinhos (FAULKNER, 2001; MAYER et al., 2011; BLUNT et al., 2011, 2017, 2018).

Nessa conjuntura, estima-se que dos 153.000 produtos naturais conhecidos, aproximadamente 25.000 são de origem marinha. As condições físicas e químicas encontradas nesse ambiente estão relacionadas com a produção de várias moléculas com características estruturais únicas, o que permite que 71% das estruturas moleculares desses compostos sejam exclusivos de organismos marinhos. Essas moléculas possuem vários tipos de atividades biológicas e com possíveis aplicações farmacológicas e médicas. No entanto, poucos produtos naturais marinhos estão em processo industrial ou já são comercializados. Estima-se que a cada 5000 substâncias que são testadas inicialmente na pesquisa farmacológica, cinco passam para os ensaios clínicos e apenas uma torna-se um medicamento. Essa redução ocorre, principalmente, pela quantidade reduzida de material disponível e, na terapêutica, pela análise

da toxicidade associada ao uso (COSTA-LOTUFO et al., 2009; ROCHA et al., 2011; BLUNT et al., 2015; LEWELLYN; ZJAWIONY, 2018).

Um histórico da produção de publicações sobre produtos naturais marinhos revela o crescimento nessa área. Datando de 1963, apenas quatro artigos foram publicados sobre produtos naturais marinhos, com apenas um mostrando moléculas inéditas. Num período de 50 anos, houve um aumento expressivo no número de publicações com foco no isolamento de novos compostos a partir de organismos marinhos. A Figura 1 mostra esse crescimento em uma relação de número de publicações por filo. A importância do filo Porifera na pesquisa de produtos naturais marinhos fica evidente quando comparado a outros grupos. Entretanto, uma queda significativa a partir de 1990 é perceptível, coincidindo com a ascensão de outros filis, como os dos microrganismos (bactérias e fungos). Dentre estes, o filo Cnidaria, que abrange as espécies estudadas neste trabalho, mantém um relativo interesse ao longo dos anos (BLUNT et al., 2015).

Figura 1 – Relação de número de publicações de produtos naturais marinhos por filo no período de 1963 a 2013



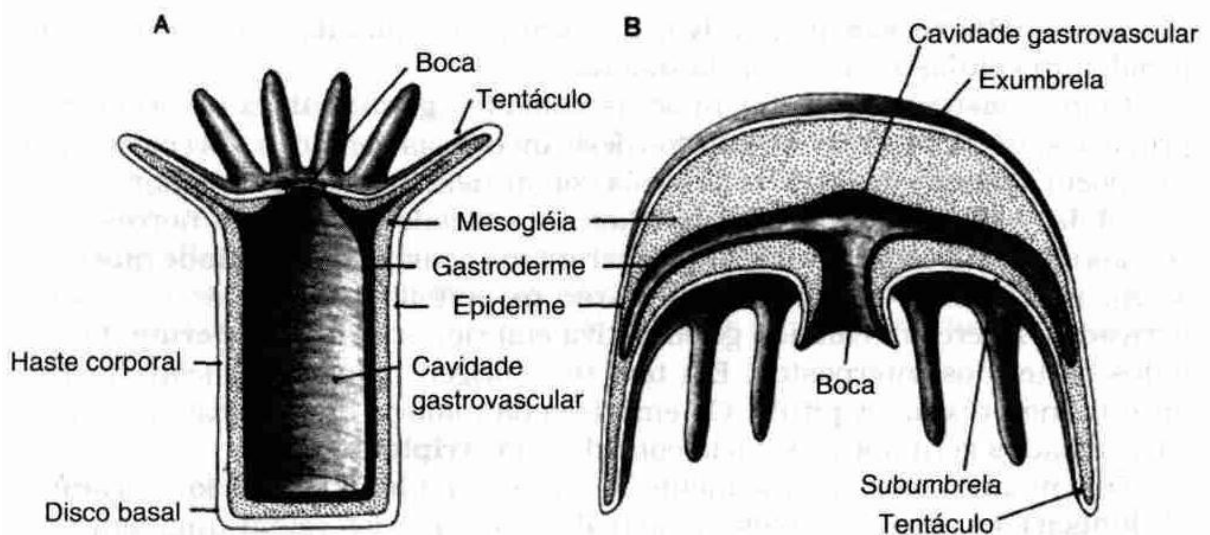
Fonte: adaptado de BLUNT et al., 2015

Corais e metabólitos secundários

Filo Cnidaria

O filo Cnidaria abrange águas-vivas, anêmonas-do-mar, corais, hidroides, gorgônias, sifonóforos, zoantídeos e mixozoários. Existem cerca de 11.000 espécies distribuídas em quatro classes (Hydrozoa, Scyphozoa, Cubozoa e Anthozoa) e a sua grande diversidade deve-se a dois aspectos fundamentais. O primeiro é a tendência de formar colônias através da reprodução assexuada, formando estruturas de grandes dimensões e com alto grau de complexidade. O segundo, apresentado pela maioria das espécies, é o seu ciclo de vida dimórfico. Este implica em duas morfologias adultas completamente diferentes: uma forma polipoide e uma forma medusoide (BRUSCA; BRUSCA, 2007). A Figura 2 ilustra a disposição dos tecidos e estruturas das formas polipoide e medusoide.

Figura 2 – Disposição dos tecidos e estruturas das formas polipoide (A) e medusoide (B)



Fonte: RUPPERT; BARNES, 1994.

A principal característica deste filo é a presença de cnidas, isto é, células altamente especializadas e localizadas principalmente nos tentáculos, que servem à captura e paralisação de presas, proteção contra predadores e auxílio ao assentamento de larvas ao substrato. Essas células armazenam proteínas tóxicas que podem ser liberadas por estimulação direta (MCCLINTOCK; BAKER, 2001).

Os cnidários conseguem seu alimento por várias vias como predação, absorção direta de nutrientes dissolvidos ou através de simbiose com microalgas. O metabolismo dessas microalgas simbióticas, conhecidas como zooxantelas, também ajuda na construção do esqueleto calcário dos corais construtores de recifes de águas rasas (MCCLINTOCK; BAKER, 2001). Recifes de corais são os ecossistemas mais diversos do mar e têm a maior densidade de biodiversidade em nível global. A diversidade de espécies dá origem a uma competição entre elas, gerando organismos com a capacidade de produzir compostos químicos para defesa ou ataque, muitos deles com valor farmacológico (ADEY, 2000).

A taxonomia dos cnidários é muitas vezes problemática visto que eles não possuem uma forma corporal consistente e bem definida. No passado, a classificação deste filo era complicada, pois os estágios de pólipo e medusa de um mesmo organismo eram, algumas vezes, nomeados distintamente. Logo, muitas espécies, principalmente de corais e gorgônias, eram descritas mais de uma vez. Sua sistemática é baseada principalmente na história de vida e na morfologia. Assim, a base genética destas características ainda é desconhecida. Além disso, amostras de fósseis de muitos cnidários são usualmente incompletas. A quimiotaxonomia e a análise cladística também têm sido usadas na sistemática de alguns cnidários coloniais, no entanto permanecem discrepâncias em famílias de alguns gêneros, principalmente entre a subclasse Octocorallia (MCCLINTOCK; BAKER, 2001).

A Classe Anthozoa abrange cnidários polipóides tanto solitários como coloniais, cuja fase medusoide encontra-se completamente ausente. É a maior classe do filo Cnidaria contendo mais de 6.000 espécies. Dentre as características morfológicas dessa classe, pode-se destacar: a presença de tentáculos geralmente em número de oito ou múltiplos de seis, contendo extensões do celêntero; a actinofaringe estende-se da boca ao celêntero e; possui um ou mais sulcos ciliados. É a classe do filo Cnidaria que mais contribuiu para o número de descobertas de produtos naturais marinhos, junto à classe Demospongiae do filo Porifera (RUPPERT; BARNES, 1994; BRUSCA; BRUSCA, 2007; LEAL et al., 2012).

Na subclasse Hexacorallia, os organismos apresentam-se sem espículas, com esqueleto calcário ou cutícula quitinosa, mas nunca com espículas isoladas. Possuem tentáculos em número de múltiplos de seis (no mínimo 12). Nutrem-se com o auxílio desses tentáculos capturando zooplâncton ou através de algas dinoflageladas simbiotes que realizam fotossíntese (zooxantelas). Uma característica exclusiva desse grupo é o cnidócito diferenciado. Este se nomeia espirocisto e tem um túbulo com mini túbulos que entrelaçam à presa ou outros objetos (Figura 3) (RUPPERT; BARNES, 1994; DALY; FAUTIN; CAPPOLA, 2003; BRUSCA; BRUSCA, 2007).

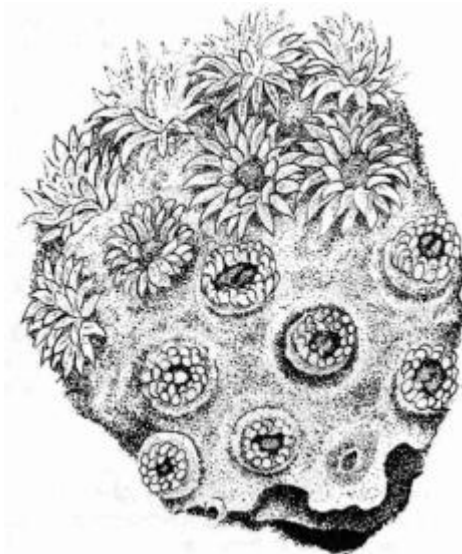
Figura 3 – Esquemas de dois cnidócitos. Nematocisto (A) e Espirocisto (B)



Fonte: REYES; SANTODOMINGO, 2002.

A ordem Scleractinia é composta pelos corais verdadeiros ou duros, cuja maioria dos organismos é colonial. Algumas espécies apresentam zooxantelas. O aspecto duro provém do exoesqueleto composto por carbonato de cálcio (aragonita) que é secretado pela epiderme da metade inferior da coluna e pelo disco basal. O processo de secreção promove a formação de uma estrutura em forma de taça esquelética dentro da qual o pólipos se fixa. Devido à forma de crescimento do coral o carbonato de cálcio é depositado por baixo dos tecidos vivos, enquanto a colônia estiver viva. Além de gerar um substrato uniforme para fixação da colônia, o esqueleto calcário, somado a outros tecidos, também auxilia na proteção. Quando contraído, o pólipos projeta-se um pouco para baixo da plataforma esquelética e torna-se difícil para outros organismos predá-los (Figura 4) (COLL, 1992; RUPPERT; BARNES, 1994; BRUSCA; BRUSCA, 2007).

Figura 4 – Parte de colônia coralina. Presença de pólipos contraídos e outros expandidos



Fonte: RUPPERT; BARNES, 1994.

Metabólitos secundários

Em determinados ecossistemas marinhos, como o fundo dos oceanos e os recifes de corais, estima-se que a biodiversidade presente seja maior do que aquela apresentada pelas florestas tropicais. Comparando-se os ambientes terrestre e marinho, este possui representantes de 34 filos dos 36 existentes no planeta. O fato de muitos organismos marinhos possuírem o corpo mole e terem uma forma de vida sedentária implica na necessidade de meios químicos para interações ecológicas, como defesa contra predadores. Dessa forma, estes organismos produzem uma variedade de moléculas sem precedentes, podendo inclusive incorporar elementos, como o bromo, que não estão disponíveis para espécies terrestres. A habilidade de síntese dessas substâncias pode ser oriunda do próprio organismo ou de seres simbioses presentes em seus tecidos (HAEFNER, 2003; GUL; HAMANN, 2005).

Em corais, a presença de sesquiterpenos voláteis na ordem Gorgonacea foi o fator que inicialmente atraiu pesquisadores no estudo de metabólitos secundários na subclasse Octocorallia. Por conseguinte, o isolamento de prostaglandinas tornou os seres deste grupo importantes alvos de pesquisa, o que aumentou o número de estudos com octocorais na descoberta de novas substâncias e teve os sesquiterpenos e diterpenos como principais resultados (COLL, 1992). Os estudos dos terpenos em Octocorallia possibilitaram, inclusive,

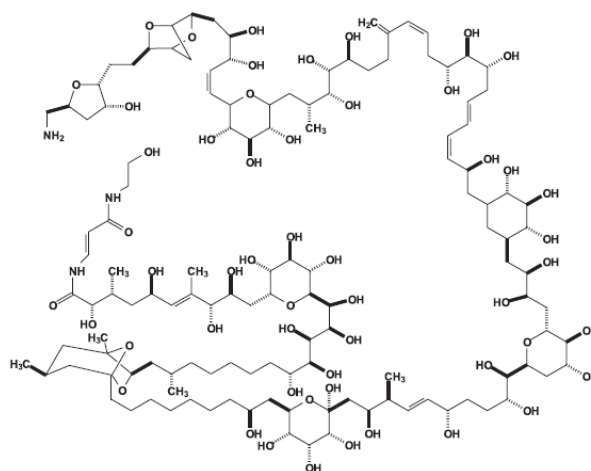
que essas substâncias pudessem ser utilizadas na classificação de octocorais (quimiotaxonomia) (GERHART, 1983).

Essas substâncias estão presentes nos tecidos e são produzidas pelos corais, cujas funções exercidas nesses organismos são na maioria das vezes associadas à defesa. Essa associação pode ser justificada por duas razões. A primeira é o alto custo energético empregado na produção de moléculas complexas ou em altas concentrações, enquanto que a segunda está na observação da correlação entre organismos sem defesas físicas evidentes e presença de compostos químicos incomuns em seus tecidos. Esta segunda razão, que pode ser verificada não somente para os corais, mas também para os invertebrados marinhos em geral, é corroborada pelo fato de que as fontes mais ricas de metabólitos secundários são organismos de corpo mole em comparação com seres que possuem alguma estrutura ou técnica de defesa mais perceptível (PAWLIK, 1993).

A grande diversidade desses compostos permite a realização de uma série de atividades biológicas. Isso é verificado na literatura, na qual são encontrados diversos estudos relatando atividades como ictiotoxicidade, anti-predação e alelopatia. Como exemplo, podemos citar o gênero *Sinularia*, que utiliza substâncias químicas como terpenoides em mecanismos de defesa e uma variedade de moléculas que geram inibição alimentar, quando sua forma colonial é mole e carnuda (COLL, 1992; SAMMARCO; COLL, 1992).

Na subclasse Hexacorallia, o gênero *Palythoa* se caracteriza por apresentar uma substância que exemplifica um grau extraordinário de capacidade de síntese da natureza de metabólitos secundários, a palitoxina (Figura 5). Esta substância é considerada como a molécula biologicamente ativa mais potente de origem marinha e uma das mais tóxicas, atuando ao nível de ATPase de membrana, inibindo a bomba de sódio e potássio. Relatos populares indicam o uso medicinal do muco produzido pela *Palythoa caribaeorum*, também conhecido como baba-de-boi, agindo como analgésico e anti-inflamatório diretamente sobre lesões (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; SOARES et al., 2006).

Figura 5 – Estrutura da palitoxina



Fonte: VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006.

Nessa mesma espécie, junto à *Protopalychia variabilis* (Hexacorallia), duas ceramidas sulfoniladas, até então não registradas, foram isoladas e suas estruturas identificadas. A paliosulfonoceramida A e paliosulfonoceramida B foram identificadas junto com outras ceramidas conhecidas, porém, efeitos citotóxicos não foram observados. Na literatura, os efeitos biológicos de ceramidas são conhecidos e variados, sendo estas estruturas alvos para modificações químicas a fim de expandir ou potencializar suas propriedades biológicas (ALMEIDA et al., 2012; BLUNT et al., 2014). Outra espécie pertencente ao grupo Hexacorallia, a *Antipathes dichotoma*, apresentou um novo alcaloide carbazólico, junto com outros alcaloides. Esta espécie possui uma série de funções farmacêuticas na cultura popular chinesa e as substâncias identificadas nos extratos obtidos com etanol e diclorometano (DCM) (2:1 v/v) apresentaram efeitos biológicos. A antipatina A e zoantoxantina 1 mostraram respostas moderadas contra linhagens tumorais de estômago SGC-7901 e baixa citotoxicidade para a linhagem tumoral de fígado HEP-G2 (QI et al., 2009; BLUNT et al., 2015).

Os corais pertencentes à ordem Scleractinia foram ignorados como fontes de produtos naturais por muitos anos, já que os pesquisadores não associavam a produção de metabólitos secundários como uma estratégia de defesa nesses corais duros. Pelo fato de secretarem carbonato de cálcio possuiriam defesa física suficiente contra seus predadores e competidores (COLL, 1992; BAE et al., 2000; ALAM et al., 2001a). Entretanto, há registros na literatura que demonstraram o isolamento de metabólitos secundários com atividades biológicas, oriundos de corais escleractíneos. Guella e colaboradores (1988) isolaram alcaloides da família das aplisinopsinas a partir de corais escleractíneos da família Dendrophylliidae (*Leptopsammia pruvoti* e *Tubastraea* sp.). O composto aplisinopsina (Tabela 1) é um

alcaloide indólico e foi isolado da esponja *Aplysinopsis reticulata* (Dictyoceraida) e, posteriormente, associada a outras espécies de esponjas e corais da família Dendrophylliidae, como as espécies *Astroides calycularis* e *T. aurea* (hoje aceita como *T. coccinea*). A aplisinopsina e seus análogos levantaram considerável interesse como uso farmacológico por apresentarem atividades como citotoxicidade para células cancerosas e influência no processo de neurotransmissão. Nenhum análogo sintético desse composto demonstrou ser mais eficiente nessas propriedades (KAZLAUSKAS et al., 1977; FATTORUSSO et al., 1985; GUELLA et al., 1988). Na espécie *Dendrophyllia* sp. também foram detectados diferentes análogos de aplisinopsina, como a 2'-demetilaplisinopsina e 2'-demetil-3'-*N*-metilaplisinopsina, assim como seus derivados 6-bromo (GUELLA et al., 1989). Em uma espécie não identificada da família Dendrophylliidae foram isolados os compostos cicloaplisinopsina A e cicloaplisinopsina B, ambos não descritos até então pela literatura, e seus derivados monobromados em quantidades traço. Junto a essas substâncias foram identificados a 3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina e seu derivado 6-bromo (MANCINI et al., 2003).

No gênero *Montipora* sp, pertencente à ordem Scleractinia, um novo alcaloide piridínico foi encontrado, sendo denominado montipiridina. Neste mesmo gênero, compostos acetilênicos até então não descritos na literatura foram detectados, porém suas propriedades antifúngicas, antibacterianas, ictiotóxicas e citotóxicas são conhecidas. Dentre eles, as montiporinas A-F demonstraram citotoxicidade para linhagens celulares tumorais. As montiporinas A e C apresentaram resultados equivalentes ao controle positivo usado (cisplatina) para a linhagem de câncer de pele humano (SK-MEL-2), enquanto que todas mostraram respostas moderadas para as linhagens tumorais SK-OV-3 (ovário), XF498 (sistema nervoso central) e HCT15 (côlon). Para a linhagem A549 (pulmão), as respostas foram quase nulas. O mesmo grupo de pesquisa também descobriu em *Montipora* sp. compostos diacetilênicos, cuja atividade citotóxica para linhagens tumorais fora confirmada. Das 14 substâncias isoladas, 10 eram inéditas na literatura, sendo nomeadas de ácido montipórico C, metil montiporato A e B e montiporina G-M (BAE et al., 2000; ALAM et al., 2001a; ALAM et al., 2001b).

Os primeiros metabólitos secundários isolados de um coral escleractíneo de águas profundas foram oito moléculas 3-ceto-esteróides do tipo ácido cólico, dos quais cinco eram substâncias ainda não identificadas. Essas moléculas foram obtidas da espécie *Deltocyathus magnificus*, porém, a suspeita de atividade anti-predação não pôde ser confirmada. O mesmo grupo de pesquisa, trabalhando com o coral *Dendrophyllia cornigera*, detectou uma mistura

complexa de β -glicosilceramidas com alto grau de heterogeneidade nas porções trabalhadas (esfingosina e ácido graxo α -hidroxil). Constituintes dessa mistura, os glicos esfingolipídeos, são frequentemente associados a processos imunológicos, mas também atraem atenção pelo seu papel em eventos como comunicação intracelular, adesão e proliferação celular, crescimento neural, transformação celular e progressão tumoral, atuando como antígenos e receptores na superfície de células (GUERRIERO et al., 1996; POCSFALVI et al., 2000). Nessa mesma espécie, *D. cornigera*, foram isolados quatro esteroides, sendo um deles inédito ((20*R*)-22*E*-colest-4,22-dieno-3,6-diona. Dois dos esteroides conhecidos apresentaram citotoxicidade para a linhagem tumoral NSCLC-N6 (carcinoma broncopulmonar) (KONTIZA et al., 2006; SKROPETA, 2008).

Gênero *Tubastraea*

O gênero *Tubastraea* (Classe Anthozoa, Ordem Scleractinia, Família Dendrophylliidae) é caracterizado como corais duros sem a presença de zooxantelas simbiotes, por isso são considerados não formadores de recifes (ahermatípicos). As espécies desse grupo residem em águas rasas e profundas, recifes de corais e costões rochosos. Esse gênero possui sete espécies: *T. caboverdiana* Ocana e Brito; *T. coccinea* Lesson, 1829; *T. diafana* (Dana, 1846); *T. faulkneri* Wells, 1982; *T. floreana* Wells, 1982; *T. micranthus* (Ehrenberg, 1834); e *T. tagusensis* Wells, 1982. São organismos nativos dos oceanos Pacífico e Índico, entretanto, algumas espécies, como *T. coccinea*, são consideradas cosmopolitas, apresentando ampla distribuição em águas tropicais do Atlântico, Pacífico e Índico devido ao processo de bioinvasão (CAIRNS, 2000; DE PAULA; CREED, 2004; CREED et al., 2017a).

A pesquisa na busca e isolamento de moléculas com valor farmacológico nesse gênero iniciou com Okuda e colaboradores (1982) ao identificarem alcaloides em extratos etanólicos de *T. coccinea* e da lesma marinha *Phestilla melanobranchia*. Sete compostos foram isolados, dentre eles cinco derivados de aplisinopsina, com e sem presença de halogênio em suas estruturas. As substâncias 2'-de-*N*-metilaplisinopsina e 6-bromo-2'-de-*N*-metilaplisinopsina foram relacionadas a aplisinopsinas encontradas em esponjas do gênero *Thorecta* sp., as quais foram consideradas inibidoras de tumores (KAZLAUSKAS et al., 1977; OKUDA et al., 1982).

No uso de extratos etanólicos de *T. aurea*, descobriu-se uma atividade de inibição da divisão celular de ovos fertilizados de ouriço do mar (*Hemicentrotus pulcherrimus*). Isolando a substância responsável por esta atividade, identificou-se a molécula aplisinopsina (FUSETANI et al., 1986).

Em *T. micranthus*, foram encontrados derivados antraquinônicos em extratos etanólicos. O ácido 3-bromobenzoico apresentou-se em altas concentrações nessa espécie e, em menores quantidades, as substâncias 1,8-dihidroxi-antraquinona, 7-hidroxi-1,8-dimetoxi-2,3-metileno dioxiantraquinona e 2'-hidro-2,4,4-trimetoxichalcona. O composto 2-bromo-4-carboxi-1-hidroxi-antraquinona apresentou atividade de defesa contra a predação pela estrela do mar *Acanthaster planci*, um dos principais predadores de corais duros no oceano Pacífico. O mesmo grupo de pesquisa identificou posteriormente a tubastrina, o primeiro alcaloide cromona proveniente de invertebrado marinho, junto à heteronemina, um conhecido sesterterpeno encontrado em esponjas (SANDUJA; ALAM; WELLINGTON, 1986; ALAM; SANDUJA, WELLINGTON, 1988).

O extrato polar de *T. aurea* demonstrou atividade antiviral. A simples combinação entre uma porção de guanidina e uma de dihidroxiestireno exibiu atividade tóxica para os vírus simples do herpes tipo 1 e vírus da estomatite vesicular. A essa molécula deu-se o nome de tubastrina (SAKAI; HIGA, 1987).

Como citado anteriormente, em Guella e colaboradores (1988), duas espécies da ordem Scleractinia demonstraram ser ricas fontes de alcaloides. *Leptopsammia pruvoti* e *Tubastraea* sp. apresentaram compostos derivados de aplisinopsina. Há a possibilidade de que as amostras usadas de *Tubastraea* sp. sejam colônias jovens de *T. micranthus*. As substâncias identificadas para *Tubastraea* sp. foram a 3'-deimino-3'-oxoaplsinopsina e seu derivado halogenado 6-bromo.

A partir do extrato orgânico de *T. faulkneri*, novos compostos citotóxicos foram identificados. Dois novos macrolídeos, as micalolidas D e E, juntamente com a micalolida C, a 3'-deimino-2',4'-bis(dimetil)-3'-oxoaplsinopsina e seu derivado 6-bromo foram isolados dessa espécie. As micalolidas C e D apresentaram resposta moderada quando testadas para o quadro de linhagens tumorais humanas NCI60 (RASHID et al., 1995).

O extrato etanólico das espécies *T. faulkneri*, *T. micranthus*, *T. diaphana* e *Tubastraea* sp., assim como as espécies *Turbinaria peltata* e *Porites lichen* promoveram atividade antimicrobiana para seis organismos. Dentre eles, cinco eram bactérias de origem marinha (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium damsela*, *Alteromonas rubra*, *Synechococcus* sp.) e uma terrestre (*Staphylococcus aureus*). A amostra de *T. faulkneri*

demonstrou ser a mais promissora. Já no extrato metanólico de *T. faulkneri*, quatro moléculas foram identificadas, cujo efeito deletério para larvas competentes para assentamento de 11 espécies de coral (sete gêneros de quatro famílias escleractíneas) fora confirmado. Tais substâncias eram responsáveis por 72% da composição do extrato. A aplisinopsina, 6-bromo-aplisinopsina, 6-bromo-2'-de-*N*-metilaplisinopsina e seu dímero mostraram ação alelopática para as larvas das espécies *Montipora digitata*, *Acropora formosa*, *Acropora millepora*, *Acropora pulchra*, *Acropora tenuis*, *Favia pallida*, *Goniastrea aspera*, *Platygyra daedalea*, *Platygyra sinensis*, *Fungia fungites* e *Oxypora lacera*. As larvas de *T. faulkneri* também foram usadas, porém não sofreram efeito tóxico após a exposição (KOH, 1997; KOH; SWEATMAN, 2000).

Outro grupo de substâncias que foram primeiramente identificadas neste gênero é a tubastrindol, alcaloides bis-indólicos. As tubastrindóis A-C foram isoladas de *T. aurea* a partir da fração de DCM de extrato bruto metanólico. Posteriormente foram identificados as tubastrindóis D-H nas mesmas amostras. Entretanto, nenhuma dessas substâncias apresentou atividade biológica, como antibacteriana, antifúngica ou citotóxica, em ensaios de *screening* inicial (IWAGAWA et al., 2003; IWAGAWA et al., 2008).

Substâncias mais complexas com a estrutura base da aplisinopsina também são encontradas neste gênero. As cicloaplisinopsina A, cicloaplisinopsina B e seu derivado metilado foram isoladas de uma espécie não identificada do gênero *Tubastraea*, junto com 3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina e seu derivado 6-bromo. A cicloaplisinopsina C é elucidada posteriormente, somada a aplisinopsina e a 6-bromo-3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina. A cicloaplisinopsina C apresenta a atividade antimalárica, detectada através de ensaios com as linhagens de *Plasmodium falciparum* F32/Tanzania (sensível a cloroquina) e FcB1/Colombia (resistente a cloroquina). A ação ocorreu por meio da inibição do crescimento (MANCINI et al., 2003; MEYER et al., 2009; GAO et al., 2013).

Amostras de *T. coccinea* e *T. tagusensis* foram submetidas a espectroscopia RAMAN. Essa investigação química culminou na identificação do carotenoide astaxantina em extratos hexânicos e da aplisinopsina em extratos metanólicos. Ambos os extratos apresentaram capacidade antioxidante (MAIA et al., 2014). A Tabela 1 contém as estruturas moleculares das substâncias isoladas do gênero *Tubastraea* descritas anteriormente em ordem cronológica.

Tabela 1 – Estruturas moleculares das substâncias isoladas do gênero *Tubastraea* (continuação)

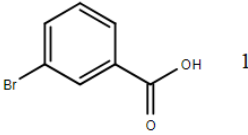
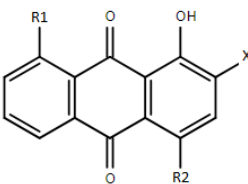
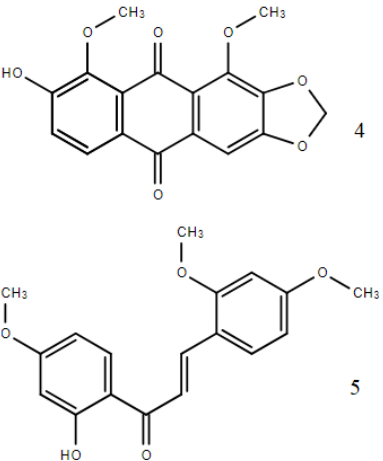
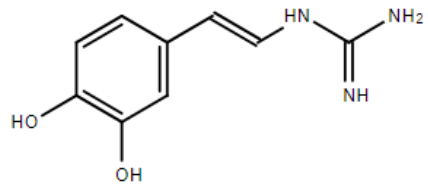
Espécie	Estrutura molecular	Composto	Referência
<i>T. micranthus</i>		1 – Ácido 3-bromobenzoico	SANDUJA;
		2 – 1,8-dihidroxi-antraquinona	ALAM;
		3 – 2-bromo-4-carboxil-1-hidroxi-antraquinona	WELLINGTON
		4 – 7-hidroxi-1,8-dimetoxi-2,3-metileno dioxiantraquinona	, 1986
		5 – 2'-hidro-2,4,4'-trimetoxichalcona	
<i>T. aurea</i>		Tubastrina	SAKAI; HIGA, 1987

Tabela 1 – Estruturas moleculares das substâncias isoladas do gênero *Tubastraea* (continuação)

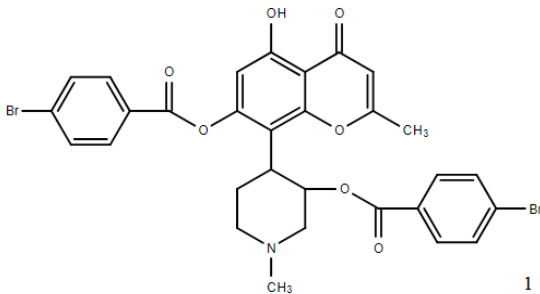
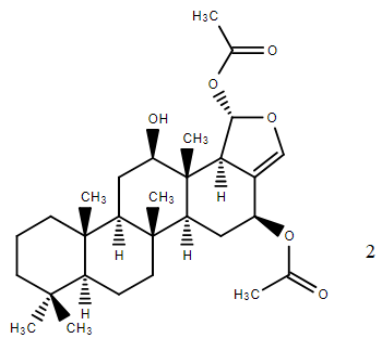
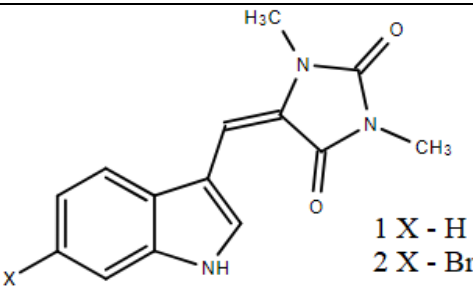
Espécie	Estrutura molecular	Composto	Referência
<i>T. micranthus</i>	 <p style="text-align: center;">1</p>	1 – Tubastraina 2 – Heteronemina	ALAM; SANDUJA; WELLINGTON, 1988
	 <p style="text-align: center;">2</p>		
<i>Tubastraea</i> sp.	 <p style="text-align: center;">1 X - H 2 X - Br</p>	1 – 3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina 2 – 6-bromo-3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina	GUELLA et al., 1988

Tabela 1 – Estruturas moleculares das substâncias isoladas do gênero *Tubastraea* (continuação)

Espécie	Estrutura molecular	Composto	Referência
<i>T. faulkneri</i>	<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4 X - H 5 X - Br</p>	1 – Micalolida C	RASHID et al., 1995
		2 – Micalolida D	
		3 – Micalolida E	
		4 – 3'-deimino-2',4'-bis(dimetil)-3'-oxoaplisinopsina	
		5 – 6-bromo-3'-deimino-2',4'-bis(dimetil)-3'-oxoaplisinopsina	

Tabela 1 – Estruturas moleculares das substâncias isoladas do gênero *Tubastraea* (continuação)

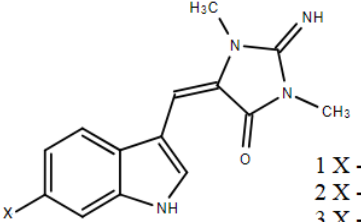
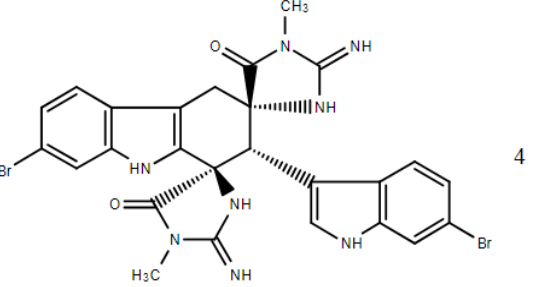
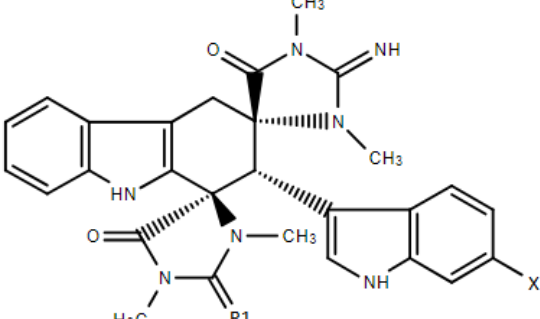
Espécie	Estrutura molecular	Composto	Referência
<i>T. faulkneri</i>	 <p>1 X - H; R1 - CH₃ 2 X - Br; R1 - H 3 X - Br; R1 - CH₃</p>	<p>1 – Aplisinopsina 2 – 6-bromo-2'-N-metilaplisinopsina 3 – 6-bromoaplisinopsina 4 – Dímero de 6-bromo-2'-N-metilaplisinopsina</p>	<p>KOH; SWEATMAN, 2000</p>
<i>T. aurea</i>	 <p>4</p>	<p>1 – Tubastrindol A 2 – Tubastrindol B 3 – Tubastrindol C</p>	<p>IWAGAWA et al., 2003</p>
	 <p>1 X - Br; R1 - NH 2 X - H; R1 - NH 3 X - H; R1 - O</p>		

Tabela 1 – Estruturas moleculares das substâncias isoladas do gênero *Tubastraea* (continuação)

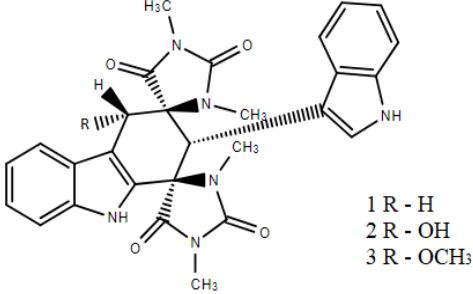
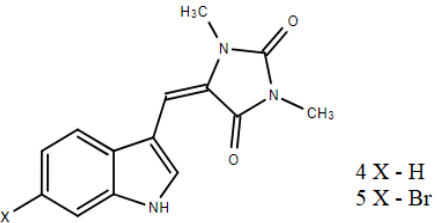
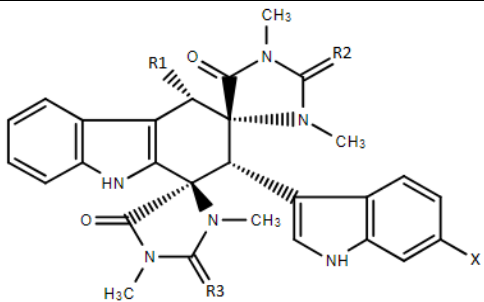
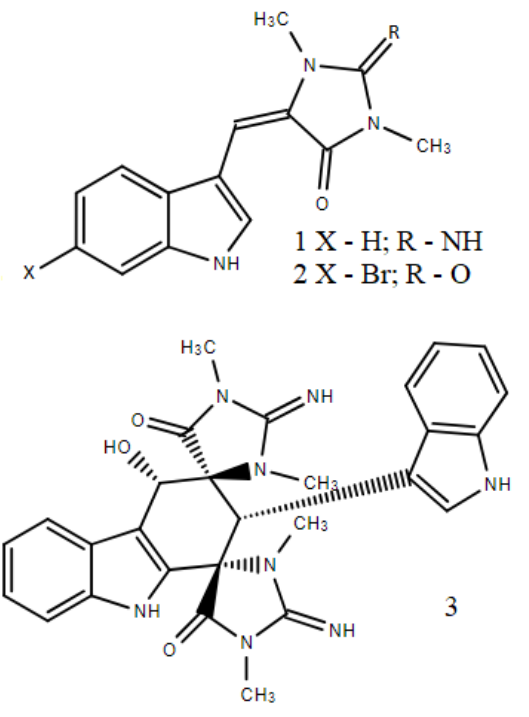
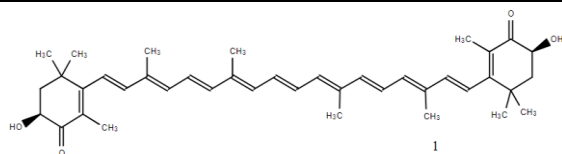
Espécie	Estrutura molecular	Composto	Referência
<i>Tubastraea</i> sp.	 <p>1 R - H 2 R - OH 3 R - OCH₃</p>	1 – Cicloaplisinopsina A 2 – Cicloaplisinopsina B 3 – 6-metoxi-cicloaplisinopsina B 4 – 3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina 5 – 6-bromo-3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina	MANCINI et al., 2003
	 <p>4 X - H 5 X - Br</p>		
<i>T. aurea</i>	 <p>1 X - Br; R1 - H; R2 - NH; R3 - O 2 X - H; R1 - OH; R2 - NH; R3 - O 3 X - Br; R1 - H; R2 - O; R3 - NH 4 X - H; R1 - H; R2 - O; R3 - NH 5 X - H; R1 - H; R2 - O; R3 - O</p>	1 – Tubastrindol D 2 – Tubastrindol E 3 – Tubastrindol F 4 – Tubastrindol G 5 – Tubastrindol H	IWAGAWA et al., 2008

Tabela 1 – Estruturas moleculares das substâncias isoladas do gênero *Tubastraea* (continuação)

Espécie	Estrutura molecular	Composto	Referência
<i>Tubastraea</i> sp.	 <p data-bbox="716 638 918 702">1 X - H; R - NH 2 X - Br; R - O</p> <p data-bbox="873 1005 907 1037">3</p>	1 – Aplisinopsina 2 – 6-bromo-3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina 3 – Cicloaplisinopsina C	MEYER et al., 2009

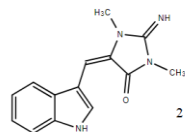
T. coccinea /

T. tagusensis



1 – Astaxantina

2 – Aplisinopsina



MAIA et al.,

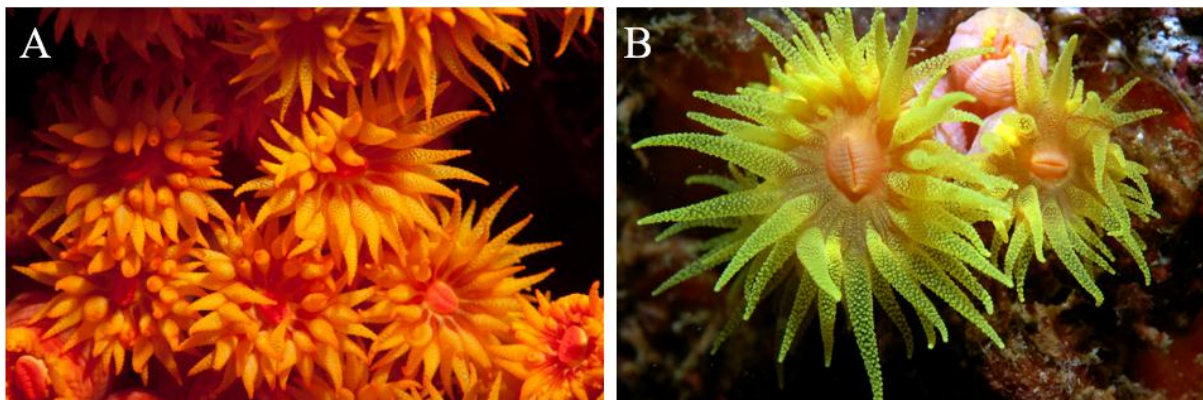
2014

Tubastraea coccinea e *Tubastraea tagusensis* no Brasil

O gênero *Tubastraea* foi oficialmente registrado, na costa brasileira, no início do século XXI. É descrito na literatura que a introdução desses organismos, também conhecidos como coral sol, ocorreu através de sua incrustação em plataformas de petróleo e gás na Bacia de Campos, região norte do estado do Rio de Janeiro, na década de 80. Esta hipótese é baseada: (1) nos primeiros registros de *Tubastraea* na região onde a incrustação é relatada em plataformas de óleo e gás; (2) nas semelhanças entre os registros da chegada dessas plataformas com os de invasão nos ecossistemas locais; (3) na associação dos primeiros locais de introdução na costa com os locais das instalações portuárias usadas por embarcações das indústrias de óleo e gás e; (4) nas idades estimadas de colônias, incrustadas em plataformas de óleo e gás, que datam de 15 anos antes da chegada dessas plataformas ao Brasil. Ao longo dos anos, as espécies invasoras identificadas como *T. coccinea* e *T. tagusensis* obtiveram sucesso no seu processo de expansão no litoral brasileiro. A bioinvasão alcançou os costões dos litorais dos estados de São Paulo, Santa Catarina e Bahia, o que aumenta a atenção a esse fenômeno, visto que a introdução de espécies exóticas possui capacidade deletéria significativa para a integridade da biodiversidade do ecossistema invadido (CASTRO; PIRES, 2001; JUNQUEIRA et al., 2009; SILVA; BARROS, 2011; LAGES et al., 2012; SAMPAIO et al., 2012; SILVA et al., 2014; CREED et al., 2017a).

T. coccinea (Figura 6A) possui cor laranja e é originária do Arquipélago de Fiji (sul do Oceano Pacífico). Atualmente é caracterizada como uma espécie cosmopolita, com maior presença na região entre os trópicos. *T. tagusensis* (Figura 6B) possui cor amarela e é originária do Arquipélago de Galápagos, onde era considerada endêmica. Atualmente encontra-se nos Oceanos Pacífico e Atlântico. Ambas as espécies são ahermatípicas, azooxanteladas e se estabelecem e se desenvolvem em substratos consolidados com diversas inclinações, sendo comuns em águas rasas e profundas a cerca de 110 m. Também podem ser encontradas em áreas sem iluminação, nos quais o processo de fixação possa ocorrer em uma primeira etapa e posterior expansão para locais com luz, segundo evidências (DE PAULA; CREED, 2004; DE PAULA; CREED, 2005; CREED; DE PAULA, 2007; CREED; OLIVEIRA; DE PAULA, 2008; JUNQUEIRA et al., 2009; CREED et al., 2017a).

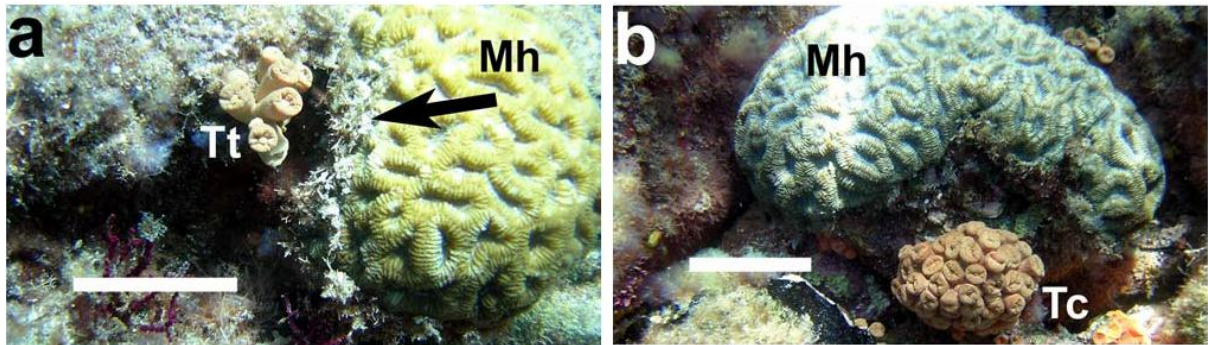
Figura 6 – A: *T. coccinea* e B: *T. tagusensis*



Fonte: A: <https://www.flickr.com/photos/51920795@N07/5761652026> acessado em 20/06/2017. B: <http://www.icmbio.gov.br/esectamoios/destaques/61-nossos-moradores.html> acessado em 20/06/2017.

Ambas as espécies representam ameaça a organismos endêmicos das regiões invadidas, o que os caracteriza como espécies invasoras. Dentre os organismos ameaçados, pode-se destacar o coral endêmico *Mussismilia hispida* (Scleractinia, Mussidae). Estudos demonstraram que interações entre essas espécies geraram efeitos negativos, com necrose nos tecidos de *M. hispida* (Figura 7) (CREED, 2006). Embora haja evidências de que estes corais invasores podem produzir substâncias aleloquímicas contra possíveis competidores por espaço (LAGES et al., 2012), Santos e colaboradores (2013) demonstraram que a resposta física, usando os tentáculos mesentéricos também são bastante eficientes para tentar excluir os corais nativos. A produção de substâncias químicas pode ser responsável pelas baixas taxas de predação por peixes generalistas e por impedir a incrustação de outros organismos marinhos na competição por espaço no substrato. Ambos os fatores contribuem para o desenvolvimento do gênero *Tubastraea* em águas brasileiras, assim como o rápido crescimento e ativa reprodução sexuada (FERREIRA et al., 2004; CREED, 2006; LAGES et al., 2010a; LAGES et al., 2012; SANTOS et al., 2013).

Figura 7 – a: Contato entre *M. hispida* (Mh) e *T. tagusensis* (Tt). b: Contato entre *M. hispida* (Mh) e *T. coccinea* (Tc). Barra de escala = 5 cm



Fonte: CREED, 2006.

Com a finalidade de identificar quais moléculas são responsáveis por promover as vantagens no processo de bioinvasão, o mesmo grupo de pesquisa do Laboratório de Ecologia Marinha Bêntica da UERJ realizou análises de diversas amostras de ambas as espécies. Essa composição pode ser observada na Tabela 2 a seguir, onde se observa a relação de substâncias detectadas através de análise de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas das frações hexano (Hex), Hex e DCM (1:1 v/v), DCM, e DCM e metanol (MeOH) (1:1 v/v) de *T. coccinea* e *T. tagusensis* (LAGES et al., 2010b; LAGES et al., 2012).

