



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

Raphael de Mello Carpes


**Estudo toxicológico de extratos do coral alcionáceo *Chromonephthea
braziliensis* (Alcyonacea, Nephtheidae)**

Rio de Janeiro

2013

Raphael de Mello Carpes

**Estudo toxicológico de extratos do coral alcionáceo *Chromonephthea braziliensis*
(Alcyonacea, Nephtheidae)**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Israel Felzenszwalb

Coorientadora: Prof.^a Dra. Claudia Alessandra Fortes Aiub

Rio de Janeiro

2013

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

C294 Carpes, Raphael de Mello.
Estudo toxicológico de extratos do coral alcionáceo *Chromonephthea
braziliensis* (Alcyonacea, Nephtheidae). / Raphael de Mello Carpes. –
2013.
97 f.

Orientador: Israel Felzenszwalb.

Coorientadora: Claudia Alessandra Fortes Aiub.

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

1. Recifes e ilhas de coral – Teses. 2. Mutagênese – Teses. 3.
Toxicidade – Teses. 4. Metabolismo secundário – Teses. I. Felzenszwalb,
Israel. II. Aiub, Claudia Alessandra Fortes. III. Universidade do Estado do
Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV Título.

CDU 593.6

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

Assinatura

Data

Raphael de Mello Carpes

**Estudo toxicológico de extratos do coral alcionáceo *Chromonephthea braziliensis*
(Alcyonacea, Nephtheidae)**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de março de 2013.

Orientador:

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientadora:

Prof.^a Dra. Claudia Alessandra Fortes Aiub
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Gisele Lobo Hajdu
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Marcos Dias Pereira
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Prof.^a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Israel Felzenszwalb pela confiança e oportunidade sem os quais este trabalho não se desenvolveria.

À Professora Dra. Claudia Alessandra Fortes Aiub cujo conhecimento e dedicação foram fundamentais para esse trabalho e para minha formação.

À Professora Dra. Beatriz Grosso Fleury por sua gentil colaboração e interesse.

Ao Professor Dr. José Luiz Mazzei da Costa pela ajuda nas dúvidas e dificuldades.

Aos meus amigos do LABMUT. Cada um de vocês me ajudou, de um jeito especial e único, e foi muito importante para a realização deste trabalho. Valeu!

Ao Departamento de Bioquímica (IBRAG), em especial ao Paulo e à Jessica.

Aos meus irmãos, Lucas e Augusto pela compreensão em ceder o computador quando eu precisava.

Aos meus amigos pelo entendimento e compreensão da minha ausência nos momentos de festa.

Muda que quando a gente muda o mundo muda com a gente
A gente muda o mundo na mudança da mente
E quando a mente muda a gente anda pra frente
E quando a gente manda ninguém manda na gente!
Na mudança de atitude não há mal que não se mude nem doença sem cura
Na mudança de postura a gente fica mais seguro
Na mudança do presente a gente molda o futuro!

Gabriel Contino (O Pensador)

RESUMO

CARPES, Raphael de Mello. *Estudo toxicológico de extratos do coral alcionáceo Chromonephthea braziliensis (Alcyonacea, Nephtheidae)*. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Os recifes de corais são ecossistemas diversos com alta densidade de biodiversidade, o que leva a intensa competição entre as espécies. Estas espécies podem produzir substâncias desconhecidas, muitas com valor farmacológico. *Chromonephthea braziliensis* é um coral mole invasor, originário do Oceano Indo-Pacífico, que foi possivelmente transportado por plataformas de petróleo e cuja presença é uma ameaça para a biodiversidade da região de Arraial do Cabo (RJ). Esta espécie produz metabólitos secundários que são responsáveis pela indução de danos para o ecossistema local. A finalidade deste estudo é a busca de novas substâncias para quimioterapia geral com base na estrutura de compostos bioativos. Extratos desse coral foram preparados a partir de colônias liofilizadas (solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol). Realizaram-se análises químicas para a caracterização dos extratos e avaliaram-se as atividades: mutagênicas e citotóxicas, usando o ensaio de mutação reversa bacteriana (*Salmonella/microsoma*) com as linhagens TA97, TA98, TA100 e TA102; genotóxicas, utilizando análise da quebra do DNA e formação de micronúcleos na linhagem RAW 264,7 de macrófagos e; tóxicas para náuplios de microcrustáceos *Artemia salina*. Observou-se citotoxicidade, na presença de S9 mix, dos extratos diclorometano para a linhagem TA102 na concentração de 20 µg/100 µL/placa e metanol para a TA97 com 5 e 20 µg/100 µL/placa. Os extratos diclorometano, acetato de etila e metanol apresentaram genotoxicidade no DNA plasmidial em concentrações elevadas (250 µg/mL), mas nenhum dano ao DNA foi observado no ensaio de micronúcleo. Todos os extratos foram tóxicos para os náuplios de microcrustáceos em pelo menos uma das concentrações usadas (0,01 – 1000 µg/mL), e a LC₅₀ pode ser determinada apenas para os extratos hexano, diclorometano e acetato de etila.

Palavras-chave: *Chromonephthea braziliensis*. Mutagenicidade. Toxicidade. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

Coral reefs are diverse ecosystems that have a high density of biodiversity leading to intense competition among species. These species may produce unknown substances, many with pharmacological value. *Chromonephthea braziliensis* is an invasive soft coral from the Indo-Pacific Ocean that has been possibly transported by oil platforms and whose presence can be a threat to Arraial do Cabo region's biodiversity. This species produces secondary metabolites that are responsible for inducing damage to the local ecosystem. The purpose of this study is the search of new drugs for generally chemotherapy based on the structure of bioactive compounds. Coral extracts were prepared from dried colonies (solvents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol). Chemical analyses were performed to characterize the extracts and evaluated their cytotoxic and mutagenic activities, using the bacterial reverse mutation assay (*Salmonella*/microsome) with TA97 strains, TA98, TA100 and TA102; genotoxic activity, using DNA breakage analysis and micronucleus formation and; toxic effects for nauplii microcrustaceans. Cytotoxicity was observed in the presence of S9 mix for dichloromethane extract for strain TA102 at the 20 µg/plate concentration and methanol extract for TA97 at 5 and 20 µg/plate. The dichloromethane, ethyl acetate and methanol extracts present genotoxicity for plasmidial DNA at high concentrations (250 µg/mL), but no DNA damage was observed in micronucleus assay. All extracts were toxic for nauplii microcrustaceans at least one of tested concentrations (0.01 – 1000 µg/mL), but LC₅₀ was calculated only for the hexane, dichloromethane and ethyl acetate extracts.

Keywords: *Chromonephthea braziliensis*. Mutagenicity. Toxicity. Secondary metabolites.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Disposição dos tecidos e estruturas das formas polipoide (A) e medusoide (B).....	16
Figura 2 –	Fórmula estrutural do isopreno.....	18
Figura 3 –	Exemplos de metabólitos secundários de octocorais.....	21
Figura 4 –	Imagem do coral alcionáceo <i>Chromonephthea braziliensis</i>	25
Quadro 1 –	Características genotípicas e fenotípicas das cepas <i>standards</i> derivadas de <i>S. Typhimurium</i> LT2 sugeridas para os testes qualitativos e quantitativos de mutagenicidade e citotoxicidade.....	34
Quadro 2 –	Organização das placas de cromatografia em relação aos eluentes e reveladores utilizados.....	47
Figura 5 –	Placas cromatográficas com extratos de <i>Chromonephthea braziliensis</i> , usando o revelador geral (sulfato cérico).....	48
Figura 6 –	Placas cromatográficas com extratos de <i>Chromonephthea braziliensis</i> , usando o revelador de terpenoides (H ₂ SO ₄ 10% e vanilina).....	48
Figura 7 –	Análise de quebra plasmidial usando gel de agarose a 0,8%, incubando 0,4 µg do plasmídeo pUC18 com o extrato n-Hex de <i>Chromonephthea braziliensis</i>	56
Figura 8 –	Análise de quebra plasmidial usando gel de agarose a 0,8%, incubando 0,4 µg do plasmídeo pUC18 com o extrato DCM de <i>Chromonephthea braziliensis</i>	56
Figura 9 –	Análise de quebra plasmidial usando gel de agarose a 0,8%, incubando 0,4 µg do plasmídeo pUC18 com o extrato AcOEt de <i>Chromonephthea braziliensis</i>	57
Figura 10 –	Análise de quebra plasmidial usando gel de agarose 0,8%, incubando 0,4 µg do plasmídeo pUC18 com o extrato MeOH de <i>Chromonephthea braziliensis</i>	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Espectros de absorção nas faixas de comprimento de onda do UV e visível representado em função da absorvância dos extratos n-Hex (A), DCM (B), AcOEt (C) e MeOH (D) de <i>C. braziliensis</i>	42
Gráfico 2 –	Espectro de absorção na faixa de frequência do IV do extrato n-Hex....	43
Gráfico 3 –	Espectro de absorção na faixa de frequência do IV do extrato DCM.....	44
Gráfico 4 –	Espectro de absorção na faixa de frequência do IV do extrato AcOEt...	45
Gráfico 5 –	Espectro de absorção na faixa de frequência do IV do extrato MeOH...	46
Gráfico 6 –	Linha de tendência do ácido clorogênico.....	49
Gráfico 7 –	Porcentagem de captura de DPPH (verde) na ausência (azul) ou na presença (vermelho) de proteinase K (250 µg/mL) em diferentes concentrações de extrato (0,001, 0,01, 0,1 e 1 mg/mL) de (A) n-Hex; (B) DCM; (C) AcOEt e (D) MeOH.....	50
Gráfico 8 –	Análise da quebra do DNA utilizando gel de agarose 0,8% incubando 0,4 µg do plasmídeo pUC18 com cada um dos quatro extratos de <i>C. braziliensis</i>	58
Gráfico 9 –	Análise de quebra do DNA utilizando gel de agarose a 0,8% incubando 0,4 µg do plasmídeo pUC18 com cada um dos quatro extratos de <i>C. braziliensis</i> na presença de melatonina (500 µM).....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Compostos mais promissores oriundos de espécies de coral da ordem Alcyonacea estudados na última década (Adaptado de ROCHA e colaboradores 2011).....	23
Tabela 2 –	Condições padrão necessárias da água de diluição para a realização do ensaio de toxicidade aguda em <i>A. salina</i>	39
Tabela 3 –	Proporção entre água de diluição e pré-solução de SDS e concentração final.....	39
Tabela 4 –	Concentrações das soluções-teste dos extratos a partir das soluções A, B e C.....	40
Tabela 5 –	Resultados de mutagenicidade e sobrevivência do extrato n-Hex de <i>C. braziliensis</i> na ausência e na presença de S9 mix.....	52
Tabela 6 –	Resultados de mutagenicidade e sobrevivência do extrato DCM de <i>C. braziliensis</i> na ausência e na presença de S9 mix.....	53
Tabela 7 –	Resultados de mutagenicidade e sobrevivência do extrato AcOEt de <i>C. braziliensis</i> na presença e na ausência de S9 mix.....	54
Tabela 8 –	Resultados de mutagenicidade e sobrevivência do extrato MeOH de <i>C. braziliensis</i> na ausência e na presença de S9 mix.....	55
Tabela 9 –	Indução de micronúcleos em ensaio com macrófagos RAW 264,7, utilizando os quatro extratos de <i>C. braziliensis</i>	60
Tabela 10 –	Toxicidade aguda com <i>A. salina</i> usando os quatro extratos de <i>C. braziliensis</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AF –	2-aminofluoreno
4-NQO –	4-nitroquinolina-1-óxido
A –	Adenina
<i>A. salina</i> –	<i>Artemia salina</i>
AcOEt –	Acetato de etila
AS –	Azida sódica
BaP –	Benzo(α)pireno
C –	Citosina
<i>C. braziliensis</i> –	<i>Chromonephthea braziliensis</i>
CN –	Controle negativo
CP –	Controle positivo
CYPs –	Citocromos p450
DAPI –	4'-6-diamidino-2-fenilindol
DCM –	Diclorometano
DMSO –	Dimetilsulfóxido
DNA –	Ácido desoxirribonucleico
DP –	Desvio padrão
DPPH –	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
<i>E. coli</i> –	<i>Escherichia coli</i>
G –	Guanina
<i>his</i> –	Gene responsável pela biossíntese de histidina
I.M. –	Índice de mutagenicidade
IV –	Infravermelho

K ₂ HPO ₄ –	Fosfato de potássio dibásico
LC _{50-24h} –	Concentração letal a 50% dos náuplios de <i>A. salina</i> no período de 24 h
Meio LB –	Meio lisogênico
MEM –	Meio essencial mínimo
MI –	Tampão McIlvaine
MitC –	Mitomicina C
MNNG –	<i>N</i> -metil- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidina
n-Hex –	Hexano
REN –	Reparo por excisão de nucleotídeos
<i>S. Typhimurium</i> –	<i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i>
S9 mix –	Sistema de metabolização exógena por enzimas do citocromo P450
SDS –	Lauril sulfato de sódio
Sobr. –	Sobrevivência
T –	Timina
UV –	Ultravioleta