Tabela 2 – Relação de substâncias detectadas em *T. coccinea* e *T. tagusensis* (continua)

LAGES et al., 2010b			LAGES et al., 2012		
PM ¹	FM ²	Substância	PM ¹	FM ²	Substância
224	C ₁₆ H ₃₂	1-hexadeceno	145	C ₉ H ₇ NO	1-H-indol-3-carboxaldeído
240	C ₁₆ H ₃₂ O	Hexadecanal	194	C ₈ H ₆ BrN	5-bromoindol
242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	Meristato de metila	223	C ₉ H ₆ BrNO	5-bromoindol-3-carbaldeído
252	C ₁₈ H ₃₆	1-octadeceno	224	C ₁₆ H ₃₂	1-hexadeceno
268	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	Palmitolato de metila	252	C ₁₈ H ₃₆	1-octadeceno
270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Palmitato de metila	254	C ₁₈ H ₃₈	Octadecano
282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Ácido oleico	254	C ₁₅ H ₃₀ N ₂ O	n.i.
284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Margarato de metila	264	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	metil 7,10,13-hexadecatrienoato
296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	Oleato de metila	268	C ₁₈ H ₃₆ O	9-octadecen-1-ol
298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	Estearato de metila	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Palmitato de metila
312	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	n-nonadecanoato de metila	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Ácido oleico
324	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	11-icosenoato de metila	284	C ₁₉ H ₄₀ O	Metoxioctadecano
326	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	Araquidato de metila	294	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	Metil 9,12-octadecadienoato
352	C ₂₃ H ₄₄ O ₂	Erucicato de metila	296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	Oleato de metila
370	C ₂₆ H ₄₂ O	26,27-dinorergosta-5,22E-dien-3β-ol	296	C ₂₀ H ₄₀ O	Fitol
384	C ₂₇ H ₄₄ O	27-norergosta-5,22-dien-3β-ol	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	Estearato de metila
384	C ₂₇ H ₄₄ O	Colest-5-en-3β-ona	318	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	Araquidonato de metila
386	C ₂₇ H ₄₆ O	Colest-5-en-3β-ol	384	C ₂₇ H ₄₄ O	27-norergosta-5,22-dien-3β-ol

Tabela 2 – Relação de substâncias detectadas em *T. coccinea* e *T. tagusensis* (continuação)

LAGES et al., 2010b			LAGES et al., 2012		
PM ¹	FM ²	Substância	PM ¹	FM ²	Substância
398	C ₂₈ H ₄₆ O	(22E,24S)-crinosterol	384	C ₂₇ H ₄₄ O	Colest-5-en-3β-ona
398	C ₂₈ H ₄₆ O	22,23-ciclopropano-colesterol	386	C ₂₇ H ₄₆ O	Colest-5-en-3β-ol
398	C ₂₈ H ₄₆ O	Ergosta-5,22-dien-3β-ol	388	C ₂₇ H ₄₈ O	Dihidrocolesterol
398	C ₂₈ H ₄₆ O	22,23-metilen-colesterol	396	C ₂₈ H ₄₄ O	Ergosta-5,7,22-trien-3β-ol
400	C ₂₈ H ₄₈ O	Campesterol	398	C ₂₈ H ₄₆ O	Ergosta-5,22-dien-3β-ol
400	C ₂₈ H ₄₈ O	23-R-metilcolesterol	398	C ₂₈ H ₄₆ O	Ergosta-5,24-dien-3β-ol
412	C ₂₉ H ₄₈ O	Estigmasta-5,22E-dien-3β-ol	412	C ₂₉ H ₄₈ O	Estigmasta-5,24(28)-dien-3β-ol
412	C ₂₉ H ₄₈ O	Estigmasta-5,24(28)-dien-3β-ol	480	C ₃₂ H ₆₄ O ₂	Ácido hexadecanoico
414	C ₂₉ H ₅₀ O	Estigmasta-5-en-3β-ol	491	C ₃₅ H ₇₀	17-pentatriaconteno
478	C ₃₂ H ₆₂ O ₂	Oleato de miristol	535	C ₃₆ H ₆₉ O ₂	Ácido 9-octadecanoico
506	C ₃₄ H ₆₆ O ₂	Oleato de cetila			
506	C ₃₄ H ₆₆ O ₂	Oleato de palmitila			
508	C ₃₄ H ₆₈ O ₂	Palmitato estearílico			
534	C ₃₆ H ₇₀ O ₂	Oleato estearílico			

¹Peso molecular, ²Fórmula molecular.

Após anos de pesquisa sobre a bioinvasão do gênero *Tubastraea* na costa brasileira sem nenhuma proposta direta sobre o crescente avanço dessas espécies, o Projeto Coral Sol surgiu em 2006 como uma iniciativa do Professor Joel Creed juntando pesquisadores, organização não-governamental (Instituto Brasileiro de Biodiversidade), agências governamentais e voluntários para combater o problema dessas espécies na costa brasileira. Trata-se do primeiro projeto socioambiental e sustentável que visa o combate a uma bioinvasão marinha no Brasil. Uma de suas metas é o controle e a recuperação ambiental dos ecossistemas da zona costeira marinha impactados por esses corais invasores. O projeto contribui para o desenvolvimento sustentável de comunidades litorâneas através do benefício direto da sociedade, recuperando a fauna e flora nativa e reduzindo a exploração ilegal de espécies de corais brasileiros. O avanço do projeto promove conhecimento científico, desenvolve técnicas de monitoramento, manejo e programas de educação ambiental, além de gerar trabalho e renda complementar para comunidades envolvidas e contribuir para formulação de políticas públicas na questão do coral-sol no país. Assim, a continuação de estudos relacionados com as atividades biológicas e química dessas espécies justifica-se inclusive por atribuir valor a esses corais que são descartados no processo de manejo (CREED et al., 2017b; OIGMAN-PSZCZOL et al., 2017).

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram que extratos metanólicos desses corais apresentaram atividade anti-inflamatória em ensaios de edema induzido por carragenina em patas de camundongo e atividade mutagênica para linhagens de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. enterica*) (SANTOS, 2013). O modelo de inflamação da carragenina tem sido amplamente utilizado para teste do potencial de fármacos anti-inflamatórios e possui uma alta correlação entre a eficácia deste modelo e a atividade em humanos. O teste da mutação reversa bacteriana utiliza linhagens geneticamente modificadas da bactéria *S. enterica* na avaliação mutagênica de substâncias. Esta metodologia demonstrou que inúmeros compostos que são mutagênicos em bactérias também são carcinogênicos em roedores e humanos. Além disso, permite a utilização de linhagens com sistema metabólico específico buscando aumentar a sensibilidade do sistema na detecção de possíveis substâncias mutagênicas (MARON; AMES, 1983; ZHANG et al., 1997; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Atividades biológicas

Atividades citotóxica, mutagênica e genotóxica

O ensaio de mutação reversa com *S. enterica* é uma metodologia rápida, de baixo custo, segura e reconhecida por agências reguladoras (OMS, OECD, ANVISA, FDA) para detectar substâncias mutagênicas. Os testes com organismos procariotos permitem realizar um diagnóstico em curto prazo de como uma amostra atua, caso haja interação com o DNA. Este ensaio também permite avaliar a ação em ambiente de metabolização exógena (S9 mix) comparada ao efeito do sistema enzimático do citocromo P450, presentes em células eucarióticas que está relacionado à metabolização de xenobióticos (OECD 1997; STANKEVICINS, 2008; OECD 2016a).

No desenvolvimento de fármacos, uma avaliação completa do potencial genotóxico de determinada substância torna-se necessária para o estabelecimento de comercialização e consumo humano. O ensaio de mutação reversa bacteriana isoladamente não é suficiente para suprir essa necessidade, visto que utiliza organismos procariotos e não identifica todas as formas de interação com o DNA, somente mutações pontuais. Dessa forma, testes genotóxicos *in vitro* e/ou *in vivo* em células de mamífero também são usados para expandir a detecção dos mecanismos genotóxicos relevantes na formação de alterações genéticas (FDA, 2012, 2018).

A importância dos estudos genotóxicos de determinada amostra está na detecção de agentes químicos ou físicos que possuem a capacidade de gerar danos ao DNA de forma direta ou indireta. Através dos testes de genotoxicidade, os processos que levam à lesão do DNA podem ser identificados e indicar o risco que o agente investigado possui. Em caso de resultados positivos, tanto em testes *in vitro* como *in vivo*, os agentes em estudo apresentam ou são substâncias com potenciais atividades mutagênicas e carcinogênicas para a espécie humana (STANKEVICINS, 2008). O ensaio de micronúcleo detecta atividades de compostos clastogênicos e aneugênicos em células que tenham sofrido divisão celular durante ou após a exposição a esses compostos. Trata-se de um ensaio eficaz em uma variedade de tipos celulares, como linhagens de células de roedores e linfócitos humanos e pode ser realizado tanto *in vitro* quanto *in vivo* (OECD, 2010, 2014).

Compostos que são aplicados como positivos em testes *in vitro* e/ou *in vivo* que detectam tipos de dano ao DNA têm potencial para tornarem-se mutágenos e/ou carcinógenos em humanos. A FDA (2012) sugere duas opções de bateria de testes padrão igualmente adequadas para detecção de agentes genotóxicos com potenciais atividades mutagênicas e carcinogênicas. A primeira opção abrange: um teste para avaliar a mutagenicidade em bactérias, como o teste de mutação reversa bacteriana; um teste citogenético *in vitro* para dano cromossomal, por exemplo, o ensaio de formação de micronúcleo, e; um teste *in vivo* para genotoxicidade, como a avaliação de dano cromossômico em células hematopoiéticas de roedores. A segunda opção de bateria de testes indica: um teste para avaliar mutagenicidade de um composto e um teste *in vivo* para avaliar a genotoxicidade em células de dois tecidos diferentes, geralmente células hematopoiéticas e hepatócitos de roedores. A razão em se considerar esses dois conjuntos de metodologias igualmente apropriadas é que resultados negativos encontrados em dois testes *in vivo* descartam a possibilidade de atividade genotóxica do composto estudado, mesmo que testes *in vitro* tenham identificado a ocorrência desta atividade.

Atividade anti-inflamatória

O processo inflamatório é a capacidade de um organismo de responder defensivamente a estímulos lesivos. Trata-se do resultado da ativação do sistema imunológico, que coordena o mecanismo de defesa em resposta a infecções microbianas e irritações ou lesões nos tecidos e/ou órgãos. A inflamação é uma das respostas genéricas que integram o sistema imunológico inato e tem como objetivo o controle gerado por injúrias. A manutenção desse controle é uma consequência benéfica do processo inflamatório, mas a intensificação e o tempo prolongado sob essas condições trazem complicações ao indivíduo, como asma, doenças cardiovasculares e câncer (CUZZOCREA, 2005; LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2009; CRUSZ; BALKWILL, 2015; KURAKULA et al., 2015; CHEUNG et al., 2016).

Substâncias que atuam como agentes anti-inflamatórios são utilizadas nos tratamentos dessas complicações. Os anti-inflamatórios podem ser divididos em três grupos: medicamentos biológicos, anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais. Enquanto que o uso de medicamentos biológicos predispõe um alto custo para o tratamento, os outros dois grupos

apresentam reações adversas devido ao uso contínuo. Os anti-inflamatórios esteroidais, também denominados corticosteroides, integram um conjunto de hormônios que interagem com um receptor de glicocorticoides e regulam a expressão de proteínas. O efeito anti-inflamatório gerado por esse grupo ocorre pelo bloqueio da liberação de prostaglandinas através da inibição da atividade da enzima fosfolipase A₂, interferindo na cascata de reações do ácido araquidônico. Os anti-inflamatórios não esteroidais atuam por meio da inibição das enzimas ciclo-oxigenases (COX), podendo ser não seletivos (COX-1 e COX-2) ou seletivos (apenas para a isoforma COX-2) (MILLER; STANTON; DEVERY, 2001; DINARELLO, 2010; CHEUNG et al., 2016).

Entretanto, tanto os corticosteroides quanto os anti-inflamatórios não esteroidais, seletivos e não seletivos, possuem efeitos colaterais em consequência do uso prolongado. Os compostos anti-inflamatórios esteroidais aumentam a susceptibilidade a infecções, devido ao seu efeito imunossupressor, alteram a pressão arterial e estão relacionados com úlceras gástricas. Os agentes inibidores não seletivos de COX geram complicações gastrointestinais e os seletivos para COX-2 induzem ou agravam hipertensão arterial (OFMAN et al., 2002; MAMDANI et al., 2003; VEGIOPOULOS; HERZIG, 2007).

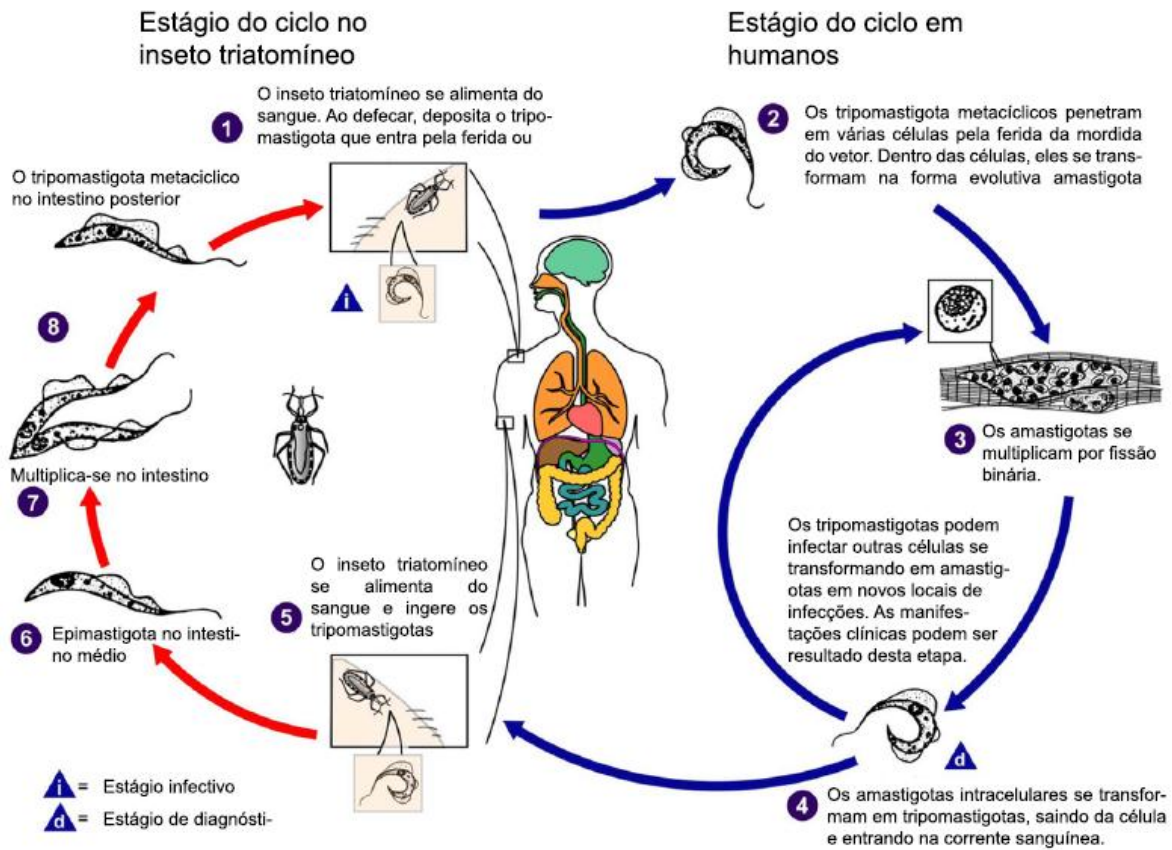
A pesquisa de produtos naturais tem como objetivo final a descoberta de novos compostos para o tratamento de doenças no ser humano. Nos últimos anos, as fontes para obter essas substâncias mudaram do meio terrestre para o meio marinho, pois as moléculas oriundas deste ambiente demonstram, no geral, bioatividade maior e mais significativa. Os invertebrados marinhos, dentre eles os corais, são os responsáveis pela maioria dessas substâncias, cujas atividades associadas compreendem o efeito anti-inflamatório (HU et al., 2011; LI et al., 2015). Recentemente, o grupo de pesquisa de Mayer e colaboradores (2017) fez um levantamento de compostos marinhos com diversas atividades farmacológicas relacionadas, incluindo o efeito anti-inflamatório, em estágio pré-clínico entre os anos de 2012 e 2013. Dos 257 compostos marinhos descritos, 19 são oriundos de corais e apresentam atividade anti-inflamatória, sendo em sua maioria terpenoides. No trabalho do mesmo grupo publicado em 2013, 226 compostos marinhos são descritos nos mesmos parâmetros entre os anos de 2009 e 2011, onde encontra-se 17 substâncias com efeito anti-inflamatório provenientes de cnidários, sendo a maioria terpenoides (MAYER et al., 2013). Esse grupo de pesquisa vem realizando esse modelo de levantamento desde 1998.

Atividades antiparasitárias

Trypanosoma cruzi

A doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário digenético *Trypanosoma cruzi*, endêmica em 21 países da América Latina. A DC pertence ao grupo das 17 doenças negligenciadas. Atualmente cerca de 8 milhões de pessoas são afetadas em todo o mundo, com 50 milhões sob o risco de contraí-la (WHO, 2015). As vias de transmissão do *T. cruzi* incluem a via vetorial (triatomíneo), transfusão de sangue, transplante de órgãos, materno-fetal, acidentes de laboratório e contaminação por via oral, sendo esta última responsável por 70% dos novos casos infecção no Brasil na última década (BERN, 2011; COURA; JUNQUEIRA, 2015a; COURA; JUNQUEIRA, 2015b). Essa patologia apresenta duas fases. A aguda, de curta duração (3-4 meses), normalmente assintomática ou oligossintomática, apresentando ou não sinais de entrada, como o sinal de Romana (ROMAÑA, 1935), e com parasitemia patente. Logo após esse período há evolução para a fase crônica, com parasitemia subpatente e assintomática. Porém, após anos ou décadas cerca de 30-40 % dos portadores evoluem para forma sintomática caracterizada por cardiopatia e/ou alterações digestivas e neurológicas (TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM, 2006; ALBAJAR-VIÑAS; DIAS, 2014). A Figura 8 demonstra o ciclo de vida e as formas evolutivas do *T. cruzi*. A atual quimioterapia para DC é insatisfatória, principalmente devido à baixa eficácia, especialmente durante a fase crônica tardia, aos severos efeitos colaterais e à resistência natural de algumas cepas de *T. cruzi* para nitroderivados usados na clínica: benzonidazol e nifurtimox (COURA; DE CASTRO, 2002; URBINA, 2010; RASSI JR; RASSI; REZENDE, 2012). Deste modo é justificada a busca por novas terapias baseadas na identificação de novas moléculas (naturais ou sintéticas) ou mesmo reposicionamento de fármacos já usados em outras patologias, mas que possam compartilhar alvos em comum ao parasito.

Figura 8 – Ciclo de vida de *T. cruzi* e suas formas evolutivas



Fonte: Adaptado de <https://abcdamedicina.com.br/doenca-de-chagas-ciclo-de-vida-patologia-e-quadro-clinico.html> acessado em 27/08/2018 às 09:13.

Na área de produtos naturais, encontram-se moléculas que apresentam atividade contra o protozoário. Exemplificando, a molécula lignano-lactonas da espécie vegetal *Piper cubeba* (Piperaceae) apresentou atividade *in vivo* em ratos infectados com o *T. cruzi*, reduzindo a infecção em tecidos (SARAIVA et al., 2006; ESPERANDIM et al., 2010). Triterpenos da *Arrabidaea triplinervia* (Bignoniaceae) e seus derivados, e terpenoides isolados da *Pinus oocarpa* (Pinaceae) apresentam atividade contra as formas epimastigota e tripomastigota (RUBIO et al., 2005; LEITE et al., 2006).

Com produtos naturais marinhos, pode-se citar alcaloides indólicos identificados a partir da bactéria marinha *Bacillus pumilus*, organismo simbiote isolado do coral negro *Antipathes* sp. Esses alcaloides, denominados 3-formilindol, 3-hidroxiacetilindol e *N*-acetil- β -oxotriptamino, apresentaram atividade moderada contra *T. cruzi* com valores de EC_{50} de 26,9 μ M, 20,6 μ M e 19,4 μ M, respectivamente. Entretanto, o índice de seletividade dessas substâncias ficou abaixo de quatro. A esponja *Agelas oroides* rendeu uma série de derivados

bromopirróis, dos quais a molécula amino-1-(amidoimidazol)-prop-1-eno demonstrou atividade moderada contra as espécies de *T. cruzi* e *T. brucei rhodesiense*. Os valores de EC₅₀ foram, respectivamente, 18 µM e 17 µM. Porém, a molécula também apresentou citotoxicidade para as células hospedeiras (L6) com EC₅₀ de 5 µM. Outras classes de substâncias provenientes de fontes marinhas também apresentam atividade tripanocida, como os terpenos. Uma série de saponinas esteroidais isoladas da esponja *Pandaros acanthifolium* apresentaram diversas atividades biológicas, dentre elas a inibição das espécies *T.b. rhodesiense* e *T. cruzi*. O metil éster pandarosideo G apresentou atividade intensa contra essas espécies de protozoários com EC₅₀ de 0,038 µM e 0,77 µM, respectivamente. Contudo, essa toxicidade elevada não foi específica para os parasitas, visto que afetou também as células hospedeiras (L6), com LC₅₀ de 0,22 µM (JONES et al., 2013). Estes dados reforçam a busca por novos compostos naturais que possam ser efetivos sobre o *T. cruzi*.

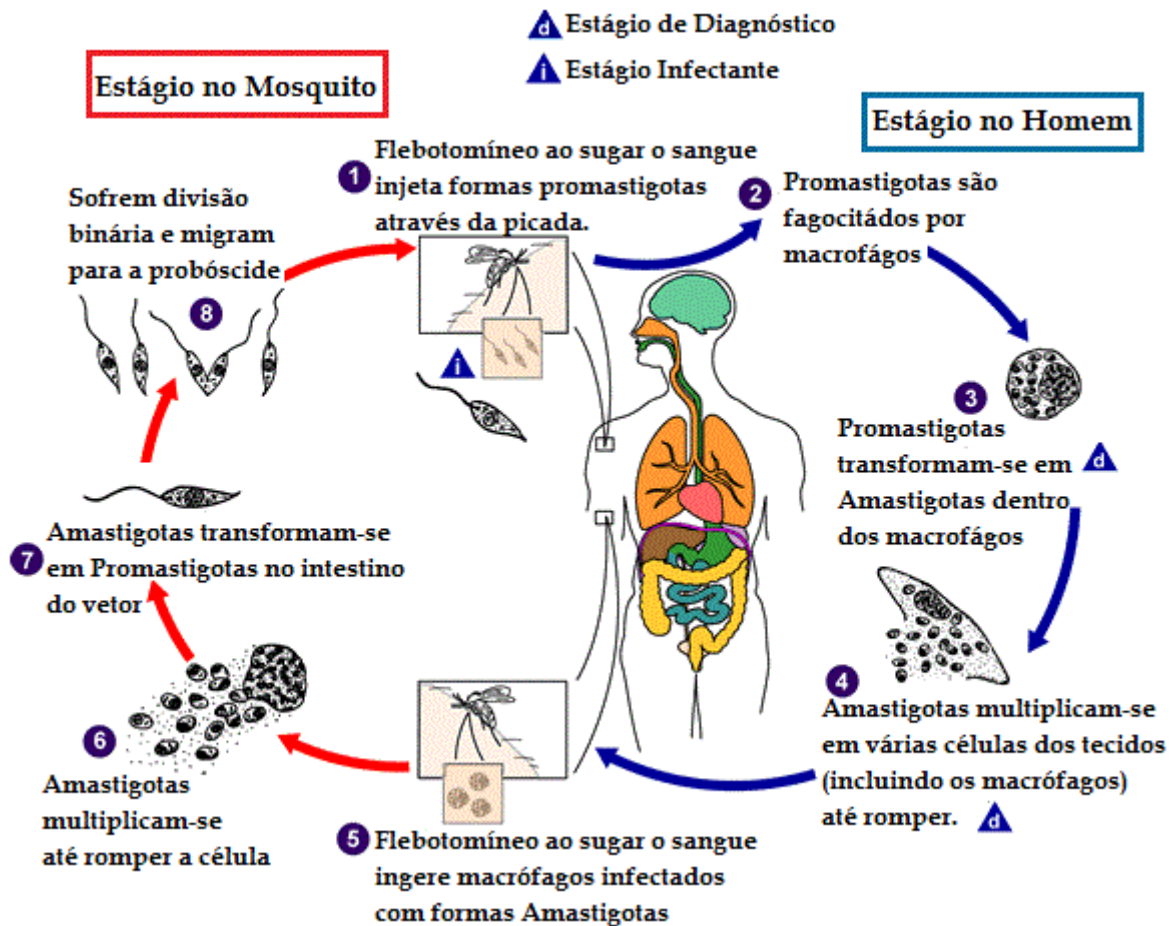
Leishmania sp.

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada e complexa, causada por diferentes espécies de *Leishmania* sp., um protozoário parasita obrigatório. Estes são transmitidos aos hospedeiros vertebrados através da picada de insetos flebotomíneos fêmeas infectadas. Os principais hospedeiros da *Leishmania* são animais, silvestres e domésticos, e o homem (STOCKDALE; NEWTON, 2013). Os casos de ocorrência dessa doença são maiores em países em desenvolvimento. O aumento da transição de pessoas entre regiões tropicais, subtropicais, Oriente Médio e sul da Europa e mudanças climáticas e ambientais globais são fatores que estão contribuindo para que esta doença se torne um risco para a população de regiões ainda não afetadas. A infecção pode gerar diferentes manifestações clínicas, como cutânea, mucocutânea e visceral (CUNHA-JUNIOR et al., 2011; SILVA et al., 2011).

A *Leishmania* apresenta duas formas evolutivas distintas: a promastigota caracteriza-se pela forma alongada com cinetoplasto anterior ao núcleo, flagelo aparente e livre e encontra-se no trato gastro-intestinal do vetor infectado. A forma amastigota possui forma arredondada ou oval, é intracelular, seu flagelo é rudimentar e encontra-se dentro do corpo celular e está presente no hospedeiro vertebrado. Além do cinetoplasto possui uma estrutura exclusiva, o megassomo, capaz de digerir moléculas ingeridas pelo parasito por endocitose

(NEVES; MELO; VITOR, 2005; TEIXEIRA et al., 2013). A Figura 9 apresenta o ciclo de vida de *Leishmania* sp.

Figura 9 – Ciclo de vida de *Leishmania* sp. e suas formas evolutivas



Fonte: Adaptado de <https://abcdamedicina.com.br/leishmaniose-visceral-e-cutanea-clinica-ciclo-de-vida-do-parasita.html> acessado em 27/08/2018 às 11:52.

As opções de tratamento para a leishmaniose são limitadas e envolvem a administração de agentes antimoniais pentavalentes como drogas de primeira linha: estibogluconato de sódio (Pentostan®) e antimoniato de meglumina (Glucantime®). A anfotericina B e pentamidina são drogas de segunda escolha. Entretanto, evidências reproduzíveis de proteção eficiente não surgiram a partir de ensaios clínicos usando as drogas de primeira linha e os tratamentos com anfotericina B e pentamidina apresentam efeitos colaterais, como toxicidade renal, hepática e pancreática, hipotensão e anomalias cardíacas (MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007; NOAZIN et al., 2008; SILVA et al., 2011).

A alta toxicidade, relatos de resistência, alto custo e longo tempo de tratamento usando os medicamentos convencionais, tem levado ao desenvolvimento de novas moléculas para

tratar a leishmaniose (COSTA et al., 2014). Nesse contexto, os estudos com produtos de origem natural ganham importância. No Brasil, testes são realizados com extratos de plantas. Alguns metabólitos são estudados por apresentar atividade leishmanicida, como alcaloides e flavonoides (MARIN et al., 2009; LEWIN et al., 2011). A isotetrandrina, alcaloide isolado da *Limnium loagensis*, mostrou efeito leishmanicida similar ao do glucantime em camundongos infectados com *L. amazonensis* e *L. venezuelensis* (FOURNET et al., 1993).

Na revisão de produtos naturais com atividade leishmanicida de Rocha e colaboradores (2005), 239 moléculas naturais foram isoladas e identificadas pertencendo às classes dos alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, lactonas, flavonoides, esteroides, entre outras. O grupo dos alcaloides se destaca por apresentar 68 moléculas. No meio marinho, as espécies de esponja do gênero *Plakortis* são conhecidas pela produção de peróxidos cíclicos e a espécie *Plakortis aff angulospiculatus* produz dois desses compostos que são ativos contra *L. mexicana*. O mais ativo apresentou LC₅₀ de 0,29 µg/mL e promoveu rompimento da parede celular após 24 h de exposição a uma concentração de 1,0 µg/mL e uma queda acentuada na motilidade dos parasitos após 30 min de exposição. O alcaloide indólico, encontrado nas esponjas *Spongia* sp. e *Ircinia* sp., apresenta atividade contra a forma amastigota *L. (L.) donovani*, possuindo um EC₅₀ de 9,6 µg/mL e baixa citotoxicidade para a célula hospedeira (EC₅₀ de 63,46 µg/mL). Extratos brutos de algas marinhas pertencentes aos filos Chlorophyta e Rhodophyta são descritas na literatura por possuírem forte atividade contra a forma promastigota de *L. major* em ensaios *in vitro*. Subfrações de extratos de Hex e DCM da espécie *Bostrychia tenella* (filo Rhodophyta), presente na costa brasileira, demonstraram atividade contra a forma promastigota de *L. amazonensis*, exibindo valores de EC₅₀ de 1,5; 2,7; 4,4 e 4,3 µg/mL respectivamente (DONIA; HAMANN, 2003; TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINCK, 2011; TORRES et al., 2014).

Atividade antimicrobiana

As resistências antimicrobiana e a antibióticos são preocupações constantes e globais que impactam diretamente na saúde de seres humanos e animais. Ambas aumentam a gravidade das infecções por bactérias, vírus, parasitas e fungos e geram desde tratamentos ineficazes até altos gastos governamentais na área de saúde e queda do produto interno bruto de um país desenvolvido. Apesar de não se conseguir estabelecer um valor exato do prejuízo,

o aumento da resistência de microrganismos às diversas terapias não é um assunto novo. Ao receber o seu Prêmio Nobel em 1945 pela descoberta da penicilina, Alexander Fleming alertou sobre o perigo que haveria no uso inadequado de antibióticos (HUTTNER et al., 2013; WHO, 2014; WHO, 2017).

Esse uso inadequado pode ser relacionado ao uso em excesso de antibióticos, por exemplo, no tratamento de infecções, da cadeia produtiva animal e na produção de alimentos. Simultaneamente, o uso excessivo de antibióticos é associado a efeitos colaterais como hipersensibilidade, imunossupressão e reações alérgicas, o que tende a uma busca por alternativas, como novas moléculas cujas fontes para se obtê-las são produtos naturais terrestres e marinhos (MOLINSKI et al., 2009; SARANRAJ; SIVASAKTHI, 2014).

A pesquisa de produtos naturais marinhos promoveu aumento consistente do número de novas moléculas com atividade contra patógenos resistentes a drogas já em circulação, onde o filo Porifera é a fonte predominante dessas moléculas, com porcentual de 57,72%, e o filo Cnidaria com 4,07%. Extensas revisões que associam moléculas marinhas à atividade antimicrobianas podem ser encontradas, como os trabalhos de Blunt e colaboradores (2014 a 2018) e Mayer e colaboradores (2011 a 2017). Restringindo a busca por compostos provenientes de corais em etapas avançadas no desenvolvimento de fármacos com essa atividade, encontram-se as substâncias knightol e pseudopterosina U. O knightol é um terpeno encontrado no coral alcionáceo *Eunicea knighti*, onde apresentou atividade contra bactérias marinhas Gram-positivas com valores de IC₅₀ entre 2 e 8 µg/mL. A pseudopterosina U também é um terpeno encontrado na gorgônia *Antillogorgia elisabethae* (Ordem Alcyonacea) e demonstrou capacidade inibitória para *S. aureus* com valores de IC₅₀ entre 2,9 e 4,5 µg/mL (TELLO et al., 2009; CORREA et al., 2011; MAYER et al., 2013; ABDELMOHSEN et al., 2017).

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Este trabalho objetiva analisar o potencial tóxico e farmacológico, quanto às atividades anti-inflamatória, tripanocida, leishmanicida e antimicrobiana de amostras dos corais invasores *T. coccinea* e *T. tagusensis* coletados na Baía de Ilha Grande (RJ) e elucidar a composição química dessas amostras.

1.2 Objetivos específicos

- a) Investigar a composição química das amostras provenientes das espécies *T. coccinea* e *T. tagusensis*;
- b) Verificar o potencial mutagênico, pela indução de mutações pontuais, das amostras de *T. coccinea* e *T. tagusensis*, em linhagens de *S. enterica*;
- c) Verificar o potencial citotóxico, pela interferência do metabolismo mitocondrial e pela integridade da membrana plasmática, das amostras de *T. coccinea* e *T. tagusensis* em linhagens celulares metabolicamente competentes e não competentes;
- d) Verificar o potencial genotóxico, pela indução de formação de células micronucleadas, das amostras de *T. coccinea* e *T. tagusensis* em linhagens celulares metabolicamente competentes e não competentes;
- e) Verificar o efeito anti-inflamatório de extratos e frações oriundos de *T. coccinea* e *T. tagusensis*;
- f) Verificar o potencial tóxico dos extratos oriundos de *T. coccinea* e *T. tagusensis* em protozoários parasitas responsáveis pela Doença de Chagas (*T. cruzi*);
- g) Verificar o potencial tóxico dos extratos oriundos de *T. coccinea* e *T. tagusensis* em protozoários parasitas responsáveis pela leishmaniose (*Leishmania (Viannia) braziliensis*);

h) Verificar o potencial antimicrobiano das amostras de *T. coccinea* e *T. tagusensis* em linhagens bacterianas e de inibição da formação de biofilme em *Staphylococcus aureus*.

2 METODOLOGIA

2.1 Coleta

As colônias de *T. coccinea* e *T. tagusensis* foram coletadas por mergulho autônomo a cerca de 8 m de profundidade, em setembro de 2014, na Ilha dos Macacos (Figura 10), Parque Estadual da Ilha Grande (S 23°04,578' - WO 44°14,129'), estado do Rio de Janeiro, costa sudeste do Brasil. A coleta do material foi realizada pela equipe do Projeto Coral Sol. As condições da água foram: transparência de 8 m; temperatura de 23°C e; salinidade de 35. O excesso de água das colônias foi retirado através da utilização de centrífuga de mão e, posteriormente, elas foram triadas, pesadas e imediatamente congeladas, até dar início ao processo de extração em laboratório. O peso úmido total de colônias coletadas de *T. coccinea* foi de 19,5 kg e de *T. tagusensis* foi de 19,4 kg. Parte destas amostras foram destinadas à Prof.^a Dra. Lidilhone Hamerski Carbonezi do Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais (IPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) em um total de 9,1 kg (*T. coccinea*) e 8,5 kg (*T. tagusensis*). Para este trabalho, foram utilizados 10,4 kg de *T. coccinea* e 10,9 kg de *T. tagusensis*.

Figura 10 – A: Mapa da região da Ilha Grande; B: Colônia de *T. tagusensis*; C: Colônia de *T. coccinea*; D: Área de coleta



Fonte: A: [https://pt.wikipedia.org/wiki/Ilha_Grande_\(Angra_dos_Reis\)](https://pt.wikipedia.org/wiki/Ilha_Grande_(Angra_dos_Reis)) acessado em 05/04/2016 às 08:56). B, C e D: O autor, 2016

2.2 Extração

A metodologia de extração seguiu Lages e colaboradores (2010a) com modificações. As colônias coletadas de *T. coccinea* e *T. tagusensis* foram secas pelo liofilizador K 105, marca Liotop. As colônias liofilizadas foram novamente triadas para a retirada de organismos incrustados. Em seguida, as amostras foram maceradas e extraídas, no ultrassom (Ultra Cleaner 1600, marca Unique), três vezes consecutivas com MeOH em um total de 3 h, na proporção de 75 g de amostra para 170 mL de MeOH. O material extraído foi filtrado em papel filtro Qualy e estocado em garrafas de âmbar, protegidas da luz. Esse material extraído e filtrado foi submetido à secagem em rotavapor sob pressão reduzida para retirada do

solvente orgânico MeOH. No final deste processo, obteve-se separadamente os extratos brutos metanólicos (EbM) de *T. coccinea* e *T. tagusensis*.

Com finalidade de obtenção de resultados comparativos de alguns ensaios, amostras provenientes de *T. coccinea* e *T. tagusensis* foram cedidas pela Prof.^a Dra. Lidilhone Hamerski (IPPN/UFRJ) e pelo Dr. Simon John Garden do Instituto de Química (IQ) da UFRJ. As colônias enviadas à UFRJ foram extraídas úmidas em etanol, gerando extratos brutos etanólicos (EbE) de ambas as espécies. No IQ, o Dr. Simon sintetizou um alcaloide derivado de aplisinopsina, o 3'-deimino-2',4'-bis(demetil)-3'-oxoaplisinopsina (APL01). As amostras de EbE foram usadas apenas nos ensaios de mutação reversa bacteriana, de citotoxicidade em células eucarióticas e formação de micronúcleo.

Devido aos resultados de EbM de *T. coccinea* obtidos no ensaio de indução de edema em pata de camundongo, que serão descritos posteriormente neste trabalho, frações foram preparadas a partir de 10 g dessa amostra em 500 mL de etanol e água (proporção 1:1 v/v). Após solubilização, a partição foi realizada sequencialmente com solventes de baixa polaridade à alta polaridade. Os materiais gerados após o fracionamento foram estocados em garrafas de âmbar e, no final deste processo, o material residual também foi estocado. Estas amostras foram submetidas à secagem em rotavapor sob pressão reduzida para retirada dos solventes orgânicos. Os solventes utilizados foram Hex, DCM, acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH), gerando as respectivas frações: f-Hex, f-DCM, f-AcOEt e f-BuOH. O material residual foi denominado f-Residual.

2.3 Estudos da composição química

2.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises de CCD foram realizadas em colaboração com a Prof.^a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho e auxílio da Prof.^a Dra. Daniele Corrêa Fernandes do Laboratório de Bioquímica Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Soluções de 1 mg/mL foram preparadas a partir das amostras de EbM de *T. coccinea* (EbMTc) e de EbM de *T. tagusensis* (EbMTt) usando MeOH como solvente. Os padrões utilizados foram colesterol, ácido pirogálico, ácido clorogênico e quercetina. Placas de sílica gel 60 (Alugram Sil G, Macherey-Nagel) de 10 por 10 cm foram preparadas utilizando os seguintes sistemas (fase móvel):

Sistema 1 – DCM;

Sistema 2 – DCM e AcOEt (proporção 1:1 v/v);

Sistema 3 – DCM e AcOEt (proporção 1:2 v/v);

Sistema 4 – DCM e AcOEt (proporção 2:1 v/v);

Sistema 5 – MeOH, DCM e AcOEt (proporção 1:2:0,5 v/v);

Sistema 6 – MeOH, DCM, AcOEt e ácido acético (1:2:1:0,5 v/v).

As soluções foram aplicadas com auxílio de amostradores. A aplicação ocorreu a uma distância de 1 cm da margem inferior da placa cromatográfica, em um total de duas aplicações, e as placas foram secas em temperatura ambiente. A cromatografia foi desenvolvida em cuba de vidro com tampa, em temperatura ambiente, e encerrada quando a fase móvel atingiu a distância de 1 cm da margem superior da placa.

Nos sistemas de 1 a 4, três reveladores foram utilizados ao final do desenvolvimento da cromatografia. As placas foram secas e o sulfato cérico (1% em ácido sulfúrico à 1,5%) foi utilizado para uma revelação não específica. Em seguida, as placas foram aquecidas por 5 min a 105°C. A vanilina foi usada para verificação de terpenos e seus derivados nas amostras. As placas foram secas e borrifadas com ácido sulfúrico 10% em etanol. Após secagem em temperatura ambiente, a vanilina (0,2% em etanol) foi aplicada e as placas foram aquecidas por 10 min a 105°C. A presença de flavonoides nas amostras foi verificada pelo revelador ácido difenilbórico aminoetiléster 0,5% em AcOEt (NP) e, após secagem das placas a frio, seguido de solução de polietileno glicol 4000 (PEG) 5,0% em DCM. As placas foram aquecidas por 5 min a 105°C em estufa. A fluorescência foi observada em câmara de ultravioleta (UV) a 365 nm. Nos sistemas 5 e 6, os reveladores sulfato cérico, vanilina e iodo foram utilizados. O iodo age como um revelador universal. Todas as placas foram fotografadas e a mobilidade relativa (Rf) das bandas calculadas (COLL et al., 1983; WAGNER; BLADT, 1995; TONA et al., 1998; VIEIRA JR. et al., 2007).

2.3.2 Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM)

As amostras f-Hex, f-DCM, f-AcOEt, f-BuOH e f-Residual filtradas foram analisadas utilizando um cromatógrafo de gás (modelo Agilent 6890N) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução (modelo 5973N) (CG/EM) com um injetor automatizado (modelo 7683), e uma coluna DB-5MS (30 m de comprimento, 0,250 mm de diâmetro interno e 0,250 µm de espessura de filme). O Hélio foi usado como gás de arraste, com uma taxa de fluxo de 1,5 mL/min, e as amostras foram injetadas em split (com divisão de fluxo), na razão 1:20. O método empregou temperatura inicial de 60°C/min, taxa de aquecimento de 10°C/min até 220°C, que em outra rampa aqueceu até 290°C, com taxa de aquecimento de 5°C/min com isoterma final de 30 min. Foram realizadas três repetições de injeção de cada amostra. Os espectros de massas obtidos foram comparados com os contidos na biblioteca Wiley 275, visando sua identificação (BANNON et al., 1982).

Os cromatogramas foram analisados utilizando o software da Agilent, MSD ChemStation versão E.02.02.1431. Todos os picos que representaram até 10% da área do pico majoritário de cada amostra foram selecionados para serem identificados pelas bibliotecas e amostradas suas abundâncias.

2.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas

A avaliação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massas foi realizada nas amostras de EbM de *T. coccinea* e *T. tagusensis* e de f-AcOEt. Ambas as metodologias foram realizadas no Centro de Espectrometria de Massas de Biomoléculas (CEMBIO) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho na UFRJ.

As amostras foram solubilizadas na proporção de 95:5 (v/v) das fases móveis A (água com ácido fórmico 0,1% (v/v)) e B (MeOH com ácido fórmico 0,1% (v/v)), na concentração de 0,5 mg/mL, filtradas e injetadas no sistema. O aparelho utilizado foi o Sistema de Cromatografia Líquida Prominence, da Shimadzu, com módulo de detector com arranjo de diodo/UV, faixa de varredura de 190 a 800 nm, e injetor manual Rheodyne com *loop* de 20 µL. A coluna usada foi a modelo Hypersyl C18, da Thermo, dimensões 150 x 2,1 mm e 3 µm de diâmetro de partícula e pré-coluna 10 x 2,1 mm, da Thermo. O fluxo de fase móvel ocorreu

a 0,2 mL/min, temperatura de forno à 40°C e o gradiente de corrida estabelecido encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Gradiente de corrida em relação à fase móvel B

Tempo (minuto)	Porcentagem da fase móvel B (%)
0	5
1	5
30	95
43	95
45	5
60	5

O espectrômetro de massas utilizado foi o de modelo Maxis Impact, da Bruker, configuração ESI-Q-TOF, com faixa de varredura de 20 a 1200 m/z, calibração interna com formiato de sódio 100 µM em água e isopropanol (proporção 1:1 v/v). Modo de aquisição dependente de dado (*Data Dependent Acquisition* – DDA/AutoMS), com isolamento/fragmentação de 1 precursor por ciclo, fonte de ionização por *eletrospray* na polaridade positiva, pressão do nebulizador à 1,5 bar, fluxo gasoso de 8 L/min e temperatura de 210°C. A técnica de espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* apresenta alta sensibilidade e é capaz de detectar inclusive macromoléculas biológicas.

A análise dos resultados foi realizada pelos *softwares* Compass Data Analysis Ink (Bruker Daltonics) e Compass Isotope Pattern (Bruker Daltonics) e baseada em quatro parâmetros de comparação:

- 1 – Sobreposição e intensidade do sinal;
- 2 – Padrão isotópico;
- 3 – Absorção no UV e;
- 4 – Precisão da massa experimental em 5 ppm (DASS, 2007), pelo cálculo:

$$ppm = \frac{(massa\ teórica - massa\ experimental)}{massa\ teórica} \times 10^6$$

(1).

2.4 Estudos toxicológicos

2.4.1 Ensaio de mutação reversa bacteriana (*Salmonella*/microsoma)

2.4.1.1 Linhagens bacterianas

As linhagens de *S. enterica* TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104 utilizadas nos testes de reversão e citotoxicidade, apresentam mutações direcionadas em diferentes loci responsáveis pela biossíntese do aminoácido histidina (*his*). Assim, a linhagem TA97 apresenta uma mutação construída (*hisD6610* e *hisO1242*, com a adição de citosinas) que quando alterada, por deleção de pares de bases G:C, gera um aumento de colônias revertentes, caracterizando uma mutação induzida do tipo *frameshift* (alteração no quadro de leitura do RNA mensageiro). A linhagem TA98 tem uma mutação construída (*hisD3052*), que quando alterada, por adição de pares de bases G:C, indicando uma mutação do tipo *frameshift*, restaura o quadro de leitura para a síntese de histidina. A linhagem TA100 possui uma mutação (*hisG46*) que substitui o aminoácido prolina pela leucina (substituição do par de bases G:C para A:T) no genótipo selvagem. A linhagem TA102 possui uma mutação no locus *hisG428*. Ao contrário das outras linhagens, esta possui o par A:T no local crítico da reversão, identificando mutações por substituição de pares de bases A:T por G:C. A linhagem TA104 possui a mesma mutação que a TA102, porém a mutação da TA104 está localizada no cromossomo e da TA102 no DNA plasmidial (LEVIN et al., 1982; MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Existem outras mutações presentes nessas linhagens que conferem aumento da sensibilidade às substâncias teste. A mutação *uvrB* é uma deleção do gene que codificaria uma proteína envolvida no sistema de reparo por excisão de nucleotídeos. Sua ausência resulta em um aumento da sensibilidade na detecção de diversos mutágenos que ao lesarem o DNA, requeiram esta via de reparo. A linhagem TA102 não apresenta tal mutação, pois seu objetivo é detectar mutágenos que exigem este sistema de reparo. A mutação *rfa* confere perda parcial da barreira de polissacarídeo da membrana celular, aumentando a permeabilidade a grandes moléculas. As linhagens também apresentam o plasmídeo pKM101 (R+) que aumenta a mutagênese química e a induzida por UV através de um aumento na via

do sistema de reparo sujeito a erro. Este plasmídeo também promove resistência ao antibiótico ampicilina. A linhagem TA102 ainda contém o plasmídeo pAQ1 cuja finalidade é de amplificar o número de sítios para mutagênese, o que aumenta a detecção a mutágenos em contraste a fraca ou nula detecção quando ausente. O plasmídeo pAQ1 também confere resistência ao antibiótico tetraciclina. Ambos os antibióticos atuam como marcadores que irão assegurar a presença dos plasmídeos (MARON; AMES, 1983). O Quadro 1 mostra as características de cada linhagem.

Quadro 1 – Características genótípicas e fenotípicas das cepas padrão derivadas de *S. enterica* LT2 sugeridas para os testes qualitativos e quantitativos de mutagenicidade e citotoxicidade

Linhagem	Mutação em <i>his</i>	Plasmídeos	Outras mutações	Tipo de mutação detectável	
TA97	<i>hisD6610</i> <i>hisO1242</i>	pKM101	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB chl</i> <i>bio</i>)	<i>Frameshift</i>	Adição de um par G:C
TA98	<i>hisD3052</i>	pKM101	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB chl</i> <i>bio</i>)	<i>Frameshift</i>	Deleção de um par G:C
TA100	<i>hisG46</i>	pKM101	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB chl</i> <i>bio</i>)	Substituição	G:C para A:T
TA102	pAQ1 (<i>hisG428</i>)	pKM101, pAQ1	<i>Rfa</i>	Substituição	A:T para G:C
TA104	<i>hisG428</i>	-	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB chl</i> <i>bio</i>)	Substituição	A:T para G:C

Fonte: MORTELMANS; ZEIGER, 2000.

2.4.1.2 Ensaio quantitativo de mutação reversa bacteriana e sobrevivência

Realizado de acordo com Maron e Ames (1983) com algumas adaptações. As cepas bacterianas cresceram por cerca de 16 h em meio lisogênico (meio LB) (10 g/L tripton; 5,0 g/L extrato de levedura; 10 g/L NaCl), à 37°C à 150 rpm, até as culturas alcançarem a fase estacionária ($1-2 \times 10^9$ células/mL). O tubo de ensaio continha uma mistura de 100 μ L de uma das concentrações (0,25; 0,3125; 0,375; 0,4375; 0,5 mg/100 μ L/placa) de uma das cinco

amostras (EbMTc, EbMTt, EbETc, EbETt e APL01) ou controles positivos ou negativo, 500 μL de solução tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,4 (27,6 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 28,4 g/L Na_2HPO_4 ; para o ensaio sem metabolização exógena) e 100 μL da suspensão bacteriana. As concentrações das amostras foram estabelecidas a partir de ensaios preliminares. Essa mistura foi incubada por 20 min à 37°C à 90 rpm. Após esse período, uma alíquota de 10 μL dessa mistura foi retirada para o ensaio de sobrevivência realizado em paralelo. Em seguida, 2 mL de top ágar contendo solução de histidina e biotina (7 g/L ágar; 5 g/L NaCl; 0,0105 g/L L-histidina; 0,0122 g/L biotina, pH 7,4) à 45°C foram adicionados ao tubo de ensaio e a mistura final foi vertida sobre uma placa de Petri contendo meio mínimo (15 g/L ágar, meio Vogel-Bonner 10X [10 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 100 g/L $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 500 g/L K_2HPO_4 ; 175 g/L $\text{Na}(\text{NH}_4)\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$], contendo 20 g/L glicose). Estas placas foram incubadas à 37°C por 72 h e as colônias revertentes *His+* foram contadas.

A alíquota de 10 μL da mistura sem adição de ágar foi adicionada a um microtubo contendo solução de salina (NaCl 9 g/L), completando-se o volume a 1 mL. Foram realizadas sucessivas diluições em solução de salina e em seguida 100 μL da última diluição foi vertido em placa de Petri contendo meio LB gelosado (em ágar 15 g/L). A diluição total da alíquota foi de 10^7 vezes. As placas foram incubadas à 37°C por 24 h. Esta metodologia foi aplicada nos ensaios preliminares. Nos ensaios posteriores, a análise de *background* com microscópio óptico (40x) foi executada para avaliação da toxicidade, cujos parâmetros usados foram presença de colônias reduzidas e afinamento ou ausência da camada de *background* (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Os controles positivos para os ensaios, na ausência de metabolização exógena foram: 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) (CAS: 56-57-5) a 1,0 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}/\text{placa}$ para a linhagem TA97; 4-NQO a 0,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}/\text{placa}$ para a linhagem TA98; azida sódica (AS) (CAS: 26628-22-8) a 0,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}/\text{placa}$ para a linhagem TA100; mitomicina C (MitC) (CAS: 50-07-7) a 0,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}/\text{placa}$ para a linhagem TA102; metil metano sulfonato (MMS) (CAS: 66-27-3) a 250 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}/\text{placa}$ para a linhagem TA104. Todos os reagentes químicos foram provenientes da empresa Sigma (St. Louis, EUA). O controle negativo usado foi o dimetilsulfóxido (DMSO) (CAS: 67-68-5) (AIUB et al., 2004; STANKEVICINS et al., 2008).

A concentração da amostra foi considerada positiva para a mutagenicidade, de acordo com os seguintes parâmetros:

- 1 – O número de colônias revertentes em ao menos uma concentração no ensaio foi pelo menos duas vezes o número de revertentes espontâneos (índice de mutagenicidade (I.M.) ≥ 2);
- 2 – Uma resposta significativa for encontrada e;

3 – A reprodutibilidade de uma curva concentração-dependente.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

2.4.2 Ensaio de viabilidade celular através de testes colorimétricos em cultura de células permanentes

2.4.2.1 Cultura de linhagens celulares permanentes

As linhagens celulares permanentes utilizadas nos ensaios de viabilidade celular foram HepG2 (célula de hepatocarcinoma humano) RAW 264,7 (macrófago murino transformado por vírus) e Caco-2 (ATCC HTB37 célula de adenocarcinoma de cólon humano). As linhagens HepG2 e RAW 264,7 foram utilizadas nos testes colorimétricos WST-1 (*Water Soluble Tetrazolium salt*) e liberação de lactato desidrogenase (LDH). As linhagens HepG2 e Caco-2 foram utilizadas no teste colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT).

A linhagem HepG2 desenvolveu-se em frascos de cultura de células na presença de meio de cultura Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (9,5 g/L MEM; 1,76 g/L de NaHCO₃; 0,88 g/L de piruvato de sódio; 21,6 mg/L de ácido aspártico; 16,8 mg/L de L-serina; estreptomicina 100 mg/L; penicilina 70 mg/L, pH 7,4; Sigma-Aldrich) suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Cultilab) à 10% em estufa com CO₂ à 5%, à 37°C, até atingir confluência necessária (80 a 95% da área do frasco de cultura). Em seguida, as células aderidas na superfície interior do frasco foram removidas por ação de tripsina (Solução de tripsina-EDTA; Sigma-Aldrich) em estufa de CO₂ à 5%, à 37°C por 5 min. A ação da tripsina foi inativada pela adição de meio MEM suplementado com SFB à 10% e a suspensão celular foi centrifugada a 1500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi suspenso em meio de cultura MEM suplementado com SFB à 10%. Após a quantificação utilizando câmara de Neubauer, a suspensão celular foi ajustada a uma concentração determinada para os experimentos.

A linhagem RAW 264,7 cresceu em frascos de cultura de células na presença de meio de cultura Eagle modificado Dulbecco (DMEM) (17,3 g/L DMEM; 3,7 g/L NaHCO₃;

estreptomicina 100 mg/mL; penicilina 70 mg/mL, pH 7,4; Life Technologies) suplementado com SFB à 10% em estufa com CO₂ à 5%, à 37°C, até atingir confluência necessária (80 a 95% da área do frasco de cultura). Em seguida, as células aderidas na superfície interior do frasco foram removidas por ação de espátula estéril. A suspensão celular foi centrifugada a 3000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi suspenso em meio de cultura DMEM suplementado com SFB à 10%. Após a quantificação utilizando câmara de Neubauer, a suspensão celular foi ajustada a uma concentração determinada para os experimentos.

A linhagem celular Caco-2 foi cultivada em frasco contendo meio de cultura DMEM acrescido de 10% de SFB, L-glutamina 2,5 mM, 50 µg/mL de gentamicina e 2,5 µg/mL de fungizona. As células foram mantidas em estufa à 37°C com atmosfera 5% de CO₂, ocorrendo a troca de meio a cada 2 ou 3 dias e o subcultivo a cada 7 ou 8 dias. Para o subcultivo das linhagens, os tapetes foram recobertos com solução de tripsina-EDTA (tripsina 0,2% e EDTA 0,02% em PBS 0,01 M com pH 7,2). Após a remoção da solução, as células foram desprendidas suavemente utilizando-se pipeta com meio de cultura completo. A suspensão contendo as células foi então, dividida em dois novos frascos, que foram incubados à 37°C em atmosfera 5% CO₂ até a confluência dos tapetes celulares (BIRD; FORRESTER, 1981).

2.4.2.2 Ensaio da proliferação celular pelo teste colorimétrico WST-1

O ensaio colorimétrico com reagente WST-1 consiste na redução do sal tetrazólio (4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzeno dissulfonato) em cristal formazan, ambos solúveis em água. Essa redução ocorre através do metabolismo mitocondrial, pela ação de enzimas desidrogenases. O aumento dessa atividade leva a uma maior formação de cristais formazan, o que permite avaliar a presença de células metabolicamente ativas na cultura (NGAMWONGSATIT et al., 2008). As amostras usadas nesse ensaio foram EbMTc, EbMTt, EbETc, EbETt, APL01 (concentrações de 0,5; 5,0; 50; 500; 5000 µg/mL) e f-AcOEt (concentrações de 0,25; 2,5; 5,0; 50; 100 µg/mL)

A partir da determinação no número de células das linhagens celulares, um volume de 100 µL de cada linhagem foi adicionado em poços de placas de cultura de 96 poços. Para a linhagem HepG2, a concentração final estabelecida foi de $1,0 \times 10^4$ células/mL em meio MEM suplementado com SFB à 10% e, para a linhagem RAW 264,7, a concentração final de

$5,0 \times 10^4$ células/mL em meio DMEM suplementado com SFB à 10%. Após o plaqueamento, as placas de cultura foram colocadas em estufa com CO₂ à 5%, à 37°C, por 24 h.

Em seguida, o meio de cultura foi retirado e as células foram tratadas com as diferentes concentrações das amostras, diluídas em meio de cultura suplementado, em volume final de 100 µL. Os meios de cultura foram utilizados como controle negativo. O reagente Triton X-100 (Sigma-Aldrich) (CAS: 9002-93-1) diluído à 2% foi usado como controle positivo para ambas as linhagens. Os tempos de tratamento estabelecidos foram de 24, 48 e 72 h. Após esse período de exposição, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS 0,2 M pH 7,4 (0,2 g/L KCl; 0,24 g/L KH₂PO₄; 8,0 g/L NaCl; 1,44 g/L Na₂HPO₄).

Após a lavagem, 100 µL de meio de cultura suplementado e um volume de 10 µL do reagente WST-1 (Cell Proliferation Kit WST-1; Cat. No. 05015944001; Roche) foram adicionados em cada poço. As placas foram protegidas da luz para o desenvolvimento da reação e colocadas em estufa com CO₂ à 5%, à 37°C, por 3 h. Depois as absorvâncias de cada poço foram obtidas por leitor de microplacas ELISA (marca CELER, modelo Polaris), com comprimento de onda de 450 nm e comprimento de referência de 630 nm.

A atividade enzimática mitocondrial foi estabelecida em porcentagem em relação às absorvâncias dos controles negativos. Os resultados foram avaliados de acordo com os seguintes parâmetros:

- 1 – Diferença estatística significativa entre os tratamentos e o controle negativo encontrada e;
- 2 – Observação de uma curva concentração-dependente.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e de acordo com as instruções do fabricante.

2.4.2.3 Ensaio da viabilidade celular pelo teste colorimétrico de liberação de LDH

Este ensaio baseia-se na relação entre células em lise ou com dano na membrana citoplasmática e a liberação e atividade da enzima LDH no sobrenadante. Com o rompimento da membrana, essa enzima é liberada para o meio extracelular e age na reação oxidativa de lactato para piruvato, levando a redução da molécula de dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NAD⁺ para NADH + H⁺). Em uma segunda etapa, o reagente catalisador diaforase transfere o H/H⁺ de NADH + H⁺ para o sal de tetrazólio (2-[4-iodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazólio cloreto), que por sua vez é reduzido em sal formazan (KLÓSEK et al., 2016).

As amostras usadas nesse ensaio foram EbMTc, EbMTt, EbETc, EbETt, APL01 (concentrações de 0,5; 5,0; 50; 500; 5000 µg/mL) e f-AcOEt (concentrações de 0,25; 2,5; 5,0; 50; 100 µg/mL)

A partir da determinação no número de células das linhagens celulares, um volume de 100 µL de cada linhagem foi adicionado em poços de placas de cultura de 96 poços. Para a linhagem HepG2, a concentração final estabelecida foi de $1,0 \times 10^4$ células/mL em meio MEM suplementado com SFB à 10% e, para a linhagem RAW 264,7, a concentração final de $5,0 \times 10^4$ células/mL em meio DMEM suplementado com SFB à 10%. Após o plaqueamento, as placas de cultura foram colocadas em estufa com CO₂ à 5%, à 37°C, por 24 h.

Por conseguinte, o meio de cultura foi retirado e as células foram tratadas com as diferentes concentrações das amostras, diluídas em meio de cultura suplementado, em volume final de 100 µL. Os meios de cultura foram utilizados como controle negativo. O reagente Triton X-100 diluído a 2% foi usado como controle positivo para ambas as linhagens. Os tempos de tratamento estabelecidos foram de 24, 48 e 72 h. Após esse período de exposição, o sobrenadante (100 µL) foi retirado e colocado em uma nova placa de cultura de 96 poços. Em seguida, 100 µL do reagente LDH (Cytotoxicity Detection Kit (LDH); Cat. No. 11644793001; Roche) foi adicionado ao sobrenadante e a reação ocorreu protegida da luz por 30 min. Ao final desse tempo, as absorvâncias foram obtidas por leitor de microplacas ELISA em comprimento de onda de 492 nm com comprimento de referência de 630 nm. Uma análise da interação das diferentes concentrações das amostras com o reagente LDH foi realizada, devido à coloração presente nas amostras preparadas (*background*).

A liberação de LDH no sobrenadante foi quantificada em relação às absorvâncias do controle positivo usado (Triton X-100), sendo descontado o *background* relativo à cada concentração de amostra. Os resultados foram avaliados de acordo com os seguintes parâmetros:

- 1 – Diferença estatística significativa entre os tratamentos e o controle positivo encontrada e;
- 2 – Observação de uma curva concentração-dependente.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e de acordo com as instruções do fabricante.

2.4.2.4 Ensaio da viabilidade celular pelo teste colorimétrico com MTT

As amostras de EbMTc e EbMTt foram avaliadas quanto a citotoxicidade nas linhagens de HepG2 e Caco-2, nas concentrações de 50, 100, 500, 1000 e 1500 µg/mL. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, apresentando tapetes celulares confluentes e aderidos, em volume de meio de cultura de 100 µL por poço. As amostras foram solubilizadas no próprio meio de cultura das linhagens celulares e adicionadas sobre as culturas, mantendo-se em seguida o cultivo por 24 h em estufa à 37°C e 5% de CO₂. No período correspondente a 3 h antes do término do cultivo (21 h) foi adicionado 5 mg/mL de MTT. Após este período, a placa foi centrifugada a 3000 rpm/5 min para deposição dos cristais de MTT formados. O sobrenadante foi descartado e os cristais diluídos pela adição de 100 µL de DMSO (100%) em cada poço. A leitura foi realizada em leitor de microplacas a 492 nm. As linhagens celulares na ausência de tratamento foram utilizadas como controle negativo e, como controle positivo, as células foram cultivadas na presença de MeOH 100%.

2.4.3 Ensaio de formação de micronúcleo em linhagens celulares

Em placa de 24 poços, foi colocado em cada poço, uma lamínula circular esterilizada. As linhagens celulares HepG2 e RAW 264,7 foram adicionadas em volume de 1 mL em cada poço na concentração de 2×10^4 células/mL, em meio de cultura suplementado com SFB à 10%. Para a linhagem HepG2, utilizou-se o meio de cultura MEM e para a linhagem RAW 264,7 usou-se o meio de cultura DMEM. As placas foram colocadas em estufa com CO₂ à 5%, à 37°C, por 24 h.

Após esse período, o meio sobrenadante de cada poço foi retirado e as diferentes concentrações (0,05; 0,5; 5,0; 50 e 500 µg/mL) das amostras (EbMTc, EbMTt, EbETc, EbETt e APL01), diluídas nos respectivos meios de cultura de cada linhagem, foram adicionadas em volume final de 1 mL por poço. Os meios de cultura foram utilizados como controle negativo. Os reagentes 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina (MNNG) (CAS: 70-25-7), na concentração de 0,5 µM, e benzo-alfa-pireno (BaP) (CAS: 50-32-8), na concentração de 100 µg/mL, foram utilizados como controle positivo para as linhagens RAW 264,7 e HepG2, respectivamente.

Em seguida, as placas foram colocadas em estufa com CO₂ à 5%, à 37°C em períodos determinados de 24 h para o tratamento das células.

No final dos tratamentos, o meio foi retirado e os poços foram lavados com PBS. Em cada poço foi adicionado um volume de 1 mL de meio de cultura suplementado com SFB à 10% contendo citocalasina B (Sigma-Aldrich) (CAS: 14930-96-2) na concentração de 3 µg/mL. As placas foram colocadas em estufa com CO₂ à 5%, à 37°C, por 24 h.

Por conseguinte, o meio contendo citocalasina B foi retirado e os poços foram lavados com PBS. A solução fixadora de MeOH e ácido acético glacial (proporção 3:1 v/v) em banho de gelo foi colocada nos poços em volume de 1 mL por 15 min. Esta solução foi retirada em seguida e os poços foram lavados com PBS. As células foram coradas com solução de Giemsa 0,6% (Laborclin). Esta solução foi preparada a partir da solução estoque filtrada na proporção de 1:20 v/v com água destilada. As células ficaram expostas por 1 h e depois lavadas com PBS. Por fim, as lamínulas foram retiradas dos poços e passaram por processo de desidratação com acetona e xilol e, posteriormente, fixadas em lâminas com Entellan (Cód. 1.07961.0100; Merck).

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico, na lente objetiva de 40x, sendo contadas 2000 células binucleadas por concentração. A ação genotóxica foi constatada para determinada concentração das amostras utilizadas a partir dos seguintes parâmetros:

- 1 – O número de células micronucleadas em determinada concentração for maior em relação ao controle negativo;
- 2 – Diferença estatística significativa entre os números de células for encontrada e;
- 3 – A reprodutibilidade de uma curva concentração-dependente for observada.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata (OECD, 2014, 2016b).

2.5 Estudos da atividade anti-inflamatória

Os ensaios para avaliar a atividade anti-inflamatória foram realizados em colaboração com a Prof.^a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho e auxílio da Prof.^a Dra. Daniele Corrêa Fernandes do Laboratório de Bioquímica Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

2.5.1 Ensaio de indução de edema em pata de camundongo

2.5.1.1 Animais

Os animais utilizados neste estudo foram camundongos machos de 3 a 4 meses, pesando 25 a 35 g da linhagem *Swiss Webster* (SW) criados no Biotério do Departamento de Bioquímica da UERJ. Eles foram mantidos em caixas plásticas apropriadas, em temperatura controlada (24°C), com ciclo de luminosidade de 12 h e alimentados com água e ração *ad libitum* ou doados pelo Instituto Vital Brazil. A higiene e desinfecção das caixas foram realizadas em dias alternados, com hipoclorito de sódio, sendo utilizada maravalha estéril. Os experimentos foram realizados seguindo os padrões éticos para o uso de animais de experimentação e aprovados pelo Comitê de Ética do IBRAG – UERJ (CEUA-IBRAG) segundo protocolo 05/2009 e 007/2013.

2.5.1.2 Modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos

As amostras utilizadas nesse experimento foram EbMTc, EbMTt e APL01. Para avaliação da atividade anti-inflamatória, aplicou-se o protocolo adaptado de Winter e colaboradores (1962).

Os animais foram separados em diferentes grupos (n=5), pré-tratados com injeção intraperitoneal (i.p.) das amostras EbMTc, EbMTt e APL01 e tiveram água e alimento retirados. Em seguida, os volumes das patas foram medidos em pletismômetro Ugo Basile (t₀). Os animais do controle negativo foram tratados com o veículo (etanol 15%; 1,25% Tween 20 em água destilada), para o controle positivo utilizou-se o tratamento com a droga padrão (Indometacina 10 mg/kg), enquanto que os demais grupos receberam o tratamento em doses determinadas (0,2; 20; 200 mg/kg) por peso corporal.

Após uma hora do pré-tratamento, os grupos receberam injeção com 50 µL (sub-plantar) de carragenina (6 mg/mL) na pata traseira direita. Os volumes das patas foram aferidos em t₁ (1 h), t₂ (2 h), t₃ (3 h) e t₄ (4 h) após a injeção de carragenina.

A seguinte fórmula foi utilizada para o cálculo do índice de edema:

$$\text{Índice de edema (\%)} = \left(\frac{\text{valor do edema } t_x \times 100}{\text{valor do edema } t_0} \right) - 100 \quad (2),$$

e para o cálculo da inibição do edema foi utilizada a fórmula a seguir:

$$\text{Inibição do edema (\%)} = 100 - \left[\frac{(\text{valor do edema } t_x \times 100)}{\text{média dos edemas do controle}} \right] \quad (3),$$

onde:

t_x = volume da pata nos diferentes tempos avaliados;

t_0 = volume de pata antes da indução da inflamação pela carragenina.

Os experimentos foram realizados em duplicata e ao término os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂.

A literatura descreve que o pico do edema no grupo controle negativo é observado após 3 h da injeção de carragenina e a partir do segundo aferimento da pata inflamada. Pelo fato do tratamento ser prévio, espera-se que não haja aumento significativo das patas e sim que se mantenham valores semelhantes do que foi aferido no t_0 (WINTER; RISLAY; NUSS, 1962; SEIBERT et al., 1994; ZHANG et al., 1997).

2.5.2 Liberação de óxido nítrico (NO) por linhagem de macrófago RAW 264,7

A linhagem de macrófagos RAW 264,7 foi adicionada em placas de 96 poços no volume de 50 µL na concentração de $5,0 \times 10^4$ células/poço, em meio DMEM suplementado com SFB à 10%, e colocada em estufa com CO₂ à 5%, à 37°C por 24 h, para adesão celular. Em seguida, as células foram incubadas na presença e ausência de lipopolissacarídeo (LPS), na concentração final de 1,0 µg/mL e volume de 25 µL, e tratadas por 24 h. As amostras de EbMTc, EbMTt, APL01, f-Hex, f-DCM, f-AcOEt, f-BuOH e f-Residual foram usadas no tratamento, nas concentrações de 0,25; 2,5; 5,0; 50; 100 µg/mL e volume de 25 µL. O meio DMEM foi usado para diluir as amostras. Após esse período, 50 µL do sobrenadante de cada poço foram transferidos para outra placa e as células tiveram o seu volume completado a 100 µL para o teste de sobrevivência com MTT. Na placa com o sobrenadante, foram adicionados

25 μL de ácido sulfanílico na concentração de 10 mg/mL e a placa foi incubada por 10 min, protegida da luz e em temperatura ambiente. Depois, foram adicionados 25 μL de N-naftil etilenodiamino na concentração de 1 mg/mL e a placa foi novamente incubada por 10 min, protegida da luz e em temperatura ambiente. Por fim, a absorvância foi obtida no comprimento de onda de 550 nm em leitor de microplacas. A concentração de NO em μM foi estabelecida tendo o nitrito de sódio (NaNO_2) como referência. Diferentes concentrações desse composto, de 0,78 a 100 μM , foram utilizadas para determinação da curva padrão. Os resultados foram calculados a partir do coeficiente de extinção obtido da curva padrão e das leituras de absorvância (SAWLE et al., 2005; FENG et al., 2011).

No teste de sobrevivência, 10 μL de MTT foram adicionados aos poços contendo as células RAW 264,7, a concentração de 5 mg/mL e as placas foram incubadas por 2 h, protegidas da luz. O volume de 100 μL de dodecil sulfato de sódio 10% contendo HCl 0,01N foram adicionados posteriormente para solubilização dos cristais de formazan gerados pela redução do MTT. Depois dessa solubilização, a absorvância foi obtida no comprimento de onda de 570 nm em leitor de microplaca. Os resultados foram expressos em porcentagem da atividade redutora mitocondrial, o que representa a viabilidade celular, sendo calculada em relação ao controle negativo do experimento (MOSMANN, 1983).

A análise dos resultados foi feita de acordo com os seguintes parâmetros:

- 1 – Diferença estatística significativa entre os tratamentos e o controle negativo e;
- 2 – Observação de uma curva concentração-dependente.

2.6 Estudos da atividade tripanocida

Os ensaios para verificar a atividade tripanocida das amostras de EbMTc e EbMTt foram realizados no Laboratório de Biologia Celular no Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz, sob a supervisão da Prof.^a Dra. Maria de Nazaré Correia Soeiro e Ma. Aline Nefertite.

2.6.1 Extratos

As amostras de EbM foram solubilizadas a uma concentração estoque de 10 mg/mL. O benzonidazol (BZ) (2-nitroimidazol; Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, Brasil) foi usado como droga de referência. As soluções estoque foram preparadas em DMSO com a concentração final desse solvente não excedendo 0,6%, para que não houvesse atividade tóxica no parasita ou nas células hospedeiras *in vitro*.

2.6.2 Parasitas

As formas tripomastigotas sanguíneas da linhagem Y foram obtidas a partir de amostras de sangue de camundongos suíços albinos infectados, no pico da parasitemia (DA SILVA et al., 2012). Os parasitas purificados foram ressuspensos em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, como descrito por Batista e colaboradores (2010). As formas tripomastigotas da linhagem Tulahuen, que expressam o gene de β -galactosidase de *Escherichia coli*, foram coletadas a partir do sobrenadante de cultura de fibroblastos infectados (linhagem L929) (ROMANHA et al., 2010; TIMM et al., 2014b).

2.6.3 Cultura de células primárias

Para os ensaios de atividade tóxica em células de mamíferos, culturas primárias de células cardíacas foram obtidas a partir de embriões de camundongos e plaqueadas em placas de 96 poços previamente revestidas com 0,01% de colagenase (MEIRELLES et al., 1986). As linhagens celulares L929 foram obtidas com descrito por Romanha e colaboradores (2010).

2.6.4 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Células cardíacas foram incubadas por 24 h à 37°C, com diferentes concentrações de cada amostra de EbM (0 a 200 µg/mL) diluídas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (pH 7,2-7,4) sem vermelho de fenol (Gibco BRL) suplementado com SFB à 10% e 2 mM de glutamina, na concentração de $0,2 \times 10^6$ células por poço em placas de 24 poços. A morfologia, densidade celular e contratibilidade espontânea foram avaliadas por microscopia ótica e sua viabilidade celular determinada pelo teste colorimétrico com reagente Presto-Blue (TIMM et al., 2014b).

Linhagens celulares L929 foram incubadas por 96 h à 37°C, com diferentes concentrações de cada amostra de EbM (0 a 200 µg/mL) diluídas em RPMI, na concentração de 4×10^3 células por poço em placas de 96 poços. A viabilidade celular foi determinada pelo teste colorimétrico com reagente Alamar-Blue (TIMM et al., 2014b).

Os resultados foram expressos seguindo instruções dos fabricantes e os valores de LC₅₀, que corresponde à concentração que reduz em 50% a viabilidade celular, determinados. O índice de seletividade (IS) foi expresso pela relação entre os valores de LC₅₀ sobre as células hospedeiras e o EC₅₀ (concentração da amostra capaz de reduzir em 50% o efeito máximo) obtido sobre os parasitas.

2.6.5 Ensaio de atividade tripanocida

Formas tripomastigotas sanguíneas da linhagem Y à 5×10^6 células/mL foram incubadas por 2 e 24 h à 37°C em RPMI na presença ou ausência de diluição seriada das amostras EbMTc e EbMTt (0 a 200 µg/mL). Após a incubação com as amostras, as taxas de mortalidade do parasita foram determinadas por microscopia ótica através da quantificação direta do número de parasitas vivos, usando câmara de Neubauer e o valor de EC₅₀ foi calculado (TIMM et al., 2014a). Para o ensaio nas formas intracelulares, culturas de tripomastigotas de *T. cruzi* (linhagem Tulahuen) foram usadas para infectar cultura de células da linhagem L929 na proporção 10:1 (parasita e célula hospedeira). Após 2 h, as culturas foram lavadas e incubadas por 48 h para estabilização da infecção. Em seguida, as amostras foram adicionadas usando concentrações não tóxicas crescentes (0 a 200 µg/mL) para as

células hospedeiras para determinação dos valores de EC_{50} e as culturas mantidas à 37°C por 96 h. Após a adição de 50 µL do substrato clorofenol vermelho β-D-galactopiranosídeo (CPRG) a 500 mM em 0,5% de Nonidet P-40 e incubação à 37°C por 18 h, a absorvância em 570 nm foi medida e os resultados expressos em porcentagem da taxa de inibição da infecção (ZINGALES et al., 2009; ROMANHA et al., 2010). Ao menos três ensaios foram conduzidos usando duplicatas (tripomastigotas sanguíneos da linhagem Y) e triplicatas (linhagem Tulahuen de *T. cruzi*). A comparação direta com a droga referência BZ foi realizada em todos os ensaios.

2.7 Estudos da atividade leishmanicida

Os ensaios para avaliar a atividade leishmanicida das amostras de EbMTc e EbMTt foram realizados em colaboração com a Prof.^a Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva e auxílio da Ma. Rafaella de Miranda Villarim Meira e aluna de iniciação científica Thainá Pereira de Souza, do Laboratório de Imunofarmacologia Parasitária, da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ.

2.7.1 Extratos

As amostras de EbMTc e EbMTt foram solubilizados em DMSO (Sigma) para preparo da solução estoque e armazenada a -20°C até o uso. A concentração final de DMSO nas culturas de células não ultrapassou 0,2%.

2.7.2 Obtenção e manutenção dos parasitos

As formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (Cepa Thor MCAN/BR/98/R619) foram isoladas pela Dra. Maria de Fátima Madureira, do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC/Fiocruz), e fornecidas pela Dra. Lea Cysne da Fiocruz. Os parasitos

foram mantidos e isolados novamente de fêmeas de hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) infectadas. As formas promastigotas foram mantidas em cultura usando meio Schneider (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), com 20% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) e gentamicina a 100 µg/mL a 28°C. Repiques semanais foram realizados para a manutenção das formas promastigotas em cultura até a quinta passagem, quando eram novamente isolados de lesões e linfonodo drenante dos hamsters infectados.

2.7.3 Ensaio sobre a viabilidade de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*

O ensaio seguiu a metodologia descrita por Costa e colaboradores (2014) com alterações. Formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* na concentração de 5×10^5 /mL foram distribuídas em triplicatas em placas de 24 poços (500 µL por poço) e incubadas por 72 h a 28°C com os extratos de ambas as espécies em uma primeira etapa (5, 50 e 500 µg/mL) diluídos em meio Schneider suplementado com 20% de SFB (volume final no poço de 1000 µL). Na segunda etapa, apenas EbMTc foi utilizada (15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 µg/mL) nos tempos de exposição de 48 e 72 h. Os controles foram parasitos cultivados somente com meio de cultura e soro, e na presença de DMSO na concentração máxima da substância teste (0,2%). Após o período de incubação, o número de promastigotas viáveis em cada poço foi contado em microscópio óptico utilizando a câmara de Neubauer.

2.7.4 Ensaio sobre a viabilidade de monócitos

A linhagem celular THP-1 (monócito derivado de leucemia monocítica aguda humana) foi cultivada em suspensão em meio RPMI 1640 suplementado com SFB à 10%. Após contagem em câmara de Neubauer, as células foram adicionadas em placas de 96 poços na concentração de 5×10^4 células/mL na presença ou ausência da amostra EbMTc (7,8; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 µg/mL) por 18 h em estufa com CO₂ à 5% e 37°C, em triplicata. Após a incubação, 25 µL de MTT a 5 mg/mL foram adicionados aos poços e as placas foram incubadas novamente em estufa com CO₂ à 5% e 37°C por 3 h, protegidas da luz. Os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e a leitura da absorvância foi

realizada com comprimento de onda de 550 nm em leitor de microplaca. Para fins comparativos, os controles adotados foram os monócitos cultivados com o meio RPMI ou DMSO à 0,2% (DASGUPTA et al., 2003; JAIN et al., 2012; CHANPUT; MES; WICHERS, 2014).

2.8 Estudos da atividade antimicrobiana

Os ensaios para verificar a atividade antimicrobiana das amostras de EbMTc, EbMTt e o alcaloide sintetizado APL01 foram realizados no Laboratório 1 do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, da Faculdade de Ciências da UERJ, em colaboração com a Prof.^a Dra. Ana Claudia de Paula Rosa Ignacio e auxílio do Dr. Thiago José de Souza Barboza.

2.8.1 Isolamento de cepas

Em todos os ensaios foram utilizadas cepas de referência, obtidas em sua maioria do American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA) e demais, da coleção do Departamento de Microbiologia Imunologia e Parasitologia da UERJ. Foram utilizadas cepas bacterianas (Quadro 2), englobando Gram-positivas e Gram-negativas de interesse clínico em saúde pública.

Para montagem do estoque, as cepas foram semeadas com o auxílio de alças descartáveis estéreis em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo 20 mL de meio de cultivo sólido Mueller-Hinton ágar (MHA, Oxoid Ltda). O material semeado foi mantido em estufa à 37°C por 18 h para crescimento. Utilizando alças, as colônias formadas nas culturas foram removidas e adicionadas em meios para armazenagem. As cepas foram estocadas a -70°C em meio Tryptic Soy Broth (TSB, Merck®) e Skim Milk (Sigma-Aldrich®) acrescidos de 20% de glicerol, para impedir a cristalização do material em congelamento.

Quadro 2 – Cepas utilizadas para avaliar o potencial antimicrobiano das amostras de EbMTt e EbMTt e do alcaloide sintetizado APL01

Gram-positivas		Gram-negativas	
Espécie	Cepa	Espécie	Cepa
<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 33679	<i>Escherichia coli</i>	EAEC 17-2
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218
<i>Staphylococcus simulans</i>	ATCC 27851	<i>Escherichia coli</i> 042	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	8668	<i>enteroagregativa (EAEC)</i>	
		<i>Escherichia coli K-12</i>	C600
		<i>Escherichia coli K-12</i>	HB 101
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
		<i>Salmonella typhimurium</i>	C20
		<i>Serratia marcescens</i>	7145
		<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 25931

2.8.2 Avaliação qualitativa e quantitativa

A avaliação do potencial antimicrobiano das amostras foi realizada a partir da metodologia descrita por Soberón e colaboradores (2007), apresentando modificações, ensaio de diluição em ágar (macrodiluição). As cepas bacterianas dos estoques foram cultivadas para crescimento em tubos de ensaio de 15 x 100 mm contendo 3 mL de meio Mueller-Hinton Broth (MHB, Oxoid, Ltda.) mantidas em estufa por 18 h à 37°C. Após a fase de crescimento, as culturas obtidas foram aliquotadas em microtubos estéreis para manipulação em trabalho. As diferentes amostras avaliadas foram solubilizadas em 20 mL de MHA aquecido a 45°C, ainda não solidificado e o conteúdo final despejado em placas de Petri de 90 mm. A concentração final das amostras foi de 1 mg/placa. O controle negativo utilizado foi o meio MHA puro. Para cada placa de tratamento foram semeados 2 µL de cada suspensão bacteriana em duplicata, sendo avaliado o crescimento das colônias após 24 h de incubação em estufa à 37°C.

Os valores de concentração bactericida mínima (MBC), concentração inibitória mínima (MIC) e IC₅₀ foram determinados através do ensaio de microdiluição em placas de 96 poços. As cepas usadas foram selecionadas ao apresentarem inibição de crescimento na presença das amostras testadas no ensaio de macrodiluição. As suspensões bacterianas foram ajustadas ao valor de 0,5 na escala de McFarland. Posteriormente, foram cultivadas em triplicata por 18 h nas concentrações de 50, 100, 500, 1000 e 1500 µg/mL. Após o período de incubação, 2 µL são retirados de cada poço e plaqueado em meio MHA por 18 h à 37°C para que o efeito de MBC seja observado. O comprimento de onda de 492 nm foi utilizado para a leitura de absorvância dos poços.

2.8.3 Avaliação do potencial de inibição na formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus*

A avaliação do estabelecimento de biofilmes de *S. aureus* foi realizada a partir do ensaio espectrofotométrico de inibição de biofilme, segundo Namasivayam e Roy (2013) com algumas modificações.

As suspensões bacterianas foram padronizadas e ajustadas a 0,14 de absorvância, sendo adicionados 100 µL da suspensão em placas de 96 poços. Em seguida, as amostras de EbMTc e EbMTt nas concentrações de 50, 100, 500, 1000 e 1500 µg/mL foram adicionadas em triplicata, sendo mantido o cultivo em incubação por 18 h à 37°C.

Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de solução corante de cristal violeta 1% (p/v) por 30 min. Após este período, a solução foi removida e os poços foram lavados com PBS, sendo em seguida adicionados 100 µL de etanol 95%, mantendo em incubação por 15 min para solubilização dos cristais. A leitura foi realizada em leitor de microplacas a 570 nm. O cálculo do índice de inibição do crescimento de biofilmes, expresso em porcentagem, se deu de acordo com a fórmula:

$$\text{Índice de inibição (\%)} = \frac{\text{Abs no controle} - \text{Abs no tratamento}}{\text{D.O. no controle}} \times 100 \quad (4).$$

2.9 Análises estatísticas

Análises descritivas das variáveis foram realizadas (média e desvio padrão). Os dados obtidos foram analisados pelo teste *One-Way* ANOVA ($p < 0,05$) seguido de Dunnet ou Tukey ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) de acordo com a metodologia aplicada (DAWSON-SAUNDERS; TRAPP, 1994). Foram utilizados os programas Microsoft[®] Office Excel e GraphPad Prism[®] 5 para Windows. Os ensaios foram repetidos pelo menos duas vezes para confirmação dos resultados.

3 RESULTADOS

3.1 Resultados de coleta e extração

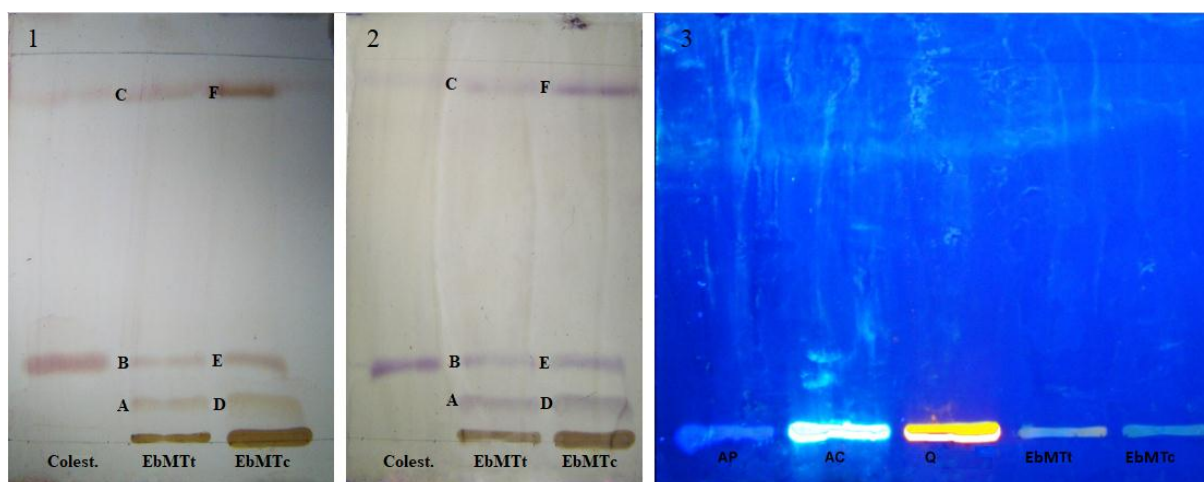
A liofilização das colônias coletadas de *T. coccinea* e *T. tagusensis* gerou 5,327 kg e 6,283 kg, respectivamente, de material seco. A extração em MeOH produziu as amostras EbMTc e EbMTt com peso total de 214,8384 g e 204,7840 g, respectivamente. A partir de 10 g de EbMTc, obteve-se as frações f-Hex (13,84%), f-DCM (6,79%), f-AcOEt (0,46%), f-BuOH (15,60%) e f-Residual (44,08%), com os respectivos pesos: 1,3840 g, 0,6792 g, 0,0460 g, 1,5606 g e 4,4079 g.

3.2 Análises da composição química

3.2.1 Resultados de CCD

As amostras de EbMTc e EbMTt foram submetidas à CCD e, após reação com os reveladores, as placas foram fotografadas e os Rfs calculados. As Figuras de 11 a 16 referentes aos sistemas de eluentes (1 a 6), apresentam as placas cromatográficas após reação com os três reveladores adotados e os Rfs das bandas observadas estão presentes nas Tabelas de 4 a 9.

Figura 11 – Placas cromatográficas com as amostras EbMTc e EbMTt com os reveladores sulfato cérico (1), vanilina (2) e NP-PEG (3) no sistema 1 (DCM)



Legenda: Colesterol (Colest.); Ácido pirogálico (AP); Ácido clorogênico (AC); Quercetina (Q).

Tabela 4 – Valores de Rf das bandas de EbMTc e EbMTt obtidas por CCD no sistema 1 (DCM)

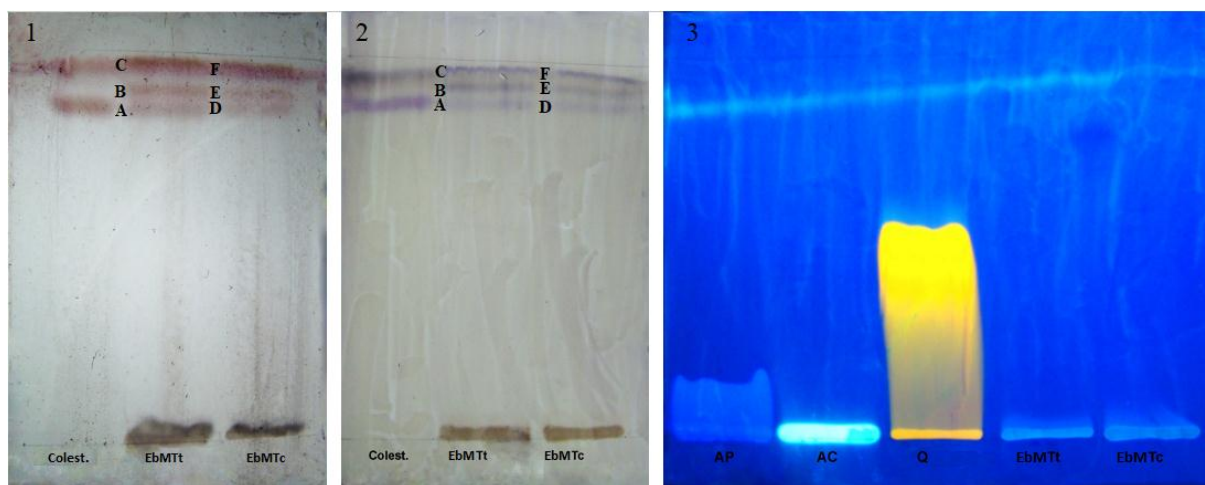
Sulfato Cérico		Vanilina		NP-PEG	
Banda	Rf	Banda	Rf	Banda	Rf
Colesterol	0,21	Colesterol	0,20	Ácido pirogálico (AP)	-
A	0,10	A	0,10	Ácido clorogênico (AC)	-
B	0,21	B	0,21	Quercetina (Q)	-
C	0,90	C	0,93	EbMTc	-
D	0,10	D	0,11	EbMTt	-
E	0,21	E	0,21		
F	0,90	F	0,96		

Legenda: Mobilidade relativa (Rf).

No sistema 1 (Figura 11), observa-se semelhança das bandas obtidas na revelação com sulfato cérico e vanilina. Apesar do sulfato cérico ser um revelador não específico, a vanilina é utilizada para verificar a presença de terpenos e derivados em uma amostra. As bandas B e E são equivalentes à substância padrão colesterol, apresentando valores de Rf (Tabela 4) iguais (sulfato cérico) ou próximos (vanilina). As bandas C e F apresentaram maior afinidade com o eluente (DCM), apresentando os maiores valores de Rf observados, o que pode indicar que as substâncias presentes nessas bandas possuem alta solubilidade nesse solvente apolar. A revelação com NP-PEG não indicou a presença de flavonoides nestas condições. Nas três

placas, observa-se resquícios de material no local onde fora aplicada a amostra, indicando que esse sistema não foi capaz de eluir toda a amostra.

Figura 12 – Placas cromatográficas com as amostras EbMTc e EbMTt com os reveladores sulfato cérico (1), vanilina (2) e NP-PEG (3) no sistema 2 (DCM / AcOEt; 1:1 v/v)



Legenda: Colesterol (Coolest.); Ácido pirogálico (AP); Ácido clorogênico (AC); Quercetina (Q).

Tabela 5 – Valores de Rf das bandas de EbMTc e EbMTt obtidas por CCD no sistema 2 (DCM / AcOEt; 1:1 v/v)

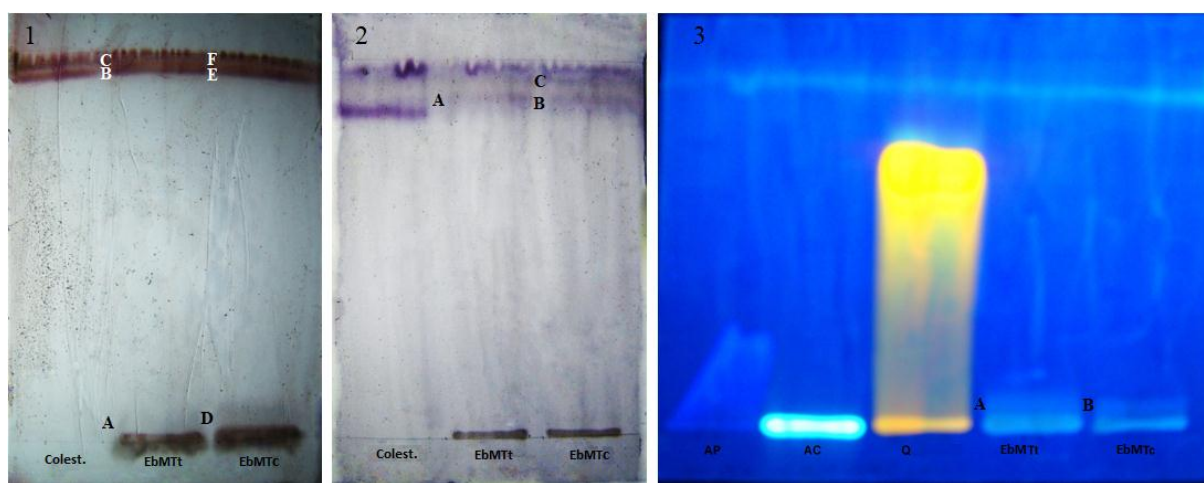
Sulfato Cérico		Vanilina		NP-PEG	
Banda	Rf	Banda	Rf	Banda	Rf
Colesterol	0,83	Colesterol	0,87	Ácido pirogálico (AP)	0,06
A	0,83	A	0,87	Ácido clorogênico (AC)	-
B	0,90	B	0,92	Quercetina (Q)	0,44
C	0,97	C	0,96	EbMTc	-
D	0,83	D	0,87	EbMTt	-
E	0,90	E	0,92		
F	0,95	F	0,96		

Legenda: Mobilidade relativa (Rf).

No sistema 2 (Figura 12), repete-se a semelhança observada no sistema 1 entre as bandas reveladas com sulfato cérico e vanilina. Porém, as bandas apresentaram maior afinidade com o eluente (DCM / AcOEt; 1:1 v/v), o que é confirmado pelos valores de Rf (Tabela 5) próximos de 1,0. As bandas A e D apresentaram o mesmo valor de Rf que a do

colesterol, indicando a presença de esteróis. A reação com vanilina demonstra a presença de terpenos e derivados, embora não seja possível indicar qual o tipo de terpeno. Não houve respostas positivas para a presença de flavonoides com o revelador NP-PEG. O sistema 2 não foi capaz de eluir toda a amostra aplicada nas placas cromatográficas.

Figura 13 – Placas cromatográficas com as amostras EbMTc e EbMTt com os reveladores sulfato cérico (1), vanilina (2) e NP-PEG (3) no sistema 3 (DCM / AcOEt; 1:2 v/v)



Legenda: Colesterol (Colest.); Ácido pirogálico (AP); Ácido clorogênico (AC); Quercetina (Q).

Tabela 6 – Valores de Rf das bandas de EbMTc e EbMTt obtidas por CCD no sistema 3 (DCM / AcOEt; 1:2 v/v)

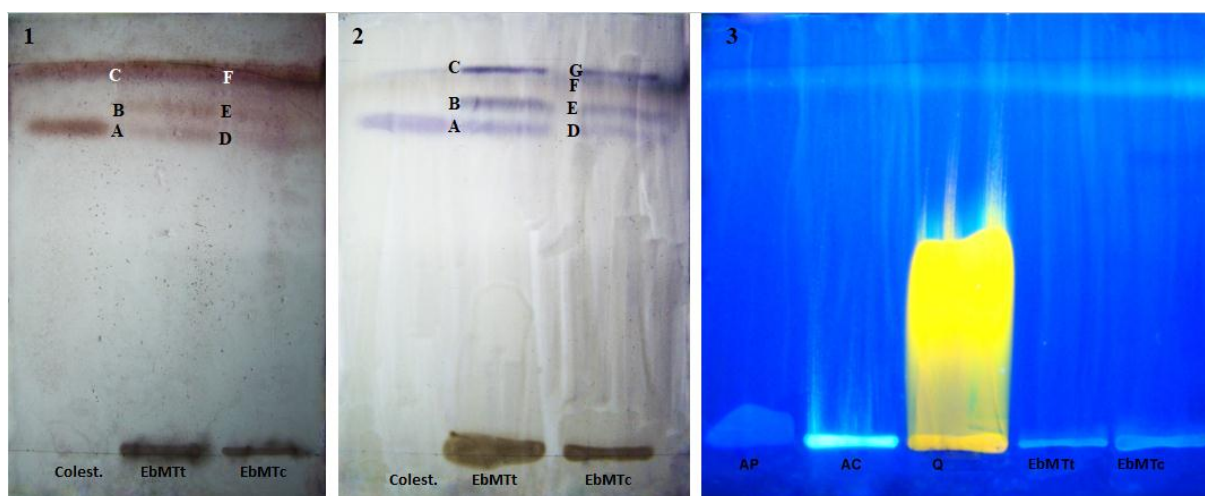
Sulfato Cérico		Vanilina		NP-PEG	
Banda	Rf	Banda	Rf	Banda	Rf
Colesterol	0,93	Colesterol	0,85	Ácido pirogálico (AP)	0,13
A	0,06	A	0,87	Ácido clorogênico (AC)	-
B	0,93	B	0,87	Quercetina (Q)	0,69
C	0,95	C	0,93	A	0,06
D	0,07			B	0,07
E	0,93				
F	0,95				

Legenda: Mobilidade relativa (Rf).