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	15
1	CORAIS.....	16
1.1	Filo Cnidaria.....	16
1.2	Classificação química.....	18
1.3	Metabólitos secundários em corais.....	20
2	PRODUTOS NATURAIS MARINHOS.....	22
2.1	Propriedades funcionais associadas a metabólitos secundários.....	22
2.2	A problemática do desenvolvimento de fármacos.....	25
2.3	Atividades citotóxica, mutagênica e genotóxica.....	26
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	Objetivo geral.....	28
3.2	Objetivos específicos.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	Coleta e extração.....	29
4.2	Caracterização dos extratos.....	29
4.2.1	<u>Espectrofotometria.....</u>	29
4.2.2	<u>Cromatografia em camada delgada.....</u>	30
4.2.3	<u>Quantificação de polfenóis.....</u>	30
4.2.4	<u>Quantificação de proteínas.....</u>	31
4.2.5	<u>Ensaio do efeito captador sobre o radical livre DPPH.....</u>	32
4.3	Testes toxicológicos.....	33
4.3.1	<u>Ensaio de mutação reversa bacteriana (<i>Salmonella</i>/microsoma).....</u>	33
4.3.1.1	Linhagens bacterianas.....	33
4.3.1.2	Preparo de metabolização exógena.....	34
4.3.1.3	Ensaio quantitativo de mutação reversa bacteriana e sobrevivência.....	35
4.3.2	<u>Análise de quebra plasmidial.....</u>	36
4.3.3	<u>Micronúcleo em macrófagos.....</u>	37
4.3.4	<u>Ensaio de toxicidade aguda com o microcrustáceo <i>A. salina</i>.....</u>	38
5	RESULTADOS.....	41
5.1	Resultados da caracterização dos extratos.....	41
5.1.1	<u>Espectrofotometria.....</u>	41

5.1.2	<u>Cromatografia em camada delgada</u>	46
5.1.3	<u>Quantificação de polfenóis</u>	49
5.1.4	<u>Quantificação de proteínas</u>	49
5.1.5	<u>Ensaio do efeito antioxidante sobre o radical livre DPPH</u>	50
5.2	Resultados dos testes toxicológicos	51
5.2.1	<u>Ensaio de mutação reversa bacteriana (<i>Salmonella</i>/microsoma)</u>	51
5.2.2	<u>Análise de quebra plasmidial</u>	56
5.2.3	<u>Micronúcleo em macrófagos</u>	59
5.2.4	<u>Ensaio de toxicidade aguda com o microcrustáceo <i>A. salina</i></u>	60
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICE – Mutagenicity, genotoxicity, and scavenging activities of extracts from the soft coral <i>Chromonephthea braziliensis</i> : a possibility of new bioactive compounds.....	76

INTRODUÇÃO

Produtos naturais desempenham um papel importante nas descobertas e nos processos de desenvolvimento de medicamentos. Isso foi particularmente evidente nas áreas do câncer e de doenças infecciosas, cuja maioria das drogas usadas no tratamento é de origem natural. 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. Entretanto, o aumento esperado da produtividade não ocorreu. Mesmo assim, pesquisas envolvidas na modificação de estruturas químicas básicas de produtos naturais continuam sendo conduzidas e levam a novos agentes (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; NEWMAN; CRAGG, 2007).

Estima-se que dos 153.000 produtos naturais conhecidos, aproximadamente 22.000 são de origem marinha. Em termos de biodiversidade, o ambiente marinho, e em particular os recifes de corais, é um dos ecossistemas mais ricos e complexos. As condições físicas e químicas encontradas nesse ambiente estão relacionadas com a produção de várias moléculas com características estruturais únicas. Estas moléculas marinhas 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 (BLUNT et al., 2011; ROCHA et al., 2011).

Uma das etapas necessárias para o registro dessas moléculas como produtos farmacêuticos é a avaliação do potencial genotóxico. Testes de genotoxicidade podem ser definidos como testes *in vitro* e *in vivo* desenvolvidos para detectar compostos capazes de induzir danos genéticos através de diversos mecanismos. Esses testes são usados principalmente para a previsão da atividade carcinogênica da substância em questão (FDA, 2012).

1 CORAIS

1.1 Filo Cnidaria

O filo Cnidaria é composto por um conjunto de seres diversos o qual 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 1 ilustra a disposição dos tecidos e estruturas das formas polipoide e medusoide.

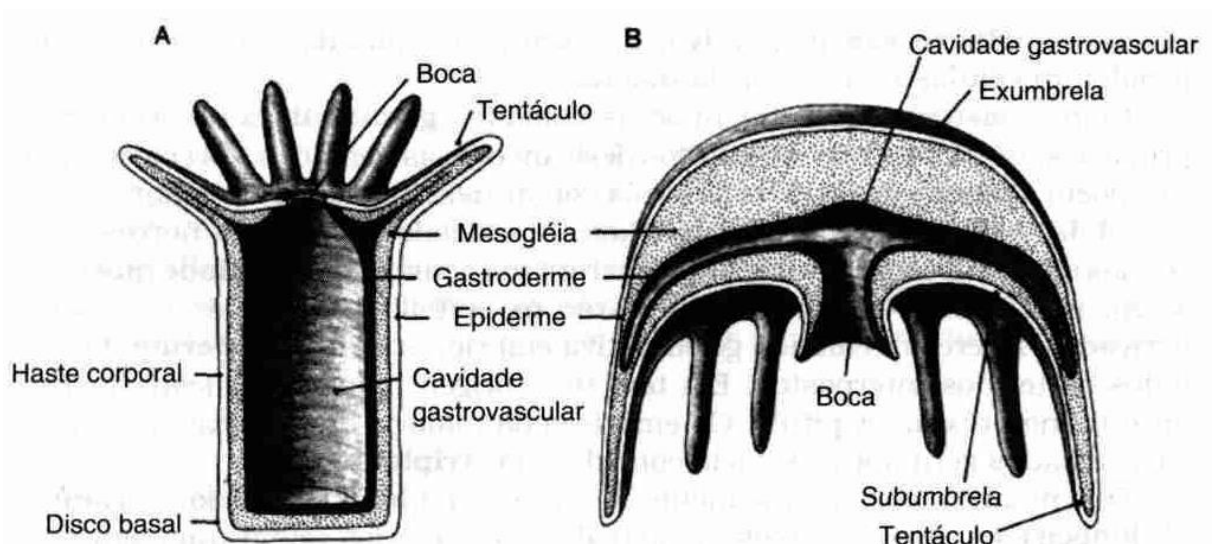


Figura 1 - Disposição dos tecidos e estruturas das formas polipoide (A) e medusoide (B) (RUPPERT; BARNES, 1994).

Os cnidários são animais marinhos, com poucas exceções, e possuem uma simetria primária radial. Apresentam uma cavidade intestinal revestida por uma endoderme, denominada celêntero, ou cavidade gastrovascular, que funciona tanto na circulação quanto na digestão. Essa cavidade repousa ao longo do eixo polar do animal e abre-se externamente em

uma extremidade para formar uma boca, circundada por tentáculos que ajudam na captura e ingestão de alimento. Seus corpos são construídos somente a partir de duas camadas germinativas (diploblásticos), a ectoderme e a endoderme, que dão origem aos dois epitélios adultos (respectivamente, epiderme e gastroderme). Possuem ainda uma camada extracelular localizada entre os dois epitélios chamada mesogleia. Esta varia de uma lâmina basal não celular fina até um tecido conjuntivo gelatinoso, fibroso ou espesso com ou sem células mesenquimais (RUPPERT; BARNES, 1994; BRUSCA; BRUSCA, 2007).

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 também ajuda na construção do esqueleto calcário dos corais construtores de recifes (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 concorrência entre as espécies, gerando organismos com a capacidade de construir 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).

1.2 Classificação química

A subclasse Octocorallia, pertencente à classe Anthozoa, possui um conjunto diversificado de compostos químicos e são particularmente ricos em isoprenos e derivados, incluindo terpenos, carotenoides e esteroides, onde cada espécie de octocoral aparenta ter um conjunto específico (GERHART, 1983). Terpenos e terpenoides (derivados oxigenados) talvez sejam a classe mais variada estruturalmente de produtos naturais de origem vegetal. Os constituintes desta classe são formados a partir de uma fusão repetitiva de cinco átomos de carbono ramificado (isopentano). Estas unidades estruturais são denominadas de isoprenos (Figura 2), pois o produto gerado pela decomposição térmica dos terpenos é o gás alceno isopreno e porque as condições químicas adequadas podem induzir uma polimerização dessa molécula, formando diversas estruturas de terpenos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Esse processo gera uma grande variedade de substâncias naturais, dando origem, por exemplo, a borracha e a óleos essenciais (SINGH; ZIMMERMAN, 1990; MORRISON; BOYD, 1995).

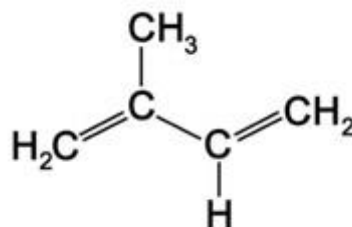


Figura 2 - Fórmula estrutural do isopreno.

De acordo com o número de unidades de isoprenos, pode ser obtido um tipo de terpeno. Os terpenos mais simples possuem um único isopreno e são denominados hemiterpenos. O mais conhecido hemiterpeno é o próprio isopreno, uma substância volátil liberada por tecidos fotossintéticos. Os monoterpênos são constituídos de dois isoprenos (10 carbonos) e são as moléculas mais representativas, sendo mais conhecidas como componentes de essências voláteis de flores e de óleos essenciais de ervas e temperos. Eles possuem diversas funções químicas, como álcoois, aldeídos, cetonas e outras, que permitem uma grande variedade de estruturas. Os terpenos formados por três monômeros de isopreno (15 carbonos) são chamados de sesquiterpenos. A estrutura e função dos sesquiterpenos são similares com as dos monoterpênos, também sendo facilmente encontrados em óleos

essenciais. Podem atuar também como fitoalexinas, antibióticos produzidos por plantas em resposta a infecções microbianas, e como antipredação, diminuindo o grau de herbivoria. Há ainda os diterpenos (quatro unidades de isopreno; 20 carbonos), os triterpenos (seis unidades de isopreno; 30 carbonos), os tetraterpenos (oito unidades de isopreno; 40 carbonos), os politerpenos (mais de oito unidades de isoprenos) e os meroterpenos, produtos naturais de origem biossintética misturada que são parcialmente derivadas de terpenos. Todos esses tipos possuem atividades ou finalidades variadas, como constituintes de membrana, hormônios vegetais, reações metabólicas, composição de resinas, toxinas e inclusive, drogas de combate ao câncer (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; BAKKALI et al., 2008).

Como mencionado, terpenos e seus derivados oxigenados constituem a classe de substâncias mais diversa da natureza (HILL, 1993). Na literatura, há inúmeros trabalhos sobre terpenos de origem vegetal. Propriedades funcionais como os efeitos mutagênicos e antimutagênicos foram abordados, onde os compostos linalol, acetato de linalila e o β -cariofileno presentes em óleos essenciais de espécies vegetais foram testados utilizando o ensaio de mutação reversa bacteriana (*Salmonella*/microsoma). Nesse estudo, o acetato de linalila apresentou mutagenicidade na presença e na ausência de metabolização exógena enquanto que o β -cariofileno demonstrou atividade antimutagênica contra os agentes 2-nitrofluoreno, azida sódica, metanossulfonato de metila e 2-aminoantraceno (DI SOTTO; EVANDRI; MAZZANTI, 2008).

O α -pineno, um monoterpenoide, é um dos compostos voláteis mais produzidos e liberados por diversas espécies de plantas, incluindo espécies tropicais, mediterrâneas e de florestas de coníferas. Essa substância apresentou capacidade de inibir o crescimento de raízes nos primeiros estágios além de promover danos oxidativos através do aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (SINGH et al., 2006).

Na área agrícola, a importância ecológica dos terpenos como defensivos de plantas (inseticidas) está bem estabelecida. Substâncias que se encontram nas subclasses de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos estão sendo estudadas como alternativas no controle químico de insetos (JÚNIOR, 2003).

Efeitos citotóxicos sobre células tumorais também são estudados. Xu e colaboradores (2012) observaram citotoxicidade de sesquiterpenos, oriundos da planta *Saussurea deltoidea*, contra três linhagens de células de carcinoma humano (A-549 / pulmonar, Hela / cervical e SMMC-7721 / hepatocelular). Compostos terpênicos extraídos e isolados de *Dipterocarpus obtusifolius*, uma planta nativa do Camboja, apresentaram citotoxicidade contra um ou mais

de um tipo celular tumoral (HepG2 / hepatocelular, SK-OV-3 / ovário, A-549 / pulmonar, MCF-7 / mamário e SNU-1 / gástrico) (KHIEV et al., 2012).

1.3 Metabólitos secundários em corais

A presença de sesquiterpenos voláteis na ordem Gorgonacea foi o fator que inicialmente atraiu pesquisadores no estudo dessas substâncias na subclasse Octocorallia. Por conseguinte, o isolamento de prostaglandinas tornou os seres deste grupo importantes alvos de pesquisa, aumentando o número de estudos com octocorais na descoberta de novas substâncias, tendo como principais resultados os sesquiterpenos e diterpenos (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 nos metabólitos produzidos pelos octocorais, 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 valor 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*, pertencente à ordem Alcyonacea, que usa defesas químicas na forma de terpenoides ictiotóxicos e uma variedade de moléculas que geram inibição alimentar, quando sua forma colonial é mole e carnuda e depende da química inorgânica (COLL, 1992; SAMMARCO; COLL, 1992). A alelopatia tem sido estudada em paralelo à antipredação. Os corais alcionáceos demonstram-se competidores agressivos na disputa por espaço, levando a mortalidade de seus competidores. O diterpeno sarcocofitóxido, produzido

pela espécie *Sarcophyton glaucum*, pode ser considerado um composto alelopático pois apresentou este efeito sobre o coral escleractíneo *Acropora robusta* (FLEURY; COLL; SAMMARCO, 2006). A Figura 3 mostra alguns exemplos de metabólitos secundários de octocorais.