No sistema 3 (Figura 13), observa-se a presença de bandas na revelação para flavonoides. As bandas A e B na placa 3 apresentam tempos de retenção semelhantes, embora

não sejam equivalentes a nenhum Rf das substâncias padrão usadas (Tabela 6). A revelação com vanilina demonstrou a presença de terpenoides nas amostras. As bandas B e E na revelação com sulfato cérico apresentaram Rf igual ao do colesterol. O aumento da proporção de AcOEt no sistema não foi suficiente para eluir todo os componentes das amostras.

Figura 14 – Placas cromatográficas com as amostras EbMTc e EbMTt com os reveladores sulfato cérico (1), vanilina (2) e NP-PEG (3) no sistema 4 (DCM / AcOEt; 2:1 v/v).



Legenda: Colesterol (Colest.); Ácido pirogálico (AP); Ácido clorogênico (AC); Quercetina (Q).

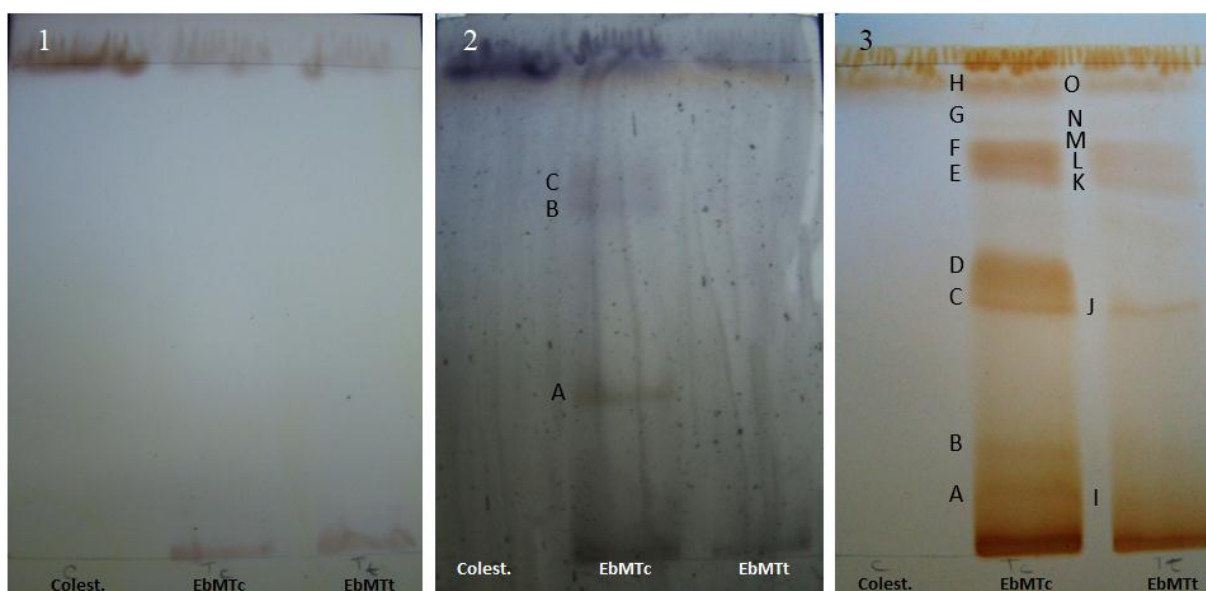
Tabela 7 – Valores de Rf das bandas de EbMTc e EbMTt obtidas por CCD no sistema 4 (DCM / AcOEt; 2:1 v/v)

Sulfato Cérico		Vanilina		NP-PEG	
Banda	Rf	Banda	Rf	Banda	Rf
Colesterol	0,82	Colesterol	0,83	Ácido pirogálico (AP)	0,11
A	0,81	A	0,82	Ácido clorogênico (AC)	-
B	0,87	B	0,90	Quercetina (Q)	0,70
C	0,91	C	0,91	EbMTc	-
D	0,80	D	0,83	EbMTt	-
E	0,85	E	0,87		
F	0,91	F	0,95		
		G	0,97		

Legenda: Mobilidade relativa (Rf).

O eluente usado no sistema 4 (DCM / AcOEt; 2:1 v/v) (Figura 14) apresentou um parâmetro de separação semelhante ao sistema 2, visto que conseguiu eluir a colesterol e promoveu a separação de compostos em pelo menos 3 bandas por amostra. Porém, não eluiu toda a amostra aplicada na placa. A revelação para terpenoides demonstrou mais uma banda em EbMTc em comparação ao sistema 2. É provável que a banda F em EbMTc do sistema 2 ($R_f = 0,96$) tenha sido dividida nas bandas F e G em EbMTc do sistema 4, cujos R_f s são 0,95 e 0,97, respectivamente (Tabela 7). A revelação para flavonoides não gerou bandas.

Figura 15 – Placas cromatográficas com as amostras EbMTc e EbMTt com os reveladores sulfato cérico (1), vanilina (2) e iodo (3) no sistema 5 (MeOH / DCM / AcOEt; 1:2:0,5 v/v)



Legenda: Colesterol (Colest.).

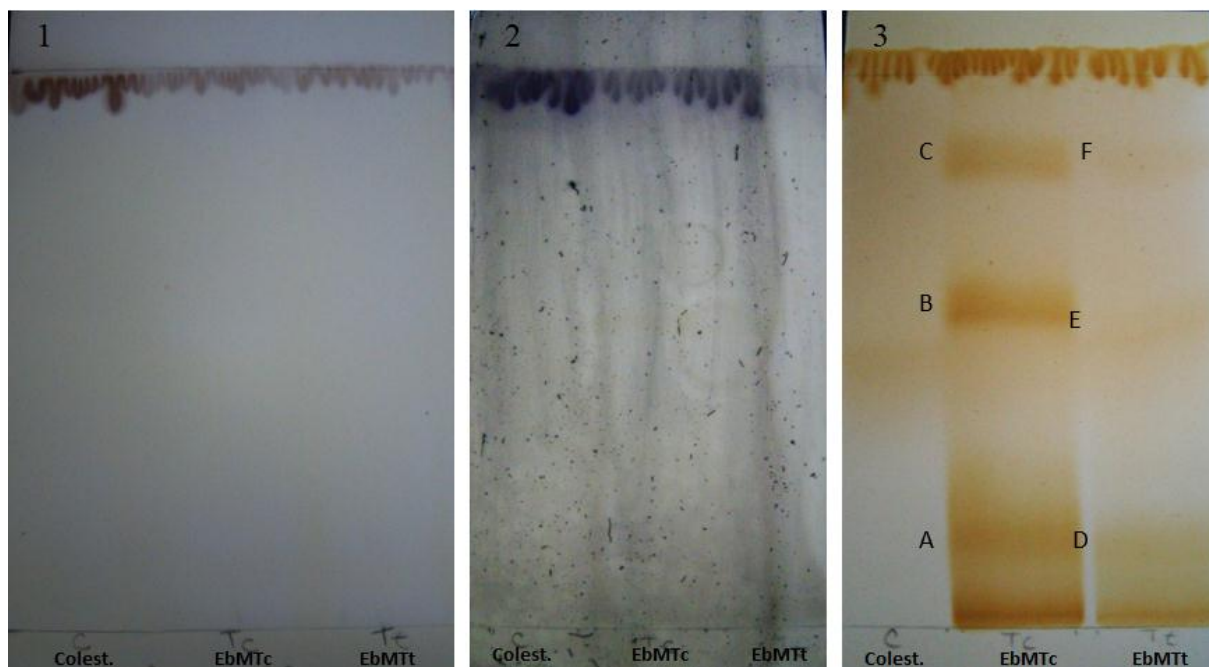
Tabela 8 – Valores de Rf das bandas de EbMTc e EbMTt obtidas por CCD no sistema 5 (MeOH / DCM / AcOEt; 1:2:0,5 v/v)

Sulfato Cérico		Vanilina		Iodo			
Banda	Rf	Banda	Rf	Banda		Rf	
Colesterol	-	Colesterol	0,96	Colesterol		0,94	
EbMTc	-	A	0,31	EbMTc	Rf	EbMTt	Rf
EbMTt	-	B	0,71	A	0,13	I	0,13
		C	0,77	B	0,23	J	0,49
		EbMTt	-	C	0,51	K	0,74
				D	0,58	L	0,78
				E	0,75	M	0,81
				F	0,80	N	0,86
				G	0,86	O	0,94
				H	0,94		

Legenda: Mobilidade relativa (Rf).

O sistema 5 (Figura 15) com sulfato cérico não revelou bandas, embora a revelação para terpenos e derivados tenha demonstrado 3 bandas em EbMTc, caracterizando a presença dessas substâncias na amostra. A revelação não específica com iodo demonstrou que esse sistema foi o que melhor identificou os componentes das amostras EbMTc e EbMTt, dentre os sistemas adotados. O sistema 5 eluiu componentes de baixa polaridade, pois as bandas H e O apresentaram os mesmos valores de Rf que a substância padrão colesterol e conseguiu revelar um número maior bandas ao longo da eluição, podendo conter substâncias mais polares (Tabela 8). Contudo, não foi capaz de eluir toda a amostra depositada, tanto em EbMTc quanto EbMTt. Vale ressaltar que as composições das amostras são semelhantes, já que algumas bandas apresentam Rfs iguais (A e I; G e N e; H e O) e com valores próximos (C e J; E e K e; F e M).

Figura 16 – Placas cromatográficas com as amostras EbMTc e EbMTt com os reveladores sulfato cérico (1), vanilina (2) e iodo (3) no sistema 6 (MeOH / DCM / AcOEt / ácido acético; 1:2:1:0,5 v/v)



Legenda: Colesterol (Coolest.).

Tabela 9 – Valores de Rf das bandas de EbMTc e EbMTt obtidas por CCD no sistema 6 (MeOH / DCM / AcOEt / ácido acético; 1:2:1:0,5 v/v)

Sulfato Cérico		Vanilina		Iodo	
Banda	Rf	Banda	Rf	Banda	Rf
Colesterol	-	Colesterol	-	Colesterol	-
EbMTc	-	EbMTc	-	A	0,20
EbMTt	-	EbMTt	-	B	0,56
				C	0,82
				D	0,20
				E	0,53
				F	0,82

Legenda: Mobilidade relativa (Rf).

No sistema 6 (Figura 16), não foi possível observar bandas definidas com os reveladores sulfato cérico e vanilina, uma vez que amostras aparentemente caminharam junto com a frente do solvente, inclusive a substância padrão. Já a revelação com iodo apresentou

bandas para ambas as amostras. Os valores de Rf referentes às bandas A e D (0,20) e às bandas C e F (0,82) foram iguais (Tabela 9). A banda relativa ao colesterol não foi observada, porém não há resquício de material no local de aplicação, o que pode sugerir que as amostras tiveram mais afinidade com a fase móvel (eluente) do que com a fase estacionária. Logo, os componentes presentes nas bandas de A à F possuem uma polaridade maior em relação à colesterol.

3.2.2 Resultados de CG/EM

Os resultados das análises das frações de EbMTc em CG/EM estão expressos na Tabela 10. Os compostos voláteis identificados nas amostras foram relacionados quanto ao tempo de retenção (TR) e abundância relativa (ou área) em porcentagem. Observa-se que f-Hex possui o maior número de substâncias identificadas na sua composição, provavelmente devido à baixa polaridade do solvente orgânico usado para o preparo desta amostra. A amostra f-DCM demonstrou apenas a presença de derivados de aplisinopsina, sendo identificados como 3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina e seu análogo halogenado 6-bromo. Na amostra f-AcOEt foi identificada apenas a substância oleato de metila. As amostras f-BuOH e f-Residual não revelaram nenhum composto nestas condições.

Tabela 10 – Composição das frações oriundas de EbMTc pela análise de CG/EM (continua)

MM ¹	FM ²	Substância	f-Hex		f-DCM		f-AcOEt	
			TR	%	TR	%	TR	%
164	C ₁₂ H ₂₀	(E, E, E)-1,4,8-dodecatrieno	22,43	2,94	-	-	-	-
224	C ₁₆ H ₃₂	Ciclohexadecano	15,24	1,74	-	-	-	-
228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	Ácido mirístico	13,97	0,09	-	-	-	-
252	C ₁₈ H ₃₆	1-octadeceno	17,32	2,44	-	-	-	-
254	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	Ácido palmitoleico	15,87	0,62	-	-	-	-
255	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₂	3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina	25,95	0,17	25,92	34,32	-	-
255	C ₁₆ H ₃₃ NO	Palmitamida	18,41	0,18	-	-	-	-
256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido palmítico	16,09	2,10	-	-	-	-
264	C ₁₇ H ₂₈ O ₂	(7E,10E,13E)-7,10,13-hexadecatrienoato de metila	52,954	1,32	-	-	-	-
264	C ₁₈ H ₃₂ O	(9Z)-9,17-octadecadienal	20,26	0,66	-	-	-	-
268	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	Palmitolato de metila	15,46	0,16	-	-	-	-
270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	Palmitato de metila	15,67	0,32	-	-	-	-
270	C ₁₈ H ₃₈ O	Álcool estearílico	16,25	0,24	-	-	-	-
281	C ₂₀ H ₄₀	Cicloicosano	19,62	0,08	-	-	-	-
282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Ácido oleico	17,98	4,97	-	-	-	-
283	C ₁₉ H ₃₈ O	1-metoxi-1-octadeceno	16,55	0,06	-	-	-	-
284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Ácido heptadecanóico	16,67	0,14	-	-	-	-
284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Ácido esteárico	18,21	1,78	-	-	-	-

Tabela 10 – Composição das frações oriundas de EbMTc pela análise de CG/EM (continuação)

MM ¹	FM ²	Substância	f-Hex		f-DCM		f-AcOEt	
			TR	%	TR	%	TR	%
294	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	Linoleato de metila	17,39	0,12	-	-	-	-
296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	Oleato de metila	17,46	0,85	-	-	20,48	42,43
296	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	8-octadecenoato de metila	17,52	0,2	-	-	-	-
299	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	Estearato de metila	17,74	0,41	-	-	-	-
308	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	Linoleato de etila	20,19	0,11	-	-	-	-
318	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	Araquidonato de metila	21,70	0,29	-	-	-	-
333	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	Araquidonato de etila	19,24	0,27	-	-	-	-
334	C ₁₄ H ₁₂ BrN ₃ O ₂	6-bromo-3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina	-	-	30,98	8,98	-	-
371	C ₂₆ H ₄₂ O	(22Z)-26,27-dinoregosta-5,22-dien-3β-ol	27,80	0,31	-	-	-	-
385	C ₂₇ H ₄₄ O	(22Z)-27-noregosta-5,22-dien-3β-ol	29,58	2,19	-	-	-	-
385	C ₂₇ H ₄₄ O	22-dehidrocolesterol	29,33	0,29	-	-	-	-
387	C ₂₇ H ₄₆ O	Colesterol	30,13	8,6	-	-	-	-
397	C ₂₈ H ₄₄ O	Ergosterol	31,14	0,77	-	-	-	-
399	C ₂₈ H ₄₆ O	(22E, 24S)-crinosterol	30,58	1,36	-	-	-	-
399	C ₂₈ H ₄₆ O	24-metildesmosterol	31,38	1,5	-	-	-	-
401	C ₂₈ H ₄₈ O	23R-metilcolesterol	31,48	0,49	-	-	-	-
411	C ₂₉ H ₄₆ O	(3β)-estigmasta-5,7,22-trien-3-ol	32,53	0,26	-	-	-	-
413	C ₂₉ H ₄₈ O	Estigmasta-5,22E-dien-3β-ol	31,88	0,28	-	-	-	-

Tabela 10 – Composição das frações oriundas de EbMTc pela análise de CG/EM (conclusão)

MM ¹	FM ²	Substância	f-Hex		f-DCM		f-AcOEt	
			TR	%	TR	%	TR	%
413	C ₂₉ H ₄₈ O	(24E)-estigmasta-5,24(28)-dien-3β-ol	32,80	0,79	-	-	-	-
413	C ₂₉ H ₄₈ O	Fucosterol	33,09	0,36	-	-	-	-
431	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	Tocoferol	30,20	0,85	-	-	-	-
453	C ₃₀ H ₆₀ O ₂	Miristato de cetila	30,76	0,32	-	-	-	-
479	C ₃₂ H ₆₂ O ₂	Oleato de miristila	45,22	3,56	-	-	-	-
481	C ₃₂ H ₆₄ O ₂	Palmitato de cetila	33,95	1,75	-	-	-	-
507	C ₃₄ H ₆₆ O ₂	Oleato de cetila	38,15	8,83	-	-	-	-
509	C ₃₄ H ₆₈ O ₂	Palmitato de estearilo	38,66	4,49	-	-	-	-
535	C ₃₆ H ₇₀ O ₂	Palmitoleato de araquidila	33,69	1,24	-	-	-	-
535	C ₃₆ H ₇₀ O ₂	Oleato de estearilo	45,00	14,56	-	-	-	-
563	C ₃₈ H ₇₄ O ₂	Oleato de icosila	40,98	0,73	-	-	-	-

¹Massa molar, ²Fórmula molecular.

3.2.3 Resultados de CLAE e espectrometria de massas

Os resultados de CLAE e espectrometria de massas das amostras EbMTc, EbMTt e f-AcOEt foram comparados com as substâncias encontradas no gênero *Tubastraea* descritas na literatura (Tabela 1). De acordo com os parâmetros empregados, as massas protonadas dos compostos 3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina e seu análogo halogenado, 6-bromo-3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina, foram identificados nas três amostras analisadas (Figura 17 e 18). Na Figura 17, nota-se que há uma mudança na intensidade do sinal dos picos referentes à molécula nas amostras EbMTc e EbMTt, o que pode indicar a presença do isômero desta substância. A massa protonada referente à molécula tubastrina foi observada nas amostras de EbMTc e f-AcOEt (Figura 19). A massa protonada de APL01 (228,0768 Da) foi identificada nas amostras de EbMTc e f-AcOEt (Figura 20), assim como o seu derivado halogenado, 6-bromo-3'-deimino-2',4'-bis(demetil)-3'-oxoaplisinopsina, de massa protonada 305,9873 Da nas mesmas amostras (Figura 21). Observa-se que as intensidades dos sinais dessas duas substâncias aumentam em f-AcOEt, sendo esta oriunda de EbMTc. Isso pode ter ocorrido devido ao refinamento gerado pelo processo de fracionamento de EbMTc. A massa protonada de 2'-de-*N*-metilaplisinopsina foi observada somente na fração f-AcOEt (Figura 22).

Figura 17 – Cromatogramas sobrepostos da molécula 3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina (azul) nas amostras (vermelho) de EbMTc (A), EbMTt (B) e f-AcOEt (C)

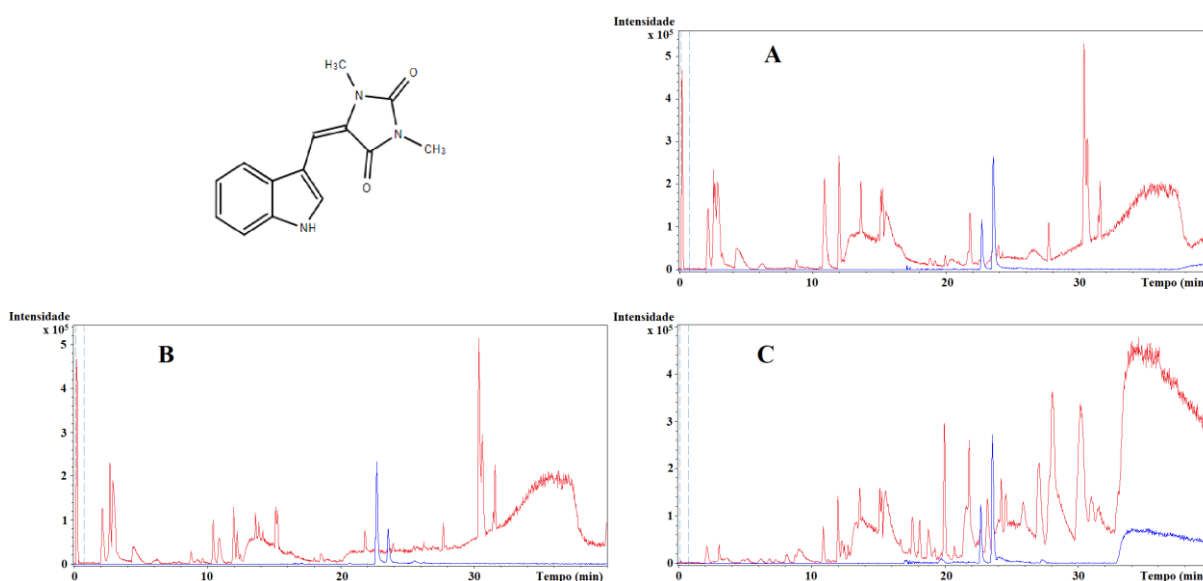


Figura 18 – Cromatogramas sobrepostos da molécula 6-bromo-3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina (azul) nas amostras (vermelho) de EbMTc (A), EbMTt (B) e f-AcOEt (C)

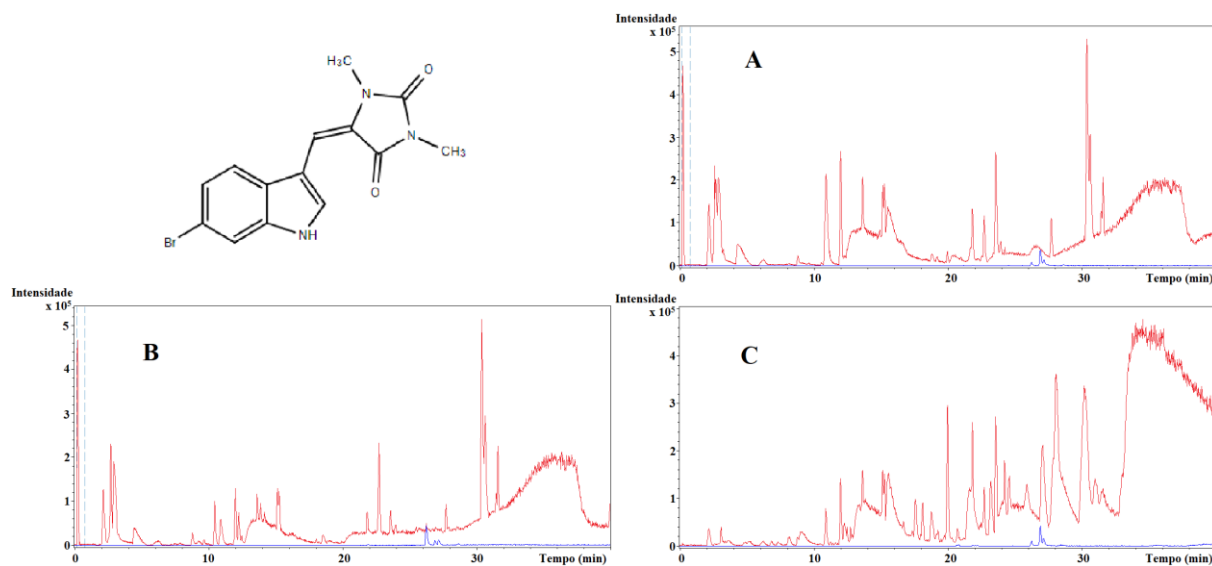


Figura 19 – Cromatogramas sobrepostos da molécula tubastrina (azul) nas amostras (vermelho) de EbMTc (A) e f-AcOEt(B)

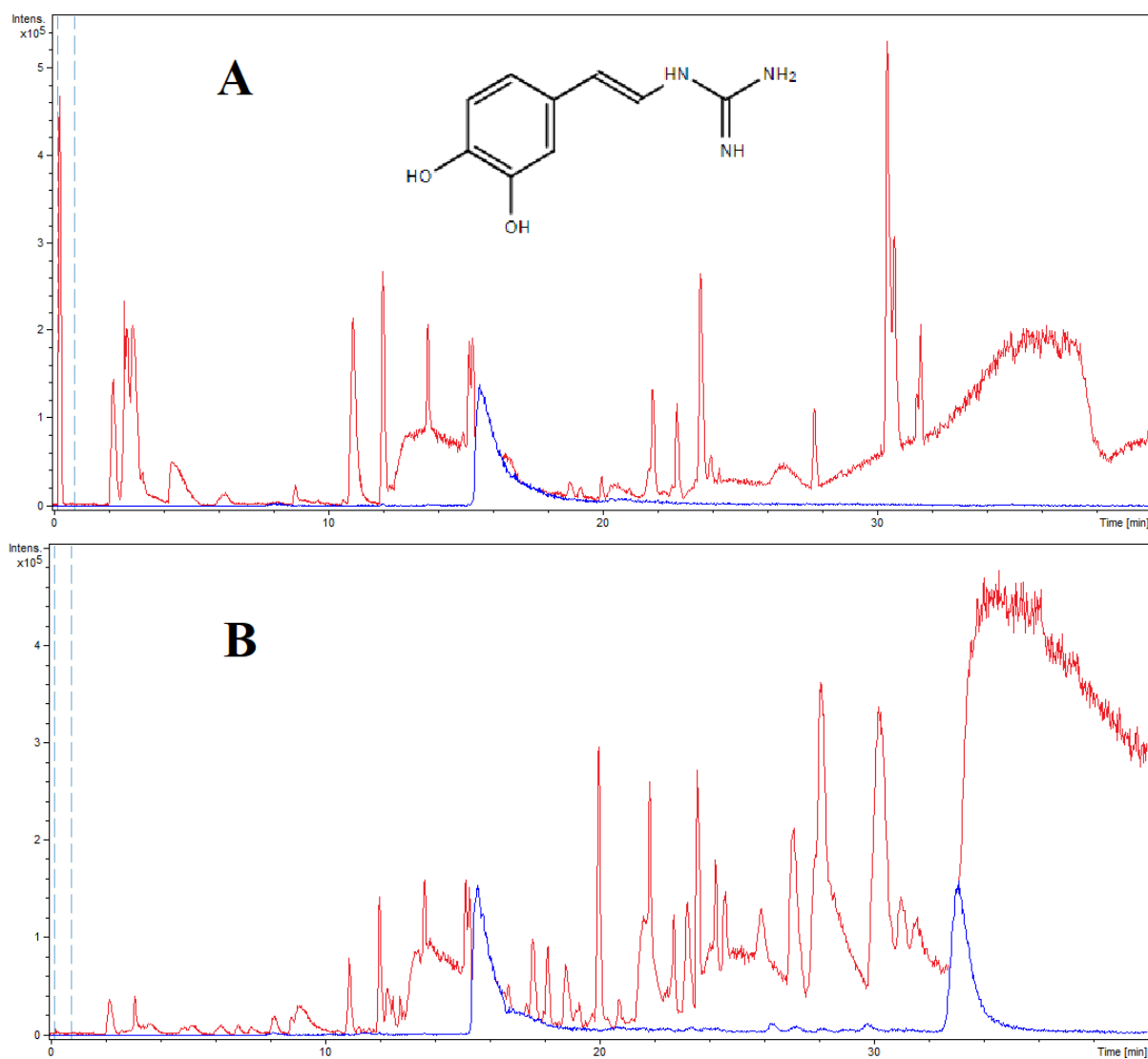


Figura 20 – Cromatogramas sobrepostos da molécula APL01 (azul) nas amostras (vermelho) de EbMTc (A) e f-AcOEt (B)

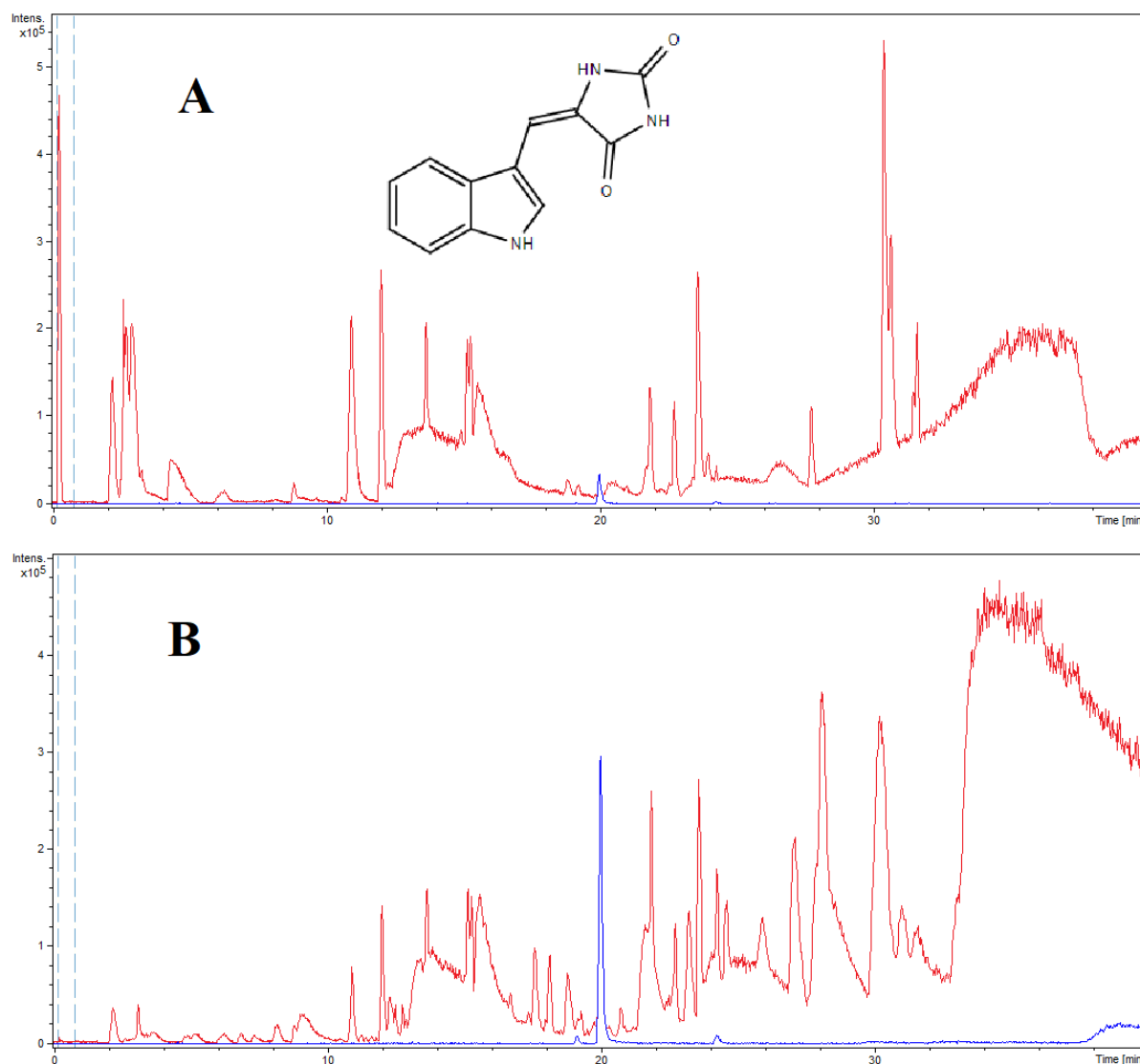


Figura 21 – Cromatogramas sobrepostos da molécula 6-bromo-3'-deimino-2',4'-bis(demetil)-3'-oxoaplisinopsina (azul) nas amostras (vermelho) de EbMTc (A) e f-AcOEt (B)

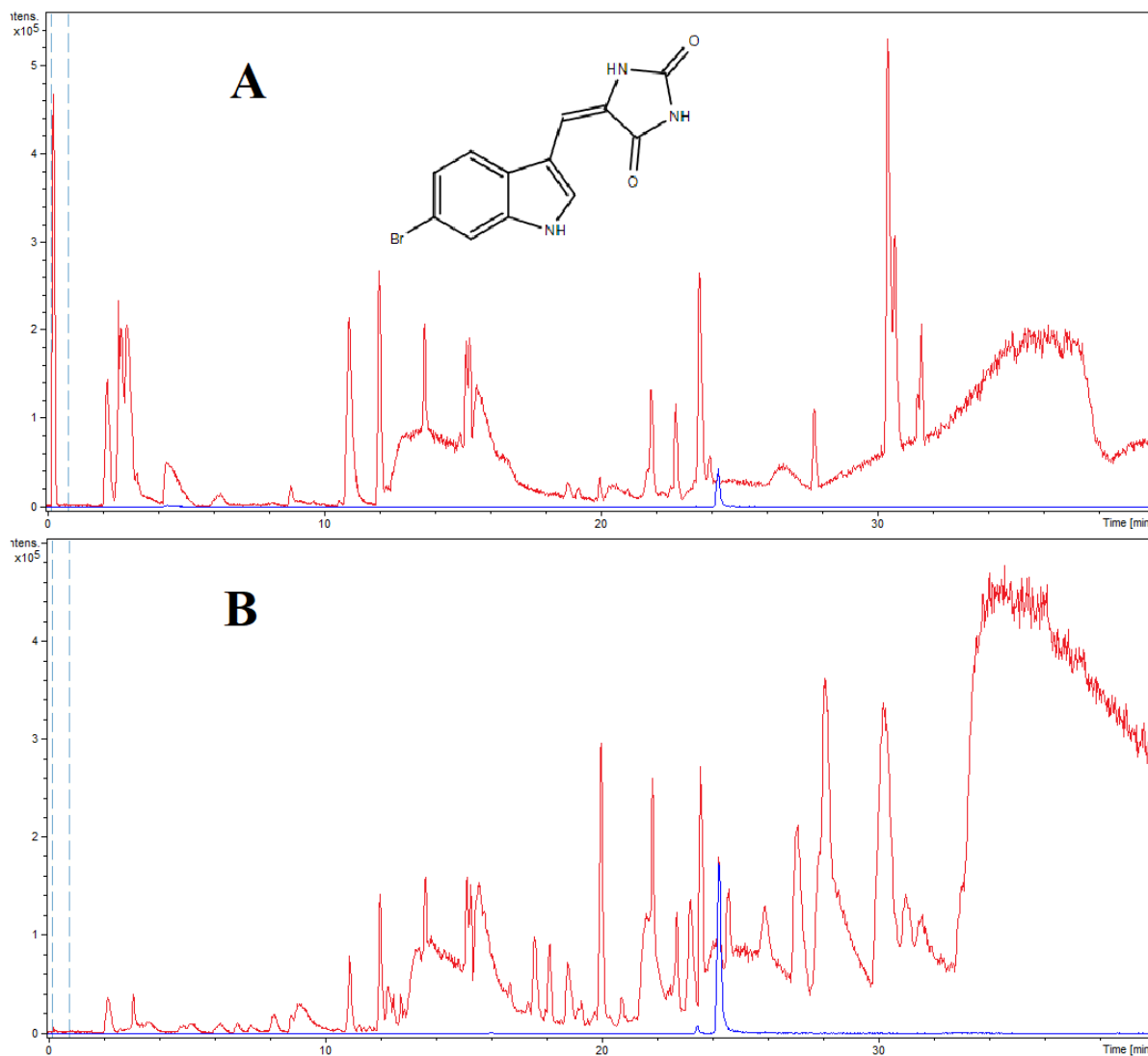
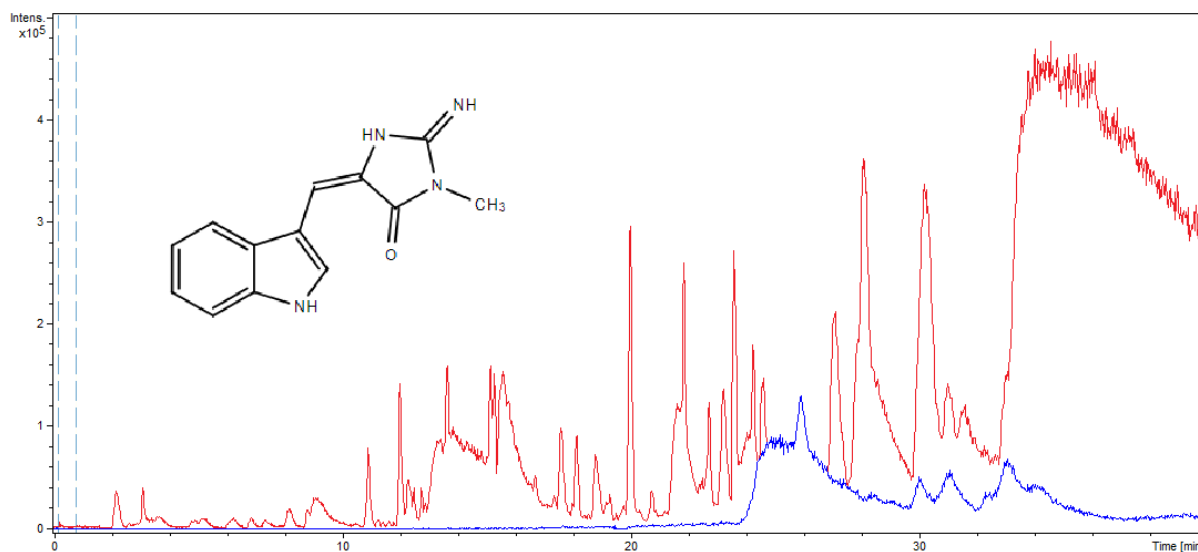


Figura 22 – Cromatogramas sobrepostos da molécula de 2'-de-*N*-metilaplisinopsina (azul) na amostra (vermelho) de EbMTc



3.3 Análises toxicológicas

3.3.1 Resultados de mutação reversa bacteriana (*Salmonella*/microssoma)

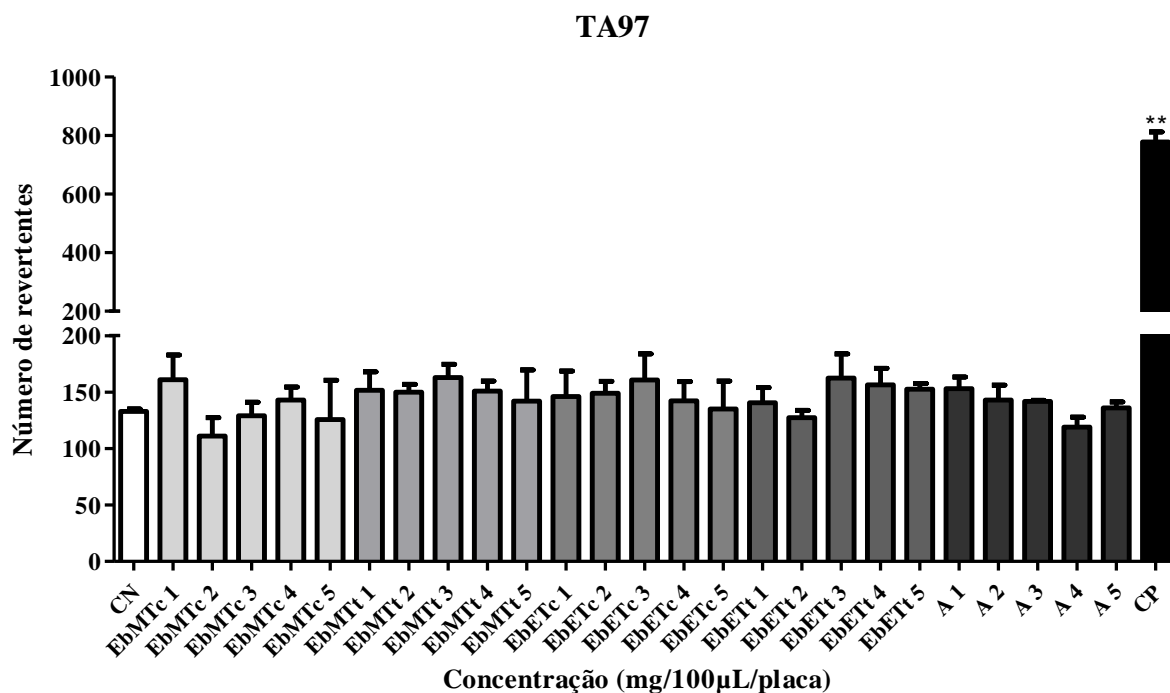
As cinco linhagens bacterianas recomendadas pela OECD (1997) foram utilizadas nos ensaios mutagênicos, devido à sua alta sensibilidade para vários compostos. As Figuras de 23 a 27 apresentam a análise da resposta mutagênica e/ou citotóxica para as linhagens TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104, respectivamente, na ausência de metabolização exógena.

A partir de ensaios preliminares (seção Apêndice) para citotoxicidade e mutagenicidade, estabeleceu-se as concentrações descritas no item 3.4.2 (0,25; 0,3125; 0,375; 0,4375; 0,5 mg/100 µL/placa). A seleção destas concentrações teve como finalidade a ampliação de um intervalo onde fora observado uma diminuição da sobrevivência das linhagens e uma aproximação do I.M. ao valor 2, o que representa uma reversão próxima ao dobro da reversão espontânea.

A linhagem TA97 (Figura 23) não apresentou evidências de citotoxicidade pela análise de *background* em nenhuma concentração para nenhuma amostra. O efeito

mutagênico não foi observado em nenhuma concentração de nenhuma amostra testada de acordo com os parâmetros utilizados.

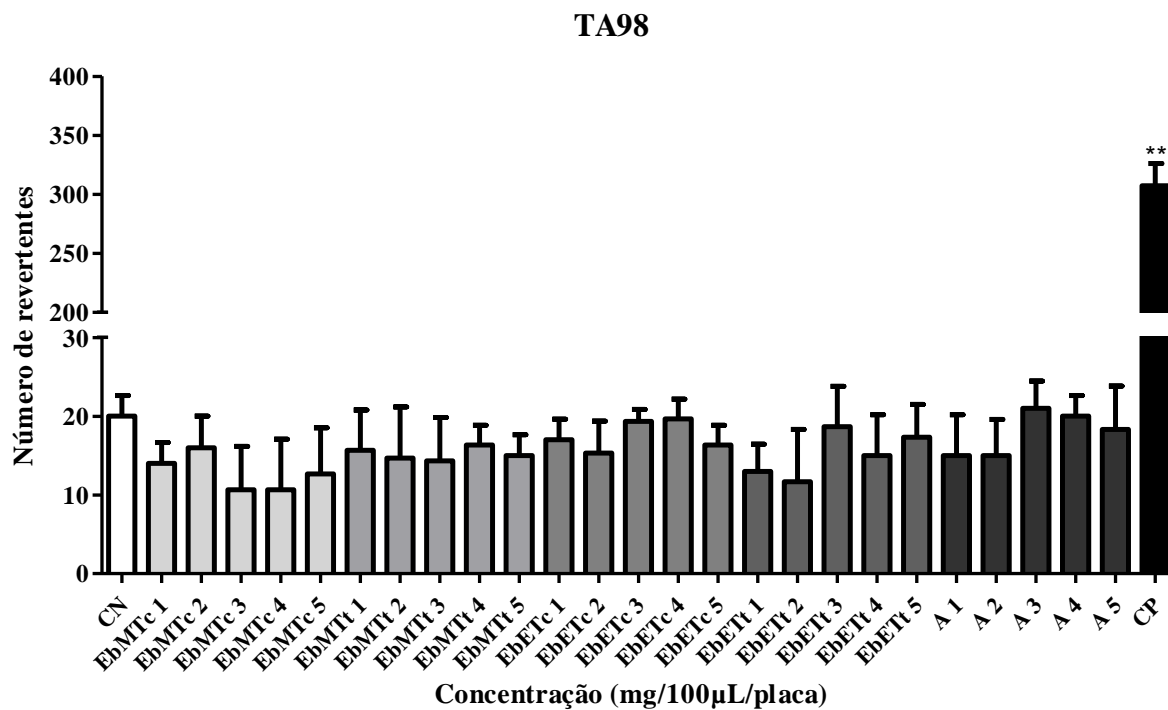
Figura 23 – Resultados da avaliação mutagênica usando a linhagem TA97 de *S. enterica* para as amostras de EbMTc, EbMTt, EbETc, EbETt e APL01 na ausência de metabolização exógena



Valores expressos em números de revertentes. As concentrações 1, 2, 3, 4 e 5 são equivalentes aos valores 0,25; 0,3125; 0,375; 0,4375 e 0,5 mg/100 µL/placa, respectivamente. CN: Controle negativo (DMSO 100%). CP: Controle positivo (4-NQO a 1,0 µg/100 µL/placa). A: APL01; Diferença estatística significativa: teste ANOVA seguido de Tukey (** $p < 0,01$) em relação ao controle negativo.

As amostras não apresentaram respostas mutagênicas ou citotóxicas para a linhagem TA98 (Figura 24) para nenhuma concentração testada. Isso é corroborado pela análise estatística, que não acusou diferença significativa entre esses grupos.

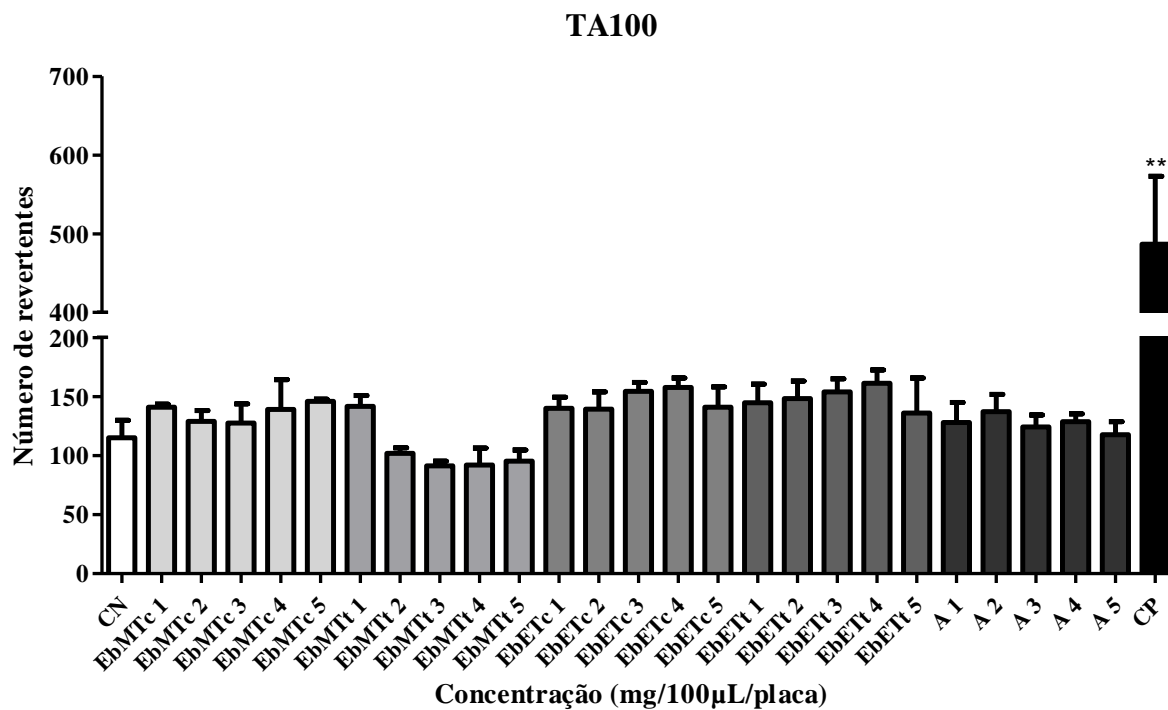
Figura 24 – Resultados da avaliação mutagênica usando a linhagem TA98 de *S. enterica* para as amostras de EbMTc, EbMTt, EbETc, EbETt e APL01 na ausência de metabolização exógena



Valores expressos em números de revertentes. As concentrações 1, 2, 3, 4 e 5 são equivalentes aos valores 0,25; 0,3125; 0,375; 0,4375 e 0,5 mg/100 µL/placa, respectivamente. CN: Controle negativo (DMSO 100%). CP: Controle positivo (4-NQO a 0,5 µg/100 µL/placa). A: APL01; Diferença estatística significativa: teste ANOVA seguido de Tukey (** $p < 0,01$) em relação ao controle negativo.

Efeitos mutagênicos e citotóxicos também não foram observados para a linhagem TA100 com as amostras e concentrações testadas (Figura 25). A amostra EbMTt nas quatro maiores concentrações proporcionaram uma leve queda na reversão, porém diferenças não foram observadas na análise de *background* e os grupos não apresentaram diferença estatística significativa, tanto para o teste ANOVA ($p > 0,05$) quanto para o teste de Tukey ($p > 0,01$).

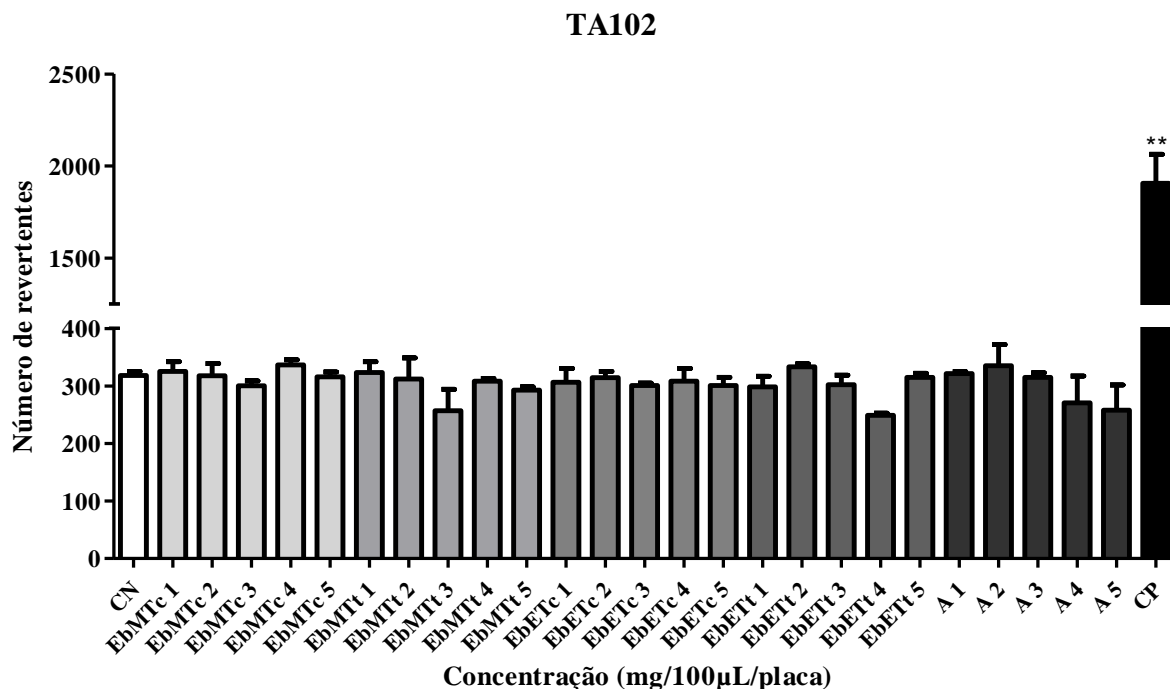
Figura 25 – Resultados da avaliação mutagênica usando a linhagem TA100 de *S. enterica* para as amostras de EbMTc, EbMTt, EbETc, EbETt e APL01 na ausência de metabolização exógena



Valores expressos em números de revertentes. As concentrações 1, 2, 3, 4 e 5 são equivalentes aos valores 0,25; 0,3125; 0,375; 0,4375 e 0,5 mg/100 µL/placa, respectivamente. CN: Controle negativo (DMSO 100%). CP: Controle positivo (AS a 0,5 µg/100 µL/placa). A: APL01; Diferença estatística significativa: teste ANOVA seguido de Tukey (** $p < 0,01$) em relação ao controle negativo.

As amostras não induziram mutagenicidade para a linhagem TA102 (Figura 26), cujos números de revertentes mantiveram-se próximo do controle negativo (DMSO). A citotoxicidade também não foi observada, visto que a análise de *background* não evidenciou diferenças. Ambas as observações, de mutagenicidade e citotoxicidade, são corroboradas pelas análises estatísticas adotadas.

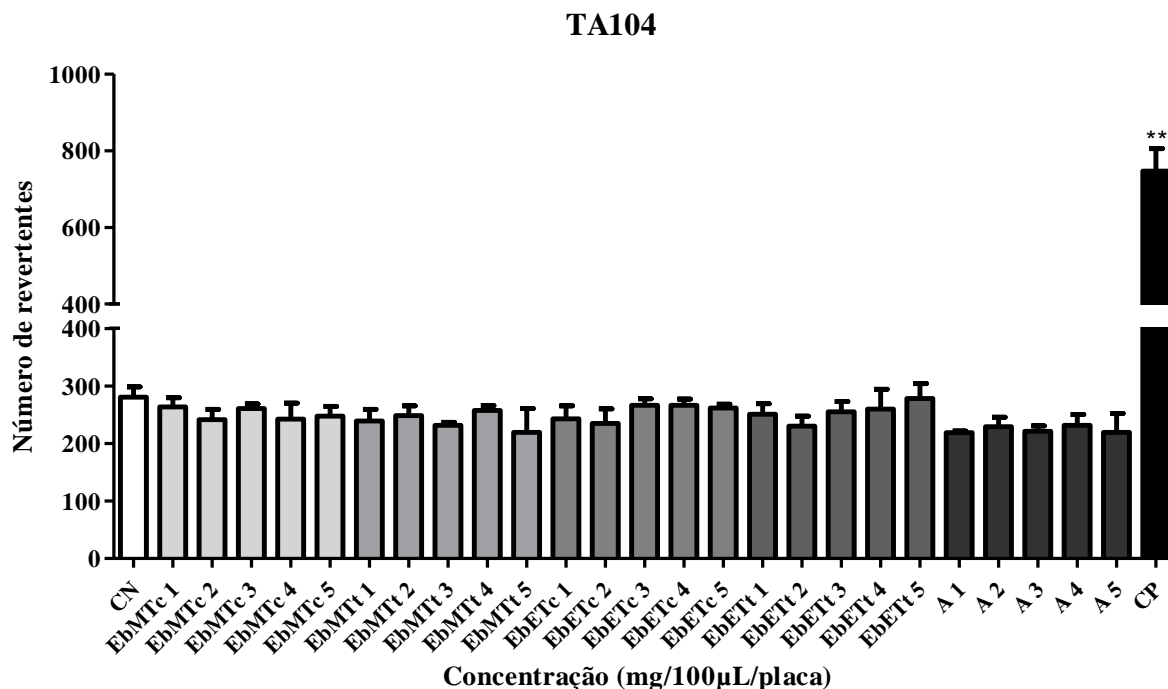
Figura 26 – Resultados da avaliação mutagênica usando a linhagem TA102 de *S. enterica* para as amostras de EbMTc, EbMTt, EbETc, EbETt e APL01 na ausência de metabolização exógena



Valores expressos em números de revertentes. As concentrações 1, 2, 3, 4 e 5 são equivalentes aos valores 0,25; 0,3125; 0,375; 0,4375 e 0,5 mg/100 µL/placa, respectivamente. CN: Controle negativo (DMSO 100%). CP: Controle positivo (MitC a 0,5 µg/100 µL/placa). A: APL01; Diferença estatística significativa: teste ANOVA seguido de Tukey (** $p < 0,01$) em relação ao controle negativo.

A reversão na linhagem TA104 não demonstrou sinais de mutagenicidade em relação ao controle negativo para as amostras testadas (Figura 27). Alterações nos parâmetros de citotoxicidade também não foram observados. A ausência de diferença estatística significativa entre as amostras e o controle negativo confirma as respostas negativas para as atividades testadas nesse ensaio.

Figura 27 – Resultados da avaliação mutagênica usando a linhagem TA104 de *S. enterica* para as amostras de EbMTc, EbMTt, EbETc, EbETt e APL01 na ausência de metabolização exógena



Valores expressos em números de revertentes. As concentrações 1, 2, 3, 4 e 5 são equivalentes aos valores 0,25; 0,3125; 0,375; 0,4375 e 0,5 mg/100 µL/placa, respectivamente. CN: Controle negativo (DMSO 100%). CP: Controle positivo (MMS a 250 µg/100 µL/placa). A: APL01; Diferença estatística significativa: teste ANOVA seguido de Tukey (** $p < 0,01$) em relação ao controle negativo.

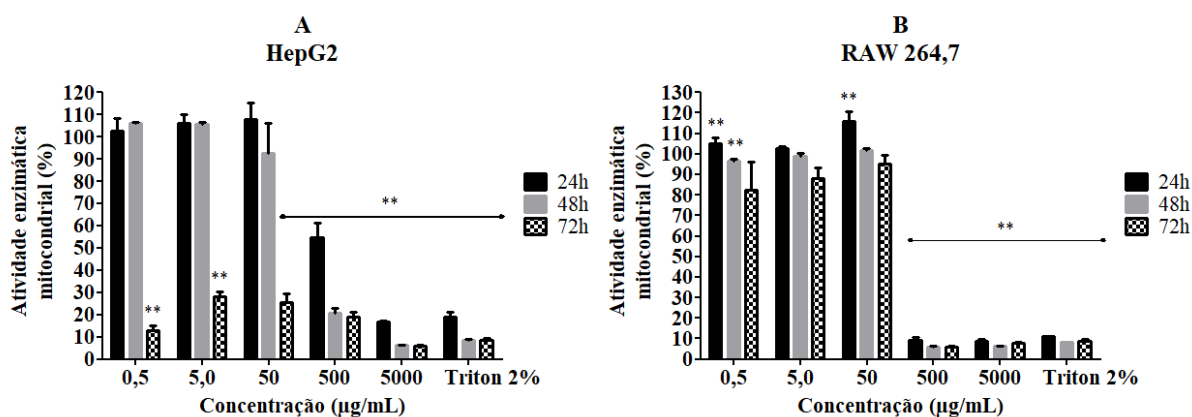
3.3.2 Resultados da viabilidade celular através de testes colorimétricos em cultura de células permanentes

3.3.2.1 Proliferação celular no teste colorimétrico WST-1

As amostras testadas foram capazes de alterar a proliferação celular em relação ao grupo controle de ambas as linhagens celulares utilizadas, de acordo com a metodologia aplicada. A presença de metabolismo mitocondrial, observado através da redução do sal tetrazólio em cristal formazan pela ação de enzimas desidrogenases, demonstrou que as culturas de HepG2 e RAW 264,7 foram capazes de se multiplicarem na presença dos extratos

dos corais invasores e do composto sintetizado, dependendo da concentração usada. As Figuras de 28 a 33 a seguir expressam os resultados encontrados.

Figura 28 – Proliferação celular pelo teste colorimétrico WST-1 das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de EbMTc



Valores percentuais expressos em média e desvio padrão das réplicas (n = 6). Diferença estatística significativa em relação ao controle negativo MEM ou DMEM (100%): teste ANOVA seguido de Dunnett (** $p < 0,01$).

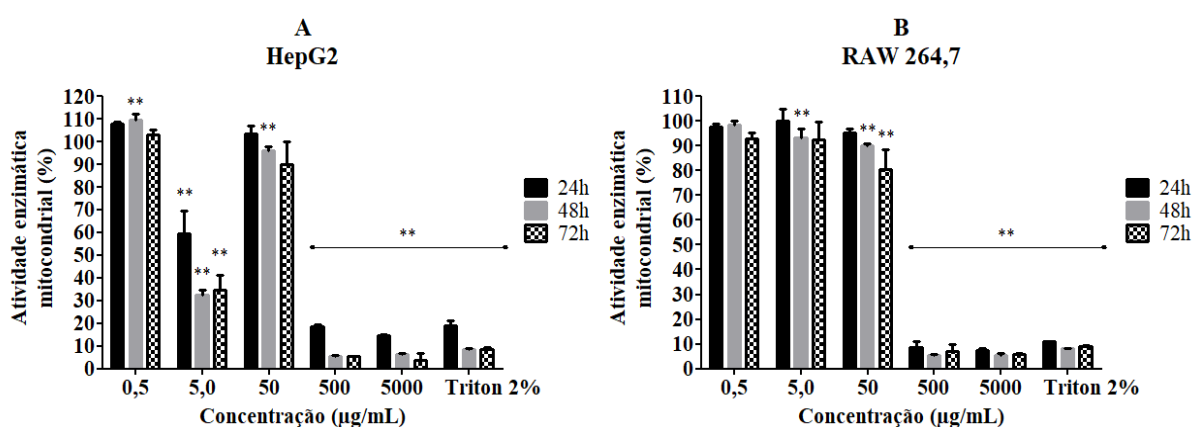
Na Figura 28, a amostra EbMTc demonstrou capacidade de gerar toxicidade para HepG2 em todas concentrações testadas em, pelo menos, um tempo de exposição. A cultura celular não foi capaz de crescer acima de 60%, em relação ao controle negativo, quando exposta às duas maiores concentrações (500 e 5000 µg/mL), independente do tempo de exposição. Esse efeito pode ser comparado ao controle positivo adotado, Triton X-100 a 2%, e corroborado pela análise estatística usada. O tempo de exposição demonstrou ser um fator importante pois, nas três menores concentrações (0,5; 5,0 e 50 µg/mL), a citotoxicidade também é observada em 72 h, apresentando proliferação abaixo de 30%.

Observa-se uma curva concentração-dependente para o período de tratamento de 24 h e para o tempo de 48 h. Considerando que todas as concentrações em 72 h promovam baixa proliferação para a linhagem HepG2, há um aumento da capacidade citotóxica entre as concentrações 5,0 e 5000 µg/mL, estabelecendo-se um padrão de curva concentração-dependente.

As células da linhagem RAW 264,7 nas duas maiores concentrações de EbMTc, não mantiveram valores próximos do grupo controle em nenhum período de tratamento, apresentando porcentagens equivalentes ao controle positivo. As três menores concentrações não demonstraram respostas citotóxicas em nenhum tempo de exposição.

Nota-se que o tempo de exposição de 72 h em HepG2 gera citotoxicidade em todas as concentrações testadas, embora o mesmo efeito não seja observado na linhagem RAW 264,7. Essa diferença provavelmente está relacionada com o metabolismo celular distinto dessas duas linhagens.

Figura 29 – Proliferação celular pelo teste colorimétrico WST-1 das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de EbMTt

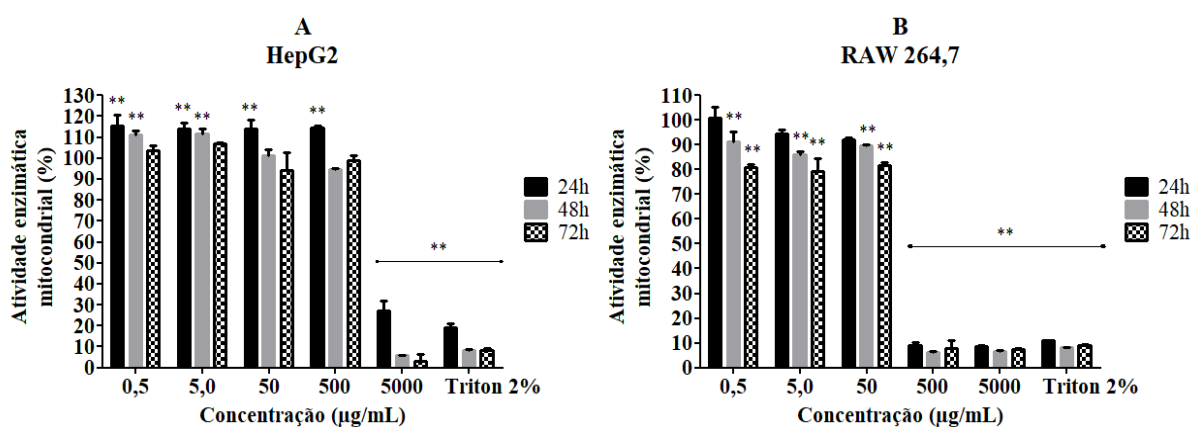


Valores percentuais expressos em média e desvio padrão das réplicas (n = 6). Diferença estatística significativa em relação ao controle negativo MEM ou DMEM (100%): teste ANOVA seguido de Dunnett (** $p < 0,01$).

Na Figura 29, as duas maiores concentrações usadas para EbMTt em HepG2 seguem o mesmo comportamento encontrado para EbMTc, nas mesmas condições. Em todos os tempos de exposição, as maiores concentrações mantiveram a proliferação celular abaixo de 20%, equiparando-se aos resultados encontrados no controle positivo. A concentração de 0,5 µg/mL não apresentou sinais de citotoxicidade em nenhum período. A concentração de 5,0 µg/mL apresentou capacidade citotóxica nos três tempos de exposição, mantendo a proliferação celular abaixo de 60%. Já a concentração seguinte, de 50 µg/mL, não promoveu tais efeitos, permanecendo em níveis de proliferação próximos do controle negativo.

Na linhagem RAW 264,7, as concentrações utilizadas apresentam os mesmos comportamentos nos tempos exposição em relação à amostra anterior. EbMTt não demonstrou capacidade de diminuir a proliferação abaixo de 80% para esta linhagem nas três menores concentrações em nenhum período. Entretanto, a análise estatística acusou diferença significativa na concentração de 50 µg/mL, para os tempos de 48 e 72 h, e na concentração de 5,0 µg/mL em 48 h de exposição. As concentrações de 500 e 5000 µg/mL inviabilizaram o crescimento celular em todos os tempos exposição.

Figura 30 – Proliferação celular pelo teste colorimétrico WST-1 das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de EbETc



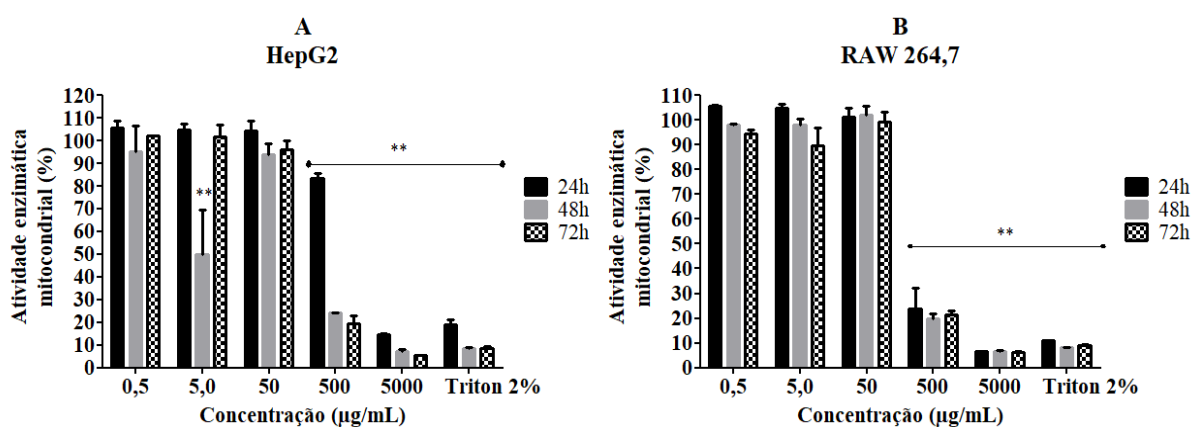
Valores percentuais expressos em média e desvio padrão das réplicas (n = 6). Diferença estatística significativa em relação ao controle negativo MEM ou DMEM (100%): teste ANOVA seguido de Dunnett (** $p < 0,01$).

A amostra EbETc (Figura 30) gerou atividade citotóxica somente na maior concentração testada para HepG2. A concentração de 5000 µg/mL apresenta níveis de proliferação celular abaixo de 30% em relação ao controle negativo, independentemente do tempo a que a linhagem HepG2 tenha sido exposta. A análise estatística corrobora essa observação. Todas as outras concentrações não promoveram efeitos tóxicos à cultura celular, independente do período de exposição, sustentando níveis equivalentes ao controle negativo. Aparentemente o tempo de exposição não foi um fator influenciador na citotoxicidade dessa amostra.

Apesar das outras concentrações (0,5; 5,0; 50 e 500 µg/mL) não promoverem respostas citotóxicas à linhagem HepG2, as porcentagens de proliferação em relação ao grupo controle (100%) no período mais curto de tratamento encontram-se acima de 110%. A análise estatística indica diferença para esses casos e, na mesma lógica, para as concentrações de 0,5 e 5,0 µg/mL no tempo de 48 h.

Para a linhagem RAW 264,7, as duas maiores concentrações demonstraram capacidade citotóxica em todos os períodos de tratamento utilizados. Nestas condições, os valores de porcentagem não ultrapassaram 15% em relação ao grupo controle, adquirindo ação semelhante ao agente citotóxico usado. As outras concentrações (0,5; 5,0 e 50 µg/mL) permaneceram em patamares próximos ao controle negativo (100%), variando entre 80 e 100%. Contudo, estas concentrações apresentam queda em relação ao grupo controle à medida em que o tempo de exposição à amostra EbETc aumenta.

Figura 31 – Proliferação celular pelo teste colorimétrico WST-1 das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de EbETt



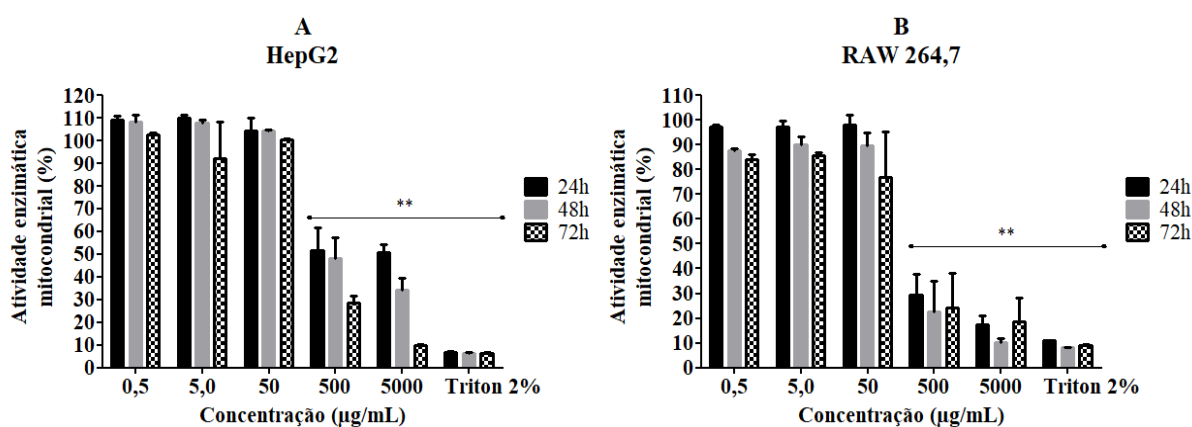
Valores percentuais expressos em média e desvio padrão das réplicas (n = 6). Diferença estatística significativa em relação ao controle negativo MEM ou DMEM (100%): teste ANOVA seguido de Dunnett (** $p < 0,01$).

O tratamento com EbETt (Figura 31), na concentração de 5000 µg/mL nos três períodos de exposição, segue os resultados encontrados das amostras anteriores, gerando citotoxicidade na linhagem HepG2. A concentração de 500 µg/mL também apresentou resposta tóxica evidente nos tempos de 48 e 72 h, com porcentagem abaixo de 25%. Já no período de 24 h, esta concentração demonstrou porcentagem acima de 80%, embora a análise estatística indique diferença significativa em relação ao controle negativo. A curva concentração-dependente é observada entre as concentrações de 50 e 5000 µg/mL em todos os tempos de exposição.

As três menores concentrações não apresentaram citotoxicidade, com exceção para a concentração de 5,0 µg/mL em 48 h de exposição, onde a porcentagem da proliferação celular atingiu 50%. A proliferação nesta concentração não permanece igual ou diminui no tempo de exposição seguinte, mas sim retorna a um nível não tóxico, com porcentagem em 100% e sem diferença estatística significativa em relação ao grupo controle.

A ação de EbETt na linhagem RAW 264,7 segue o comportamento geral observado nas amostras anteriores. As concentrações de 500 e 5000 µg/mL demonstram capacidade citotóxica em todos os períodos observados, cujas porcentagens de proliferação celular não ultrapassam 30% e 10%, respectivamente, em relação ao controle negativo. As menores concentrações utilizadas variaram entre 90% e 105% e não apresentaram diferença estatística significativa em nenhum tempo de exposição.

Figura 32 – Proliferação celular pelo teste colorimétrico WST-1 das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de APL01



Valores percentuais expressos em média e desvio padrão das réplicas (n = 6). Diferença estatística significativa em relação ao controle negativo MEM ou DMEM (100%): teste ANOVA seguido de Dunnett (** $p < 0,01$).

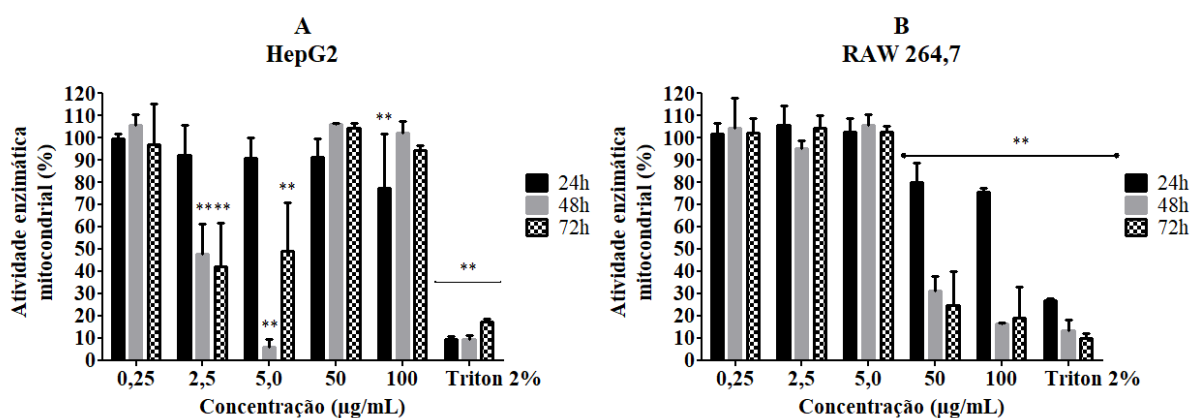
O alcaloide sintetizado APL01 induziu citotoxicidade (Figura 32) nas duas maiores concentrações testadas e em todos os períodos de tratamento, para a linhagem HepG2. As outras concentrações não apresentaram tal atividade, mesmo em períodos de exposição prolongados. A ausência de diferença estatística confirma essa observação, em que a porcentagem da proliferação celular em relação ao controle negativo manteve-se entre 90% e 110%.

A relação concentração-dependente está presente com redução entre as concentrações de 50 e 5000 µg/mL nos períodos de 48 e 72 h. Nesses tempos de exposição, observa-se uma intensificação da citotoxicidade, atingindo valores percentuais de proliferação celular em relação ao grupo controle abaixo de 35% e 10%, respectivamente.

A cultura de macrófagos RAW 264,7 apresentou semelhanças com a cultura de hepatocarcinoma humano. As concentrações de 500 e 5000 µg/mL promoveram ação citotóxica em todos os períodos de exposição e as menores concentrações permaneceram com porcentagens entre 80% e 100%, valores próximos do controle negativo de acordo com a análise estatística usada.

Nas condições onde houve atividade citotóxica, em que a análise estatística indicou diferença, a concentração de 500 µg/mL em 24 h apresentou a maior porcentagem de proliferação em ambas as linhagens. Entretanto, a média da porcentagem em HepG2 ficou em 50%, enquanto que em RAW 264,7 esse valor é de 30%.

Figura 33 – Proliferação celular pelo teste colorimétrico WST-1 das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de f-AcOEt, proveniente de EbMTc



Valores percentuais expressos em média e desvio padrão das réplicas (n = 6). Diferença estatística significativa em relação ao controle negativo MEM ou DMEM (100%): teste ANOVA seguido de Dunnett (** $p < 0,01$).

Na Figura 33, a amostra f-AcOEt, proveniente de EbMTc, demonstrou capacidade citotóxica para a linhagem HepG2. Entretanto, a maior concentração testada, 100 µg/mL, não foi a responsável por tal efeito. Os períodos de tratamento de 48 e 72 h não foram influentes para gerar resposta citotóxica, pois a proliferação celular manteve-se entre 95% e 105%, com exceção do período de tratamento de 24 h, cuja porcentagem média ficou um pouco abaixo de 80% e análise estatística indicou diferença em relação ao controle negativo. As concentrações de 2,5 e 5,0 µg/mL apresentaram proliferação abaixo de 50% nos tempos de 48 e 72 h, sinalizando citotoxicidade.

Observa-se um declínio da proliferação ao longo das concentrações onde o nível mais tóxico é na concentração de 5,0 µg/mL no tempo de 48 h. No período seguinte de 72 h, esta concentração tem sua proliferação aumentada, porém não a ponto de ser semelhante ao controle negativo. Neste caso, a associação entre tempo de exposição prolongado e aumento da citotoxicidade não fora observada. Já no período de 24 h, observa-se uma relação concentração-dependente ao longo das concentrações.

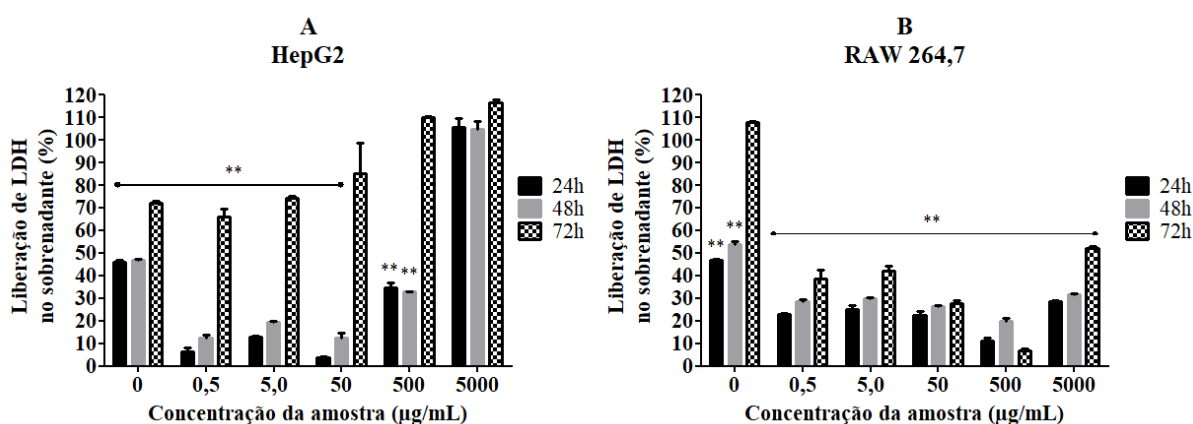
Na linhagem RAW 264,7, a amostra f-AcOEt apresentou potencial citotóxico nas duas maiores concentrações (50 e 100 µg/mL), cujas porcentagens de proliferação celular em relação ao grupo controle nos tempos de 48 e 72 h estiveram abaixo de 30%, com valores semelhantes aos encontrados pela ação de Triton-X a 2%. Já em relação ao tempo de 24 h, essas concentrações apresentaram resultados entre 75% e 80%, mas diferentes estatisticamente do controle negativo. As menores concentrações (0,25; 2,5 e 5,0 µg/mL) não

provocaram respostas positivas para citotoxicidade em nenhum período de tratamento utilizado.

3.3.2.2 Viabilidade celular no teste colorimétrico LDH

O ensaio para detectar a atividade citotóxica das amostras através da reação com a enzima LDH demonstrou resultados positivos. A presença de LDH no meio extracelular é um indicativo de que a membrana citoplasmática sofreu algum tipo de lesão, levando ao extravasamento do conteúdo intracelular, ou ocorreu lise celular. Ambos os casos levam à morte da célula, o que permite associar a citotoxicidade observada com a ação das amostras. As Figuras de 34 a 39 a seguir ilustram os resultados encontrados.

Figura 34 – Citotoxicidade celular avaliada pelo teste colorimétrico LDH das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de EbMTc



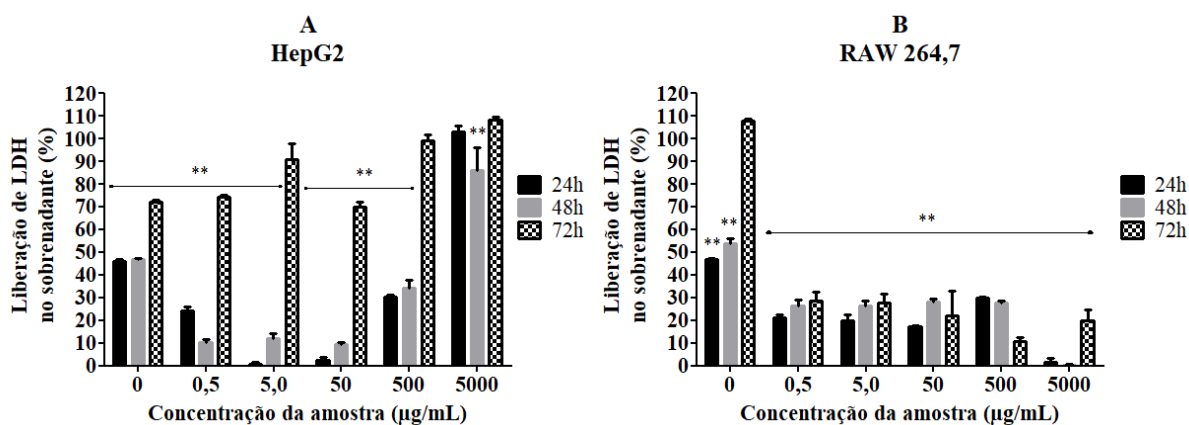
Valores percentuais expressos em média e desvio padrão das réplicas (n = 6). Diferença estatística significativa em relação ao controle positivo Triton X-100 a 2% (100%): teste ANOVA seguido de Dunnett (** $p < 0,01$).

O tratamento da linhagem HepG2 com EbMTc (Figura 34) gerou citotoxicidade na maior concentração usada (5000 µg/mL) em todos os tempos de exposição, tendo resultados semelhantes ao grupo controle aplicado, Triton X-100 a 2% (100%). A ação da amostra causando dano à membrana citoplasmática também foi observada nas concentrações de 50 e 500 µg/mL no período mais longo de tratamento, cujas porcentagens estabeleceram-se entre 85% e 110%. As concentrações de 0,5 e 5,0 µg/mL não demonstraram tal efeito em nenhum

tempo de exposição. A relação concentração-dependente é observada nos três tempos de exposição.

As células da linhagem RAW 264,7 não apresentaram dano à membrana plasmática em nenhuma concentração testada independente do tempo a que foram expostas à amostra EbMTc. As porcentagens de citotoxicidade não ultrapassaram 55% para as condições adotadas. Entre as concentrações de 0,5 e 500 $\mu\text{g/mL}$, observa-se uma curva concentração-dependente nos três períodos de tratamento.

Figura 35 – Citotoxicidade celular avaliada pelo teste colorimétrico LDH das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de EbMTt

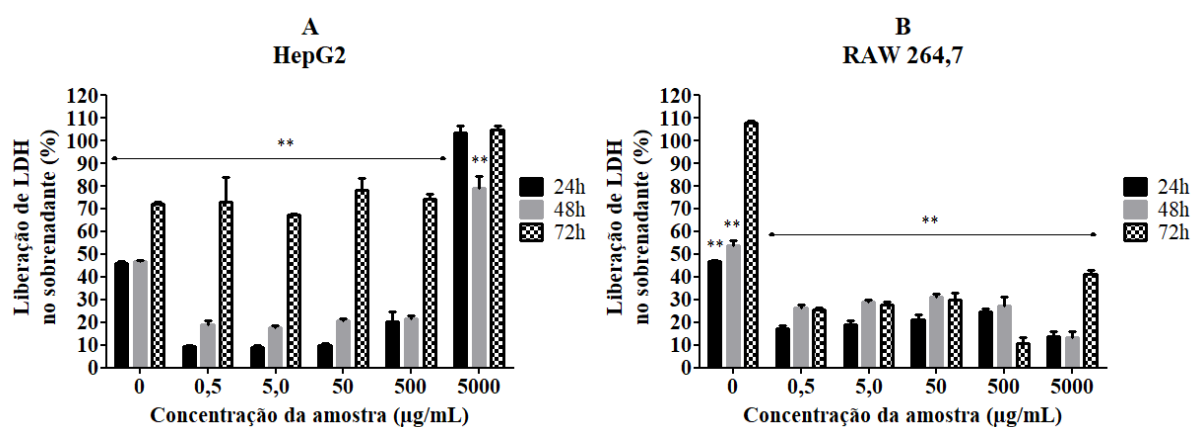


Valores percentuais expressos em média e desvio padrão das réplicas ($n = 6$). Diferença estatística significativa em relação ao controle positivo Triton X-100 a 2% (100%): teste ANOVA seguido de Dunnett (** $p < 0,01$).

Na Figura 35, a amostra EbMTt provocou dano à membrana plasmática nas células da linhagem HepG2 na maior concentração testada nos tempos de exposição de 24 e 72 h e nas concentrações de 5,0 e 500 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 72 h, cujas porcentagens de citotoxicidade mantiveram-se entre 90% e 100%. Fora estas situações, as outras concentrações não foram capazes de gerar resposta tóxica nos períodos usados. Observa-se uma curva concentração-dependente em todos os períodos de tratamento com aumento do dano celular ao longo de todas as concentrações.

Para a linhagem RAW 264,7, a amostra não apresentou atividade citotóxica quando comparada ao controle positivo usado. A porcentagem de citotoxicidade para o ensaio com LDH manteve-se abaixo de 30% para todas as concentrações em todos os tempos de exposição. A relação concentração-dependente não foi observada para EbMTt em linhagem de macrófagos.

Figura 36 – Citotoxicidade celular avaliada pelo teste colorimétrico LDH das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de EbETc

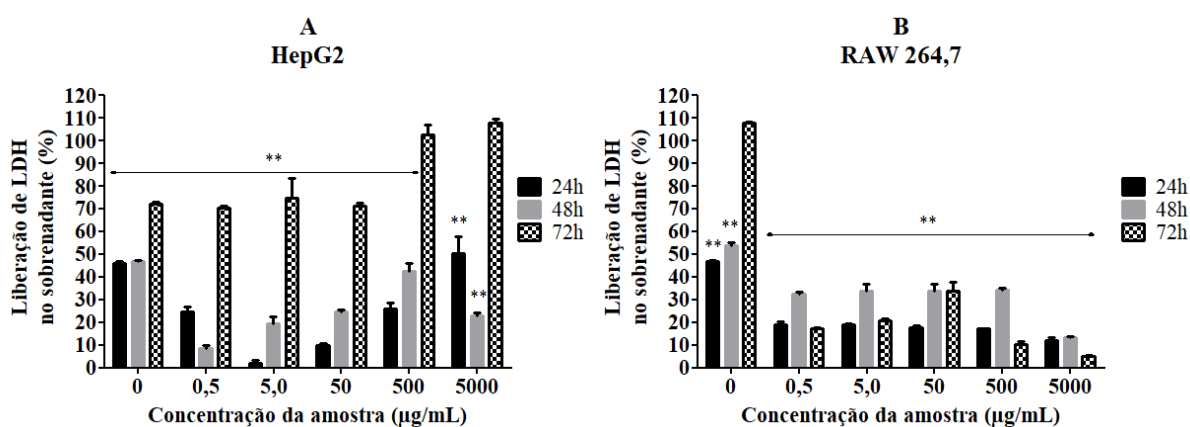


Valores percentuais expressos em média e desvio padrão das réplicas (n = 6). Diferença estatística significativa em relação ao controle positivo Triton X-100 a 2% (100%): teste ANOVA seguido de Dunnett (** $p < 0,01$).

Na Figura 36, a maior concentração de EbETc segue o comportamento geral encontrado nas amostras anteriores, promovendo citotoxicidade para a linhagem de hepatocarcinoma humano em todos os períodos de tratamento, exceto para o período de 48 h. Neste caso, a porcentagem esteve abaixo de 80%, apresentando diferença estatística significativa em relação ao controle positivo. As demais concentrações não demonstraram resposta tóxica em nenhum tempo de exposição. A curva concentração-resposta não foi observada em EbETc para esta linhagem.

O tratamento da linhagem RAW 264,7 apresentou o mesmo comportamento observado nas amostras anteriores, em que não houve associação com atividade citotóxica nas condições testadas. Os valores percentuais mantiveram-se abaixo de 45%. Porém, esses valores aumentam conforme o aumento das concentrações, o que gera uma relação concentração-dependente em todos os períodos de exposição.

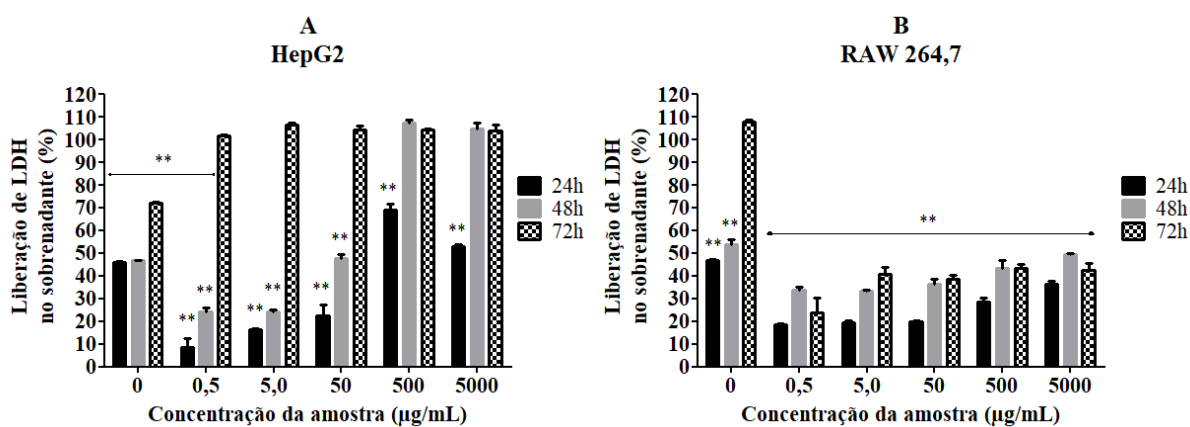
Figura 37 – Citotoxicidade celular avaliada pelo teste colorimétrico LDH das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de EbETt



Valores percentuais expressos em média e desvio padrão das réplicas (n = 6). Diferença estatística significativa em relação ao controle positivo Triton X-100 a 2% (100%): teste ANOVA seguido de Dunnett (** $p < 0,01$).

A amostra EbETt (Figura 37) demonstrou capacidade de induzir dano à membrana plasmática em células da linhagem HepG2 apenas nas duas maiores concentrações testadas (500 e 5000 µg/mL) no tempo de exposição de 72 h, atingindo valores próximos de 100%. Nos tratamentos em 24 e 48 h há um aumento da citotoxicidade em função da concentração, caracterizando uma relação concentração-resposta. Respostas positivas não foram encontradas para esta atividade na linhagem RAW 264,7 em nenhuma concentração testada submetidas a qualquer período de tratamento.

Figura 38 – Citotoxicidade celular avaliada pelo teste colorimétrico LDH das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de APL01

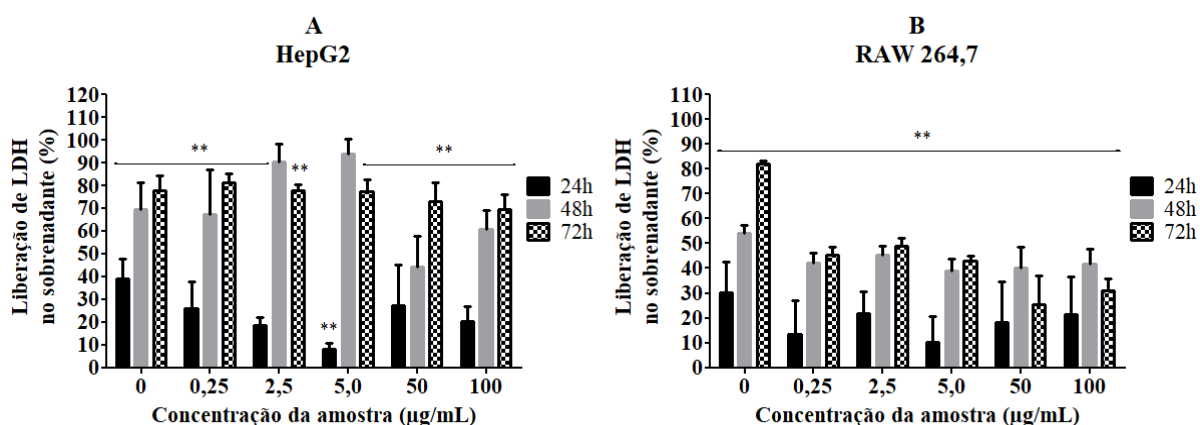


Valores percentuais expressos em média e desvio padrão das réplicas (n = 6). Diferença estatística significativa em relação ao controle positivo Triton X-100 a 2% (100%): teste ANOVA seguido de Dunnett (** $p < 0,01$).

O tratamento com APL01 (Figura 38) resultou em efeitos citotóxicos pela via de indução de dano à membrana citoplasmática na linhagem HepG2. No tempo de exposição de 72 h, todas as concentrações apresentaram tal capacidade, visto que os valores percentuais atingem 100%, sendo equivalentes aos resultados encontrados no tratamento com Triton X-100 (100%). No período de 48 h, as duas maiores concentrações (500 e 5000 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram citotoxicidade, com a média das porcentagens semelhante ao controle positivo. Já no período de 24 h, não se observou nenhuma resposta positiva para essa atividade. A curva concentração-resposta é observada nos tempos de exposição de 24, 48 e 72 h, embora haja uma queda na porcentagem no período mais curto de 70% a 50%, aproximadamente, entre as concentrações de 500 e 5000 $\mu\text{g/mL}$.

Na linhagem de macrófagos RAW 264,7, a amostra APL01 não promoveu citotoxicidade em nenhuma concentração utilizada, em nenhum tempo de exposição. As porcentagens permaneceram abaixo de 50%, porém aumentam em função do aumento das concentrações, evidenciando uma relação concentração-resposta, principalmente nos tratamentos de 24 e 48 h de duração.

Figura 39 – Citotoxicidade celular avaliada pelo teste colorimétrico LDH das linhagens celulares HepG2 (A) e RAW 264,7 (B) na presença de f-AcOEt, proveniente de EbMTc



Valores percentuais expressos em média e desvio padrão das réplicas (n = 6). Diferença estatística significativa em relação ao controle positivo Triton X-100 a 2% (100%): teste ANOVA seguido de Dunnett (** $p < 0,01$).

A fração derivada do extrato de *T. coccinea*, f-AcOEt (Figura 39), apresentou capacidade de gerar dano na membrana plasmática de células da linhagem HepG2. No tratamento em 48 h, f-AcOEt demonstrou respostas positivas a esse efeito nas concentrações

de 2,5 e 5,0 µg/mL, atingindo percentuais de 90% de citotoxicidade. Os períodos de 24 e 72 h não apresentaram atividade citotóxica em nenhuma concentração testada.

O efeito de f-AcOEt na linhagem RAW 264,7 seguiu o comportamento das amostras anteriores, apresentando respostas negativas para citotoxicidade. Nenhuma concentração em nenhum tratamento foi capaz de induzir dano à membrana plasmática nos macrófagos e, por conseguinte, não intensificou a reação com a enzima LDH presente no meio intracelular.

3.3.3 Resultados da formação de micronúcleo em linhagens celulares

A genotoxicidade das amostras EbMTc, EbMTt, EbETc, EbETt e APL01 foi analisada em diferentes concentrações (0,05; 0,5; 5; 50 e 500 µg/mL) quanto a sua capacidade de induzir a formação de micronúcleo nas linhagens HepG2 e RAW 264,7. Micronúcleos constituem-se de cromossomos fragmentados ou inteiros e são formados durante a mitose por ação de agentes clastogênicos ou aneugênicos. As células contendo aberrações cromossomais têm esses erros transmitidos para as células filhas pois esse material genético defeituoso não interage com o fuso mitótico na fase de transição entre metáfase e anáfase. Como resultado, forma-se um núcleo de tamanho reduzido que pode ser visualizado tanto em células em divisão (binucleadas) quanto em células na interfase (mononucleadas). A Tabela 11 demonstra os resultados obtidos nesse ensaio.

A capacidade genotóxica não foi observada para nenhuma amostra em nenhuma concentração testada, uma vez que não houve aumento da FMN em relação ao controle negativo em nenhuma condição. A ausência de diferença estatística significativa corrobora a resposta negativa. A maior concentração usada (500 µg/mL) gerou citotoxicidade pois a presença de células nas lamínulas não foi confirmada por análise em microscopia de luz.