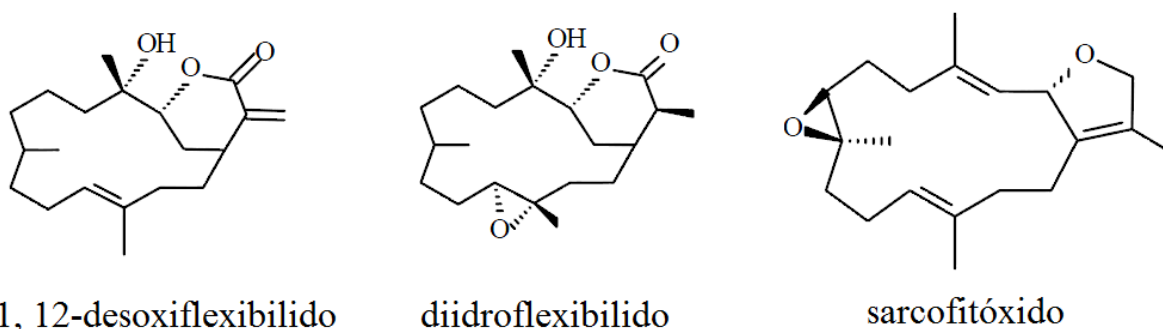


Figura 3: Exemplos de metabólitos secundários de octocorais. 11,12-desoxyflexibilido com atividade ictiotóxica; diidroflebilido promove inibição alimentar e; sarcofitoxido com ação alelopática (LAGES, 2003).

Outras atividades podem ser associadas à produção de metabólitos secundários nos octocorais. Shen e colaboradores (2012) observaram atividade antiincrustante moderada de cembranoides (diterpenos), isolados da espécie *Sinularia pavidata*, contra a fixação de larvas da craca *Balanus amphitrite*. Essa atividade também foi testada em ensaios utilizando extratos alcoólicos de nove espécies de octocorais contra quatro espécies de diatomáceas marinhas incrustantes. Os resultados demonstraram a ação antiincrustante em 23 das 36 combinações de espécies possíveis (9 corais x 4 diatomáceas), com destaque para os octocorais *Echinogorgia complexa* (Gorgonacea) e *Dendronephthya* sp. (Alcyonacea) que apresentaram 100% de atividade antiincrustante, o que implica na presença de potentes compostos anti-incrustações de amplo espectro (WILSANAND; WAGH; BAPUJI, 2001). A ação como feromônios sexuais também está associada aos metabólitos secundários, como descrito por Coll e colaboradores (1995), que demonstraram a atividade de um diterpeno cembranoide como agente atrativo de gametas da espécie *Lobophyton crassum*.

2 PRODUTOS NATURAIS MARINHOS

2.1 Propriedades funcionais associadas a metabólitos secundários

Os oceanos cobrem mais de 70% da superfície da Terra e contém mais de 300.000 espécies descritas de plantas e animais. Ao longo dos anos, plantas e animais se adaptaram a todas as regiões dos oceanos, incluindo as áreas polares, temperadas e tropicais. 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).

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 ao longo de 25 anos, sendo os compostos mais promissores aqueles produzidos por invertebrados marinhos (FAULKNER, 2001; BLUNT et al., 2011; MAYER et al., 2011).

A ordem Alcyonacea abrange corais moles, geralmente coloridos, e que são ricos em substâncias nutricionais importantes, como proteínas, carboidratos e especialmente lipídeos. Entretanto, esses organismos sofrem relativamente baixos níveis de predação, uma vez que produzem grande quantidade de metabólitos secundários (COLL, 1992; SAMMARCO; COLL, 1992; HOOPER; COLEMAN, 1995). Vários estudos de biossíntese foram realizados sobre os metabólitos de corais alcionáceos e alguns desses compostos já mostraram que possuem grande potencial para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e agentes antiincrustantes (BHAKUNI; RAWAT, 2005; ROCHA et al., 2011). A Tabela 1 mostra alguns dos compostos mais promissores da ordem Alcyonacea estudados na última década (ROCHA et al., 2011).

Tabela 1: Compostos mais promissores oriundos de espécies de coral da ordem Alcyonacea estudados na última década (Adaptado de ROCHA e colaboradores, 2011).

Família e espécies	Atividade	Nome do composto	Química
<i>Alcyoniidae</i>			
<i>Klyxum simplex</i>	Antiinflamatória	Simplexin E	Diterpenoide
<i>Klyxum simplex</i>	Antitumoral	Klysimplexin B and H	Diterpenoide
<i>Lobophytum</i> sp.	Antitumoral	Lobophytene	Diterpenoide
<i>Lobophytum</i> sp.	Anti-HIV	Lobohedleolide	Diterpenoide
<i>Lobophytum</i> sp.	Anti-HIV	(7Z)-lobohedleolide	Diterpenoide
<i>Lobophytum</i> sp.	Anti-HIV	17-dimethylamino lobohedleolide	Diterpenoide
<i>Lobophytum crassum</i>	Antiinflamatória	Crassumolides A and C	Terpenoide
<i>Lobophytum cristagalli</i>	Antitumoral	Cembranolide diterpene	Diterpenoide
<i>Lobophytum durum</i>	Antiinflamatória	Durumolides A–C	Terpenoide
<i>Lobophytum durum</i>	Antiinflamatória	Durumhemiketalolide A–C	Cembranoide
<i>Sarcophyton crassocaule</i>	Antitumoral	Crassocolides H–M	Cembranoide
<i>Sinularia</i> sp.	Antiúlcera	Sinulide	Espermina
<i>Sinularia</i> sp.	Antimicrobiana	Lipids	Policetídeo
<i>Sinularia flexibilis</i>	Antitumoral	Flexilarin D	Cembranoide
<i>Sinularia flexibilis</i>	Antiincrustante	11-episinulariolide	Diterpenoide
<i>Sinularia gibberosa</i>	Antiinflamatória	Gibberoketosterol	Esteróide
<i>Sinularia querciformes</i>	Antiinflamatória	Querciformolide C	Terpenoide
<i>Clavariidae</i>			
<i>Clavularia</i> sp.	Sistema nervoso	Stolonidiol	Diterpenoide
<i>Clavularia koellikeri</i>	Antitumoral	Cembrane-type diterpenoid	Diterpenoide
<i>Clavularia viridis</i>	Antitumoral	Claviridic acid	Prostanoide
<i>Clavularia viridis</i>	Antitumoral	Clavulones	Prostanoide
<i>Clavularia viridis</i>	Antitumoral	Claviridenone	Prostanoide
<i>Clavularia viridis</i>	Antitumoral	Halogenated prostanoids	Prostanoide
<i>Clavularia viridis</i>	Antitumoral	Bromovulone III	Prostanoide
<i>Clavularia viridis</i>	Antitumoral	Yonarasterols	Esteróide
<i>Clavularia viridis</i>	Antitumoral	Stoloniferone E	Esteróide

<i>Telesto riisei</i>	Antitumoral	Punaglandins	Prostaglandina
Nephtheidae			
<i>Dendronephthya</i> sp.	Antiincrustante	Isogosterones A–D	Esteróide
<i>Dendronephthya rubéola</i>	Antitumoral	Capnell-9(12)-ene-8 β ,10 α -diol	Sesquiterpenoide
<i>Nephthea chabroli</i>	Antitumoral	Chabranol	Terpenoide
<i>Nephthea erecta</i>	Antiinflamatória	Ergostanoids 1 and 3	Ergostanoide
Xeniidae			
<i>Asterospicularia laurae</i>	Antitumoral	Asterolaurin A	Diterpenoide
<i>Cespitularia hypotentaculata</i>	Antitumoral	Cespitularin C	Diterpenoide
<i>Xenia novaebritanniae</i>	Antibacteriana	Xeniolide I	Diterpenoide
<i>Xenia plicata</i>	Antitumoral	Blumiolide C	Diterpenoide

A família Nephtheidae, presente na ordem Alcyonacea, possui 20 gêneros com cerca de 500 espécies descritas. Devido à estratégia de defesa de acumular metabólitos secundários em seus tecidos ou de lançá-los na área de entorno, os seres desse grupo podem sobreviver em muitos ambientes hostis (HU et al., 2011). Na família Nephtheidae, algumas espécies podem ser destacadas com relação à distribuição de terpenos. *Nephthea* spp é produtora de sesquiterpenos e/ou diterpenos (70% de esqueletos cembranóides), *Litophyton* spp produz até 100% de diterpenos cembranóides e *Lemnalia*, *Paralemnalia* e *Capnella* spp produzem 100% de sesquiterpenos (COLL, 1992).

O coral mole *Chromonephthya braziliensis* (Alcyonacea, Nephtheidae) (Ofwegen, 2005) foi primeiramente registrado em Arraial do Cabo, litoral sudeste do Brasil (FERREIRA, 2003) (Figura 4). Estudos recentes demonstraram que a presença de *C. braziliensis* em águas brasileiras pode ser uma ameaça para a biodiversidade da região, especialmente para espécies endêmicas de corais, como a gorgoniana *Phyllogorgia dilatata* (LAGES et al., 2006). Este coral exótico produz metabólitos secundários que lhe conferem ação vantajosa em relação às espécies nativas, contribuindo na defesa contra peixes predadores e aumentando o seu sucesso na competição por espaço (LAGES et al., 2006; FLEURY et al., 2008; OLIVEIRA; MEDEIROS, 2008).



Figura 4: Imagem do coral alcionáceo *Chromonephthea braziliensis* (Ofwegen, 2005) (Fonte: LAGES, 2003).

2.2 A problemática do desenvolvimento de fármacos

O ambiente marinho contém uma riqueza ainda inexplorada de produtos naturais para o tratamento de doenças infecciosas (DONIA; HAMANN, 2003). Pode ser argumentado que a pesquisa farmacológica envolvendo organismos marinhos é intrinsecamente lenta e possui desvantagens em relação a programas baseados em síntese de compostos. Porém, o número e a qualidade dos resultados gerados mais que justificam a pesquisa em farmacologia marinha (FAULKNER, 2000).

Tem ocorrido um número crescente de descobertas de compostos marinhos com atividades biológicas ou propriedades de grande interesse. No ambiente marinho, as esponjas (Filo Porifera) são responsáveis pela maior proporção dessas descobertas (SIPKEMA et al., 2005; STANKEVICINS et al., 2008).

No entanto, com os crescentes esforços em bioprospecção e a exploração de ambientes marinhos desconhecidos, o potencial biotecnológico de outros grupos de invertebrados marinhos, dentre eles os corais, também atraiu a atenção de pesquisadores (TURK; KEM, 2009). Com isso, cerca de 22.000 substâncias foram descobertas desde o início da área de bioquímica de compostos marinhos bioativos em meados de 1960, dos quais um número muito limitado desses compostos teve uma aplicação industrial (BLUNT et al., 2011; ROCHA et al., 2011).

“*Where are the drugs?*” é a pergunta feita por Faulkner (2000) onde é abordada a problemática da justificativa de não existir uma quantidade de fármacos produzidos ou em estágio final de produção, que seja proporcional ao número de descobertas de compostos marinhos com propriedades funcionais de interesse. Um dos obstáculos a ser superado é a obtenção de material suficiente para testes clínicos. Em muitos casos, o material biológico a ser coletado não possui grande disponibilidade no ambiente e o processo de síntese química é de difícil realização devido à alta complexidade das moléculas.

2.3. Atividades citotóxica, mutagênica e genotóxica

O ensaio de mutação reversa com *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (*S. Typhimurium*) é uma metodologia rápida, de baixo custo, segura e mais utilizada atualmente por diversos laboratórios 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 (CYPs), presentes em células eucarióticas que está relacionado à metabolização de xenobióticos (STANKEVICINS, 2008).

No desenvolvimento de fármacos, uma avaliação completa do potencial genotóxico de determinada substância torna-se necessária para que o seu consumo humano seja viável. 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. Dessa forma, testes genotóxicos *in vitro* e/ou *in vivo* em células de mamífero também são usados, nesse processo de desenvolvimento, para expandir a detecção dos mecanismos genotóxicos relevantes na formação de alterações genéticas (FDA, 2012).

A importância de estudos genotóxicos sobre 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 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).

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 hematopoéticas 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.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este estudo visou a realização de análises químicas e avaliações toxicológicas dos extratos do coral alcionáceo *Chromonephthea braziliensis* utilizando hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol como solventes. A finalidade desta análise é a busca de substâncias para quimioterapia geral com base na estrutura de compostos bioativos, utilizando espécies invasoras como fonte de produtos naturais.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar possíveis grupamentos e estruturas presentes nos extratos de hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol do coral *C. braziliensis*;
- Verificar a presença de terpenos e outras substâncias a fim de elucidar as composições dos quatro extratos de *C. braziliensis*;
- Quantificar a presença de polifenóis totais nos extratos de *C. braziliensis*;
- Quantificar a presença de complexos proteicos;
- Investigar a atividade antioxidante dos extratos de *C. braziliensis*;
- Avaliar a capacidade mutagênica e citotóxica dos extratos de *C. braziliensis* aplicando ensaios padronizados com linhagens de *S. Typhimurium*;
- Analisar os efeitos genotóxicos dos extratos de *C. braziliensis* em células eucariotas e partes celulares e;
- Avaliar a ecotoxicidade dos extratos de *C. braziliensis* aplicando ensaios padronizados com microcrustáceos e a sobrevivência desses organismos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e extração

Os extratos foram fornecidos pela professora Dra. Beatriz Grosso Fleury, do Departamento de Ecologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. As colônias de *C. braziliensis* foram coletadas por mergulho autônomo a cerca de 8 m de profundidade, em maio de 2004, em uma reserva marinha na região do Arraial do Cabo, (23° 44' S - 42° 02' O), estado do Rio de Janeiro, costa sudeste do Brasil. O total de pedaços liofilizados de *C. braziliensis* (286 g peso seco) foi extraído sequencialmente em três vezes, usando solventes de polaridades diferentes: n-hexano (n-Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH). A evaporação desses solventes, sob pressão reduzida, rendeu quatro resíduos correspondentes (9,2 g; 3,0 g; 0,4 g e 2,9 g, respectivamente), sendo estes resíduos utilizados nos ensaios.