Tabela 11 – Indução de formação de micronúcleo em linhagens celulares pelas amostras de EbMTc, EbMTt, EbETc, EbETt e APL01

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	FMN (%) \pm DP	
		HepG2	RAW 264,7
EbMTc	CN	1,00 \pm 0,0	0,75 \pm 0,35
	CP	8,28 \pm 1,58**	4,74 \pm 0,31**
	0,05	0,25 \pm 0,35	0,50 \pm 0,0
	0,5	0,75 \pm 0,35	0,50 \pm 0,0
	5,0	1,09 \pm 0,13	0,54 \pm 0,05
	50	0,45 \pm 0,63	0,51 \pm 0,72
	500	-	-
EbMTt	0,05	0,25 \pm 0,35	0,50 \pm 0,0
	0,5	0,25 \pm 0,35	0,50 \pm 0,0
	5,0	0,50 \pm 0,71	0,51 \pm 0,01
	50	0,28 \pm 0,39	0,82 \pm 0,39
	500	-	-
EbETc	0,05	0,52 \pm 0,02	0,50 \pm 0,0
	0,5	0,51 \pm 0,01	0,50 \pm 0,0
	5,0	1,03 \pm 0,39	0,56 \pm 0,02
	50	1,24 \pm 0,80	0,61 \pm 0,86
	500	-	-
EbETt	0,05	0,50 \pm 0,0	0,50 \pm 0,0
	0,5	0,50 \pm 0,0	0,50 \pm 0,0
	5,0	0,76 \pm 0,34	0,75 \pm 0,35
	50	0,83 \pm 0,33	0,76 \pm 0,34
	500	-	-
APL01	0,05	0,75 \pm 0,35	0,50 \pm 0,0
	0,5	1,58 \pm 1,53	0,50 \pm 0,0
	5,0	0,25 \pm 0,35	1,04 \pm 0,05
	50	0,64 \pm 0,0	0,33 \pm 0,47
	500	-	-

Valores expressos em média e desvio padrão (DP) da frequência de micronúcleos em 1000 células binucleadas (FMN %). CN: controle negativo (MEM para HepG2. DMEM para RAW 264,7). CP: controle positivo (MNNG a 0,5 μM). (-): ausência de células. Diferença estatística significativa em relação ao controle negativo: teste ANOVA seguido de Tukey (** $p < 0,01$).

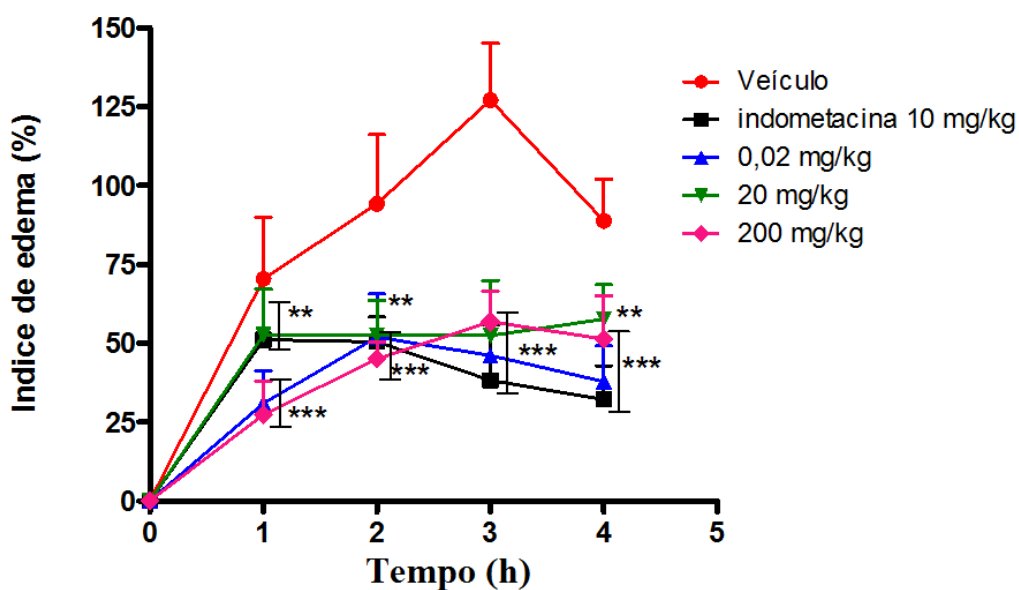
3.4 Análises sobre atividade anti-inflamatória

3.4.1 Resultados do potencial anti-inflamatório pelo modelo de indução de edema em pata de camundongo

Os resultados foram expressos em porcentagem do índice de edema em função do tempo (h). As Figuras 40 e 41 representam as amostras de EbMTc e EbMTt, respectivamente. Em ambas as figuras, o pico máximo de indução de edema gerado pela carragenina ficou na terceira hora, representado na curva do controle negativo (veículo).

As doses utilizadas de EbMTc demonstraram atividade anti-inflamatória a partir da primeira hora (t_1), que se manteve até o final do experimento (t_4). Todas as doses foram capazes de diminuir a indução do edema de forma semelhante ao controle positivo indometacina. Todas as doses mantiveram diferença estatística significativa em relação ao controle negativo durante todo o experimento.

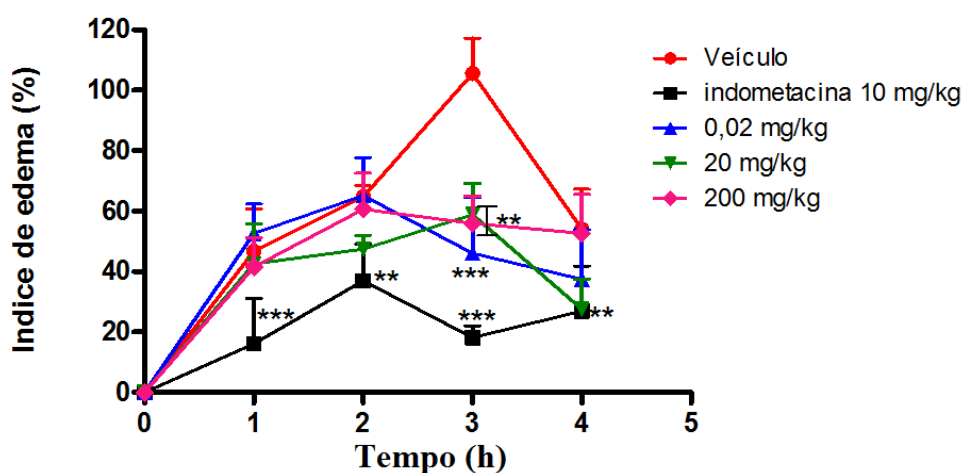
Figura 40 – Avaliação da atividade de EbMTc no modelo de edema de pata induzida por injeção intraplantar de carragenina



Grupos de camundongos SW macho (5/grupo) foram tratados com o veículo (etanol 15%; 1,25% Tween 20 em água destilada), como controle negativo, ou extrato (0,02; 20 e 200 mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg) por via i.p.. Os resultados expressam média \pm desvio padrão (** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$) em relação ao Veículo (teste ANOVA seguido de Dunnett).

Com EbMTt, no pico da inflamação gerada por carragenina (t_3), todas as doses apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle negativo (veículo), mas não produziram um efeito igual ou maior do que a indometacina. A dose que demonstrou melhor desempenho nesta amostra foi a de 20 mg/kg, visto que foi a única que manteve o índice de edema menor em relação ao veículo nos tempos t_3 e t_4 , sendo esta observação confirmada pela presença de diferença estatística significativa. Nenhuma dose conseguiu melhores resultados que a indometacina ao longo do experimento, exceto a de 20 mg/kg em t_4 , cujos resultados foram semelhantes.

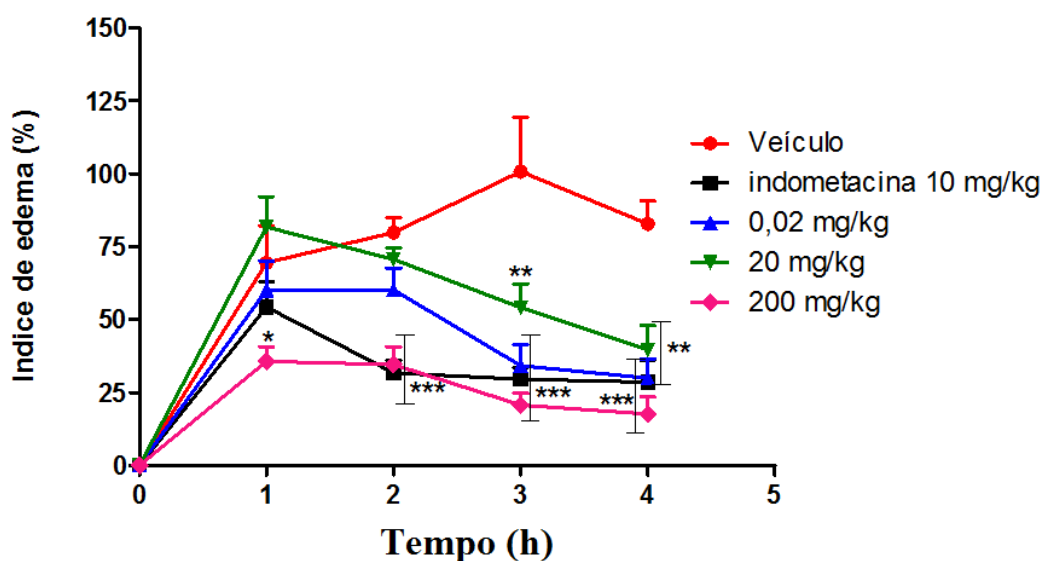
Figura 41 – Avaliação da atividade de EbMTt no modelo de edema de pata induzida por injeção intraplantar de carragenina



Grupos de camundongos SW macho (5/grupo) foram tratados com o veículo (etanol 15%; 1,25% Tween 20 em água destilada), como controle negativo, ou extrato (0,02; 20 e 200 mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg) por via i.p.. Os resultados expressam média \pm desvio padrão (** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$) em relação ao Veículo (teste ANOVA seguido de Dunnett).

A amostra APL01 demonstrou resultados positivos para as três doses utilizadas. Na Figura 42, observa-se uma relação dose-resposta, com exceção da dose de 20 mg/kg, que obteve o pior desempenho na redução do edema, em relação às concentrações de 0,02 e 200 mg/kg. A concentração de 200 mg/kg foi a mais eficiente na redução do edema e obteve resultados melhores do que o controle positivo em t_1 , sendo as demais respostas semelhantes ao controle positivo. A concentração de 0,02 mg/kg teve comportamento semelhante ao da indometacina, exceto em t_2 , em que se observa uma eficácia maior do efeito anti-inflamatório no controle positivo. Todas as concentrações foram capazes de reduzir o edema gerado pela carragenina no pico do edema.

Figura 42 – Avaliação da atividade de APL01 no modelo de edema de pata induzida por injeção intraplantar de carragenina

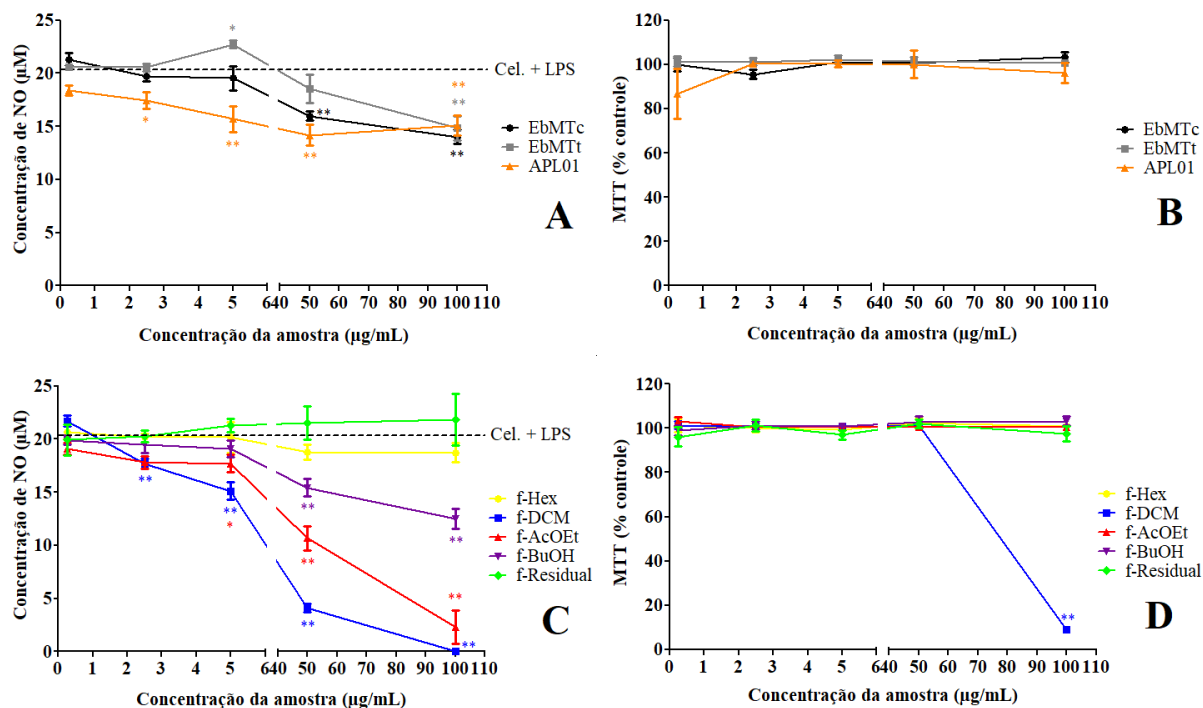


Grupos de camundongos SW macho (5/grupo) foram tratados com o veículo (etanol 15%; 1,25% Tween 20 em água destilada), como controle negativo, ou extrato (0,02; 20 e 200 mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg) por via i.p.. Os resultados expressam média \pm desvio padrão (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$) em relação ao Veículo (teste ANOVA seguido de Dunnett).

3.4.2 Resultados da liberação de NO por linhagem de macrófago RAW 264,7

O NO é um mediador do processo inflamatório e sua liberação é uma das funções exercidas pelos macrófagos. Dentre as diversas ações que possui no organismo, o óxido nítrico age no estímulo à vasodilatação, etapa importante para locomoção de células de defesa, e executa atividade antimicrobiana através da ação de espécies ativas de nitrogênio. Esta molécula é altamente instável e converte-se em nitrito e nitrato em poucos segundos. Sua detecção pode ser realizada pela reação de Griess, onde o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido, gerando diazocomposto, que por sua vez, irá reagir com N-naftil etilenodiamino, gerando um composto de coloração vermelha. A Figura 43 apresenta os resultados encontrados para as amostras analisadas.

Figura 43 – Concentração de nitrito gerado por macrófagos estimulados por LPS e sobrevivência, respectivamente, na presença de extratos brutos e alcaloide sintetizado (A e B) e frações derivadas de EbMTc (C e D)



Valores expressos em média e desvio padrão. Diferença estatística significativa em relação ao grupo controle de macrófagos estimulados por LPS (Cel. + LPS): teste ANOVA seguido de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Nota-se que a ação dos extratos brutos, EbMTc e EbMTt, sobre a diminuição da liberação de NO ocorreu nas duas maiores concentrações (50 e 100 µg/mL), sendo EbMTc com melhor desempenho (50 µg/mL). Porém, a ação de APL01 foi mais efetiva do que os extratos brutos nas primeiras concentrações. A análise estatística corrobora essas observações. Em 100 µg/mL, as três amostras apresentaram respostas semelhantes entre si. Não houve indícios de morte de macrófagos em nenhuma concentração testada para essas amostras no ensaio de sobrevivência com MTT.

A análise da resposta anti-inflamatória gerada pelas frações de EbMTc demonstrou efeitos mais fortes em relação à amostra de origem e ao alcaloide sintetizado. As frações f-Hex, f-DCM, f-AcOEt e f-BuOH foram capazes de diminuir a liberação de NO nas duas maiores concentrações, com destaque para f-DCM e f-AcOEt que atingiram níveis de NO próximos a zero. Entretanto, na análise de sobrevivência no ensaio com MTT, f-DCM apresentou sinais de citotoxicidade na concentração de 100 µg/mL, o que sugere que a provável diminuição da liberação de NO ocorreu devido à morte celular. Logo, f-AcOEt foi a

amostra que apresentou melhor desempenho neste ensaio, pois reduziu a produção de NO sem interferir na viabilidade celular.

3.5 Análises da atividade tripanocida

O estudo *in vitro* fenotípico com EbMTc e EbMTt foi realizado para avaliar a atividade dessas amostras sobre formas tripomastigotas sanguíneas (linhagem Y) e suas toxicidades correspondentes sobre células mamíferas hospedeiras (células cardíacas) (Tabela 12). A análise dos resultados demonstrou que após um curto período de incubação (2 h) nenhuma amostra foi ativa. Após um período de 24 h de incubação, os EbMs de ambas as espécies de corais mostraram valores de EC₅₀ de 135 µg/mL para EbMTc e 153 µg/mL para EbMTt e somente o BZ exibiu valores de EC₅₀ abaixo de 5 µg/mL. A ação tóxica das amostras foi avaliada usando concentrações crescentes nas células hospedeiras, de forma que se excluía as concentrações que apresentavam essa característica. Para essa análise avaliaram-se os aspectos morfológicos, contractibilidade (para células cardíacas) e análise de densidade, assim como viabilidade celular através de ensaio colorimétrico (Presto-Blue). Estudos de viabilidade celular usando Presto-Blue (células cardíacas) e Alamar-Blue (linhagem L929) mostraram que após 24-96 h nenhuma amostra testada apresentou toxicidade detectável até 200 µg/mL. Entretanto, a microscopia óptica revelou uma perda parcial da densidade celular nas concentrações acima de 100 µg/mL (Tabelas 12 e 13). Nenhuma das amostras exibiu IS superior ao apresentado por BZ (Tabela 12).

Tabela 12 – Atividade *in vitro* de EbMTc, EbMTt e BZ nas formas tripomastigotas da linhagem Y e cultura de células cardíacas

Compostos	EC ₅₀ (média ± DP) µg/mL		EC ₉₀ (média ± DP) µg/mL		LC ₅₀	IS* 24 h
	2 h	24 h	2 h	24 h	24 h	
BZ	>200	3,5 ± 1,6	>200	23 ± 0	>52	>15
EbMTc	>200	135 ± 7,1	>200	187 ± 1,4	>200	>1,5
EbMTt	>200	153 ± 0	>200	193 ± 0	>200	>1,3

Baseado no EC₅₀ de 24 h. Valores de EC₅₀ e EC₉₀ após 2 e 24 h, valores de LC₅₀ com incubação à 37°C e seus correspondentes IS.

Ensaio foram conduzidos para analisar a atividade tripanocida nas formas intracelulares de *T. cruzi*, usando outra linhagem do parasito, a linhagem Tulahuen transfectada com β -galactosidase. Para isso, essa atividade foi avaliada após 96 h de incubação para cada amostra, seguindo Romanha e colaboradores (2010), com alterações. Os resultados demonstraram que a incubação com células L929 infectadas por 96 h à 37°C, usando concentrações não tóxicas (até 200 $\mu\text{g/mL}$) de cada extrato resultou em uma atividade menos intensa quando comparada ao BZ, assim como o IS (Tabela 13).

Tabela 13 – Atividade (EC_{50}) e IS de EbMTc, EbMTt e BZ em linhagens celulares L929 infectadas com *T. cruzi* (linhagem Tulahuen transfectada com gene da β -galactosidase) após 96 h de infecção

Compostos	EC_{50} (média \pm DP) $\mu\text{g/mL}$	LC_{50}	IS
BZ	$1,8 \pm 1$	>52	>29
EbMTc	$>100 \pm 0$	>200	>2
EbMTt	$>100 \pm 0$	>200	>2

Valor de LC_{50} de cada amostra e seus correspondentes IS.

Para excluir a possibilidade de efeitos diferentes devido a formas distintas do parasito (tripomastigotas sanguíneos e amastigotas intracelulares presentes em células hospedeiras), avaliou-se a ação das amostras em formas amastigotas extracelulares obtidas a partir do sobrenadante de culturas de células cardíacas. Após 48 h de incubação, com concentrações crescentes de cada amostra, nenhuma atividade foi observada até a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 14).

Tabela 14 – Atividade *in vitro* das amostras de EbMTc, EbMTt em formas amastigotas da linhagem Y

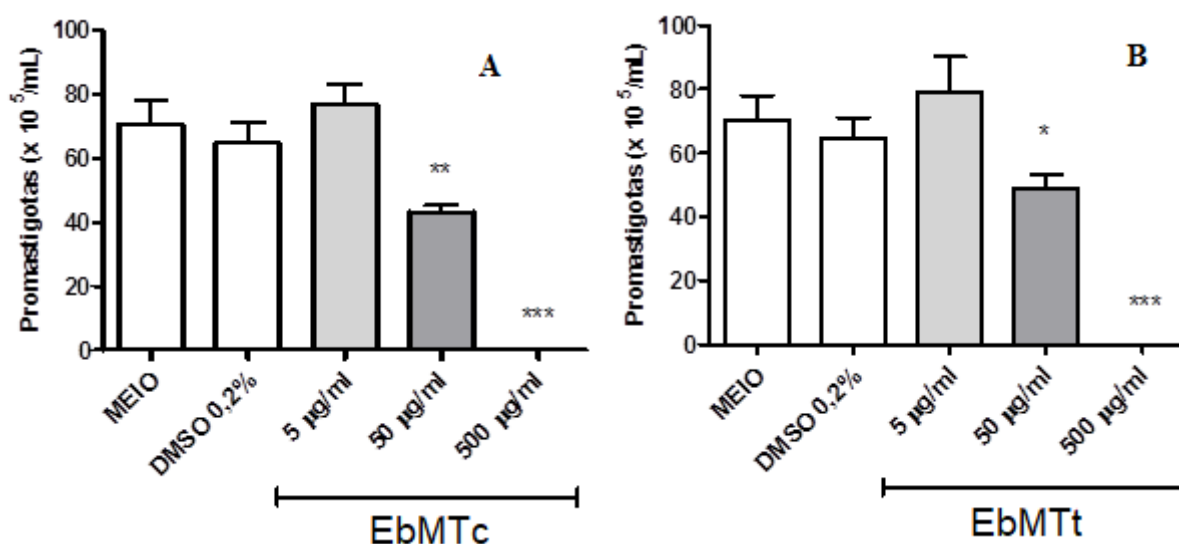
Compostos	EC_{50} (média \pm DP) $\mu\text{g/mL}$	LC_{50}	IS
EbMTc	$>200 \pm 0$	>200	>1
EbMTt	$>200 \pm 0$	>200	>1

Valores de EC_{50} após 48 h, valores de LC_{50} com incubação à 37°C e seus correspondentes IS.

3.6 Análises da atividade leishmanicida

Para a análise da ação leishmanicida das amostras de EbMTc e EbMTt, investigou-se a atividade sobre as formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. A viabilidade das células foi avaliada após 72 h de cultivo com diferentes concentrações das amostras (5, 50 e 500 µg/mL) através da contagem de parasitos viáveis em microscópio óptico, com câmara de Neubauer. Os resultados (Figura 44) mostraram-se positivos para esta atividade. No tratamento com EbMTc (Figura 44 A) houve redução do número de promastigotas viáveis de 33% na concentração de 50 µg/mL ($p < 0,01$) e de 100% a 500 µg/mL ($p < 0,001$) em relação ao controle negativo (DMSO), enquanto que no tratamento com EbMTt (Figura 44 B) a redução foi de 24% na concentração de 50 µg/mL ($p < 0,1$) e também 100% a 500 µg/mL ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os valores dos controles com meio de cultura e DMSO. Observou-se que a concentração de 500 µg/mL das amostras foi capaz de matar todos os parasitos tratados.

Figura 44 – Avaliação da viabilidade de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* tratadas com EbMTc (A) e EbMTt (B)

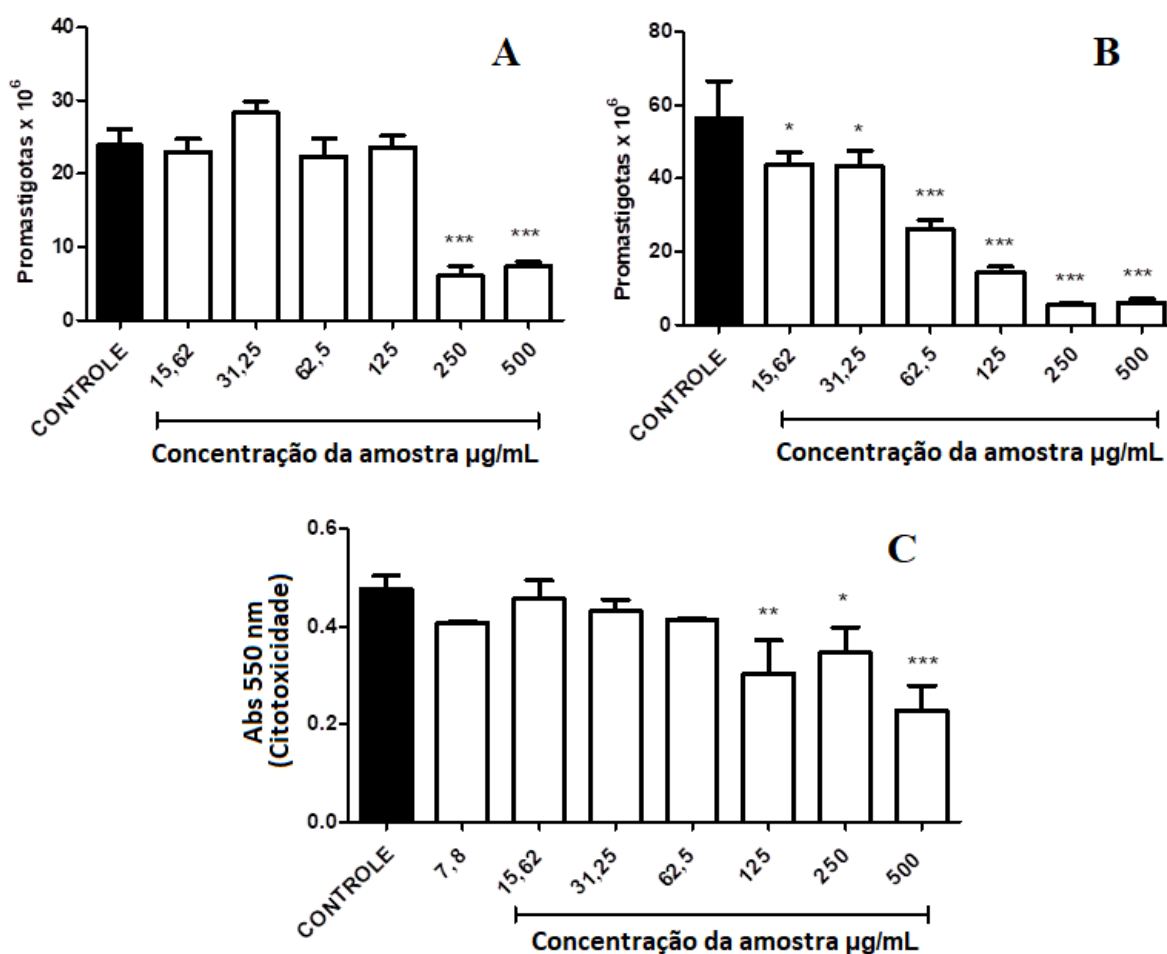


Controles foram parasitos cultivados na presença ou ausência de DMSO a 0,2%. Diferença estatística significativa em relação ao grupo controle: teste ANOVA seguido de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

A amostra com melhor efeito, EbMTc, foi analisada em uma segunda etapa. A atividade leishmanicida foi verificada sobre as formas promastigotas em dois tempos de exposição, 48 e 72 h, e sua citotoxicidade sobre a linhagem de monócito THP-1 foi

observada. A Figura 45 expressa os resultados encontrados. No tratamento de 48 h, observa-se uma redução significativa do número de promastigotas viáveis a partir da concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$. Em 72 h, essa redução inicia-se na menor concentração adotada (15,62 $\mu\text{g/mL}$) e gera-se uma relação concentração-dependente. O cálculo da IC_{50} para ambos os tratamentos sugere uma potencialização do efeito leishmanicida relacionada ao aumento da concentração e do tempo de exposição, visto que o seu valor diminui de 245 $\mu\text{g/mL}$, em 48 h, para 58 $\mu\text{g/mL}$, em 72 h. O efeito citotóxico gerado em 18 h em monócitos THP-1 foi observado a partir de 125 $\mu\text{g/mL}$, porém, o valor de LC_{50} foi maior que 500 $\mu\text{g/mL}$. Com os valores de IC_{50} dos dois tratamentos menores que a LC_{50} , pode-se inferir que a amostra EbMTc foi mais seletiva para os protozoários do que para a célula hospedeira.

Figura 45 – Avaliação da viabilidade de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* tratadas com EbMTc durante 48 h (A) e 72 h (B), e citotoxicidade em monócitos (C)



Controles foram parasitos (A e B) e monócitos © cultivados na presença ou ausência de DMSO a 0,2%. Diferença estatística significativa em relação ao grupo controle: teste ANOVA seguido de Tukey (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

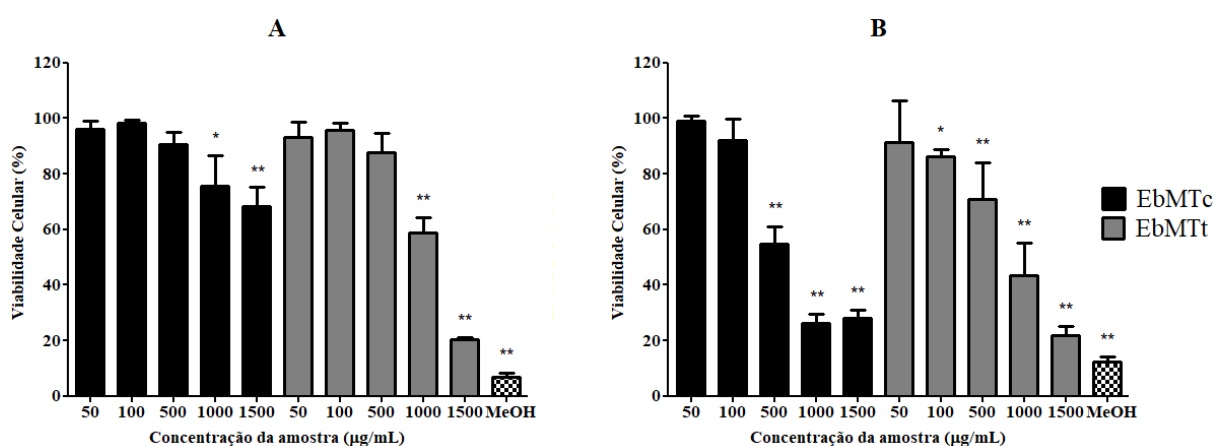
3.7 Análises da atividade antimicrobiana

3.7.1 Resultados de citotoxicidade com teste colorimétrico com MTT

As amostras EbMTc e EbMTt apresentaram sinais de citotoxicidade no teste colorimétrico com MTT para as linhagens celulares HepG2 e Caco-2, sendo EbMTt a amostra mais citotóxica (Figura 46). Em HepG2, a resposta citotóxica foi observada a partir de 1000 µg/mL para ambas as amostras, onde EbMTt apresentou efeito mais forte em relação à EbMTc, com porcentagens de viabilidade celular nessa concentração de 59% e 68%, respectivamente. A concentração de 1500 µg/mL de EbMTt resultou na menor viabilidade celular, atingindo 20% em relação ao controle negativo (Figura 46 A).

A linhagem Caco-2 apresentou maior sensibilidade às amostras do que HepG2. O efeito citotóxico foi observado a partir de 500 µg/mL para EbMTc e de 100 µg/mL para EbMTt, de acordo com a análise estatística adotada. Em EbMTc, a concentração de 500 µg/mL apresentou 55% de viabilidade e as duas maiores concentrações promoveram uma viabilidade abaixo de 30% em relação ao grupo controle. Já em EbMTt, observou-se uma relação concentração-dependente, cujo maior efeito observado, em 1500 µg/mL, gerou 22% de viabilidade. A concentração de 100 µg/mL resultou em 86% de viabilidade, porém, com diferença estatística associada.

Figura 46 – Viabilidade celular pelo teste colorimétrico MTT das linhagens celulares HepG2 (A) e Caco-2 (B) na presença das amostras EbMTc e EbMTt



Valores percentuais expressos em média e desvio padrão. Diferença estatística significativa em relação ao controle negativo (100%): teste ANOVA seguido de Dunnett (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

3.7.2 Resultados da avaliação qualitativa e quantitativa

As amostras testadas para essa atividade não apresentaram capacidade de inibir o crescimento de nenhuma cepa testada, exceto a cepa *S. pyogenes* (8668) na presença de EbMTc e EbMTt. Entretanto, foram observadas reduções em todas as demais cepas em pelo menos uma das amostras, com destaque para EbMTc (Tabela 15).

O extrato bruto de *T. coccinea* foi capaz de gerar redução do crescimento em todas as cepas utilizadas no experimento, demonstrando um efeito antimicrobiano muito mais evidente quando comparado às outras amostras. Além da redução, EbMTc também gerou uma mudança na coloração das cepas *E. coli* (ATCC 25922), *S. marcescens* (7145), *S. simulans* (ATCC 27851), *E. coli* (ATCC 35218) e *E. coli* K-12 (HB 101) (Figura 47). Podemos indicar uma diminuição na produção de pigmentos destas cepas ao serem comparadas com as colônias equivalentes da placa controle.

EbMTt também apresentou capacidade de redução de crescimento das cepas testadas, embora de forma mais branda. Porém, não demonstrou efeito sobre as cepas *E. coli* (ATCC 25922), *S. typhimurium* (C20), *E. coli* K-12 (C600), *S. sonnei* (ATCC 25931), *E. coli* K-12 (HB 101) e *E. coli* enteroagregativa (042). Quanto à mudança na produção de pigmentos das cepas, apenas *E. coli* K-12 (HB 101) apresenta tal alteração indicada pela diminuição de sua coloração em comparação ao controle.

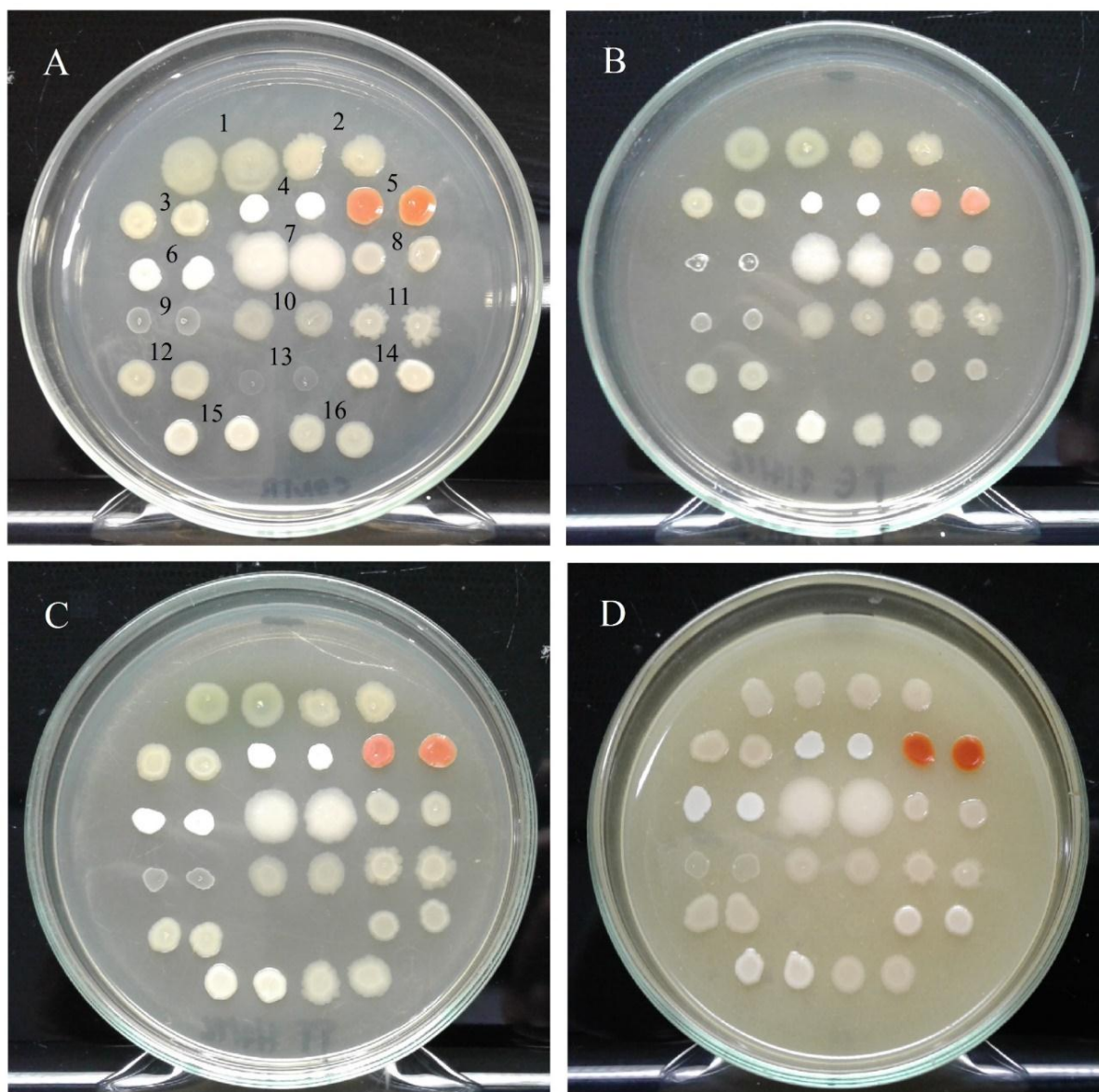
O alcaloide APL01 apresentou atividade antimicrobiana com menor intensidade entre as amostras testadas. As reduções de crescimento somente foram observadas nas cepas *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. coli* enteroagregativa (17-2), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. simulans* (ATCC 27851) e *E. coli* K-12 (HB 101). Possíveis alterações na pigmentação das colônias não puderam ser consideradas, visto que, na concentração utilizada de 1 mg/mL para o ensaio de macrodiluição, APL01 gera mudança na coloração do meio. Devido à composição simples dessa amostra (substância sintetizada), espera-se que a quantidade de organismos teste afetados seja menor em comparação com amostras mais complexas, como os extratos brutos. Contudo, a intensidade da atividade estudada não seguiu o esperado, tendo em vista o uso de uma concentração elevada para uma substância isolada.

Tabela 15 – Crescimento bacteriano na presença de EbMTc, EbMTt e APL01

Cepas	EbMTc	EbMTt	APL01
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	R	RB	R
<i>E. coli</i> enteroagregativa (17-2)	R	RB	R
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	R	-	-
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	R	R	RB
<i>S. marcescens</i> (7145)	R	RB	-
<i>S. simulans</i> (ATCC 27851)	R	R	RB
<i>B. thuringiensis</i> (ATCC 33679)	R	RB	-
<i>S. typhimurium</i> (C20)	R	-	-
<i>E. faecalis</i> (29212)	R	RB	-
<i>E. coli</i> K-12 (C600)	R	-	-
<i>S. sonnei</i> (ATCC 25931)	R	-	-
<i>E. coli</i> (ATCC 35218)	R	RB	-
<i>S. pyogenes</i> (8668)	I	I	-
<i>E. coli</i> K-12 (HB 101)	R	-	RB
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 700603)	R	RB	-
<i>E. coli</i> enteroagregativa (042)	R	-	-

Legenda: R = redução; I = inibição; RB = redução branda; Traço (-) = crescimento similar ao controle;
Concentração das amostras: 1 mg/mL

Figura 47 – Atividade antimicrobiana em macrodiluição das amostras EbMTc, EbMTt e APL01

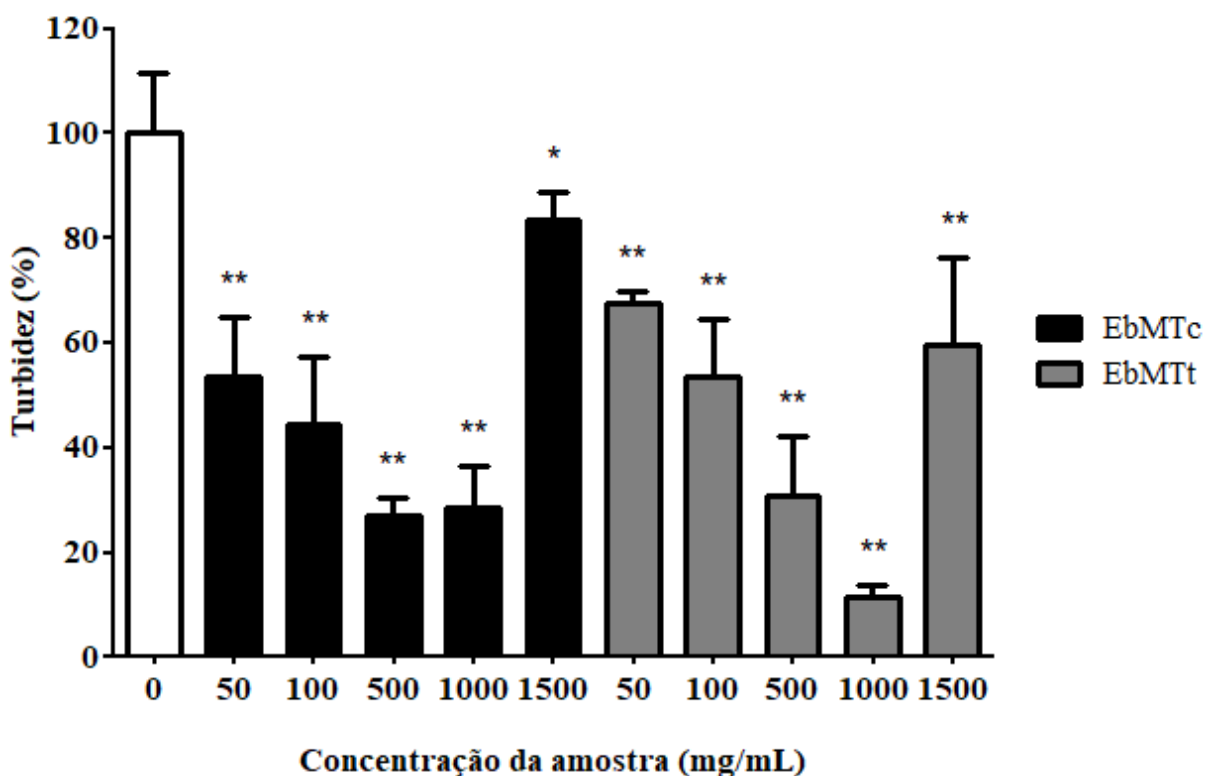


Crescimento bacteriano em: (A) meio MHA; (B) EbMTc; (C) EbMTt e; (D) APL01. Concentração das amostras 1 mg/mL. 1 – *P. aeruginosa* (ATCC 27853); 2 – *E. coli* enteroagregativa (17-2); 3 – *E. coli* (ATCC 25922); 4 – *S. aureus* (ATCC 25923); 5 – *S. marcescens* (7145); 6 – *S. simulans* (ATCC 27851); 7 – *B. thuringiensis* (ATCC 33679); 8 – *S. typhimurium* (C20); 9 – *E. faecalis* (29212); 10 – *E. coli* K-12 (C600); 11 – *S. sonnei* (ATCC 25931); 12 – *E. coli* (ATCC 35218); 13 – *S. pyogenes* (8668); 14 – *E. coli* K-12 (HB 101); 15 – *K. pneumoniae* (ATCC 700603); 16 – *E. coli* enteroagregativa (042).

Baseado nos resultados do ensaio de macrodiluição, utilizou-se as amostras EbMTc e EbMTt no ensaio de microdiluição com as linhagens em que induziram inibição de crescimento. A análise da cepa *S. pyogenes* (8668) com diferentes concentrações das amostras EbMTc e EbMTt no ensaio de microdiluição não gerou valores para MIC e MBC. Isso ocorreu pois não foi observado concentrações do tratamento com turbidez equivalente ao

grupo controle e houve crescimento bacteriano nas alíquotas plaqueadas de 2 μL . Contudo, os valores de IC_{50} foram calculados para ambas as amostras, sendo de 391,5 $\mu\text{g/mL}$ para EbMTc e 258,8 $\mu\text{g/mL}$ para EbMTt. A Figura 48 demonstra os resultados obtidos.

Figura 48 – Atividade antimicrobiana em microdiluição das amostras EbMTc e EbMTt para *S. pyogenes* (8668)



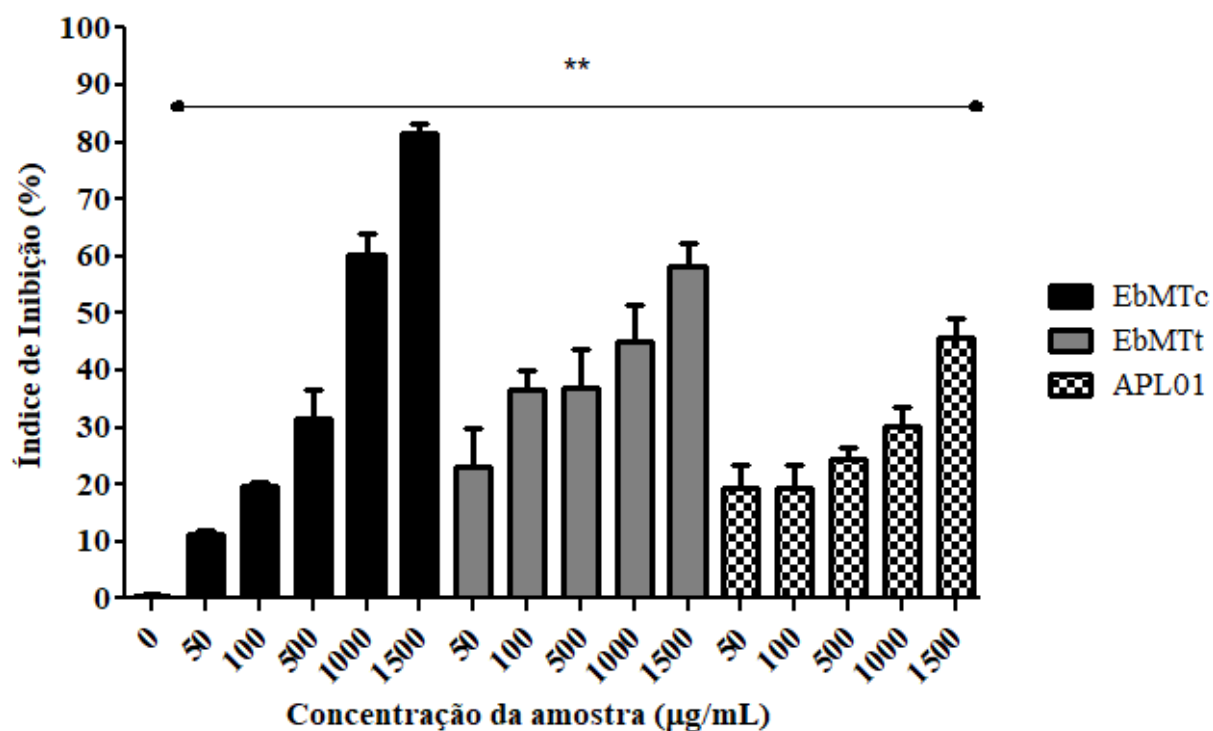
Valores percentuais de turbidez expressos em média e desvio padrão. Diferença estatística significativa em relação ao grupo controle: teste ANOVA seguido de Dunnett (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Observa-se que EbMTt atingiu a menor porcentagem de turbidez (abaixo de 20%) na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, obedecendo uma relação concentração-dependente a partir da menor concentração usada (50 $\mu\text{g/mL}$). Em EbMTc, as concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ obtiveram os melhores efeitos contra *S. pyogenes*. Entretanto, para ambas as amostras, a concentração de 1500 $\mu\text{g/mL}$ apresentou os menores efeitos antimicrobianos. Isso pode ter ocorrido devido à complexidade da composição dos extratos, podendo gerar sinergismo.