4.2 Caracterização dos extratos

A análise química dos extratos consistiu na avaliação de absorção de espectros do ultravioleta (UV), do visível e do infravermelho (IV), cromatografia em camada delgada, quantificação de proteínas, quantificação de polifenóis e atividade sequestrante de radicais livres sobre o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).

4.2.1 Espectrofotometria

Amostras dos quatro extratos de *C. braziliensis* foram preparadas para as leituras espectrofotométricas nas regiões do UV e visível. Essas amostras foram diluídas em água e acetonitrila (proporção 1:5 v/v) a uma concentração de 50 µg/mL e, analisadas e registradas no espectrofotômetro Shimadzu UV-160A na faixa de 200 a 800 nm. Para a leitura na região

do IV, amostras secas foram diretamente depositadas formando um filme pastoso e com uso de janela de KBr. Em seguida foram analisadas no aparelho Perkin-Elmer Spectrum One e as interpretações dos espectrogramas do IV foram realizadas de acordo com Coates (2000), com relação às possíveis ligações com haletos de alquila, e Lopes e Fascio (2004), em relação às outras funções e ligações.

4.2.2 Cromatografia em camada delgada

Soluções de 10 mg/mL foram preparadas a partir dos quatro extratos de *C. braziliensis* usando, como solvente, metanol. Placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) de 10 cm de comprimento por 6,7 cm de largura foram preparadas utilizando 5 eluentes:

- I – acetato de etila e hexano (proporção 1:1 v/v);
- II – acetato de etila e diclorometano (proporção 1:9 v/v);
- III – acetato de etila e diclorometano (proporção 3:7 v/v);
- IV – acetato de etila e metanol (proporção 19:1 v/v);
- V – metanol e diclorometano (proporção 1:9 v/v).

As soluções foram aplicadas utilizando capilar de vidro. Dois reveladores foram utilizados ao final do desenvolvimento da cromatografia, um como revelador não específico (sulfato cérico) e outro como revelador para terpenoides (ácido sulfúrico 10% e vanilina 0,2% em etanol). Após a aplicação dos reveladores, as placas foram secas, aquecidas e fotografadas (COLL et al., 1983; TONA et al., 1998; VIEIRA JR. et al., 2007).

4.2.3 Quantificação de polifenóis

Os quatro extratos de *C. braziliensis* foram preparados para a realização deste ensaio. Uma alíquota de 5 mg de cada extrato foi suspensa em 5 mL de uma mistura de metanol e água (proporção 8:2 v/v), usando vórtex. O sobrenadante foi transferido para um novo recipiente (tubo de centrifugação). Este procedimento foi realizado duas vezes. O sobrenadante foi filtrado, com auxílio de seringa e filtro de nylon 0,22 µm Millipore, e

obtiveram-se frações a 500 µg/mL (de amostra original) que foram utilizadas para a quantificação de polifenóis totais (SAKAKIBARA et al., 2003).

Em placa de microtitulação de 96 poços, foram misturados em cada poço 35 µL de uma das frações de *C. braziliensis* com 35 µL do reagente Folin-Ciocalteu, permanecendo protegidas da luz e em temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, 35 µL de Na₂CO₃ (20 mg/mL) foram adicionados às misturas e as placas foram mantidas à 30°C em ambiente escuro por 2 h. Após esse período, foi realizada uma leitura de absorvância em comprimento de onda de 750 nm (leitor de microplacas µQuant Bio-Tek Instruments Inc., EUA). O ensaio foi feito em triplicata. As médias das absorvâncias foram calculadas e usadas para se obter a absorvância corrigida, a partir das médias do branco das amostras.

A estimativa do teor total de polifenóis em % (massa/massa) foi correspondente ao ácido clorogênico. Para a curva de calibração foram utilizadas as concentrações de 5, 50, 75 e 100 µg/mL de ácido clorogênico diluído em água. Os coeficientes angular e linear da curva de calibração foram determinados e usados para se converter os valores de absorvância corrigida das frações para µg/mL de ácido clorogênico, de acordo com a equação:

$$Teor (\mu g/mL) = \frac{Abs - B}{A} \quad (1),$$

onde:

Abs – absorvância corrigida das frações;

A – coeficiente angular da curva de calibração do ácido clorogênico;

B – coeficiente linear da curva de calibração do ácido clorogênico.

Para o cálculo do teor total de polifenóis, foi usada a equação:

$$Teor\ total\ de\ polifenóis\ (\%) = \frac{Teor\ (\mu g/mL)}{Concentração\ da\ fração} \times 100 \quad (2),$$

onde a concentração da fração equivale à 500 µg/mL (MAZZAFERA, 1997; MAZZAFERA, 2003; BHALE et al., 2007).

4.2.4 Quantificação de proteínas

Avaliou-se a composição de proteínas utilizando Qubit™ Protein Assay Kit (Q33211), tal como recomendado pela Invitrogen. As amostras de *C. braziliensis* foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 1 mg/mL. Uma alíquota de 1 µL, referente a

cada amostra, foi solubilizada em 99 μL de solução tampão de trabalho do kit, homogeneizada por agitação e colocadas no aparelho para leitura de absorção (280 nm). Após a leitura, a concentração de proteínas referente a solução de 1mg/mL foi obtida no próprio aparelho. Três diferentes considerações podem ser feitas em relação à concentração de proteínas:

I – o aumento da concentração de proteínas pode ser relacionado com a diminuição da biodisponibilidade de metabólitos secundários, sob a sua forma livre;

II – a redução da concentração de proteínas pode ser devido à extração sequencial e;

III – as proteínas presentes nos extratos poderiam atuar como agentes sequestrantes.

4.2.5 Ensaio do efeito captador sobre o radical livre DPPH

Uma alíquota de 1,0 mL da solução de DPPH 0,25 mM em etanol e 1,0 mL de uma das quatro concentrações diluídas em DMSO (0,001; 0,01; 0,1 e 1,0 mg/mL) para cada extrato de *C. braziliensis* foram misturados. A mistura foi agitada vigorosamente e deixou-se atingir um estado de equilíbrio à temperatura ambiente a 30 minutos. O butil hidroxil tolueno foi utilizado como controle nas mesmas concentrações das amostras. Para cada concentração, tanto de amostra quanto de controle, realizou-se a leitura do branco. A descoloração do DPPH foi determinada medindo a absorvância espectrofotométrica à 517 nm. A capacidade de captar radicais DPPH foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Atividade (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{absorvância da amostra à 517 nm}}{\text{absorvância do controle à 517 nm}} \right) \right] \cdot 100\%$$

O mesmo procedimento foi realizado utilizando proteinase K (CAS: 39450-01-6), a fim de isolar as substâncias a partir de proteínas presentes nos extratos. As amostras foram incubadas com 100 μL de proteinase K (0,125 g proteinase K; 0,30 g TRIS Base [CAS: 77-86-1]; 0,022 g CaCl_2 ; 0,025 L H_2O ; 0,025 glicerol) a 250 $\mu\text{g/mL}$ durante 60 minutos à 50°C. Posteriormente, 1,0 mL de DPPH em etanol (0,25 mM) foi adicionado à mistura final e a descoloração de DPPH foi medida à 517 nm depois de 30 minutos à temperatura ambiente. A leitura do branco também foi realizada. (AMAROWICZ; NACZK; SHAHIDI, 2000).

4.3 Testes toxicológicos

Avaliações mutagênicas, citotóxicas, genotóxicas e ecotóxicas foram realizadas através dos ensaios de mutação reversa bacteriana (*Salmonella*/microsoma) ou Teste de Ames, análise de quebra plasmidial, micronúcleo em macrófagos e toxicologia aguda em *Artemia salina* (*A. salina*).

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

4.3.1.1 Linhagens bacterianas

As linhagens de *S. Typhimurium* TA97, TA98, TA100 e TA102, 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 (LEVIN et al., 1982; MARON; AMES, 1983).

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 (REN). 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 confere resistência ao antibiótico ampicilina. A linhagem TA102 ainda contém o plasmídeo pAQ1 que confere resistência ao antibiótico tetraciclina. A presença do plasmídeo aumenta a detecção a mutágenos em contraste a fraca ou nula detecção quando ausente (MARON; AMES, 1983). O Quadro 1 mostra as características de cada linhagem.

Quadro 1: Características genóticas e fenotípicas das cepas *standards* derivadas de *S. Typhimurium* 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

4.3.1.2 Preparo de metabolização exógena

A ativação metabólica exógena tem a finalidade de tornar os testes em organismos procariotos mais consistentes e aplicáveis, uma vez que essa ativação mimetiza o sistema de metabolização de xenobióticos presente em mamíferos.

A metabolização exógena (S9 mix) utilizada foi adquirida do laboratório Molecular Toxicology Inc. (MoltoxTM, USA) e preparada a partir de fígados de ratos machos Sprague-Dawley pré-induzidos por bifenil-policlorinato (Aroclor 1254). O Aroclor 1254 induz principalmente a síntese de CYP2B e CYP1A, podendo levar tanto ao aumento da

desintoxicação quanto ao aumento da ativação dos xenobióticos, o que dependerá da substância estudada (ZEIGER; CHHABRA; MARGOLIN, 1979).

A preparação de S9 mix (4%) foi realizada de acordo com Mortelmans e Zeiger (2000) em condições de esterilidade total e em banho de gelo. Para 50 mL de S9 mix utilizou-se 5,0 mL de S9 reconstituído com 2,1 mL de água estéril (40 mg/mL de proteínas totais); 1,0 mL de $MgCl_2$ -KCl 0,15 M; 0,25 mL de glicose-6-fosfato 1 M; 2,0 mL de NADP 0,1 M; 25 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4 e 16,75 mL de água destilada estéril.

4.3.1.3 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 triptona; 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 µL de uma das concentrações (0,5; 5; 10 e 20 µg/100 µL/placa) de um dos quatro extratos de *C. braziliensis* ou controles positivos ou negativo, 500 µL de solução tampão fosfato de sódio (27,6 g/L $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ e 28,4 g/L Na_2HPO_4 ; 0,2 M pH 7,4; para o ensaio sem metabolização exógena) ou de S9 mix (para o ensaio com metabolização exógena) e 100 µL da suspensão bacteriana. 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 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 100 g/L $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$; 500 g/L K_2HPO_4 ; 175 g/L $Na(NH_4)HPO_4 \cdot 4H_2O$], 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 fisiológica (NaCl 9 g/L), completando-se o volume a 1 mL. Foram realizadas sucessivas diluições em solução de salina fisiológica 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.

Os controles positivos para os ensaios, na ausência de metabolização foram: 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) (CAS: 56-57-5) a 1,0 µg/100 µL/placa para a linhagem TA97; 4-NQO a 0,5 µg/100 µL/placa para a linhagem TA98; azida sódica (AS) (CAS: 26628-22-8) a 0,5 µg/100 µL/placa para a linhagem TA100 e mitomicina C (MitC) (CAS: 50-07-7) a 0,5 µg/100 µL/placa para a linhagem TA102. Para os ensaios com presença de metabolização exógena foram usadas as substâncias 2-aminofluoreno (2-AF) (CAS: 153-78-6) a 10 µg/100 µL/placa para as linhagens TA97 e TA100 e benzo(α)pireno (BaP) (CAS: 50-32-8) a 20 µg/100 µL/placa para as linhagens TA98 e TA102. Todos os reagentes químicos foram provenientes da empresa Sigma (St. Louis, EUA). O controle negativo usado foi o DMSO (CAS: 67-68-5) (AIUB et al., 2004; STANKEVICINS et al., 2008).

A amostra foi considerada positiva para a mutagenicidade, quando:

- (a) 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);
- (b) uma resposta significativa para a análise de variância (ANOVA, $p \leq 0,05$) foi encontrada e;
- (c) a reprodutibilidade da curva dose-resposta foi positiva ($p \leq 0,05$).

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

4.3.2 Análise de quebra plasmidial

O plasmídeo pUC18, de tamanho de 2686 pares de bases foi extraído da linhagem DH5α (*fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*) de *Escherichia coli*, utilizando um kit de extração de DNA plasmidial (Kit Miniprep para Plasmídeo) da empresa Axygen Biosciences. O plasmídeo (massa = 400 ng) foi tratado durante 10 minutos a 37°C com os quatro extratos de *C. braziliensis* nas concentrações finais de 28,6; 50; 100 e 250 µg/mL, diluídos em DMSO. Essas misturas (volume de 10 µL) foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,8%) durante 15 min (E-Gel® iBase™ Power System). A visualização das bandas de DNA formadas ocorreu por meio do transiluminador de luz ultravioleta (E-Gel® Safe Imager™ Real-time Transilluminator), ambos os aparelhos da empresa Invitrogen, 60 Hz. O ensaio utilizou como controles positivos o cloreto estânico (SnCl₂) nas concentrações de 100 e 200 µg/mL (Sigma

Chemical Co. St. Louis, EUA) diluídas em água (GOMES; SOUTO; FELZENSZWALB, 1996; FELZENSZWALB et al., 1998).

A concentração de 250 µg/mL de cada amostra e o plasmídeo pUC18 (massa = 400 ng) foram tratadas com melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) numa etapa posterior. A melatonina na concentração de 1 mM foi dissolvida em 50 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,4, com metanol a 10% (ONUKEI et al., 2005). As misturas reacionais foram incubadas a 37°C durante 2 h.

4.3.3 Micronúcleo em macrófagos

O micronúcleo se constitui em uma pequena massa nuclear e separada do núcleo principal. São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal.

A linhagem de macrófagos RAW264,7 de camundongo foi utilizada a partir de uma cultura em confluência. Foram adicionados em cada um dos 24 poços da placa de microtitulação, contendo uma lamínula, 950 µL do meio Minimum Essential Medium (MEM) Eagle Ca⁺⁺ 1,8 mM pH 7,6 (Gibco) suplementado com 1,76 g/L de NaHCO₃, 0,88 g/L de piruvato de sódio, 21,6 mg/L de ácido aspártico e 16,8 mg/L de L-serina, com soro fetal bovino (10%), ambos à 37°C, e 50 µL da suspensão de células (concentração final 2 x 10⁵ células/mL). Essa suspensão foi mantida em meio MEM, contendo soro fetal bovino (10%), estreptomicina (100 mg/L) e penicilina (70 mg/L). Em seguida as placas foram colocadas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ por 90 min.

Para o tratamento celular, foram adicionados 100 µL das concentrações de 20, 200, 350 e 500 µg/mL, diluídos em DMSO, dos quatro extratos de *C. braziliensis*, equivalente a 10% do volume inicial, e as placas foram incubadas por 3 h. Após esse período, retiramos o meio e a placa é rinsada com 1 mL de meio MEM. Novamente adiciona-se em cada poço da placa 1 mL de meio MEM com soro e a placa permanece por 24 h em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. No ensaio, utilizou-se como controle positivo o *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (MNNG) na concentração de 0,5 µM e o DMSO como controle negativo.

Para a determinação do número de mitoses e o número de células micronucleadas, o meio MEM foi substituído pela solução gelada de fixador metanol-ácido acético glacial (3:1 v/v) por 15 min. As células fixadas foram rinsadas com 1 mL de tampão McIlvaine (MI)

(21,01 g/L de ácido cítrico e 35,60 g/L de Na₂HPO₄, pH 7,5) por 2 min e postas para secar a temperatura ambiente. As células fixadas foram coradas com 500 µL de 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (0,2 µg/mL dissolvido em tampão MI) por 40 min, lavadas com 1 mL de tampão MI por 2 min duas vezes, e postas para secar novamente, a temperatura ambiente. Para determinarmos o número de mitoses e o número de células com micronúcleos, assim como as percentagens de necrose e apoptose, 1000 células por concentração foram analisadas no microscópio de fluorescência (Reichert Univar) com excitação de comprimento de onda de 350 nm na lente objetiva de 40x. O experimento foi realizado em triplicata.

O ensaio de micronúcleo com macrófagos tem como objetivo avaliar se os extratos foram capazes de gerar uma alteração estrutural e assim corroborar o observado pelo teste de quebra de plasmídeo. A alteração ocorre devido a uma interação da amostra com o DNA durante o processo de divisão celular. A interação gera um erro na formação do fuso acromático e induz a formação do micronúcleo, um pedaço de cromossomo gerado por quebra.

A presença de núcleos celulares homoganeamente brilhantes foi considerada para a morfologia de fenótipo normal. Núcleos apoptóticos foram identificados através da cromatina condensada na periferia da membrana nuclear ou por uma morfologia de corpos nucleares fragmentados. Células necróticas apresentam a cromatina agregada de forma irregular e os núcleos picnóticos (coloração escura e pequena) e a membrana celular estourada com os restos celulares derramados no meio extracelular (ECKL et al., 1987).

4.3.4 Ensaio de toxicidade aguda com o microcrustáceo *A. salina*

O ensaio de toxicidade aguda com *A. salina* consiste na exposição desse microcrustáceo a diferentes concentrações da amostra por um período de 24 h. Foi verificado o efeito da amostra na sobrevivência do organismo-teste. Os cistos de *A. salina* foram incubados em água de diluição (33 g de sal marinho por litro de água), mantidos em ambiente escuro, sob aeração constante, em temperatura ambiente por 24 h, em uma proporção de 100 mg de cistos por 100 mL de água de diluição, até a eclosão. Os náuplios recém-eclodidos foram separados em um novo recipiente com água de diluição com auxílio de uma pipeta Pasteur e permaneceram nas mesmas condições, para que atingissem os estágios larval II e III, após um período de 24 h. Após esse período, dez náuplios foram transferidos para poços de

placas de microtitulação (24 poços), contendo 2 mL de solução-teste (amostra + água de diluição), e mantidos no escuro em temperatura ambiente por 24 h. Os números de náuplios vivos e mortos foram contabilizados. Não avaliou-se a mobilidade dos náuplios para este ensaio. O resultado foi expresso em $LC_{50} - 24$ h (concentração letal a 50% dos náuplios de *A. salina* no período de 24 h) e foi obtido através da análise de regressão de probitos, utilizando o método Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95%. (VANHAECKE et al., 1981; LEE; CHEN; CHOU, 1999).

Para a realização do ensaio é preciso que as condições da água estejam de acordo com a Tabela 2 abaixo:

Tabela 2: Condições padrão necessárias da água de diluição para a realização do ensaio de toxicidade aguda em *A. salina*.

Parâmetros	Valores
Salinidade	35‰ ± 1‰
Concentração de O ₂	Acima de 90% ou 8,0 mg/mL
Temperatura	25°C ± 5°C
pH	8,0 ± 0,5

Cinco concentrações de Lauril Sulfato de Sódio (SDS) foram utilizadas como controle positivo, a partir de uma pré-solução de 320 mg/mL, com a finalidade de obter a LC_{50} de cada amostra. A Tabela 3 mostra a proporção entre a quantidade de água de diluição e da pré-solução, bem como, a concentração final de SDS para um volume de 2 mL.

Tabela 3: Proporção entre água de diluição e pré-solução de SDS e concentração final.

Concentração	Água de diluição (µL)	Pré-solução de 320 mg/mL (µL)	Concentração final de SDS (mg/mL)
1	1850,0	150,0	24,0
2	1857,5	112,5	18,0
3	1915,6	84,4	13,5
4	1937,5	62,5	10,0
5	1953,1	46,9	7,5

As amostras foram preparadas após uma série de diluições. A partir de uma solução de 125 mg/mL de cada extrato diluído em DMSO, foram preparadas três soluções (A, B e C) que

foram usadas para as sete soluções-teste utilizadas no ensaio. Essas diluições foram utilizadas para os quatro extratos de *C. braziliensis*. As soluções A, B e C foram preparadas da seguinte forma:

Solução A = 64 μL da solução a 125 mg/mL + 5936 μL de água de diluição (1330 $\mu\text{g/mL}$);

Solução B = 10 μL da solução A + 990 μL de água de diluição (13,30 $\mu\text{g/mL}$);

Solução C = 100 μL da solução B + 900 μL água de diluição (1,33 $\mu\text{g/mL}$).

A Tabela 4 mostra como foram preparadas as soluções-teste a partir das soluções A, B e C.

Tabela 4: Concentrações das soluções-teste dos extratos a partir das soluções A, B e C.

Solução-teste	Solução A ou B ou C	Água de diluição (μL)	Concentração da solução-teste ($\mu\text{g/mL}$)
1	1500 μL solução A	500	1000
2	750 μL solução A	1250	500
3	150 μL solução A	1850	100
4	15 μL solução A	1985	10
5	150 μL solução B	1850	1
6	15 μL solução B	1985	0,1
7	15 μL solução C	1985	0,01

5. RESULTADOS

Alguns dos resultados referentes aos ensaios de mutação reversa bacteriana quantitativo e sobrevivência sem metabolização exógena, análise de quebra plasmidial, micronúcleo em macrófagos e efeito captador de radical livre aplicando DPPH possibilitaram a produção de um manuscrito já aceito para publicação na revista *Genetic and Molecular Research*, intitulado “*Mutagenicity, genotoxicity, and scavenging activities of extracts from the soft coral Chromonephthea braziliensis: a possibility of new bioactive compounds*”. O mesmo encontra-se na seção Apêndice.

5.1 Resultados da caracterização dos extratos

5.1.1 Espectrofotometria

Os espectros de UV e visível estão representados no Gráfico 1 a seguir. Todos os extratos de *C. braziliensis* apresentaram absorção na faixa de aproximadamente 210 a 350 nm. Isso indica que as amostras foram capazes de absorver comprimentos de onda das três faixas do UV: UV-A (400-315 nm), UV-B (315-280 nm) e UV-C (≤ 280 nm).

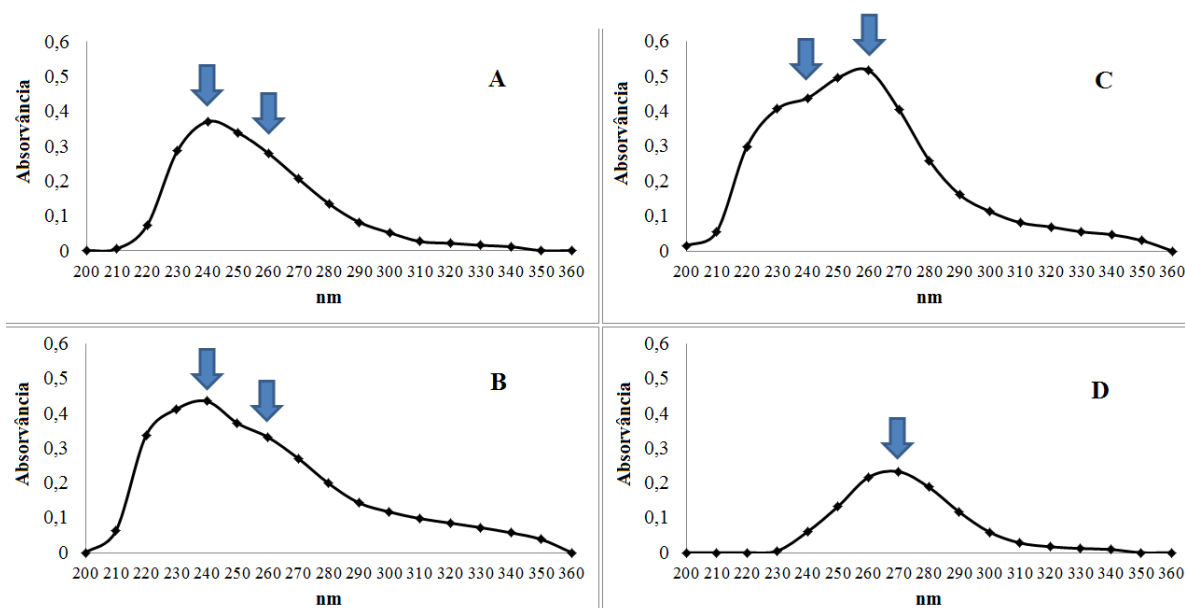


Gráfico 1: Espectros de absorção nas faixas de comprimento de onda do UV e visível representado em função da absorvância dos extratos n-Hex (A), DCM (B), AcOEt (C) e MeOH (D) de *C. braziliensis*.

Semelhanças podem ser observadas entre os gráficos dos extratos n-Hex e DCM que apresentam o pico maior de absorção em 240 nm em intensidades próximas, e entre os gráficos de AcOEt e MeOH cujos respectivos picos de maior absorção são próximos, 260 nm para AcOEt e 270 para MeOH. No gráfico de DCM, existe uma influência da região de absorção de 260 nm, possibilitando a ocorrência de substâncias com essa propriedade. A absorção em 240 nm no gráfico de AcOEt também é evidente o que sugere a presença de substâncias com essa característica de absorção. O gráfico referente ao extrato MeOH aparentemente consta de classes mais homogêneas de compostos. Os espectros de IV dos extratos n-Hex, DCM, AcOEt e MeOH encontram-se respectivamente nos Gráficos 2, 3, 4 e 5 a seguir.

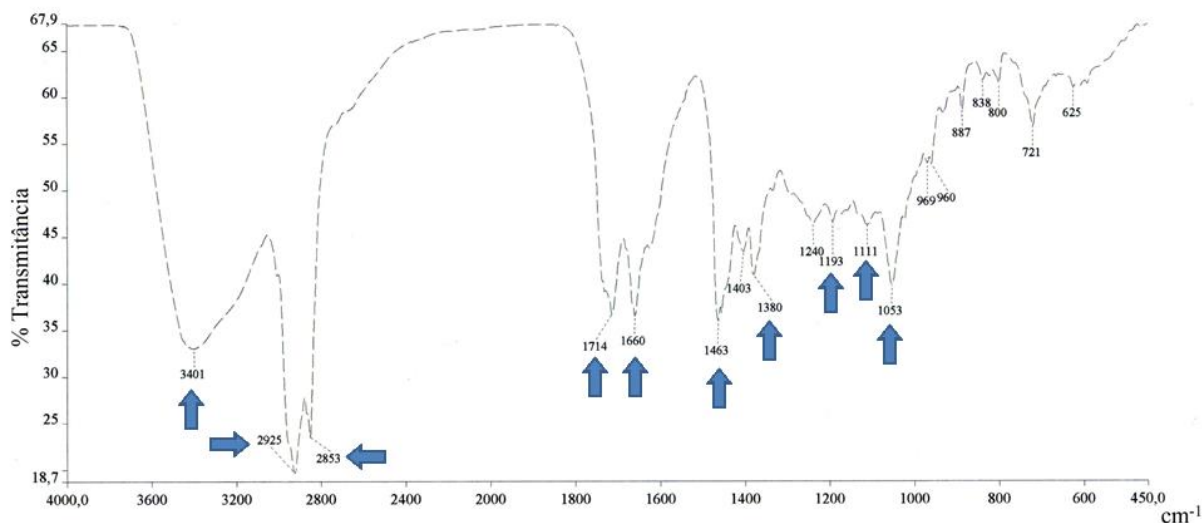


Gráfico 2: Espectro de absorção na faixa de frequência do IV do extrato n-Hex.