3.7.3 Resultados do potencial de inibição na formação de biofilmes de *S. aureus*

As amostras EbMTc, EbMTt e APL01 apresentaram capacidade de inibir a formação de biofilme da linhagem bacteriana *S. aureus* (Figura 49), mesmo não demonstrando respostas positivas sobre a mesma linhagem no ensaio de macrodiluição. Em EbMTc, observa-se uma relação concentração-dependente a partir da menor concentração (50 µg/mL). A concentração de 1500 µg/mL conseguiu reduzir a formação de biofilme em mais de 80%, obtendo o maior índice de inibição dentre as amostras testadas. Já EbMTt, obteve um percentual de 23% na menor concentração testada, apresentando maior eficiência quando comparada à amostra de EbMTc, cujo valor percentual nas mesmas condições foi de 11%. A maior concentração de EbMTt promoveu uma redução de 58% na formação de biofilme, sendo o maior índice alcançado por esta amostra. O alcaloide APL01 apresentou respostas positivas para a atividade testada, embora não tenha ultrapassado o patamar de 50% em nenhuma concentração. O maior índice gerado por APL01 foi de 46% na concentração de 1500 µg/mL. Todas as concentrações de todas as amostras apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo controle. Os valores de EC₅₀ de EbMTc, EbMTt e APL01 foram 414,1 µg/mL, 82,08 µg/mL e 153,9 µg/mL, respectivamente. O valor da MIC de biofilme não pôde ser calculado pois nenhuma amostra conseguiu índice de inibição de 100%.

Figura 49 – Inibição da formação de biofilme em *S. aureus* das amostras EbMTc, EbMTt e APL01 após 18 h de cultivo à 37°C



Valores percentuais expressos em média e desvio padrão. Diferença estatística significativa em relação ao grupo controle: teste ANOVA seguido de Dunnett (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4 DISCUSSÃO

Os corais escleractíneos foram ignorados como fontes de produtos naturais devido à sua estrutura calcária promover defesa física contra possíveis predadores e competidores. Essa estratégia inviabilizou pesquisas sobre a produção de metabólitos secundários nesses organismos, o que fez com que a busca de produtos naturais marinhos em cnidários focasse os corais de baixa rigidez. Entretanto, a defesa química é uma tática utilizada pelos corais duros e as substâncias envolvidas possuem potencial farmacológico de interesse (COLL, 1992; BAE et al., 2000; VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; LEAL et al., 2013).

O gênero *Tubastraea*, pertencente à ordem Scleractinia, produz metabólitos secundários os quais foram associados a atividades biológicas. A presença dos representantes desse táxon em águas brasileiras é resultado de um processo de bioinvasão, cujo vetor foram plataformas de óleo e gás que se estabeleceram na região da Baía de Ilha Grande no estado do Rio de Janeiro, na década de 80. As espécies *T. coccinea* e *T. tagusensis* demonstraram-se fortes competidores diante de espécies endêmicas e com baixa taxa de predação, o que gerou sucesso no processo de invasão, cuja presença pode ser observada atualmente em outros estados brasileiros. Dentre os metabólitos encontrados nos tecidos de espécies desse gênero, existem alcaloides que apresentam potencial farmacológico, podendo ser destacada a aplisinopsina e seus derivados (BIALONSKA; ZJAWIONY, 2009; LAGES et al., 2010a; LAGES et al., 2012; GAO et al., 2013; CREED et al., 2017a).

A pesquisa e desenvolvimento de fármacos com base em produtos naturais marinhos possuem barreiras na obtenção de material biológico suficiente para que os testes pré-clínicos e clínicos sejam executados. Essas dificuldades são representadas basicamente pela baixa coleta de organismos, limitada principalmente pelo impacto ambiental gerado, e a alta complexidade do composto isolado, o que inviabiliza a síntese. Entretanto, tem-se desenvolvido diversas estratégias para contornar esses obstáculos, dentre elas, fermentação industrial, bioprospecção, engenharia genética, aquacultura e simplificação estrutural. Esses métodos permitem inclusive que a toxicidade associada ao uso terapêutico da molécula em estudo diminua ou seja eliminada. Essa conjuntura possibilita a continuação da busca por novas fontes de produtos naturais marinhos (COSTA-LOTUFO et al., 2009; LEAL et al., 2013; LI et al., 2015).

A avaliação completa da capacidade de uma substância ou composto de induzir qualquer tipo de dano ao material genético de células somáticas e/ou germinativas é

fundamental para o consumo e comercialização de um futuro fármaco. Os testes necessários para esta avaliação, que estão inseridos na fase pré-clínica de desenvolvimento do fármaco, verificam basicamente dois potenciais: mutagenicidade e genotoxicidade (incluindo toxicidade aguda e crônica no desenvolvimento ou teratogênese). O potencial mutagênico promove eventos que alteram o DNA e/ou a quantidade ou estrutura de cromossomos. Essas alterações são irreversíveis e, quando não geram morte à própria célula, podem ser transmitidas para futuras gerações de células ou, no caso de células germinativas, para os descendentes. O potencial genotóxico é mais amplo e abrange, além da mutagenicidade, os eventos reversíveis de alteração no DNA, promovidos pelo sistema de reparo ou outros processos celulares. Estes eventos podem acarretar em mudanças permanentes na estrutura ou no conteúdo informacional nas células sobreviventes ou nos descendentes. As alterações genéticas podem resultar em efeitos que se manifestam após um longo período de exposições. Em células somáticas, tais efeitos podem gerar câncer caso interfiram, por exemplo, no funcionamento de genes supressores de tumores ou genes associados ao sistema de reparo. Vale ressaltar que outras complicações como envelhecimento precoce e doenças cardiovasculares e neurodegenerativas também podem ser associadas. Quando os danos ao DNA ocorrem em células germinativas há correlação com adversidades como infertilidade, aborto espontâneo e doenças genéticas como síndrome de Down, hemofilia e fibrose cística (OECD, 2009; FDA, 2012; OECD, 2016a).

Nas análises de CCD, observou-se que as amostras EbMTc e EbMTt apresentaram semelhanças na sua composição nas condições dos experimentos. O uso da substância padrão do esteroil monohidroxilado colesterol atuou como referencial de substâncias com baixa polaridade, indicando a presença destas e de substâncias mais polares nas amostras. No geral, a quantidade de bandas e os valores de Rf encontrados nessas amostras foram muitos próximos. As diferenças indicam maior complexidade da composição de EbMTc em relação à EbMTt. Elas encontram-se nos sistemas 3 e 4, na revelação com vanilina, em que EbMTc possui uma banda a mais, e no sistema 5, cuja revelação com vanilina apresentou três bandas a mais em EbMTc e na revelação com iodo, com uma banda a mais em EbMTc. Apesar de não ter retirado todo o material da origem, o sistema 5 (MeOH / DCM / AcOEt; 1:2:0,5 v/v) foi o que melhor separou os componentes das amostras, pois, na revelação com iodo, gerou o maior número de bandas. O iodo é aplicado para diversas classes de substâncias, como alcaloides, lipídeos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, sulfonamidas entre outras, devido às diferentes reações que podem ocorrer como, por exemplo, com ligações duplas, com nitrogênio terciário e formações de produtos de oxidação, o que pode explicar a maior

quantidade de bandas encontradas. Observou-se que as placas para os reveladores sulfato cérico e vanilina apresentaram o mesmo perfil. A revelação com sulfato cérico é caracterizada como não específica, mas é usada na investigação de substâncias das classes dos terpenos e dos flavonoides. A vanilina é mais utilizada para verificar terpenos e seus derivados (CHAVES, 1997; WALL, 2005).

A presença de bandas com valores de Rf próximos ou iguais aos do colesterol sugerem a presença de compostos com características semelhantes. A relação de substâncias detectadas em *T. coccinea* e *T. tagusensis*, apresenta o colesterol (colest-5-en-3 β -ol) e outros compostos de características semelhantes, o que pode indicar a presença dessas moléculas nas amostras EbMTc e EbMTt (LAGES et al., 2010b; LAGES et al., 2012). A revelação com vanilina e sulfato cérico levantam a hipótese de terpenos e derivados nessas amostras. Estes compostos são estudados em cnidários da subclasse Octocorallia, estão presentes nos seus tecidos e metabólitos secundários e são utilizados na sua classificação taxinômica (quimiotaxonomia) (GERHART, 1983; COLL, 1992; PAWLIK, 1993). Dentre as diversas atividades farmacológicas associadas, pode-se citar os diterpenos girosanol A e B, isolados do coral alcionáceo *Sinularia gyrosa*, que apresentou atividade antiviral contra citomegalovírus humano (herpes-vírus) com IC₅₀ de 2,6 e 3,7 μ M (CHENG et al., 2010).

O sistema 3 apresentou bandas para EbMTc e EbMTt com o revelador NP-PEG, que verifica a presença de flavonoides. Embora a ocorrência dessa classe de substâncias seja hegemônica em plantas, devido à habilidade biossintética inerente desses organismos, há raras exceções. Uma delas é o isoflavonoide 9-metil-neodunol, isolado do coral *Echinopora lamelosa*, cuja ordem é a mesma dos corais invasores *T. coccinea* e *T. tagusensis* (Scleractinia). Portanto, a hipótese da existência de flavonoides em cnidários pode ser considerada (SANDUJA et al., 1984; IWASHINA, 2000).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Ecologia Marinha Bêntica da UERJ elucidou a composição química dos corais invasores através da técnica de CG/EM em frações Hex, Hex e DCM (1:1 v/v), DCM e DCM e MeOH (1:1 v/v) (LAGES et al., 2010b; LAGES et al., 2012). No presente trabalho aplicou-se a mesma metodologia, com poucas variações, para as frações oriundas de EbMTc (f-Hex, f-DCM, f-AcOEt, f-BuOH e f-Residual). Um total de 47 compostos foram identificados, comparando-se os espectros de massas contidos na biblioteca Wiley 275 e com probabilidades acima de 90%. Nota-se que f-Hex possui todas as substâncias identificadas, com exceção de um alcaloide halogenado e oxigenado análogo à aplisinopsina. Isso ocorreu provavelmente devido à baixa polaridade do solvente usado no preparo de f-Hex. A amostra f-DCM apresentou apenas duas moléculas na sua composição,

porém interessantes, visto que se trata de alcaloides. A molécula 3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina e seu derivado halogenado 6-bromo são análogos da aplisinopsina e apresentaram alta proporção na composição de f-DCM, representada pela porcentagem da área com os valores de 34,32% e 8,98%, respectivamente. Ressalta-se a presença do composto 3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina, tanto em f-Hex quanto f-DCM, em razão da classe e da própria substância estar presente no gênero *Tubastraea*. Em f-AcOEt, identificou-se apenas a molécula de oleato de metila, responsável por 42,43% da composição desta amostra.

Na comparação com o trabalho de Lages e colaboradores (2010b), verifica-se a ocorrência das substâncias palmitolato de metila, ácido heptadecanóico (margarato de metila), (22Z)-26,27-dinorergosta-5,22-dien-3 β -ol (isômero), (22E, 24S)-crinosterol, 23R-metilcolesterol, estigmasta-5,22E-dien-3 β -ol, oleato de cetila e palmitato de estearilo. Já com Lages e colaboradores (2012), registrou-se a presença de (7E,10E,13E)-7,10,13-hexadecatienoato de metila, linoleato de metila (metil 9,12-octadecadienoato), araquidonato de metila, ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol), 24-metildesmosterol (ergosta-5,24-dien-3 β -ol), palmitato de cetila (ácido hexadecanoico). Ao comparar os três trabalhos obtêm-se as substâncias 1-octadeceno, palmitato de metila, ácido oleico, oleato de metila, estereato de metila, (22Z)-27-norergosta-5,22-dien-3 β -ol, colesterol (Colest-5-en-3 β -ol) e oleato de estearilo (ácido 9-octadecenoico). O composto (24E)-estigmasta-5,24(28)-dien-3 β -ol é isômero do fucosterol que são descritos nos dois trabalhos de Lages, mas não especificados quanto à sua isomeria. A substância oleato de miristila é descrita em Lages e colaboradores (2010b), porém somente na fração Hex e DCM (1:1 v/v) de *T. tagusensis*. O total das áreas correspondentes aos compostos identificados foi de 75,79%, 43,30% e 42,43% para f-Hex, f-DCM e f-AcOEt.

Ácidos graxos, esteróis, lipídeos e hidrocarbonetos desempenham diversas funções em cnidários. No coral alcionáceo *Chromonephthea braziliensis*, o esteroide 23-ceto-cladielina-A foi isolado a partir de extrato de Hex e apresentou atividade antipredatória contra peixes generalistas. Em corais escleractíneos, há a possibilidade de esteroides exercerem função como hormônios sexuais, uma vez que a presença de enzimas envolvidas no metabolismo desses hormônios foi confirmada. Ácidos graxos, assim como os esteróis, são componentes estruturais das membranas celulares e podem agir como compostos alelopáticos em organismos marinhos (TARRANT et al., 2003; CHIANG; HUANG; WU, 2004; BLOMQUIST et al., 2006; FLEURY et al., 2008; LAGES et al., 2012).

Os resultados das análises de CLAE e espectrometria de massas de EbMTc, EbMTt e f-AcOEt foram comparados com as substâncias descritas no gênero *Tubastraea*. De acordo

com os parâmetros adotados, verificou-se a presença das substâncias 3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina e 6-bromo-3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina nas três amostras. O cromatograma referente à suposta presença de 3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina apresenta dois picos alternando-se quanto à intensidade, o que sugere a presença de isômeros. É descrito na literatura, a ocorrência da mistura dos isômeros de 8*E* e 8*Z* de 3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina no gênero *Tubastraea* (GUELLA et al., 1988; MANCINI et al., 2003; MEYER et al., 2009). Essa mistura demonstrou fraca atividade antagonista para receptores de canais de cloreto controlados por glicina da subunidade alfa 3 ($\alpha 3$ GlyR), enquanto que tubastrindol B demonstrou-se um potente antagonista para a subunidade alfa 1 ($\alpha 1$ GlyR). Substâncias que possuem capacidade de modular diferentes isoformas de GlyR são importantes no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças geradas por distúrbios respiratórios e do movimento, como espasticidade e hiperecplexia (BALANSA et al., 2013; LEWELLYN; ZJAWIONY, 2018).

A presença do alcaloide tubastrina foi verificada nas amostras EbMTc e f-AcOET (Figura 19). Esta molécula foi identificada primeiramente em *T. aurea* e apresentou atividade antiviral. Estudos posteriores demonstraram que a tubastrina e derivados isolados da esponja *Spongosorites* spp. foram capazes de inibir moderadamente o crescimento bacteriano de *S. aureus*, *Serratia* sp. e *E. coli*. A tubastrina, isolada da ascídia *Aplidium orthium*, se apresentou como um inibidor da produção de superóxido em neutrófilos humanos estimulados por PMA (forbol-12-miristato-13-acetato), um agente estimulante do complexo enzimático da NADPH oxidase, em ensaios *in vitro*. Em ensaios *in vivo*, a tubastrina demonstrou capacidade anti-inflamatória em modelos agudos para artrite gotosa e de inibição da infiltração de neutrófilos (SAKAI; HIGA, 1987; URBAN; CAPON; HOOPER, 1994; SANTOS; CRAVEIRO; BERLINCK, 2007; PEARCE et al., 2008).

As massas do alcaloide sintetizado APL01 e seu análogo halogenado 6-bromo foram observadas nas amostras EbMTc e f-AcOEt. Nota-se que as intensidades dos picos aumentam na fração, o que pode indicar um processo de purificação. O processo de fracionamento sequencial adotado no preparo das frações de EbMTc promoveu essa purificação, o que é corroborado pelas análises de CG/EM, onde a amostra f-Hex conservou a maioria dos compostos de baixa polaridade. APL01 é identificada como 3'-deimino-2',4'-bis(demetil)-3'-oxoaplisinopsina. Ambos os compostos foram encontrados no coral escleractíneo *Leptopsammia pruvoti*, coletado na região de Marselha (GUELLA et al., 1988; BIALONSKA; ZJAWIONY, 2009).

A molécula 2'-de-*N*-metilaplisinopsina foi observada apenas em EbMTc. Trata-se de um metabólito que foi encontrado pela primeira vez na esponja *Dercitus* sp. e, posteriormente, em *T. coccinea* e no molusco especialista *P. melanobrachia*, onde foi levantada a hipótese de que esse molusco acumulava aplisinopsinas no seu manto, através da alimentação do coral, cujo efeito geraria defesa contra seus predadores. O coral escleractíneo *Dendrophyllia* sp. também possui esse metabólito em seus tecidos e foi encontrada, junto com o seu análogo halogenado 6-bromo dentre outras substâncias, na esponja *Smenospongia aurea*. Entretanto, é nesse derivado 6-bromo que se encontra atividades farmacológicas interessantes. O 6-bromo-2'-de-*N*-metilaplisinopsina encontrado, em *S. aurea*, apresentou atividade antimalárica moderada para clones D6 de *P. falciparum* e inibiu a ação da enzima plasmepsina II em ensaios *in vitro*, apresentando baixa citotoxicidade. Esta substância demonstrou alta afinidade como ligante antagonista de subtipos de receptores 5-HT₂ de serotonina (5-HT_{2A} e 5-HT_{2B}). Quando oriunda da esponja *Hyrtios* sp., demonstrou-se um potente agente antioxidante (DJURA; FAULKNER, 1980; OKUDA et al., 1982; GUELLA et al., 1989; HU et al., 2002; UTKINA 2009).

As leituras das absorções da luz UV para todas as substâncias analisadas foi de 194 nm. Isso ocorreu devido ao uso de ácido fórmico na fase móvel. Esse reagente possui absorção na faixa de 193 a 250 nm (KELLER-RUDEK et al., 2013).

O ensaio de mutação reversa bacteriana, conhecido como teste de Ames, avalia a capacidade mutagênica de uma amostra. Esse teste verifica se um composto é capaz de induzir mutações como substituições de pares de bases e mudanças no quadro de leitura resultantes de pequenas adições ou deleções. Esta metodologia é empregada como análise inicial da atividade genotóxica e, especificamente, da indução de mutação pontual, sendo reconhecida por diversas agências reguladoras. O teste detecta mutações que revertem alterações pontuais presentes em linhagens específicas de *S. enterica* e restauram a capacidade da bactéria de sintetizar um aminoácido essencial para o seu desenvolvimento, neste caso a histidina. Além disso há correlação entre uma substância teste ser mutagênica para bactéria e carcinogênica em células de mamíferos, embora essa correlação não seja absoluta (OECD, 1997; MORTHELMANS; ZEIGER, 2000; OECD 2016a; FDA, 2018).

Em ensaios preliminares para o estudo mutagênico, observamos aumento do número de colônias revertentes em relação ao controle negativo usado (DMSO), obedecendo uma relação concentração-dependente. As maiores concentrações usadas geraram sobrevivências abaixo de 70%, estando relacionadas à queda do I.M. das respectivas concentrações. Entre as amostras testadas, os efeitos observados encontravam-se em todas as linhagens utilizadas

entre as concentrações de 0,25 e 0,5 mg/100 µL/placa. Com o intuito de observar uma possível resposta mutagênica e/ou citotóxica de acordo com os parâmetros adotados, ampliamos esse intervalo e estabelecemos as concentrações de 0,25; 0,3125; 0,375; 0,4375; 0,5 mg/100 µL/placa. Os resultados expressos no presente trabalhos nas Figuras 23, 24, 25, 26 e 27 não apresentaram respostas mutagênicas para nenhuma linhagem usada em nenhuma concentração para nenhuma amostra testada. A análise de *background* realizada para a sobrevivência, cujos parâmetros foram presença de colônias reduzidas e afinamento ou ausência da camada de *background*, não acusou sinais de toxicidade. A ausência de diferença estatística significativa corroborou os resultados negativos para mutagenicidade.

A literatura carece de estudos mutagênicos para espécies do gênero *Tubastraea*. Essa carência é presente ao expandir a busca para espécies da ordem Scleractinia. No campo dos produtos naturais marinhos, englobando organismos como cianobactérias, algas, fungos, esponjas e outros cnidários, podemos realizar algumas comparações. Em Güner e colaboradores (2015), os extratos feitos em clorofórmio, Hex e MeOH da alga *Cystoseira compressa* foram avaliados quanto às suas capacidades antimicrobiana e antioxidante, assim como, seus potenciais citotóxicos e mutagênicos. Os extratos foram testados para as linhagens TA98 e TA100 e não apresentaram efeitos mutagênicos em nenhuma concentração testada, dentre as quais incluía a concentração máxima permitida pelo ensaio de 5 mg/placa, tanto na ausência quanto na presença de metabolização exógena. Em outro trabalho, alcaloides sintetizados a partir de estruturas moleculares provenientes da esponja *Theonella* sp. apresentaram atividade antimalárica, embora não apresentassem seletividade necessária. Estes alcaloides sintetizados foram avaliados quanto ao seu potencial mutagênico e genotóxico, através dos testes de micronúcleo, cometa, Ames e anexina V – iodeto de propídio, para compreensão dos mecanismos responsáveis pela toxicidade associada. O conjunto desses resultados levaram os autores a desconsiderarem essas moléculas para o tratamento da malária, mas sim como agentes antitumorais, devido à alta seletividade observada para linhagens tumorais, uma vez que a toxicidade era gerada por indução da morte celular apoptótica desencadeada por má segregação cromossômica durante a divisão celular em células tumorais humanas (BARBOSA et al., 2018).

Nosso grupo de pesquisa produziu três trabalhos nessa vertente. Extratos das esponjas nativas da costa brasileira *Aplysina fulva* e *Arenosclera brasiliensis* foram avaliados quanto ao seu potencial genotóxico. Nas amostras de *A. fulva*, a indução de quebra de DNA foi verificada nas condições testadas, através dos ensaios de Ames, SOS cromoteste e cometa, o que promoveu as atividades citotóxicas e mutagênicas (AIUB et al., 2006). Para a espécie

endêmica *A. brasiliensis*, tanto a atividade genotóxica quanto a antigenotóxica foram estudadas pelos ensaios de Ames, tratamento com DNA plasmidial, SOS cromoteste e de antimutagenicidade. Os extratos de *A. brasiliensis* apresentaram atividade mutagênica, por uma via metabólica, e antimutagênica, ao gerar proteção à mutágenos, tanto dentro quanto fora da célula, e através da ativação do sistema de reparo (STANKEVICINS et al., 2008). O estudo sobre mutagenicidade, genotoxicidade e atividades antioxidantes de extratos do coral alcionáceo invasor *Chromonephthea brasiliensis* possibilitou uma compreensão da ação dos seus metabólitos secundários. Corais alcionáceos possuem pouca rigidez em seus tecidos (corais moles) e são alvos farmacológicos interessantes (CARPES et al., 2013).

Ensaio de citotoxicidade são comumente usados em estudos toxicológicos *in vitro*. O uso de cultura de células viabiliza rapidez e economia e evita o uso de animais em análises iniciais. Desequilíbrio do metabolismo energético, organização do citoesqueleto, integridade da membrana plasmática ou uma função celular específica são algumas das formas de se iniciar um processo de citotoxicidade (ISHIYAMA et al., 1996; SCHOONEN; WESTERINK; HORBACH, 2009). O ensaio de proliferação celular pelo teste colorimétrico WST-1 permite observar a proliferação celular através da redução do sal tetrazólio em cristal formazan pela ação de enzimas desidrogenases da mitocôndria. Já o ensaio de viabilidade celular pelo teste colorimétrico de liberação de LDH é baseado na medição da atividade desta enzima no meio extracelular. Esta liberação é um indicador de morte celular irreversível devido ao dano gerado na membrana citoplasmática (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006; NGAMWONGSATIT et al., 2008).

O uso das linhagens HepG2 e RAW 264,7 permite verificar o efeito do aparato enzimático envolvido no processo de metabolização de xenobióticos de um tipo celular (HepG2) em substâncias teste e comparar com uma linhagem que não possui esse conjunto de enzimas desenvolvido (RAW 264,7). Isso possibilita inferir se a resposta citotóxica, quando presente, provém da amostra em si ou dos produtos gerados a partir da metabolização do composto. As culturas de ambas as linhagens conseguiram se desenvolver na presença dos extratos brutos metanólicos e etanólicos de *T. coccinea* e *T. tagusensis*, do alcaloide sintetizado APL01 e da fração f-AcOET oriunda de EbMTc, dependendo da concentração. Na análise de proliferação celular com WST-1, observou-se que as duas maiores concentrações (500 e 5000 µg/mL) promoveram condições que impediram esse desenvolvimento, com exceção de EbETc onde apenas a concentração de 5000 µg/mL gerou citotoxicidade para HepG2. No geral, o fator temporal não influenciou na citotoxicidade, exceto para EbMTc em HepG2. Na análise da integridade da membrana plasmática pelo teste colorimétrico LDH, as

amostras não demonstraram capacidade de gerar lesão na membrana celular de RAW 264,7 em nenhuma concentração testada. Em HepG2, a concentração de 5000 µg/mL gerou citotoxicidade com as amostras EbMTc, EbMTt e EbETc. Para EbETt e APL01, o efeito citotóxico dessa concentração ficou dependente do tempo de exposição. A associação das condições de 500 µg/mL e 72 h de exposição também foi determinante para gerar lesão na membrana de HepG2. A concentração de 5000 µg/mL equivale à maior concentração utilizada no ensaio de mutação reversa bacteriana. Essas observações sugerem que, apesar das maiores concentrações possuírem caráter tóxico, o que é esperado, a metabolização das substâncias que compõem as amostras pode estar induzindo citotoxicidade por interferência da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais.

A amostra f-AcOEt foi testada em concentrações menores, porém correspondentes às testadas para o efeito anti-inflamatório *in vitro*. No ensaio com WST-1, os dois maiores tempos de exposição associados com as concentrações de 2,5 e 5,0 µg/mL geraram respostas tóxicas evidentes, enquanto que em RAW 264,7, as duas maiores concentrações foram citotóxicas, ocorrendo maior intensidade deste efeito nos tempos de 48 e 72 h. No ensaio com reagente para LDH, f-AcOEt não promoveu efeito citotóxico em RAW 264,7 em nenhuma condição teste, e para HepG2 a citotoxicidade somente foi observada nas concentrações de 2,5 e 5,0 em 48 h de tratamento, considerando a análise estatística. Essa amostra é menos complexa em sua composição do que os extratos, contudo, pode apresentar moléculas com diferentes características como o oleato de metila, um éster de ácido graxo, e a 3'-deimino-3'-oxoaplisinopsina, um alcaloide indólico, possibilitando a ocorrência de sinergismo. A presença do núcleo hidantoínico pode estar relacionada com o efeito citotóxico observado em ambos os ensaios na linhagem tumoral usada. (SZTANKE et al., 2006; REDDY et al., 2010; LEWELLYN; ZJAWIONY, 2018).

O ensaio de formação de micronúcleo avalia o potencial genotóxico do composto a ser estudado através da indução de quebras cromossômicas e aneuploidia. Micronúcleos são formados por fragmentos de cromossomo ou cromossomos inteiros que são incapazes de migrar para um dos polos mitóticos durante a etapa de anáfase da divisão celular e não são incorporados por nenhum núcleo das células filhas. Portanto, esta metodologia é capaz de identificar compostos capazes de gerar efeitos clastogênicos e aneugênicos. A contagem de micronúcleos é feita após a primeira divisão celular posterior ao período de tratamento. A citocalasina B é um inibidor de polimerização de actina e impede a finalização da etapa de citocinese, induzindo a formação de células binucleadas. Isso garante que os micronúcleos observados foram formados após o período de tratamento (OECD, 2015, 2016a, 2016b).

Com a evidência de que as concentrações de 500 e 5000 µg/mL induziriam citotoxicidade, estabeleceu-se concentrações menores para o ensaio de micronúcleo, tendo como referência tóxica a concentração de 500 µg/mL. A ausência da capacidade genotóxica das amostras, expressa pela manutenção do valor FMN próximo ao controle negativo, independe do aparato enzimático celular envolvido no metabolismo de compostos exógenos. Apesar das amostras gerarem citotoxicidade, a via pela qual ocorre morte celular pode não envolver a interação com o material genético, uma vez que respostas negativas para mutagenicidade também foram observadas. Pfuhler e colaboradores (2007) ponderam o uso de testes para verificar mutagenicidade em células de mamíferos, posto que o ensaio de mutação reversa bacteriana (teste de Ames) detecta todas as vias relevantes que induzem uma mutação. Este ensaio somado ao de formação de micronúcleo, que possui alta eficiência para detectar efeitos clastogênicos, reduzem a necessidade de usar células de mamíferos ou animais para constatar a resposta mutagênica. Em Kirkland e colaboradores (2011), 962 compostos, 557 carcinógenos e 405 genotoxinas *in vivo*, foram estudados para verificar se a combinação de uso das metodologias de reversão bacteriana e micronúcleo seriam suficientes para detectar um agente genotóxico. Concluiu-se que há uma alta improbabilidade de não se detectar um composto genotóxico em uma bateria de ensaios consistindo dessas duas metodologias.

Cerca de 25.000 produtos naturais marinhos foram descritos até os dias de hoje, apesar de poucos serem comercializados. Exemplificando, apenas sete substâncias foram aprovadas pela FDA para uso, sendo que quatro são destinadas para o tratamento de câncer (brentuximab vedotina - Adcetris®; trabectedina - Yondelis®; Citarabina® (Ara-C) e; mesilato de eribulina - Halaven®) e o restante são usados como analgésico (ziconotida - Prialt®), antiviral (Vidarabina® (Ara-A)) e no tratamento de hipertrigliceridemia (ômega 3). Desse conjunto de moléculas marinhas, mais de 3.000 são provenientes do filo Cnidaria e estão relacionadas a atividades anti-inflamatória, antitumorais, antivirais, antimaláricas, antimicrobianas, anti-incrustante, antituberculose e com ação em células neurais (ROCHA; LEAL; CALADO, 2015; RANGEL; FALKENBERG, 2015; LEWELLYN; ZJAWIONY, 2018).

As análises da atividade anti-inflamatória através do modelo de indução de edema em pata de camundongo revelaram que as amostras EbMTc, EbMTt e APL01 possuem potencial anti-inflamatório. Entre os dois extratos, a amostra EbMTc apresentou melhor desempenho com a concentração de 0,02 mg/kg durante todo o experimento, demonstrando um efeito melhor ou semelhante à droga controle indometacina. A concentração de 200 mg/kg apresenta um comportamento semelhante à de 0,02 mg/kg em EbMTc ao longo do experimento, porém

no pico de indução do edema (t_3), onde a carragenina apresenta o seu efeito de forma mais potente, a concentração de 0,02 mg/kg mantém o índice de edema abaixo de 50%, equivalente à indometacina.

APL01 também apresentou resultados interessantes, cuja concentração de 200 mg/kg demonstrou melhor atividade quando comparada ao controle positivo. Contudo, trata-se de uma substância pura sintetizada e necessitou-se de uma concentração vinte vezes maior que o controle positivo (10 mg/kg) para se obter a mesma intensidade da resposta anti-inflamatória. Vale ressaltar que a concentração de 0,02 mg/kg de APL01 demonstrou resultados semelhantes à indometacina nos tempos t_1 , t_3 e t_4 e melhores que a concentração de 20 mg/kg. Quando a menor concentração de uma molécula gera uma resposta mais potente do que concentrações maiores, o efeito hormese pode ser considerado (BHAKTA-GUHA; EFFERTH, 2015).

O efeito dessas três amostras sobre a liberação de NO por macrófagos RAW 264,7 estimulados por LPS foi comparado com os das frações oriundas de EbMTc. As amostras EbMTc, EbMTt e APL01 conseguiram diminuir a liberação de NO quando comparadas ao grupo controle, com diferença estatística significativa associada e sem sinais de citotoxicidade. Esse efeito foi mais evidente nas duas maiores concentrações (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) com destaque para as amostras EbMTc e APL01. Porém, os melhores resultados deste experimento vieram das frações de EbMTc, especificamente a amostra f-AcOEt nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, cuja atividade inibitória atingiu valores próximos de zero, referente à concentração de NO em μM . A amostra f-DCM gerou respostas mais intensas, mas não podem ser associadas à atividade anti-inflamatória pois induziu citotoxicidade nos macrófagos no ensaio de sobrevivência com MTT.

Ao considerar a presença de terpenos, alcaloides e derivados de aplisinopsina nas amostras, de acordo com os resultados das análises químicas, pode-se inferir alguns pontos sobre a origem do efeito anti-inflamatório observado. Como descrito anteriormente, encontra-se na literatura extensas revisões de substâncias marinhas oriundas de corais em estágio pré-clínico do desenvolvimento de fármacos, de onde podemos verificar os prováveis mecanismos de ação responsáveis pelas diversas atividades farmacológicas, entre as quais a ação anti-inflamatória. No geral, a inibição da expressão das enzimas óxido nítrico sintase (isoforma iNOS) e COX-2 e a inibição da liberação de NO são os principais mecanismos pelos quais compostos oriundos de corais atuam como agentes anti-inflamatórios. Entretanto, a maioria dessas moléculas são terpenos e derivados terpenóides provenientes de corais moles. Já para os alcaloides marinhos, compreendendo organismos de outros filós, as vias de ação que

induzem o efeito anti-inflamatório podem ocorrer pela inibição da liberação de NO em macrófagos, de iNOS, COX-2, TNF- α , interleucina 6, NF- κ B, prostaglandina E2, entre outras (MAYER et al., 2013; ROCHA; LEAL; CALADO, 2015; NETZ; OPATZ, 2015; MAYER et al., 2017).

Uma das atividades associadas a aplisinopsina é a neuromodulação através da inibição seletiva de óxido nítrico sintase (NOS). Há três isoformas de NOS, sendo duas expressas constitutivamente e uma de forma induzida. A isoforma I ou nNOS (NO sintase neuronal) está presente no cérebro e a isoforma III ou eNOS (NO sintase endotelial), em células endoteliais. Ambas são dependentes da ligação com Ca^{+2} através da proteína calmodulina para ativação, enquanto que a iNOS (NO sintase induzida) independe da formação do complexo Ca^{+2} /calmodulina para sua manutenção, sendo induzida em macrófagos e em outras células por LPS bacterianos e/ou citocinas. Derivados de aplisinopsina, como o 6-bromo-2'-de-N-metilaplisinopsina que é encontrado em *T. coccinea*, são capazes de inibir a ação tanto de nNOS quanto de iNOS. O NO é uma importante molécula sinalizadora e possui funções como neurotransmissor, na regulação da pressão sanguínea, na adesão de plaquetas, no controle da circulação placentária, na regulação das contrações uterinas no trabalho de parto, em ações endócrinas, nos mecanismos de autoimunidade e no processo inflamatório, como por exemplo no combate a microrganismos invasores. Portanto, substâncias que possam regular enzimas NOS são importantes alvos terapêuticos (OKUDA et al., 1982; FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; AOKI et al., 2001; BIALONSKA; ZJAWIONY, 2009). As aplisinopsinas apresentam mais um fator que está diretamente relacionada com ação anti-inflamatória. A presença do anel imidazolidínico ou hidantoína confere esta capacidade, bem como outros potenciais, como antimicrobiano, antifúngico, herbicida, citotóxica, entre outras. Essa estrutura foi descoberta por Adolf von Baeyer em 1861 e, por conseguinte, hidantoínas e seus derivados têm sido pesquisados devido às suas propriedades farmacológicas (BATEMAN, 1980; CEGAN; VECERA, 1984; CARVALHO et al., 1989; LIMA et al., 1992; MALTA, 2005; REDDY et al., 2010).

Seguindo a linha da associação entre compostos oriundos de cnidários e atividades farmacológicas, o potencial antiparasitário das amostras EbMTc e EbMTt foi verificado em relação aos protozoários *T. cruzi* e *L. (V.) braziliensis*. Ambos promovem doenças com ocorrência no Brasil e a quimioterapia aplicada no tratamento dessas doenças apresentam baixa eficácia, severos efeitos colaterais e relatos de resistência por parte dos parasitas para determinadas drogas. A bateria de ensaios realizados na FIOCRUZ para a atividade tripanocida constatou que os extratos metanólicos de *T. coccinea* e *T. tagusensis* não

apresentam tal potencial, visto que não foram melhores ou de igual eficiência que a droga controle. Essa observação é representada pelos baixos valores de IS gerados pelas amostras em comparação com o benzonidazol. Este composto é utilizado no tratamento da doença de Chagas e apresenta boa eficácia na fase aguda, promovendo chances de cura. Entretanto, demonstra-se com baixo êxito na fase crônica, além de gerar efeito tóxico na medula óssea, dermatite, neuropatias periféricas e outras respostas adversas, podendo levar à suspensão do tratamento. Sua ação ocorre através da inibição da síntese proteica e da cadeia respiratória. O nifurtimox é outro medicamento utilizado no combate ao *T. cruzi* e seu uso apresenta problemas equivalentes ao benzonidazol (COURA; CASTRO, 2002; APT, 2010; LOUP; PIALOUX; LESCURE, 2011; MORILLO et al., 2015; DIAS et al., 2016).

Na revisão de Jones e colaboradores (2013), faz-se um levantamento de produtos naturais marinhos com atividade contra os parasitas *T.b. brucei*, *T.b. rhodesiense* e *T. cruzi*, classificando-os quanto ao seu efeito através dos valores de IC_{50} e sua seletividade. O trabalho considerou apenas moléculas com IC_{50} menor que 40 μM , discutindo a atividade tripanocida e o IS. As classes das substâncias abordadas foram terpenos, policetídeos, xantonas e alcaloides com origens marinhas variadas, como bactérias, fungos esponjas e ascídias. Das 65 moléculas revisadas, concluiu-se que o policetídeo manadoperoxido B e um análogo de xantona heterocíclica foram os compostos mais promissores contra, respectivamente, *T.b. rhodesiense* e *T. cruzi*, cujos respectivos valores de IC_{50} foram 0,0088 μM e 3,8 μM e índice de seletividade acima de 3000 para o policetídeo e de 31 para o análogo de xantona. Embora haja um número constante de compostos marinhos em fase pré-clínica de desenvolvimento para atividade tripanocida, a maioria dos mecanismos de ação não são esclarecidos. As revisões de Blunt e colaboradores, de 2014 a 2018, descrevem poucos compostos com essa atividade, havendo apenas uma fonte de substâncias com atividade moderada para *T. cruzi* (*Bacillus pumilus*, organismo simbiote isolado do coral negro *Antipathes* sp.) (MAYER et al., 2013; BLUNT et al., 2014-2017; MAYER et al., 2017; BLUNT et al., 2018).

As amostras de EbMTc e EbMTt apresentaram ação contra as formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, reduzindo em 33% e 24%, respectivamente, a viabilidade dos parasitas sob as condições de 50 $\mu g/mL$ em 72 h de exposição. Ensaio posteriores estabeleceram valores de IC_{50} para EbMTc de 245 $\mu g/mL$ e 48 $\mu g/mL$ relativos aos tempos de exposição de 48 e 72 h, respectivamente, com LC_{50} acima de 500 $\mu g/mL$ em 18 h. Pode-se inferir que as amostras foram mais seletivas aos parasitos, embora os tempos de exposição sejam diferentes. Compostos marinhos com atividade leishmanicida podem ser de diversas classes e com várias origens. O diterpeno 11 β -acetoxispongi-12-em-16-ona oriundo de esponjas coletadas na costa

turca do mar Egeu exibiu forte efeito inibidor contra *L. donovani* com valor de IC₅₀ de 0,75 µg/mL, mas com baixa seletividade (4,4) quando testada em linhagens celulares L6 (músculo esquelético). O esteroide halistanol A, isolado da esponja *Petromica ciocalyptoides*, inibiu em 92% a atividade da enzima adenina fosforibosil transferase, envolvida na síntese de DNA de *L. tarentolae*, na concentração de 25 µg/mL (EC₅₀ de 2,87 µg/mL). A cristaxenicina A é um diterpenoide isolado da gorgônia *Acanthoprimnoa cristata* e apresentou atividade contra *L. amazonensis* com valor de IC₅₀ de 0,088 µM e alta seletividade (23 e 53) perante as linhagens P388 e HeLa. Análogos de aplisinopsina sintetizados também apresentam atividade leishmanicida, gerando inibição de 70 a 85% em concentrações de 100 µg/mL contra *L. donovani* em ensaios *in vitro*. Em ensaios *in vivo*, apenas o derivado sintético tosilado de aplisinopsina demonstrou moderada inibição do parasita em doses de 25 mg/kg durante cinco dias. A síntese de moléculas híbridas com uma parte de aplisinopsina e outra de pentamidina gerou agentes leishmanicidas. A pentamidina é uma droga de segunda linha para o tratamento de leishmaniose visceral, porém seu uso está associado com efeitos colaterais severos, induzindo toxicidade hepática, pancreática e renal, além de outras adversidades. Uma das moléculas híbridas foi capaz de inibir em 62% o crescimento das formas amastigotas em macrófagos infectados sem indícios de toxicidade, *in vitro*, e reduziu em porcentagem semelhante a presença dos parasitos em hamsters tratados por via intraperitoneal. A semelhança dos resultados *in vitro* e *in vivo* levantou a hipótese de uma completa biodisponibilidade dessa molécula. Outra molécula híbrida, mais promissora, apresentou IC₅₀ de 2,0 µM e índice de seletividade de 53,35 para amastigotas em macrófagos. Comparando esta molécula híbrida com a pentamidina, constatou-se que o novo composto é dez vezes mais potente contra os protozoários e com toxicidade 401 vezes menor nas células hospedeiras (GULATI et al., 1994; PORWAL et al., 2009; ORHAN et al., 2010; TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINCK, 2011; ISHIGAMI et al., 2012).

As amostras EbMTc, EbMTt e APL01 apresentaram potencial antimicrobiano. No ensaio de avaliação qualitativa, EbMTc e EbMTt conseguiram inibir o crescimento da cepa *S. pyogenes* (8668). As três amostras reduziram o crescimento de todas as 16 linhagens testadas na concentração de 1 mg/mL, destacando-se a amostra EbMTc. No ensaio quantitativo da atividade antimicrobiana para *S. pyogenes*, os dois extratos metanólicos de *T. coccinea* e *T. tagusensis* apresentaram efeito em todas as concentrações usadas, gerando valores de IC₅₀ de 391,5 µg/mL e 258,8 µg/mL, respectivamente. *S. pyogenes* caracteriza-se por infectar apenas humanos e gera complicações como faringite, escarlatina, impetigo, erisipela, fasciíte necrosante, síndrome do choque tóxico, entre outras (LINO, 2010). Ambas as amostras

também apresentaram efeito citotóxico, principalmente para a linhagem Caco-2. Bianco e colaboradores (2016) realizaram ensaios para avaliar o potencial antimicrobiano das frações hexânica, butanólica e aquosa (residual) provenientes do extrato etanólico de *T. coccinea*. As frações butanólica e aquosa apresentaram atividade, estabelecendo MIC de 31,25 µg/mL a 500 µg/mL nas cepas *S. aureus* (ATCC 25923), *S. typhimurium* (ATCC 14028), *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e nas linhagens clínicas *S. aureus*, *K. pneumoniae* Carbapenemase, *S. aureus* resistente à meticilina e *E. faecalis* resistente à vancomicina. Já os valores de MBC estiveram no intervalo entre 62,5 e 1000 µg/mL para as mesmas cepas. Os autores destacam a fração butanólica como amostra mais promissora e registram, através de CCD, a presença de substâncias com mesmo perfil dos alcaloides. Como descrito anteriormente, os trabalhos de Koh demonstraram o potencial antimicrobiano do gênero *Tubastraea*, com extrato metanólico de *T. faulkneri*, cuja composição possui apilisinopsina e derivados (KOH, 1997; KOH; SWEATMAN, 2000).

Biofilme caracteriza-se por ser um agregado de microrganismos cujas células se anexam umas às outras e, estando imersas em uma matriz extracelular de substâncias poliméricas produzida por essas células, formam uma superfície. Ao crescerem sob estas condições, bactérias passam a apresentar resistência a antibióticos, o que pode ser associado à natureza crônica de determinadas infecções. Nesta linha, organismos do gênero *Staphylococcus* são uma das principais causas de infecções hospitalares, promovendo doenças como endocardite, osteomielite, pneumonia e outras. A atividade inibitória da formação de biofilme em *S. aureus* foi observada nas três amostras, com EbMTc atingindo 80% de inibição na maior concentração testada e EbMTt com EC₅₀ de 82,08 µg/mL. Apesar da ausência de relatos na literatura que associem o efeito inibitório de biofilme com amostras de *Tubastraea*, podemos realizar essa associação através do efeito anti-incrustante. É descrito que biofilmes bacterianos contribuem para a bioincrustação e são importantes nas etapas iniciais do processo incrustante. Alcaloides diterpênicos provenientes da esponja *Agelas nakamurai* apresentam atividade anti-incrustante e efeito inibitório de biofilme bacteriano. Ressalta-se que os efeitos não são recorrentes de uma mesma molécula, mas são metabólitos gerados pela esponja, cujas atuações encontram-se nas interações com o meio marinho. No muco do coral escleractíneo *Acropora digitifera*, 22 bactérias simbiontes foram identificadas, das quais seis produzem biossurfactantes. Duas espécies, *Providencia rettgeri* e *Psychrobacter* sp. são capazes de produzir estes compostos com atividade inibitória de biofilme estável após exposição a altas temperaturas, o que possibilita o desenvolvimento de agentes incrustantes para aplicações industriais. Biossurfactantes são compostos que possuem

atividade superficial, anfipáticos e de baixo peso molecular cuja atividade está na redução das tensões superficial e interfacial entre moléculas na superfície e na interface, respectivamente, tanto em soluções aquosas quanto em misturas de hidrocarbonetos. Em um levantamento sobre produtos naturais anti-incrustantes gerados por microrganismos associados com organismos marinhos, os corais aparecem em associações com bactéria e fungos onde os efeitos anti-incrustante e antimicrobiano estão relacionados através da inibição da formação de biofilme. Como já mencionado, ambas as espécies *T. coccinea* e *T. tagusensis* possuem capacidade anti-incrustante, o que confere vantagem no processo de bioinvasão da costa brasileira. Logo, pode-se sugerir que a observação do efeito inibitório de biofilme gerado por EbMTc e EbMTt é corroborada pela atividade anti-incrustante registrada nessas duas espécies (OHLSEN; KOLLER; HACKER, 1997; STEWART; COSTERTON, 2001; HERTIANI et al., 2010; LAGES et al., 2010a; LAGES et al., 2010b; STOWE et al., 2011; LEE et al., 2013; PADMAVATHI; PANDIAN, 2014; SATHEESH; BA-AKDAH; AL-SOFYANI, 2016).

Considerando os resultados e as análises realizadas sobre as atividades testadas no presente trabalho das amostras de *T. coccinea* e *T. tagusensis*, sugerimos que a alternativa farmacológica para o uso desses corais invasores é viável, visto que EbMTc, EbMTt, f-AcOEt e APL01 apresentaram potencial anti-inflamatório, leishmanicida e antimicrobiano. A citotoxicidade observada foi dependente de altas concentrações ou longos períodos de exposição. A toxicidade associada a estas amostras foi nula quanto aos potenciais mutagênico e genotóxico, o que confere segurança quanto ao uso em ensaios pré-clínicos e clínicos. Com relação à quantidade de material necessário para realização destes testes, fator limitante para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos oriundos de produtos naturais marinhos, o manejo das espécies de coral sol pode fornecer material biológico capaz de suprir essa necessidade. Dessa forma, agregamos valor aos corais descartados e aumentamos a importância da questão do coral sol no Brasil perante outras áreas da ciência.