No extrato de n-Hex (Gráfico 2), as absorções de 1714 e 1660 cm^{-1} indicam a presença do grupamento carbonila (C=O). As absorções de 2925 e 2853 cm^{-1} podem representar estiramento de ligação O–H referente ao grupo funcional ácido carboxílico. Os picos de absorção de 1714 e 1660 cm^{-1} permitem dizer que a função éster pode estar presente nesse extrato; ou a presença de alquil-cetona (1714 cm^{-1}) e aril-cetona ou amida terciária (1660 cm^{-1}). As absorções em 1193, 1111 e 1053 cm^{-1} podem indicar o estiramento da ligação C–N (alquil-amina) que, junto com o pico de 3401 cm^{-1} , referente à ligação N–H, possibilita a presença da função amida. O pico 3401 cm^{-1} ainda pode ser referente à função fenol ou álcool, sendo este mais provavelmente primário, pois o estiramento O–H é muito próximo de 1050 cm^{-1} (1053 cm^{-1}). A absorção 1660 cm^{-1} ainda pode indicar o estiramento da ligação C=C presente nas cadeias hidrocarbônicas. Nessas cadeias podem ocorrer estiramentos de ligações C–H representadas pelos picos 2925 e 2853 cm^{-1} , indicando radicais metil, sendo deformações simétricas de ligações CH_3 (próximo ao pico de absorção de 1375 cm^{-1}) e deformações em tesoura de ligações CH_2 (próximo ao pico de absorção de 1465 cm^{-1}). De acordo com o espectro, os estiramentos de ligações com haletos também podem ser considerados, pois há absorções abaixo de 1400 cm^{-1} , onde 1111 e 1053 cm^{-1} podem representar compostos com ligação C–F, 800 e 721 cm^{-1} para compostos com ligação C–Cl e 625 cm^{-1} para compostos com ligação C–Br.

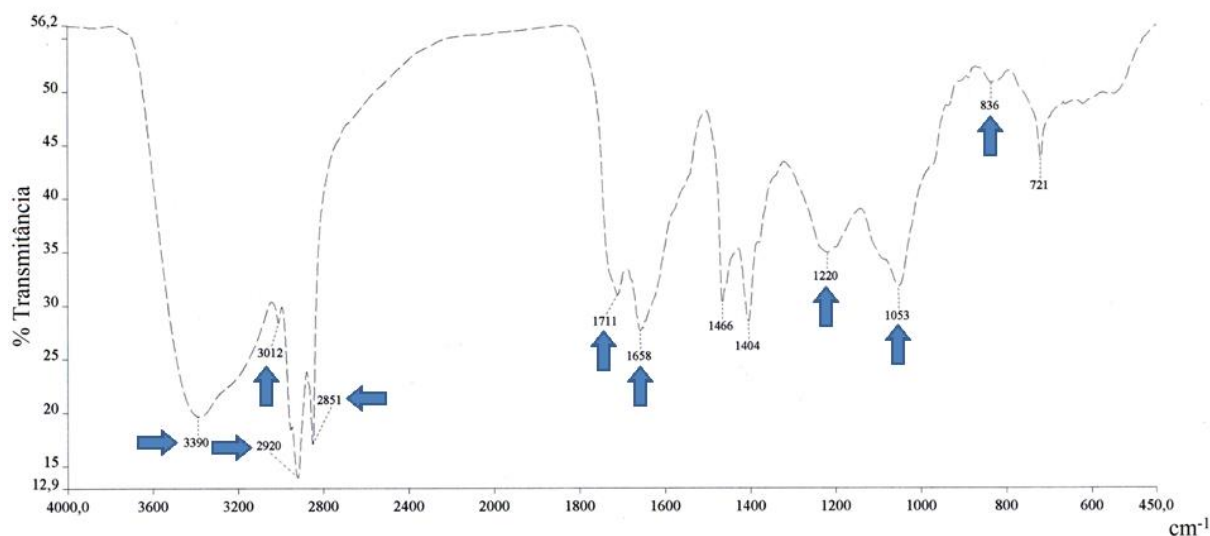


Gráfico 3: Espectro de absorção na faixa de frequência do IV do extrato DCM.

No extrato de DCM (Gráfico 3), as absorções de 1711 e 1658 cm^{-1} indicam a presença de estiramento da ligação C=O. Os picos de absorção 3012, 2920 e 2851 cm^{-1} podem indicar o estiramento da ligação O–H (ácido carboxílico). As absorções 1220 e 1053 podem representar a ligação C–O, que associadas à leitura de 1711 cm^{-1} , podem estar relacionadas à função éster ou alquil-cetona; ou podem representar a ligação C–N (alquil-amina) que, juntamente com a absorção 3390 cm^{-1} (estiramento da ligação N–H), podem indicar a função amida. Os picos 3390, 1220 e 1053 ainda também possibilitam a ocorrência da função fenol ou álcool primário (3390 cm^{-1} pode indicar estiramento da ligação O–H; pico próximo de 1050 cm^{-1} referente a álcool primário). O pico de absorção 1658 cm^{-1} pode representar a função amida terciária ou aril-cetona. A absorção 1658 cm^{-1} também indica o estiramento da ligação C=C, cuja associação com a leitura 3012 cm^{-1} possibilita a ocorrência de anel aromático. A absorção de 836 cm^{-1} pode estar relacionada a deformações das ligações C–H fora do plano, indicando a presença de derivados de benzeno. As ligações com haletos de alquila também podem ser consideradas, visto que há absorções abaixo de 1400 cm^{-1} , onde 1053 cm^{-1} estaria vinculada a ligações C–F e 721 cm^{-1} a ligações C–Cl.

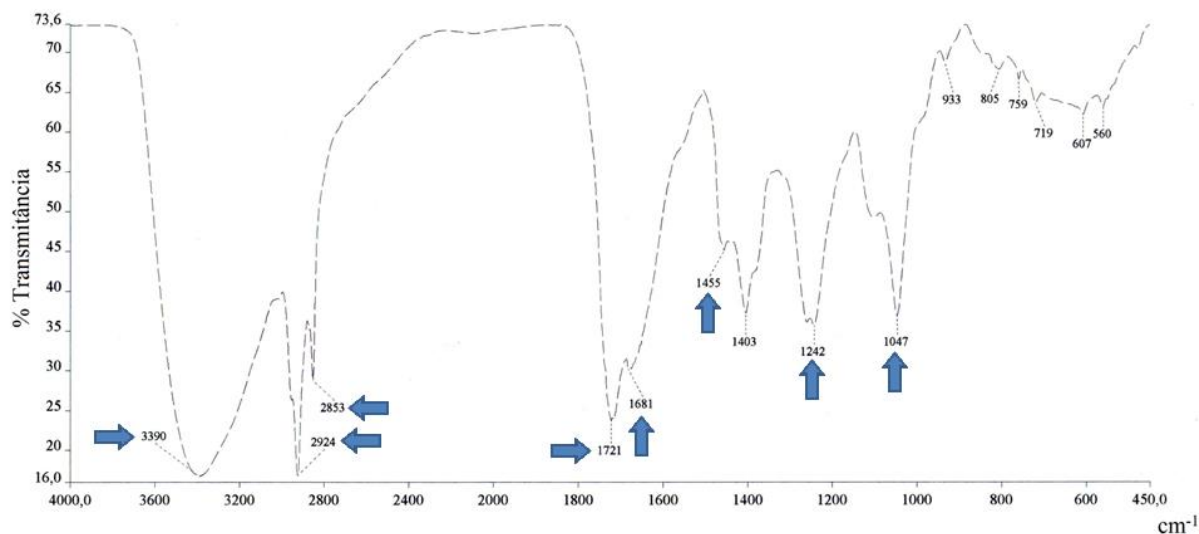


Gráfico 4: Espectro de absorção na faixa de frequência do IV do extrato AcOEt.

Já no extrato de AcOEt (Gráfico 4), o estiramento da ligação C=O pode ser considerado devido a presença das absorções 1721 e 1681 cm^{-1} . As absorções 2924 e 2853 cm^{-1} possibilitam a presença de estiramento da ligação O–H, relacionado à função orgânica ácido carboxílico. Os picos de absorção 1242 e 1047 cm^{-1} são indicativos de ligação C–O ou C–N (alquil-amina), que associados à absorção 3390 cm^{-1} , podem indicar as funções fenol ou álcool primário ou amida. As leituras de 1721 e 1681 cm^{-1} ainda podem sugerir a presença de éster, alquil-cetona, aril-cetona ou amida terciária. A absorção próxima de 1680 cm^{-1} indica estiramento de ligação C=C (alceno) e os picos de 2924, 2853 e 1455 cm^{-1} podem indicar ligações C–H na cadeia carbônica, mais precisamente deformações simétricas do radical metil CH_3 . As leituras abaixo de 1400 cm^{-1} , referentes a haletos de alquila, podem representar ligações C–F (1047 cm^{-1}), ligações C–Cl (759 e 719 cm^{-1}), ligações C–Br (607 cm^{-1}) e ligações C–I (560 cm^{-1}).

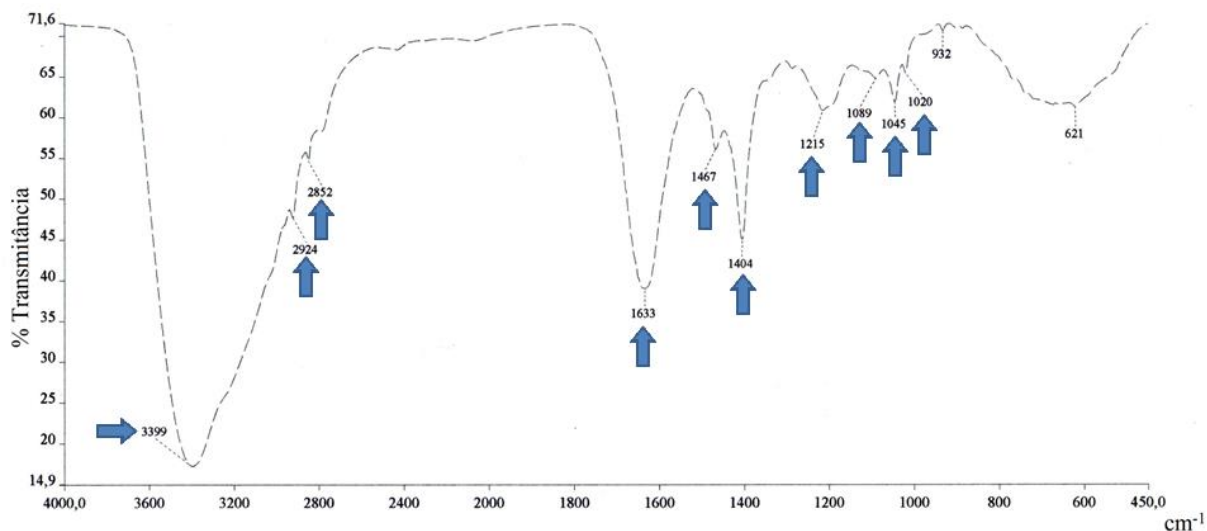


Gráfico 5: Espectro de absorção na faixa de frequência do IV do extrato MeOH.

No espectro do extrato de MeOH (Gráfico 5), a absorção de 1633 cm^{-1} pode estar relacionada ao grupamento carbonila ($\text{C}=\text{O}$). A presença das absorções de 2924 e 2852 cm^{-1} podem representar o estiramento da ligação $\text{O}-\text{H}$, vinculada à função ácido carboxílico. Os picos de absorção 1215 , 1089 , 1045 e 1020 cm^{-1} permitem as interpretações dos estiramentos de ligação $\text{C}-\text{O}$ ou $\text{C}-\text{N}$. Esta última, alquil-amina, pode estar associada ao estiramento $\text{N}-\text{H}$ (3399 cm^{-1}) possibilitando a presença de amida no extrato. Outra possibilidade é de considerar a ligação $\text{C}-\text{O}$ associada à hidroxila ($\text{O}-\text{H}$; absorção 3399 cm^{-1}), possibilitando as funções fenol ou álcool primário. A absorção 1633 cm^{-1} também pode estar associada à função amida terciária e ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{C}$ (alceno). As leituras de 2924 e 2852 cm^{-1} , junto com a absorção 1467 cm^{-1} , podem ser indícios da existência de radicais metil, mais precisamente de deformação em tesoura da ligação CH_2 . Haletos de alquila possivelmente estão presentes no extrato, pois o espectro mostra as leituras de 1089 , 1045 e 1020 cm^{-1} referentes a ligações $\text{C}-\text{F}$ e de 621 cm^{-1} referentes a ligações $\text{C}-\text{Br}$.

5.1.2 Cromatografia em camada delgada

O Quadro 2 mostra a organização das placas de cromatografia em relação aos eluentes e reveladores utilizados. As imagens das placas encontram-se nas Figuras 5, com revelador geral, e 6, com revelador de terpenoides.

Quadro 2: Organização das placas de cromatografia em relação aos eluentes e reveladores utilizados.

Placa Cromatográfica	Eluentes (v/v)	Revelador
Placa 1	AcOEt / Hex (1:1)	Revelador geral (Sulfato cérico)
Placa 2	AcOEt / DCM (1:9)	
Placa 3	AcOEt / DCM (3:7)	
Placa 4	AcOEt / MeOH (19:1)	
Placa 5	MeOH / DCM (1:9)	
Placa 6	AcOEt / Hex (1:1)	Terpenoides (H ₂ SO ₄ 10%; vanilina)
Placa 7	AcOEt / DCM (1:9)	
Placa 8	AcOEt / DCM (3:7)	
Placa 9	AcOEt / MeOH (19:1)	
Placa 10	MeOH / DCM (1:9)	

Observa-se na Figura 5 que o extrato de n-Hex possui uma grande quantidade de substâncias, com os eluentes e reveladores utilizados. Isso é corroborado com os resultados de Lages (2003). Porém, esse extrato não é o de maior complexidade, o que pode ser visto nas Placas 1 e 4 para o AcOEt que possui um maior número de bandas que aparecem ao longo de todas estas placas. O espectro UV-Vis de AcOEt (Gráfico 1; C) confirma essa observação, já que é mais espalhado. Observa-se nas Placas 2 e 3 que aparentemente uma mesma classe de substâncias é extraída pelos extratos n-Hex, DCM e AcOEt, mas com intensidades diferentes. O extrato de MeOH apresenta uma quantidade pequena de substâncias. Provavelmente, melhores condições para seu fracionamento na cromatografia em camada delgada não tenham sido obtidas.

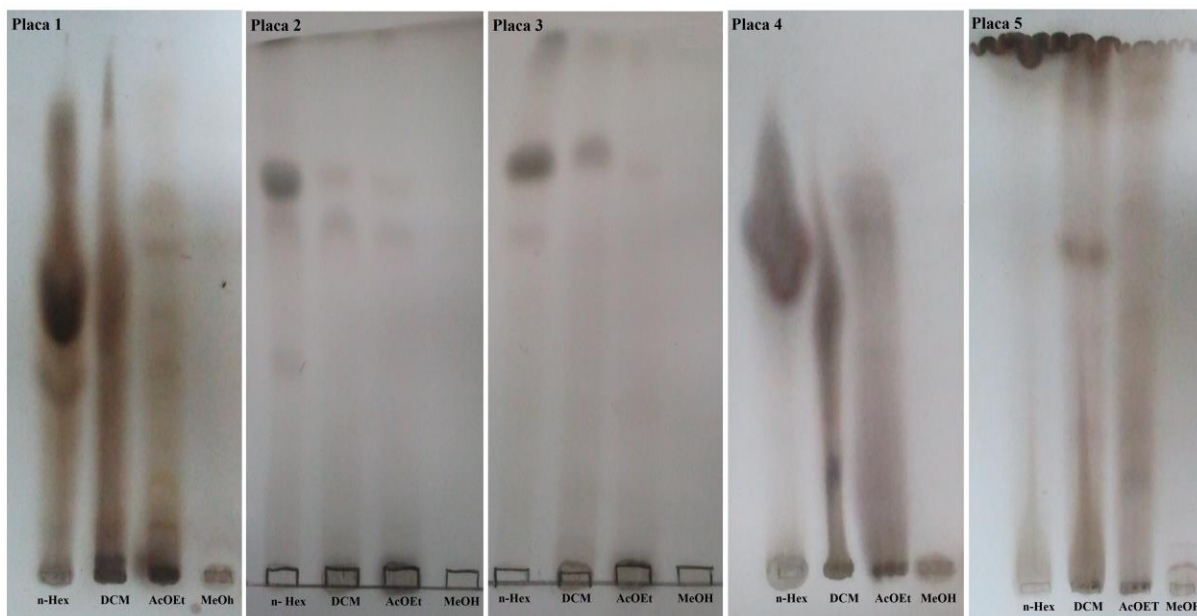


Figura 5: Placas cromatográficas com extratos de *Chromonephthea braziliensis* (Ofwegen, 2005), usando o revelador geral (sulfato cérico).

O uso do revelador de terpenoides (H_2SO_4 10% e vanilina) permite dizer que existem substâncias dessa classe nos extratos. Uma maior quantidade de terpenos foi extraído com n-Hex e, em menor concentração, nos extratos DCM e AcOEt. Entretanto, não possibilita identificar o tipo de terpeno presente, por exemplo, sesquiterpeno ou diterpeno. Estes são os tipos mais prováveis de serem encontrados, segundo Coll (1992).

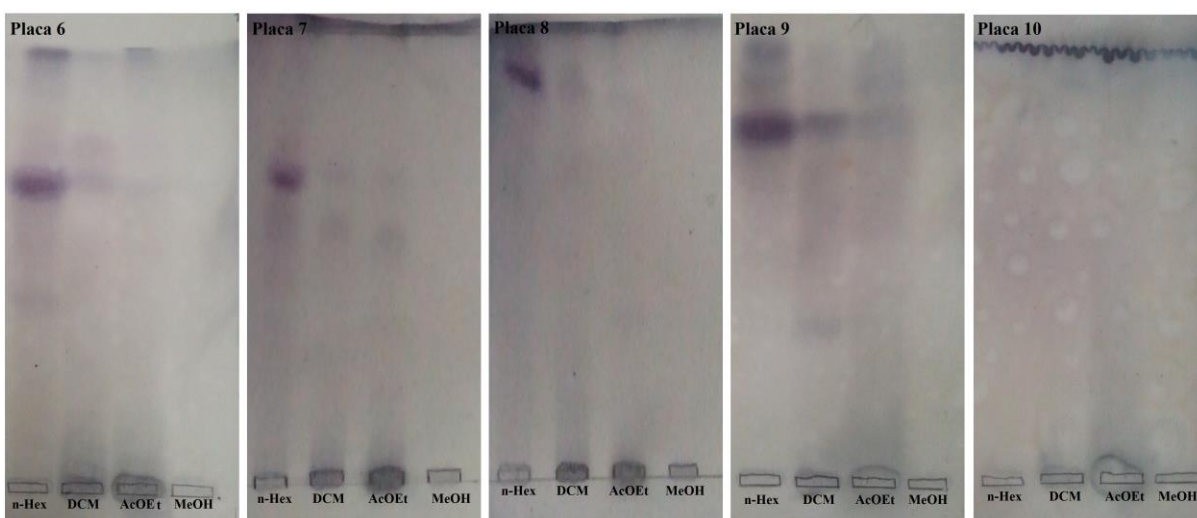


Figura 6: Placas cromatográficas com extratos de *Chromonephthea braziliensis* (Ofwegen, 2005), usando o revelador de terpenoides (H_2SO_4 10% e vanilina).

5.1.3 Quantificação de polifenóis

De acordo com a curva de calibração obtida do ácido clorogênico, os valores dos coeficientes angular e linear foram 0,0016 e 0,0064 respectivamente (Gráfico 6). Os valores da média da absorvância corrigida foram: 0,124 para a fração de n-Hex, 0,116 para a fração de DCM, 0,092 para a fração de AcOEt e 0,035 para a fração de MeOH. A partir dos coeficientes angular e linear, dos valores das médias de absorvância e com a concentração utilizada de cada fração de *C. braziliensis* (500 µg/mL) foi calculado a porcentagem de polifenóis totais em cada amostra. Os resultados foram: 14,74% para o extrato n-Hex, 13,74% para o extrato DCM, 10,66% para o extrato AcOEt e 3,53% para o extrato MeOH.

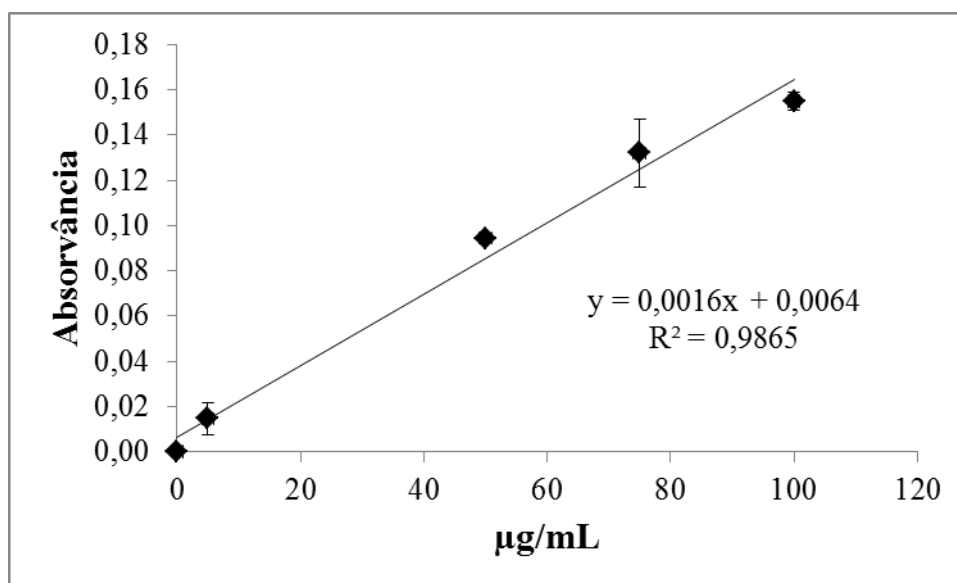


Gráfico 6: Linha de tendência do ácido clorogênico.

5.1.4 Quantificação de proteínas

A concentração de proteína medida em cada extrato foi: 309 µg/mL para o extrato n-Hex, 492,5 µg/mL para o extrato DCM, 373 µg/mL para o extrato AcOEt e 69,1 µg/mL para o extrato MeOH. A diminuição nas concentrações de proteínas observadas nos extratos pode ser devido ao processo sequencial de extração.

5.1.5 Ensaio do efeito captador sobre o radical livre DPPH

A incubação dos extratos em diferentes concentrações pode sugerir a capacidade das proteínas de agir como agentes *scavengers* ou capazes de formar complexos com metabólitos secundários, o que levaria a uma diminuição da atividade captadora de radicais livres dos extratos. Diferenças significativas (ANOVA $p < 0,05$) foram encontradas entre a presença e a ausência de proteinase K, sugerindo que as proteínas presentes nos extratos interferiram na capacidade captadora de radicais livres pelos metabólitos secundários (Gráfico 7), exceto para o extrato DCM.

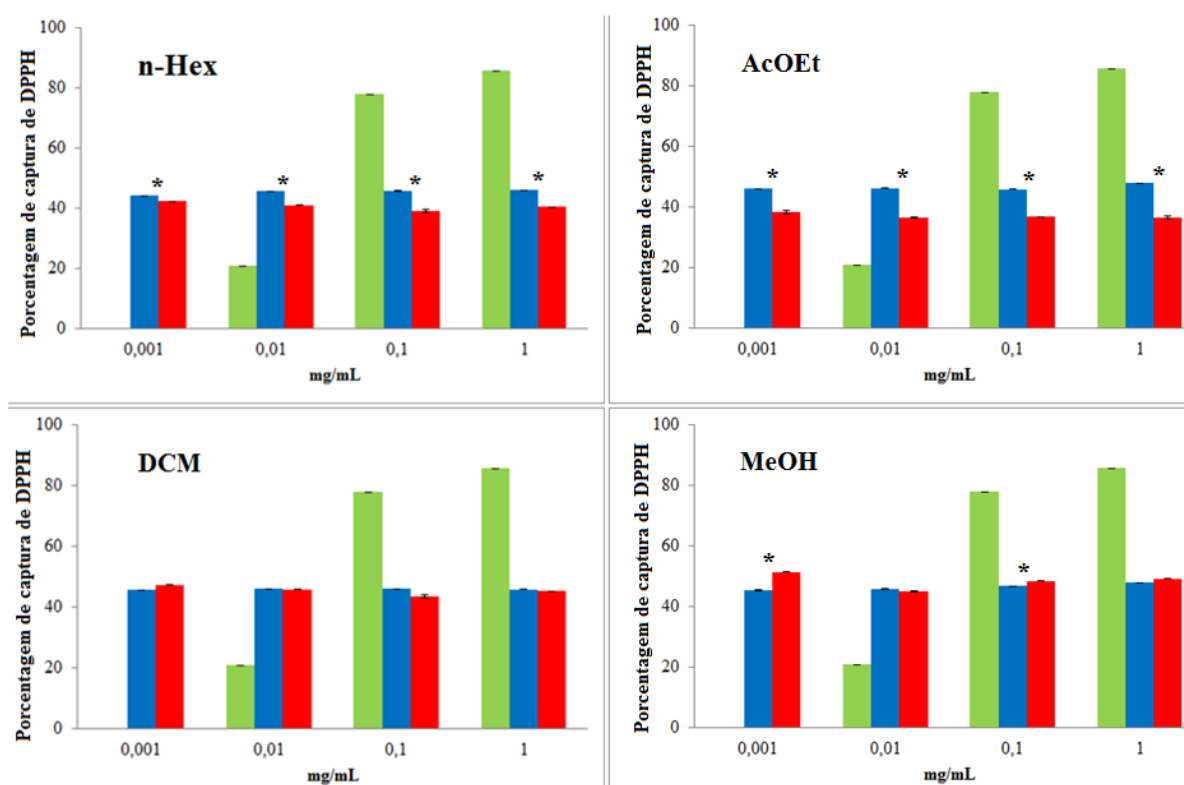


Gráfico 7: Porcentagem de captura de DPPH (verde) na ausência (azul) ou na presença (vermelho) de proteinase K (250 $\mu\text{g/mL}$) em diferentes concentrações dos extratos (0,001, 0,01, 0,1 e 1 mg/mL) de (A) n-Hex; (B) DCM; (C) AcOEt e (D) MeOH. Diferenças estatisticamente significativas entre ausência e presença de proteinase K, sob as mesmas concentrações são identificados por um * (ANOVA $p < 0,05$).