CONCLUSÕES

- a) Os extratos EbMTc e EbMTt possuem compostos de baixa polaridade identificados na literatura com ocorrência nas mesmas espécies. Verificou-se a presença de alcaloides nas amostras EbMTc, EbMTt e f-AcOEt;
- b) Os extratos metanólicos e etanólicos de ambas as espécies e o composto sintetizado APL01 não induziram mutações pontuais e não geraram citotoxicidade para linhagens de *S. enterica*;
- c) Os quatro extratos, APL01 e f-AcOEt apresentaram potencial citotóxico para cultura de células permatetes nos testes colorimétricos WST-1 e LDH. As seis amostras geraram citotoxicidade mediante interferência da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais, independente da metabolização das substâncias presentes nas suas composições. A citotoxicidade provocada por lesão na membrana plasmática dependeu de metabolização;
- d) Os extratos metanólicos e etanólicos de ambas as espécies e APL01 não induziram a formação de células micronucleadas nas culturas de células HepG2 e RAW 264,7;
- e) EbMTc, EbMTt e APL01 foram capazes de diminuir o edema em pata de camundongo gerado por carragenina, cujos resultados de EbMTc foram os mais promissores. A f-AcOET, proveniente de EbMTc, apresentou atividade anti-inflamatória, pois inibiu a produção *in vitro* de NO por macrófagos;
- f) EbMTc e EbMTt não apresentaram potencial tripanocida para nenhuma forma evolutiva do protozoário *T. cruzi*;
- g) EbMTc e EbMTt apresentaram potencial tóxico para formas promastigotas do protozoário *L. (V.) braziliensis*, cujos resultados de EbMTc foram os mais promissores;
- h) EbMTc e EbMTt apresentaram potencial antimicrobiano, inibindo o crescimento de *S. pyogenes* (8668). Ambos os extratos e APL01 inibiram a formação de biofilme em *S. aureus*. EbMTc demonstrou-se a amostra mais promissora para atividade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

- ABDELMOHSEN, U. R. et al. Potential of marine natural products against drug-resistant fungal, viral, and parasitic infections. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 2, p. 30-41, 2017.
- ADEY, W. H. Coral reef ecosystems and human health: biodiversity counts! *Ecosystem Health*, v. 6, n. 4, p. 227-236, 2000.
- AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- AIUB, C. et al. Genotoxic evaluation of a vinifera skin extract that present pharmacological activities. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, p. 969-973, 2004.
- AIUB, C. et al. Genotoxic evaluation of extracts from *Aplysina fulva*, a Brazilian marine sponge. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 611, n. 1-2, p. 34-41, 2006.
- ALAM, M.; SANDUJA, R.; WELLINGTON, G. M. Tubastraine: isolation and structure of a novel alkaloid from the stony coral *Tubastraea micrantha*. *Heterocycles*, v. 27, n. 3, p. 719-723, 1988.
- ALAM, N. et al. Cytotoxic diacetylenes from the stony coral *Montipora* species. *Journal of Natural Products*, v. 64, n. 8, p. 1059-1063, 2001b.
- ALAM, N. et al. Montipyridine, a new pyridinium alkaloid from the stony coral *Montipora* species. *Journal of Natural Products*, v. 64, n. 7, p. 956-957, 2001a.
- ALBAJAR-VIÑAS, P.; DIAS, J. C. P. Advancing the treatment for Chagas' disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 370, n. 20, p. 1942-1943, 2014.
- ALMEIDA, J. G. L. et al. Palyosulfonoceramides A and B: Unique sulfonylated ceramides from the Brazilian zoanthids *Palythoa caribaeorum* and *Protopalythoa variabilis*. *Marine Drugs*, v. 10, n. 12, p. 2846-2860, 2012.
- AOKI, S. et al. Novel neuronal nitric oxide synthase (nNOS) selective inhibitor, aplysinopsin-type indole alkaloid, from marine sponge *Hyrtios erecta*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 49, n. 10, p. 1372-1374, 2001.
- APT, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 4, p. 243-253, 2010.
- BAE, B. H. et al. New acetylenic compounds from the stony coral *Montipora* sp. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 11, p. 1511-1514, 2000.
- BALANSA, W. et al. Australian marine sponge alkaloids as a new class of glycine-gated chloride channel receptor modulator. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 21, n. 14, p. 4420-4425, 2013.

- BANNON, C. D. et al. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. II. Methylation of fats and oils with boron trifluoridemethanol. *Journal of Chromatography*, v.247, p. 63-69, 1982.
- BARBER, M. S. et al. 316. Studies in nuclear magnetic resonance. Part IV. Stereochemistry of the bixins. *Journal of the Chemical Society*, p. 1625-1630, 1961.
- BARBOSA, M. C. S. et al. Synthesis and evaluation of the mutagenicity of 3-alkylpyridine marine alkaloid analogues with anticancer potential. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 825, p.31-39, 2018.
- BATEMAN, J. H. Hydantoin and derivatives. In: MARK, H. F. et al. (Eds.). *Encyclopedia of chemical technology*. New York: John Wiley & Sons, 1980. p. 692-711.
- BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 364, p. 2527-2534, 2011.
- BHAKTA-GUHA, D.; EFFERTH, T. Hormesis: Decoding two sides of the same coin. *Pharmaceuticals*, v. 8, n. 4, p. 865-883, 2015.
- BIALONSKA, D; ZJAWIONY, J. K. Aplysinopsins--marine indole alkaloids: chemistry, bioactivity and ecological significance. *Marine drugs*, v. 7, n. 2, p. 166-183, 2009.
- BIANCO, E. M. et al. *Tubastraea coccinea*: A non-indigenous coral (Cnidaria, Scleractinia) collected at Arvoredo Island, south of Brazil with potential MRSA and VRE antimicrobial activity. *Open Journal of Marine Science*, v. 6, n. 2, p. 334-340, 2016.
- BIRD, B. R.; FORRESTER, F. T. *Basic laboratory techniques in cell cultures*. Atlanta: U.S. Department of health and human services, CDC, 1981.
- BLOMQUIST, C. H. et al. 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) in scleractinian corals and zooxanthellae. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, v. 143, n. 4, p. 397-403, 2006.
- BLUNT, J. W. et al. Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, v. 28, n. 2, p. 196-268, 2011.
- BLUNT, J. W. et al. Marine Natural Products. *Natural Products Reports*, v. 31, n. 2, p. 160-258, 2014.
- BLUNT, J. W. et al. Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, v. 32, n. 2, p. 116-211, 2015.
- BLUNT, J. W. et al. Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, v. 33, n. 3, p. 382-431, 2016.
- BLUNT, J. W. et al. Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, v. 34, n. 3, p. 235-294, 2017.

- BLUNT, J. W. et al. Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, v. 35, n. 1, p. 8-53, 2018.
- BRITO, A. R. M. S.; BRITO, A. A. S. Forty years of Brazilian medicinal plant research. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 39, n. 1, p. 53-67, 1993.
- BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. *Invertebrados*. Trad. Sob a coordenação de Fábio Lang da Silveira. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 227-278.
- CAIRNS, S. D. A revision of the shallow-water azooxanthellate Scleractinia of the Western Atlantic. *Studies of Natural History Caribbean*, v. 75, p. 1-231, 2000.
- CARPES, R. M. et al. Mutagenicity, genotoxicity, and scavenging activities of extracts from the soft coral *Chromonephthea braziliensis*: A possibility of new bioactive compounds. *Genetics and Molecular Research*, v. 12, n. 3, p. 3575-3587, 2013.
- CARVALHO, M. G. et al. Activité antifongique de dérivés benzilidène-5 pyrrolones et furannones. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, v. 47, n. 6, p. 376-382, 1989.
- CASTRO, C. B.; PIRES, D. O. Brazilian coral reefs: What we already know and what is still missing. *Bulletin of Marine Science*, v. 69, n. 2, p. 357-371, 2001.
- CEGAN, A.; VECERA, M. Substituent effects on hydrolytic stability and herbicidal activity of 3-arylimidazolidine-2,4-diones. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, v. 49, n. 6, p. 1521-1528, 1984.
- CHANPUT, W.; MES, J. J.; WICHERS, H. J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, v. 23, p. 37-45, 2014.
- CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por ccd: uma metodologia aplicada à disciplina “Química Orgânica”. *Química Nova*, v. 20, n. 5, p. 560-562, 1997.
- CHENG, S. Y. Antiviral and anti-inflammatory diterpenoids from the soft coral *Sinularia gyrosa*. *Journal of Natural Products*, v. 73, n. 6, p. 1184-1187, 2010.
- CHEUNG, R. C. F. et al. Marine natural products with anti-inflammatory activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 4, p. 1645-1666, 2016.
- CHIANG, I. Z.; HUANG, W. Y.; WU, J. T. et al. Allelochemicals of *Botryococcus braunii* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, v. 40, n. 3, p. 474-480, 2004.
- COLL, J. C. et al. Transformation of soft coral (Coelenterata: Octocorallia) terpenes by *Ovula ovum* (Mollusca: Prosobranchia). *Marine Biology*, v. 74, n. 1, p. 35-40, 1983.
- COLL, J. C. The chemistry and chemical ecology of octocorals (Coelenterata, Anthozoa, Octocorallia). *Chemical Reviews*, v. 92, n. 4, p. 613-631, 1992.
- CORREA, H. et al. Cytotoxic and antimicrobial activity of pseudopterosins and *seco*-pseudopterosins isolated from the octocoral *Pseudopteroorgia elisabethae* of San Andrés

and Providencia Islands (Southwest Caribbean Sea). *Marine Drugs*, v. 9, n. 3, p. 334-343, 2011.

COSTA, L. S. et al. Pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in *Leishmania (Viannia) braziliensis* and controls lesions in infected hamsters. *Plos One*, v. 9, n. 10, p. 1-8, 2014.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico e perspectivas. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 3-24, 2002.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V. Ecological diversity of *Trypanosoma cruzi* transmission in the Amazon basin. The main scenarios in the Brazilian Amazon. *Acta Tropica*, v. 151, p. 51-57, 2015a.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V. Surveillance, health promotion and control of Chagas disease in the Amazon Region - Medical attention in the Brazilian Amazon Region: a proposal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 7, p. 825-830, 2015b.

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

CREED, J. C.; DE PAULA, A. F. Substratum preference during recruitment of two invasive alien corals onto shallow-subtidal tropical rocky shores. *Marine Ecology Progress Series*, v. 330, p. 101-111, 2007.

CREED, J. C.; OLIVEIRA, A. E. S.; DE PAULA, A. F. Cnidaria, Scleractinia, *Tubastraea coccinea* Lesson, 1829 and *Tubastraea tagusensis* Wells, 1982: Distribution extension. *Check List*, v. 4, n. 3, p. 297-300, 2008.

CREED, J. C. et al. The invasion of the azooxanthellate coral *Tubastraea* (Scleractinia: Dendrophylliidae) throughout the world: history, pathways and vectors. *Biological Invasions*, v. 19, p. 283-305, 2017a.

CREED, J. C. et al. The Sun-Coral Project: the first social-environmental initiative to manage the biological invasion of *Tubastraea* spp. in Brazil. *Management of Biological Invasions*, v. 8, n. 2, p. 181-195, 2017b.

CRUSZ, S. M.; BALKWILL, F. R. Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 12, p. 584-596, 2015.

CUNHA-JUNIOR, E. F. et al. Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, p. 1555-1559, 2011.

CUZZOCREA, S. Shock, inflammation and PARP. *Pharmacological Research*, v. 52, n. 1, p. 72-82, 2005.

DA SILVA, D. R. et al. Acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: establishing a murine model that utilises non-invasive measurements of disease parameters. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 2, p. 211-216, 2012.

DALY, M.; FAUTIN, D. G.; CAPPOLA, V. A. Systematics of the Hexacorallia (Cnidaria: Anthozoa). *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 139, n. 3, p. 419-437, 2003.

DASGUPTA, B. et al. Infection of human mononuclear phagocytes and macrophage-like THP1 cells with *Leishmania donovani* results in modulation of expression of a subset of chemokines and a chemokine receptor. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 27, p. 366-374, 2003.

DASS, C. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. 1a ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007. p. 197-261.

DAWSON-SAUNDERS, B.; TRAPP, R. G. Evaluating diagnostic procedures. In: *Basic and clinical biostatistics*, 2a ed., Norwalk: Appleton & Lange, 1994.

DE PAULA, A. F.; CREED, J. C. Spatial distribution and abundance of nonindigenous coral genus *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) around Ilha Grande, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 65, n. 4, p. 661-673, 2005.

DE PAULA, A. F.; CREED, J. C. Two species of the coral *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) in Brazil: A case of accidental introduction. *Bulletin of Marine Science*, v. 74, n. 1, p. 175-183, 2004.

DIAS, J. C. P. et al. 2nd Brazilian consensus on Chagas disease, 2015. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, n. 1, p. 3-60, 2016.

DINARELLO, C. A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 935-950, 2010.

DJERASSI, C. et al. Terpenoids. XLVII.¹ The Structure of Genipin². *The Journal of Organic Chemistry*, v. 26, n. 4, p. 1192-1206, 1961.

DJURA, P.; FAULKNER, D. J. Metabolites of the marine sponge *Dercitus* sp. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 45, n. 4, p. 735-737, 1980.

DONIA, M.; HAMANN, M. T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 3, n. 6, p. 338-348, 2003.

DUCKE, A. O gênero *Strychnos* no Brasil. *Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte*, v. 30, n. 3, p. 1-64, 1995.

ESPERANDIM, V. R. et al. Reduction of parasitism tissue by treatment of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* with lignano lactones. *Parasitology Research*, v. 107, n. 3, p. 525-530, 2010.

FATTORUSSO, E. et al. Tryptophan derivatives from a mediterranean anthozoan, *Astroides calycularis*. *Journal of Natural Products*, v. 48, n. 6, p. 924-927, 1985.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 18, n. 1, p. 1-49, 2001.

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

FENG, D. et al. Folic acid inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages by suppressing MAPKs and NF- κ B activation. *Inflammation Research*, v. 60, p. 817-822, 2011.

FERREIRA, C. E. L.; GONÇALVES, J. E. A.; COUTINHO, R. Cascos de navios e plataformas como vetores na introdução de espécies exóticas. In: SILVA, J. S. V.; SOUZA, R. C. C. L. (Eds.). *Água de lastro e bioinvasão*. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2004. p. 143-155.

FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FLEURY, B. G. et al. New hemiketal steroid from the introduced soft coral *Chromonephthea braziliensis* is a chemical defense against predatory fishes. *Journal of Chemical Ecology*, v. 34, n. 8, p. 987-993, 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *Guidance for Industry: S2(R1)* Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. Rockville, 2012. 35 p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). *Guidance for Industry: M7(R1)* Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. Silver Spring, 2018. 131 p.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

FOURNET, A. et al. Effect of some bisbenzylisoquinoline alkaloids on American *Leishmania* sp. in BALB/c mice. *Phytoterapy Research*, v. 7, n. 4 p. 281-284, 1993.

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

GAO, C. et al. Alkaloids from corals. *Chemistry & Biodiversity*, v. 10, n. 8, p. 1435-1447, 2013.

- GERHART, D. J. The chemical systematics of colonial marine animals: an estimated phylogeny of the order Gorgonacea based on terpenoid characters. *The Biological Bulletin*, v. 164, n. 1, p. 71-81, 1983.
- GOTTLIEB, O. R.; MORS, W. B. Amazonian phytochemistry - Review in perspective. *Interciência*, v. 3, p. 252, 1978.
- GUELLA, G. et al. Novel aplysinopsin-type alkaloids from scleractinian corals of the family Dendrophylliidae of the Mediterranean and the Philippines. Configurational-assignment criteria, stereospecific synthesis, and photoisomerization. *Helvetica Chimica Acta*, v. 71, n. 4, p. 773-782, 1988.
- GUELLA, G. et al. Aplysinopsin-type alkaloids from *Dendrophyllia* sp., a scleractinian coral of the family Dendrophylliidae of the Philippines, facile photochemical (Z/E) photoisomerization and thermal reversal. *Helvetica Chimica Acta*, v. 72, n. 7, p. 1444-1450, 1989.
- GUERRIERO, A. et al. Novel cholic-acid-type sterones of *Deltocyathus magnificus*, a deep-water scleractinian coral from the Loyalty Islands, SW Pacific. *Helvetica Chimica Acta*, v. 79, n. 4, p. 982-988, 1996.
- GUL, W.; HAMANN, M. T. Indole alkaloid marine natural products: An established source of cancer drug leads with considerable promise for the control of parasitic, neurological and other diseases. *Life sciences*, v. 78, n. 5, p. 442-453, 2005.
- GULATI, D. et al. A new synthesis of aplysinopsin, a marine alkaloid and its analogues and their biological activities. *Indian Journal of Chemistry*, v. 33, n. 1, p. 4-9, 1994.
- GÜNER, A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities with acute toxicity, cytotoxicity and mutagenicity of *Cystoseira compressa* (Esper) Gerloff & Nizamuddin from the coast of Urla (Izmir, Turkey). *Cytotechnology*, v. 67, n. 1, p. 135-143, 2015.
- HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*, v. 8, n. 12, p. 536-544, 2003.
- HERTIANI, T. et al. From anti-fouling to biofilm inhibition: New cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian *Agelas* sponges. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 3, p. 1297-1311, 2010.
- HU, G. P. et al. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine Drugs*, v. 9, n. 4, p. 514-525, 2011.
- HU, J. F. et al. New antiinfective and human 5-HT₂ receptor binding natural and semisynthetic compounds from the jamaican sponge *Smenospongia aurea*. *Journal of Natural Products*, v. 65, n. 4, p. 476-480, 2002.
- HUTTNER, A. et al. Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, v. 2, n. 31, p. 1-13, 2013.

ISHIGAMI, S. T. et al. Cristaxenicin A, an antiprotozoal xenicane diterpenoid from the deep sea gorgonian *Acanthoprimnoa cristata*. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 77, n. 23, p. 10962-10966, 2012.

ISHIYAMA, M. et al. A combined assay of cell viability and *in vitro* cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 19, n. 11, p. 1518-1520, 1996.

IWAGAWA, T. et al. Aplysinopsin dimers from a stony coral. *Tubastraea aurea*. *Heterocycles*, v. 75, n. 8, p. 2023-2028, 2008.

IWAGAWA, T. et al. Three novel bis(indole) alkaloids from a stony coral, *Tubastraea* sp. *Tetrahedron Letters*, v. 44, n. 12, p. 2533-2535, 2003.

IWASHINA, T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, v. 113, n. 3, p. 287-299, 2000

JAIN, S. K. et al. A parasite rescue and transformation assay for antileishmanial screening against intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in THP1 human acute monocytic leukemia cell line. *Journal of Visualized Experiments*, v. 70, p. 1-14, 2012.

JIMENO, J. M. A clinical armamentarium of marine-derived anti-cancer compounds. *Anti-cancer Drugs*, v. 13, n. 1, p. 15-19, 2002.

JONES, A. J. et al. Trypanocidal activity of marine natural products. *Marine Drugs*, v. 11, n. 10, p. 4058-4082, 2013.

JUNQUEIRA, A. O. R. et al. Zoobentos. In: LOPES, R. M. (Ed.). *Informe sobre as espécies exóticas invasoras marinhas no Brasil*. Brasília: MMA/SBF, 2009. p. 145-339.

KATIYAR, C. et al. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. *AYU*, v. 33, n. 1, p. 10-19, 2012.

KAZLAUSKAS, R. et al. Aplysinopsin, a new tryptophan derivative from a sponge. *Tetrahedron Letters*, v. 18, n. 1, p. 61-64, 1977.

KELLER-RUDEK, H. et al. The MPI-Mainz UV/VIS spectral atlas of gaseous molecules of atmospheric interest. *Earth System Science Data*, v. 5, n. 2, p. 365-373, 2013.

KIJJOA, A.; SAWANGWONG, P. Drugs and cosmetics from the sea. *Marine Drugs*, v. 2, n. 2, p. 73-82, 2004.

KIRKLAND, D. et al. A core *in vitro* genotoxicity battery comprising the Ames test plus the *in vitro* micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and *in vivo* genotoxins. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 721, n. 1, p. 27-73, 2011.

KLÓSEK, M. et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in prostate cancer cells after treatment with xanthohumol – a natural compound

present in *Humulus lupulus* L. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, p. 837-854, 2016.

KOH, E. G. L. Do scleractinian corals engage in chemical warfare against microbes? *Journal of Chemical Ecology*, v. 23, n. 2, p. 379-398, 1997.

KOH, E. G. L.; SWEATMAN, H. Chemical warfare among scleractinians: bioactive natural products from *Tubastraea faulkneri* Wells kill larvae of potential competitors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 251, n. 2, p. 141-160, 2000.

KONTIZA, I. et al. 3-Keto steroids from the marine organisms *Dendrophyllia cornigera* and *Cymodocea nodosa*. *Steroids*, v. 71, n. 2, p. 177-181, 2006.

KURAKULA, K. et al. Nuclear receptor Nur77 attenuates airway inflammation in mice by suppressing NF- κ B activity in lung epithelial cells. *The Journal of Immunology*, v. 196, n. 4, p. 1388-1398, 2015.

LAGES, B. G. et al. Chemical composition and release in situ due to injury of the invasive coral *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia). *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 58, p. 47-56, 2010b.

LAGES, B. G. et al. Chemical defenses against generalist fish predators and fouling organisms in two invasive ahermatypic corals in the genus *Tubastraea*. *Marine Ecology*, v. 31, n. 3, p. 473-482, 2010a.

LAGES, B. G. et al. Proximity to competitors changes secondary metabolites of nonindigenous cup corals, *Tubastraea* spp., in the southwest Atlantic. *Marine Biology*, v. 159, n. 7, p. 1551-1559, 2012.

LEAL, M. C. et al. Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades – Where and what are we bioprospecting? *PLoS ONE*, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2012.

LEAL, M. C. et al. Coral aquaculture to support drug discovery. *Trends in Biotechnology*, v. 31, n. 10, p. 555-561, 2013.

LEE, J. H. et al. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*, v. 29, n. 5, p. 491-499, 2013.

LEITE, J. P. V. et al. Trypanocidal activity of triterpenes from arrabidaea triplinervia and derivatives. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, n. 11, p. 2307-2309, 2006.

LEVIN, D. E. et al. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 79, n. 23, p. 7445-7449, 1982.

LEWELLYN, K.; ZJAWIONY, J. K. Chapter 5 Aplysinopsins as promising marine natural product drug leads: Recent developments. In: RAMPELOTTO, P. H.; TRINCONE, A. (Eds.). *Grand challenges in marine biotechnology*. Cham: Springer, 2018. p. 190-215.

LEWIN, G. et al. In vitro antileishmanial properties of new flavonoids against *Leishmania donovani*. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, v. 1, n. 3, p. 168–171, 2011.

LI, K. et al. Recent advances and applications of experimental technologies in marine natural product research. *Marine Drugs*, v. 13, n. 5, p. 2694-2713, 2015.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Inflammation in atherosclerosis: From pathophysiology to practice. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 54, n. 23, p. 2129-2138, 2009.

LIMA, M. C. A. et al. Synthèse et activité antimicrobienne de dérivés chlorobenzyl benzyldène imidazolidinediones et thiazolidinediones substituées. *Pharmazie*, v. 47, n. 3, p. 182-184, 1992.

LINO, L. M. *Factores de virulência em Streptococcus pyogenes*. 2010. 40 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. *Biossíntese de produtos naturais*. 1. ed. Lisboa: IST Press, 2007. p. 15-56.

LOUP, G.; PIALOUX, G.; LESCURE, F. X. Update in treatment of Chagas disease. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 24, n. 5, p. 428-434, 2011.

MAIA, L. F. et al. Raman spectroscopic study of antioxidant pigments from cup corals *Tubastraea* spp. *The Journal of Physical Chemistry A*, v. 118, n. 19, p. 3429-3437, 2014.

MALTA, D. J. N. *Síntese, elucidação estrutural e atividade biológica de novos derivados imidazolidinônicos*. 2005. 152 f. Dissertação. (Mestre em Biotecnologia de Produtos Bioativos) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

MAMDANI, M. et al. Effect of selective cyclooxygenase 2 inhibitors and naproxen on short-term risk of acute myocardial infarction in the elderly. *Archives of Internal Medicine*, v. 163, n. 4, p. 481-486, 2003.

MANCINI, I. et al. On the origin of quasi-racemic aplysinopsin cycloadducts, (bis)indole alkaloids isolated from scleractinian corals of the family Dendrophylliidae. Involvement of enantioselective Diels–Alderses or asymmetric induction in artifact processes involving adventitious catalysts? *Tetrahedron*, v. 59, n. 44, p. 8757-8762, 2003.

MARÍN, C. et al. Antileishmaniasis activity of flavonoids from *Consolida oliveriana*. *Journal of Natural Products*, v. 72, n. 6, p. 1069-1074, 2009.

marine antileishmanial natural products. *Planta Medica*, v. 77, n. 6, p. 572-585, 2011.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.

MAYER, A. M. S. et al. 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 mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 153, n. 2, p. 191-222, 2011.

MAYER, A. M. S. et al. Marine pharmacology in 2009-2011: marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Drugs*, v. 11, n. 7, p. 2510-2573, 2013.

MAYER, A. M. S. et al. Marine Pharmacology in 2012-2013: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Drugs*, v. 15, n. 9, p. 1-61, 2017.

MCCLINTOCK, J. B.; BAKER, B. J. *Marine chemical ecology*. New York: CRC Press, 2001. p.14-17.

MEIRELLES, M. N. L. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructure and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis *in vitro*. *European Journal of Cell Biology*, v. 31, p. 198-206, 1986.

MEYER, M. et al. An antiplasmodial new (bis)indole alkaloid from the hard coral *Tubastraea* sp. *Natural Product Research*, v. 23, n. 2, p. 178-182, 2009.

MILLER, A.; STANTON, C.; DEVERY, R. Modulation of arachidonic acid distribution by conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in MCF-7 and SW480 cancer cells. *Lipidis*, v. 36, n. 10, p. 1161-1168, 2001.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: Past, present and future. *Current Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 1153-1169, 2007.

MOLINSKI, T. F. et al. Drug development from marine natural products. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 8, n. 1, p. 69-85, 2009.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MORILLO, C. A. et al. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 14, p. 1295-1306, 2015.

MORSINGH, F.; ROBINSON, R. The syntheses of brazilin and haematoxylin. *Tetrahedron*, v. 26, n. 1, p. 281-289, 1970.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, v. 455, n. 1-2, p. 26-60, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAMASIVAYAM, S. K. R.; ROY, E. A. Antibiofilm effect of medicinal plant extracts against clinical isolate of biofilm of *Escherichia coli*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 5, n. 2, p. 486-489, 2013.

NETZ, N.; OPATZ, T. Marine indole alkaloids. *Marine Drugs*, v. 13, n. 8, p. 4814-4914, 2015.

NEVES, D. P.; MELO, P. M.; VITOR, R. W. A. *Parasitologia Humana*. 11ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NGAMWONGSATIT, P. et al. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *Journal of Microbiological Methods*, v. 73, p. 211-215, 2008.

NOAZIN, S. et al. First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials. *Vaccine*, v. 26, n. 52, p. 6759-6767, 2008.

OFMAN, J. J. et al. A metaanalysis of severe upper gastrointestinal complications of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *The Journal of Rheumatology*, v. 29, n. 4, p. 804-812, 2002.

OHLSEN, K.; KOLLER, K. P.; HACKER, J. Analysis of expression of the alpha-toxin gene (hla) of *Staphylococcus aureus* by using a chromosomally encoded hla::lacZ gene fusion. *Infection and Immunity*, v. 65, n. 9, p. 3606-3614, 1997.

OIGMAN-PSZCZOL, S. et al. O controle da invasão do coral-sol no Brasil não é uma causa perdida. *Ciência e Cultura*, v. 69, n. 1, p. 56-59, 2017.

OKUDA, R. K. et al. Marine natural products: The past twenty years and beyond. *Pure and Applied Chemistry*, v. 54, n. 10, p. 1907-1914, 1982.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD *Guideline for testing of chemicals: Bacterial reverse mutation test*. 1997. 11 p.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD *Guideline for the testing of chemicals: Carcinogenicity Studies*. 2009. 15 p.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD *Guideline for the testing of chemicals: In vitro mammalian cell micronucleus test*. 2010. 23 p.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD *Guideline for the testing of chemicals: In vitro mammalian cell micronucleus test*. 2014. 26 p.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD *Guidance Document on Revisions to OECD Genetic Toxicology Test Guidelines*. 2015. 58 p.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD *Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015*. 2016a. 60 p.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD *Guideline for the testing of chemicals: In vitro mammalian cell micronucleus test*. 2016b. 29 p.

ORHAN, I. et al. Inhibitory activity of marine sponge-derived natural products against parasitic protozoa. *Marine Drugs*, v. 8, n. 1, p. 47-58, 2010.

PADMAVATHI, A. R.; PANDIAN, S. K. Antibiofilm activity of biosurfactant producing coral associated bacteria isolated from Gulf of Mannar. *Indian Journal of Microbiology*, v. 54, n. 4, p. 376-382, 2014.

PAWLIK, J. R. Marine invertebrate chemical defenses. *Chemical Reviews*, v. 93, n. 5, p. 1911-1922, 1993.

PEARCE, A. N. et al. Orthidines A–E, tubastrine, 3,4-dimethoxyphenethyl- β -guanidine, and 1,14-sperminedihomovanillamide: potential anti-inflammatory alkaloids isolated from the New Zealand ascidian *Aplidium orthium* that act as inhibitors of neutrophil respiratory burst. *Tetrahedron*, v. 64, n. 24, p.5748-5755, 2008.

PFUHLER, S. et al. Genetic toxicity assessment: Employing the best science for human safety evaluation part iv: Recommendation of a working group of the Gesellschaft fuer Umwelt-Mutationsforschung (GUM) for a simple and straightforward approach to genotoxicity testing. *Toxicological Sciences*, v. 97, n. 2, p. 237-240, 2007.

PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. *Química Nova*, v. 18, n. 6, p. 608-615, 1995.

POCSFALVI, G. et al. Molecular characterization of a highly heterogeneous mixture of glucosylceramides from a deep-water Mediterranean scleractinian coral *Dendrophyllia cornigera*. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*, v. 14, n. 23, p. 2247-2259, 2000.

POMPONI, S. A. The bioprocess–technological potential of the sea. *Journal of Biotechnology*, v. 70, n. 1-3, p. 5-13, 1999.

PORWAL, S. et al. Discovery of novel antileishmanial agents in an attempt to synthesize pentamidine-aplysinsin hybrid molecule. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, n. 19, p. 5793-5802, 2009.

QI, S. H. et al. Alkaloids from the south China sea black coral *Antipathes dichotoma*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 57, n. 1, p. 87-88, 2009.

RANGEL, M.; FALKENBERG, M. An overview of the marine natural products in clinical trials and on the market. *Journal of Coastal Life Medicine*, v. 3, n. 6, p. 421-428, 2015.

RASHID, M. A. et al. Mycalolides D and E, new cytotoxic macrolides from a collection of the stony coral *Tubastraea faulkneri*. *Journal of Natural Products*, v. 58, n. 7, p. 1120-1125, 1995.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.

REDDY, Y. T. et al. Aplysinopsin analogs: Synthesis and anti-proliferative activity of substituted (Z)-5-(N-benzylindol-3-ylmethylene)imidazolidine-2,4-diones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 10, p. 3570-3574, 2010.

REYES, J.; SANTODOMINGO, N. *Manual de identificación CITES de invertebrados marinos de Colombia*. Medellín: Servigráficas, 2002. p. 7-24.

ROCHA, J. et al. Cnidarians as a source of new marine bioactive compounds — an overview of the last decade and future steps for bioprospecting. *Marine Drugs*, v. 9, n. 10, p. 1860-1886, 2011.

ROCHA, J.; LEAL, M.; CALADO, R. Marine bioactive compounds from cnidarians. In: KIM, S. K. (Ed.). *Springer Handbook of Marine Biotechnology*. Heidelberg: Springer, 2015. p. 823-849.

ROCHA, L. G. et al. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, v. 12, p. 514-535, 2005.

ROMAÑA, C. Acerca de un sintoma inicial de valor para el diagnóstico de la forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanósica unilateral. (Hipótesis sobre la puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). *MEPRA*, v. 22, p. 16-28, 1935.

ROMANHA, A. J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 2, p. 233-238, 2010.

RUBIO, J. et al. Trypanocidal activity of oleoresin and terpenoids isolated from *Pinus oocarpa*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 60, p. 711-716, 2005.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. *Invertebrate zoology*. 6a ed. New York: Saunders College Publishing, 1994. p. 95-170.

SAKAI, R.; HIGA, T. Tubastrine, a new guanidinostyrene from the coral *Tubastrea aurea*. *Chemistry Letters*, v. 16, n. 1, p. 127-128, 1987.

SAMMARCO, P. W.; COLL, J. C. Chemical adaptations in the Octocorallia: evolutionary considerations. *Marine Ecology Progress Series*, v. 88, p. 93-104, 1992.

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

SANDUJA, R. et al. Secondary metabolites of the coelenterate *Echinopora lamellose*. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, v. 21, n. 3, p. 845-848, 1984.

SANDUJA, R.; ALAM, M.; WELLINGTON, G. M. Secondary metabolites of the non-symbiotic coral *Tubastraea micrantha* (Ehrenberg): isolation and structure of novel anthraquinoid derivatives. *Journal of Chemical Research. Synopses*, v. 12, p. 450-451, 1986.

SANTOS, K. O.; CRAVEIRO, M. V.; BERLINCK, R.G. S. Desenvolvimento de abordagem objetivando a síntese da 3-desidroxí-4-metoxitubastrina. *Química Nova*, v. 30, n. 8, p. 1892-1895, 2007.

SANTOS, L. A. H. et al. Antagonism between invasive pest corals *Tubastraea* spp. and the native reef-builder *Mussismilia hispida* in the southwest Atlantic. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 449, p. 69-76, 2013.

SANTOS, V. G. *Estudo da atividade anti-inflamatória e toxicológica em extratos de corais do gênero Tubastraea*. 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SARAIVA, J. et al. In vitro and in vivo activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, v. 100, n. 4, p. 791-795, 2006.

SARANRAJ, P.; SIVASAKTHI, S. Medicinal plants and its antimicrobial properties: A review. *Global Journal of Pharmacology*, v. 8, n. 3, p. 316-327, 2014.

SATHEESH, S.; BA-AKDA, M. A.; AL-SOFYANI, A. A. Natural antifouling compound production by microbes associated with marine macroorganisms – A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 19, n. 3, p. 26-35, 2016.

SAWLE, P. et al. Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages. *British Journal of Pharmacology*, v. 145, p. 800-810, 2005.

SCHOONEN, W. G. E. J.; WESTERINK, W. M. A.; HORBACH, G. J. High-throughput screening for analysis of in vitro toxicity. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, v. 99, p. 401-452, 2009.

SEIBERT, K. et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, p. 12013-12017, 1994.

SILVA, A. G. et al. Eleven years of range expansion of two invasive corals (*Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*) through the southwest Atlantic (Brazil). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 141, p. 9-16, 2014.

SILVA, E. C.; BARROS, F. Macrofauna bentônica introduzida no Brasil: lista de espécies marinhas e dulcícolas e distribuição atual. *Oecologia Australis*, v. 15, n. 2, p. 326-344, 2011.

- SILVA, F. P. L. et al. Synthesis, evaluation against *Leishmania amazonensis* and cytotoxicity assays in macrophages of sixteen new congeners Morita-Baylis-Hillman adducts. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, p. 4295-4391, 2011.
- SKROPETA, D. Deep-sea Natural Products. *Natural Product Reports*, v. 25, n. 6, p. 1131-1166.
- SOARES, C. L. S. et al. Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 4, p. 463-468, 2006.
- SOBERÓN, J. R. et al. Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, p. 1450-1461, 2007.
- SPONCHIADO, G. et al. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 178, p. 289-296, 2016.
- STANKEVICINS, L. C. Avaliação genotóxica e antigenotóxica de extratos obtidos a partir das esponjas marinhas *Aplysina fulva* e *Arenosclera brasiliensis*. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- STANKEVICINS, L. C. et al. Genotoxic and antigenotoxic evaluation of extracts from *Arenosclera brasiliensis*, a brazilian marine sponge. *Toxicology in Vitro*, v. 22, p. 1869-1877, 2008.
- STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, v. 358, n. 9276, p. 135-138, 2001.
- STOCKDALE, L.; NEWTON, R. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. *PLOS*, v. 7, n. 6, p. 2278- 2293, 2013.
- STOWE, S. D. et al. Anti-biofilm compounds derived from marine sponge. *Marine Drugs*, v. 9, n. 10, p. 2010-2035, 2011.
- SZTANKE, K. et al. Synthesis, crystal structure and anticancer activity of novel derivatives of ethyl 1-(4-oxo-8-aryl-4,6,7,8-tetrahydroimidazo[2,1-c][1,2,4]triazin-3-yl)formate. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, n. 4, p. 539-547, 2006.
- TARRANT, A. M. et al. Metabolism of estrogens and androgens by scleractinian corals. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, v. 136, n. 3, p. 473-485, 2003.
- TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease - a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 5, p. 463-491, 2006.
- TEIXEIRA, D. E. et al. *Atlas didático*. Ciclo de vida da Leishmania. Rio de Janeiro. Cecierj, 2013.

TELLO, E. et al. Cembranoid diterpenes from the Caribbean sea whip *Eunicea knight*. *Journal of Natural Products*, v. 72, n. 9, p. 1595-1602, 2009.

TEMPONE, A. G.; OLIVEIRA, C. M.; BERLINCK, R. G. S. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Medica*, v. 77, n. 6, p. 572-585, 2011.

TIMM, B. L. et al. *In Vitro* and *In Vivo* biological effects of novel arylimidamide derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 7, p. 3720-3726, 2014b.

TIMM, B. L. et al. *In vitro* investigation of the efficacy of novel diamidines against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, v. 141, p. 1272-1276, 2014a.

TONA, L. et al. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 61, n. 1, p. 57-65, 1998.

TORRES, F. A. E. et al. New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 24, p. 265-276, 2014.

URBAN, S.; CAPON, R. J.; HOOPER, J. N. A. A new alkaloid from an Australian marine sponge, *Spongosorites* sp. *Australian Journal of Chemistry*, v. 47, n. 12, p. 2279-2282, 1994.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica*, v. 115, p. 55-68, 2010.

UTKINA, N. K. Antioxidant activity of aromatic alkaloids from the marine sponges *Aaptos aaptos* and *Hyrtios* sp. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 45, n. 6, p. 849-853, 2009.

VEGIOPOULOS, A.; HERZIG, S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 275, n. 1, p. 43-61, 2007.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA JR., G. M. V. et al. Terpenos e ácidos graxos de *Dipteryx lacunifera* Ducke. *Química Nova*, v. 30, n. 7, p. 1658-1662, 2007.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant drug analysis, a thin-layer chromatography atlas*. 2a ed. Berlin: Springer, 1995.

WALL, P. E. *Thin-layer chromatography: a modern practical approach*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2005. p. 6-55.

WINTER, C. A.; RISTEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology Medicine*, v. 111, p. 544-547, 1962.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION (2015). Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 18/04/2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. 2014. 256 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO *Critically important antimicrobials for human medicine – 5th rev.* 2017. 48 p.

WORMS – WORLD REGISTER OF MARINE SPECIES (2018). Statistics. Disponível em: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=stats>. Acesso em: 01/03/2018.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Eds.). *Plantas medicinais sob a óptica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 2001. p. 17-46.

ZHANG, I. et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E₂ production. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 283, n. 3, p. 1069-1075, 1997.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.

APÊNDICE – Ensaios preliminares para citotoxicidade e mutagenicidade para linhagens
padrão de *S. entérica*

Tabela 16 – Resultados de mutagenicidade e sobrevivência para amostras de EbM de *T. coccinea* e *T. tagusensis* na ausência de metabolização exógena

MeOH	µg/100 µL/placa	<i>T. coccinea</i>			<i>T. tagusensis</i>		
		Média ± DP	I.M.	% Sobr.	Média ± DP	I.M.	% Sobr.
TA97	DMSO	119 ± 13	1,0	100	155 ± 16	1,0	100
	50	135 ± 15	1,1	88	157 ± 4	1,0	47
	250	162 ± 19*	1,4	100	129 ± 27	0,8	43
	500	106 ± 15	0,9	84	98 ± 11*	0,6	27
	2500	102 ± 8	0,9	41	28 ± 11*	0,2	29
	5000	22 ± 8*	0,2	6	1 ± 2*	0,0	22
	4-NQO 1,0	539 ± 8*	4,5	100	757 ± 38*	4,9	23
TA98	DMSO	13 ± 5	1,0	100	17 ± 4	1,0	100
	50	16 ± 7	1,2	100	18 ± 3	1,1	92
	250	19 ± 3	1,5	98	11 ± 8	0,7	85
	500	22 ± 7	1,7	59	20 ± 8	1,2	67
	2500	18 ± 11	1,4	22	22 ± 4	1,3	56
	5000	7 ± 2	0,5	0	20 ± 9	1,2	52
	4-NQO 0,5	342 ± 24	26,3	93	87 ± 5*	5,2	85
TA100	DMSO	101 ± 18	1,0	100	112 ± 27	1,0	100
	50	99 ± 8	1,0	100	153 ± 26	1,4	100
	250	114 ± 5	1,1	100	139 ± 5	1,2	100
	500	120 ± 13	1,2	100	106 ± 4	0,9	100
	2500	138 ± 8*	1,4	53	155 ± 16	1,4	100
	5000	59 ± 32	0,6	4	135 ± 8	1,2	100
	AS 0,5	661 ± 141*	6,6	100	728 ± 36*	6,5	100
TA102	DMSO	389 ± 43	1,0	100	336 ± 43	1,0	100
	50	386 ± 27	1,0	100	497 ± 153	1,5	98
	250	320 ± 56	0,8	100	453 ± 38*	1,3	71
	500	352 ± 17	0,9	78	398 ± 41	1,2	73
	2500	264 ± 8*	0,7	17	348 ± 94	1,0	73
	5000	261 ± 54*	0,7	0	320 ± 99	1,0	100
	Mit. C 0,5	3290 ± 273*	8,5	100	2307 ± 178*	6,9	82
TA104	DMSO	173 ± 76	1,0	100	393 ± 6	1,0	100
	50	141 ± 14	0,8	100	405 ± 23	1,0	100
	250	177 ± 17	1,0	96	400 ± 10	1,0	100
	500	245 ± 13	1,4	100	382 ± 8	1,0	100
	2500	321 ± 191	1,9	39	381 ± 30	1,0	100
	5000	183 ± 21	1,1	6	287 ± 35*	0,7	40
	MMS 250	747 ± 59*	4,3	100	443 ± 7*	1,1	100

Valores expressos em média e desvio padrão (DP) de triplicatas; I.M.: Índice de mutagenicidade em relação ao controle negativo; Sobr.: sobrevivência; DMSO: dimetilsulfóxido; 4-NQO: 4-nitroquinolina-1-óxido; AS: Azida sódica; Mit. C: Mitomicina C; MMS: metil metano sulfonato; *Diferença significativa (ANOVA e Tukey's $p < 0,05$); Indicação em **negrito** dos resultados quando I.M. ≥ 2 para mutagenicidade e quando a sobrevivência celular $< 70\%$ para citotoxicidade.

Tabela 17 – Resultados de mutagenicidade e sobrevivência para amostras de EbE de *T. coccinea* e *T. tagusensis* na ausência de metabolização exógena

EtOH	$\mu\text{g}/100 \mu\text{L}/\text{placa}$	<i>T. coccinea</i>			<i>T. tagusensis</i>		
		Média \pm DP	I.M.	% Sobr.	Média \pm DP	I.M.	% Sobr.
TA97	DMSO	134 \pm 16	1,0	100	80 \pm 13	1,0	100
	50	151 \pm 29	1,1	100	74 \pm 8	0,9	96
	250	152 \pm 13	1,1	100	66 \pm 12	0,8	85
	500	170 \pm 28	1,3	93	86 \pm 7	1,1	54
	2500	132 \pm 16	1,0	84	68 \pm 10	0,8	56
	5000	180 \pm 22*	1,3	86	74 \pm 26	0,9	55
	4-NQO 1,0	341 \pm 34*	2,6	100	231 \pm 26*	2,9	41
TA98	DMSO	20 \pm 7	1,0	100	20 \pm 3	1,0	100
	50	22 \pm 10	1,1	100	17 \pm 9	0,9	80
	250	18 \pm 5	0,9	100	19 \pm 4	1,0	75
	500	25 \pm 5	1,2	100	23 \pm 2	1,1	76
	2500	23 \pm 6	1,1	100	19 \pm 4	1,0	56
	5000	33 \pm 7	1,6	100	22 \pm 5	1,1	46
	4-NQO 0,5	536 \pm 126*	26,4	100	432 \pm 114*	21,6	70
TA100	DMSO	180 \pm 3	1,0	100	114 \pm 31	1,0	100
	50	168 \pm 19	0,9	100	99 \pm 16	0,9	91
	250	150 \pm 18*	0,8	100	87 \pm 16	0,8	86
	500	171 \pm 23	0,9	100	141 \pm 15	1,2	100
	2500	149 \pm 15*	0,8	100	128 \pm 17	1,1	69
	5000	255 \pm 11*	1,4	93	156 \pm 9	1,4	53
	AS 0,5	685 \pm 155*	3,8	100	529 \pm 30*	4,7	100
TA102	DMSO	420 \pm 41	1,0	100	333 \pm 42	1,0	100
	50	460 \pm 35	1,1	90	336 \pm 41	1,0	100
	250	387 \pm 56	0,9	85	403 \pm 51	1,2	66
	500	391 \pm 54	0,9	64	405 \pm 21	1,2	66
	2500	400 \pm 77	1,0	48	268 \pm 40	0,8	22
	5000	241 \pm 105	1,0	33	413 \pm 19*	1,2	37
	Mit. C 0,5	1145 \pm 228*	3,7	100	2813 \pm 287*	8,4	116
TA104	DMSO	193 \pm 21	1,0	100	226 \pm 22	1,0	100
	50	186 \pm 6	1,0	90	189 \pm 37	0,8	88
	250	211 \pm 25	1,1	92	204 \pm 30	0,9	91
	500	155 \pm 6*	0,8	90	203 \pm 70	0,9	98
	2500	195 \pm 26	1,0	100	240 \pm 8	1,1	95
	5000	242 \pm 36	1,3	58	232 \pm 23	1,0	93
	MMS 250	2955 \pm 461*	15,3	16	1133 \pm 259*	5,0	59

Valores expressos em média e desvio padrão (DP) de triplicatas; I.M.: Índice de mutagenicidade em relação ao controle negativo; Sobr.: sobrevivência; DMSO: dimetilsulfóxido; 4-NQO: 4-nitroquinolina-1-óxido; AS: Azida sódica; Mit. C: Mitomicina C; MMS: metil metano sulfonato; *Diferença significativa (ANOVA e Tukey's $p < 0,05$); Indicação em **negrito** dos resultados quando I.M. ≥ 2 para mutagenicidade e quando a sobrevivência celular $< 70\%$ para citotoxicidade.

Tabela 18 – Resultados de mutagenicidade e sobrevivência para APL01 na ausência de metabolização exógena

APL01	$\mu\text{g}/100 \mu\text{L}/\text{placa}$	APL01		
		Média \pm DP	I.M.	% Sobr.
TA97	DMSO	125 \pm 27	1,0	100
	10	142 \pm 20*	1,1	91
	50	178 \pm 25	1,4	100
	100	152 \pm 21	1,2	89
	500	154 \pm 12	1,2	88
	1000	128 \pm 11	1,0	100
	4-NQO 1,0	503 \pm 49*	4,0	100
	TA98	DMSO	26 \pm 6	1,0
10		28 \pm 4	1,1	99
50		33 \pm 7	1,3	100
100		29 \pm 10	1,1	100
500		38 \pm 6	1,5	100
1000		31 \pm 0	1,2	100
4-NQO 0,5		566 \pm 101*	22,0	100
TA100		DMSO	139 \pm 10	1,0
	10	149 \pm 20	1,1	100
	50	122 \pm 43	0,9	100
	100	151 \pm 11	1,1	100
	500	152 \pm 22	1,1	100
	1000	150 \pm 27	1,1	100
	AS 0,5	741 \pm 179*	5,3	100
	TA102	DMSO	336 \pm 43	1,0
10		482 \pm 89	1,4	100
50		380 \pm 34	1,1	80
100		398 \pm 52	1,2	100
500		451 \pm 31*	1,3	95
1000		415 \pm 65	1,2	95
Mit. C 0,5		2307 \pm 178*	6,9	91
TA104		DMSO	193 \pm 1	1,0
	10	201 \pm 16	1,0	98
	50	192 \pm 13	1,0	92
	100	273 \pm 9	1,4	86
	500	248 \pm 19	1,3	93
	1000	226 \pm 28	1,2	84
	MMS 250	488 \pm 8	2,5	60

Valores expressos em média e desvio padrão (DP) de triplicatas; I.M.: Índice de mutagenicidade em relação ao controle negativo; Sobr.: sobrevivência; DMSO: dimetilsulfóxido; 4-NQO: 4-nitroquinolina-1-óxido; AS: Azida sódica; Mit. C: Mitomicina C; MMS: metil metano sulfonato; *Diferença significativa (ANOVA e Tukey's $p < 0,05$); Indicação em **negrito** dos resultados quando I.M. ≥ 2 para mutagenicidade e quando a sobrevivência celular $< 70\%$ para citotoxicidade.