5.2 Resultados dos testes toxicológicos

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

As quatro linhagens bacterianas foram utilizadas nos ensaios mutagênicos e citotóxicos, devido à sua alta sensibilidade para vários compostos. No entanto, nenhuma resposta positiva foi observada para esses ensaios, considerando-se os critérios descritos na página. As Tabelas 5, 6, 7 e 8 apresentam a análise da resposta mutagênica e/ou citotóxica para os extratos, respectivamente, n-Hex, DCM, AcOEt e MeOH de *C. braziliensis*, na presença e na ausência de metabolização exógena com S9.

O extrato n-Hex não apresentou uma resposta mutagênica, mas um sinal de toxicidade foi observado para TA102 na concentração mais alta por um decréscimo da percentagem de sobrevivência, no ensaio sem S9 mix.

Tabela 5: Resultados de mutagenicidade e sobrevivência do extrato n-Hex de *C. braziliensis* na ausência e na presença de S9 mix.

n-Hex	µg/100 µL/placa	-S9			+S9		
		Média ± DP	I.M.	% Sobr.	Média ± DP	I.M.	% Sobr.
TA97	DMSO	132 ± 5	1,0	100	129 ± 10	1,0	100
	0,5	94 ± 9 *	0,7	100	142 ± 13	1,1	81
	5,0	100 ± 11 *	0,8	100	125 ± 9	1,0	90
	10	110 ± 16	0,8	100	125 ± 5	1,0	76
	20	131 ± 13	1,0	100	129 ± 4	1,0	84
	4-NQO 1,0	368 ± 27	2,8	100	563 ± 76	4,4	94
TA98	DMSO	18 ± 3	1,0	100	24 ± 7	1,0	100
	0,5	26 ± 7	1,4	100	28 ± 3	1,2	100
	5,0	21 ± 2	1,1	100	21 ± 1	0,9	83
	10	12 ± 3	0,7	87	26 ± 3	1,1	100
	20	14 ± 7	0,8	100	19 ± 5	0,8	100
	4-NQO 1,0	183 ± 0	10,0	100	96 ± 33	4,0	95
TA100	DMSO	146 ± 12	1,0	100	119 ± 15	1,0	100
	0,5	100 ± 8 *	0,7	89	151 ± 1	1,3	100
	5,0	131 ± 12	0,9	86	146 ± 13	1,2	100
	10	133 ± 20	0,9	96	132 ± 20	1,1	100
	20	96 ± 18 *	0,7	88	149 ± 24	1,3	100
	AS 0,5	751 ± 61	5,1	100	1171 ± 70	9,8	100
TA102	DMSO	229 ± 43	1,0	100	261 ± 7	1,0	100
	0,5	170 ± 36	0,7	90	292 ± 43	1,1	100
	5,0	220 ± 19	1,0	90	211 ± 16	0,8	76
	10	216 ± 99	0,9	90	245 ± 11	0,9	100
	20	230 ± 162	1,0	84	269 ± 9	1,0	95
	Mit. C 0,5	989 ± 95	4,3	100	719 ± 117	2,8	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; *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.

No extrato de DCM, os efeitos mutagênicos e citotóxicos foram negativos, exceto para a linhagem TA102 na concentração de 20 µg/100 µL/placa, onde o efeito citotóxico foi observado devido à porcentagem de sobrevivência ter ficado abaixo de 70%, no ensaio com S9 mix. Uma queda da sobrevivência também pode ser observada quando o extrato de DCM fica em contato com a linhagem TA97.

Tabela 6: Resultados de mutagenicidade e sobrevivência do extrato DCM de *C. braziliensis* na ausência e na presença de S9 mix.

DCM	$\mu\text{g}/100 \mu\text{L}/\text{placa}$	-S9			+S9		
		Média \pm DP	I.M.	% Sobr.	Média \pm DP	I.M.	% Sobr.
TA97	DMSO	176 \pm 49	1,0	100	110 \pm 26	1,0	100
	0,5	162 \pm 52	0,9	95	111 \pm 12	1,0	100
	5,0	162 \pm 34	0,9	90	124 \pm 24	1,1	99
	10	170 \pm 38	1,0	80	105 \pm 24	1,0	89
	20	165 \pm 12	0,9	80	109 \pm 4	1,0	91
	4-NQO 1,0	934 \pm 361	5,3	100	588 \pm 49	5,4	100
TA98	DMSO	28 \pm 4	1,0	100	22 \pm 5	1,0	100
	0,5	29 \pm 8	1,1	100	19 \pm 9	0,9	100
	5,0	28 \pm 6	1,0	100	12 \pm 1	0,6	100
	10	30 \pm 2	1,1	100	25 \pm 3	1,1	100
	20	28 \pm 7	1,0	100	23 \pm 2	1,0	100
	4-NQO 1,0	993 \pm 272	35,9	100	92 \pm 35	4,1	100
TA100	DMSO	246 \pm 16	1,0	100	107 \pm 19	1,0	100
	0,5	248 \pm 25	1,0	100	104 \pm 9	1,0	100
	5,0	262 \pm 21	1,1	100	110 \pm 7	1,0	100
	10	263 \pm 34	1,1	100	102 \pm 6	1,0	100
	20	227 \pm 18	0,9	100	86 \pm 8	0,8	100
	AS 0,5	2673 \pm 805	11,0	100	411 \pm 56	3,8	100
TA102	DMSO	346 \pm 65	1,0	100	294 \pm 22	1,0	100
	0,5	370 \pm 95	1,1	100	297 \pm 27	1,0	73
	5,0	390 \pm 72	1,1	100	301 \pm 18	1,0	94
	10	372 \pm 90	1,1	100	289 \pm 3	1,0	77
	20	277 \pm 78	0,8	100	270 \pm 25	0,9	54
	Mit. C 0,5	1036 \pm 464	3,0	100	595 \pm 67	2,0	62

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; *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.

O extrato de AcOEt não induziu efeitos citotóxicos ou mutagênicos. Entretanto, houve redução da taxa de sobrevivência quando esse extrato esteve em contato com as linhagens TA97 e TA100 no ensaio sem S9 mix e com as linhagens TA97 e TA102 na presença de metabolização exógena.

Tabela 7: Resultados de mutagenicidade e sobrevivência do extrato AcOEt de *C. braziliensis* na ausência e na presença de S9 mix.

AcOEt	µg/100 µL/placa	-S9			+S9		
		Média ± DP	I.M.	% Sobr.	Média ± DP	I.M.	% Sobr.
TA97	DMSO	128 ± 25	1,0	100	140 ± 18	1,0	100
	0,5	174 ± 33	1,4	95	121 ± 15	0,9	79
	5,0	164 ± 31	1,3	95	140 ± 11	1,0	93
	10	151 ± 20	1,2	90	143 ± 19	1,0	92
	20	135 ± 10	1,0	80	137 ± 5	1,0	82
	4-NQO 1,0	853 ± 188	6,6	100	512 ± 11	3,7	95
TA98	DMSO	37 ± 2	1,0	100	25 ± 2	1,0	100
	0,5	39 ± 7	1,1	100	29 ± 1*	1,2	100
	5,0	30 ± 4	0,8	100	23 ± 7	0,9	100
	10	31 ± 9	0,9	100	24 ± 5	1,0	100
	20	39 ± 12	1,1	100	33 ± 6	1,3	77
	4-NQO 1,0	362 ± 42	9,9	100	87 ± 8	3,5	100
TA100	DMSO	201 ± 35	1,0	100	152 ± 5	1,0	100
	0,5	208 ± 4	1,0	100	154 ± 12	1,0	100
	5,0	184 ± 22	0,9	95	146 ± 23	1,0	100
	10	184 ± 27	0,9	90	145 ± 21	1,0	100
	20	218 ± 25	1,1	90	123 ± 3*	0,8	100
	AS 0,5	2929 ± 478	15,0	100	527 ± 51	3,5	100
TA102	DMSO	329 ± 27	1,0	100	264 ± 11	1,0	100
	0,5	361 ± 19	1,1	100	237 ± 34	0,9	78
	5,0	229 ± 93	0,7	100	251 ± 40	1,0	79
	10	265 ± 6	0,8	100	272 ± 17	1,0	91
	20	295 ± 6	0,9	100	193 ± 11*	0,7	100
	Mit. C 0,5	1703 ± 120	5,2	100	539 ± 92	2,0	97

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; *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.

O extrato MeOH seguiu os padrões do DCM e de AcOEt, sem efeitos mutagênicos ou citotóxicos no ensaio sem S9 mix. Já na presença de metabolização exógena, o efeito citotóxico foi observado nas concentrações de 5,0 e 20 µg/100 µL/placa para a linhagem TA97. Não houve indícios de mutagenicidade no ensaio com S9 mix.

Tabela 8: Resultados de mutagenicidade e sobrevivência do extrato MeOH de *C. braziliensis* na ausência e na presença de S9 mix.

MeOH	µg/100 µL/placa	-S9			+S9		
		Média ± DP	I.M.	% Sobr.	Média ± DP	I.M.	% Sobr.
TA97	DMSO	112 ± 30	1,0	100	125 ± 9	1,0	100
	0,5	128 ± 8	1,1	100	126 ± 20	1,0	88
	5,0	91 ± 5	0,8	100	119 ± 3	0,9	65
	10	99 ± 6	0,9	100	141 ± 10	1,1	74
	20	126 ± 40	1,1	100	144 ± 10	1,2	49
	4-NQO 1,0	974 ± 108	8,7	100	463 ± 58	3,7	75
TA98	DMSO	24 ± 1	1,0	100	21 ± 4	1,0	100
	0,5	23 ± 5	1,0	100	23 ± 4	1,1	100
	5,0	26 ± 4	1,1	100	18 ± 3	0,8	100
	10	17 ± 3	0,7	100	21 ± 4	1,0	100
	20	20 ± 2	0,9	100	31 ± 8	1,5	100
	4-NQO 1,0	479 ± 97	20,0	100	56 ± 10	2,7	100
TA100	DMSO	195 ± 7	1,0	100	147 ± 9	1,0	100
	0,5	160 ± 3*	0,8	100	166 ± 32	1,1	100
	5,0	182 ± 12	0,9	100	152 ± 34	1,0	100
	10	193 ± 5	1,0	100	151 ± 11	1,0	100
	20	186 ± 18	1,0	95	151 ± 4	1,0	100
	AS 0,5	2680 ± 103	14,0	100	623 ± 164	4,2	100
TA102	DMSO	334 ± 9	1,0	100	186 ± 16	1,0	100
	0,5	350 ± 29	1,0	100	164 ± 20	0,9	90
	5,0	310 ± 34	0,9	100	154 ± 16	0,8	92
	10	293 ± 48	0,9	100	139 ± 5	0,8	82
	20	297 ± 25	0,9	100	144 ± 11	0,8	74
	Mit. C 0,5	1067 ± 219	3,2	100	497 ± 175	2,7	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; *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.

5.2.2 Análise de quebra plasmidial

Os resultados dos ensaios sem melatonina encontram-se nas Figuras 7, 8, 9 e 10. Os géis referentes aos ensaios com melatonina não apresentaram bandas com padrão de quebra plasmidial, logo, não foram representados em figuras. Observamos que ao incubarmos o plasmídeo pUC18 (0,4 µg) com o extrato n-Hex nas concentrações 28,6; 50; 100 e 250 µg/mL, ele manteve-se íntegro (Figura 7).

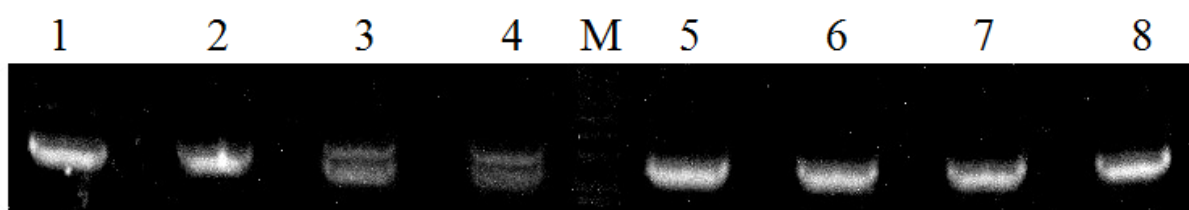


Figura 7: Análise de quebra plasmidial usando gel de agarose a 0,8%, incubando 0,4 µg do plasmídeo pUC18 com o extrato n-Hex de *Chromonephthea braziliensis*. Colunas: 1 - H₂O; 2 - DMSO; 3 - 100 µg/mL de SnCl₂; 4 - 200 µg/mL de SnCl₂; M - Marcador (1 Kb Plus DNA Ladder); 5 - 28,6 µg/mL de n-Hex; 6 - 50 µg/mL de n-Hex; 7 - 100 µg/mL de n-Hex; 8 - 250 µg/mL de n-Hex.

Com o extrato de DCM, AcOEt e MeOH, foram observadas alterações na forma íntegra do DNA plasmidial na concentração de 250 µg/mL (Figuras 8, 9 e 10).

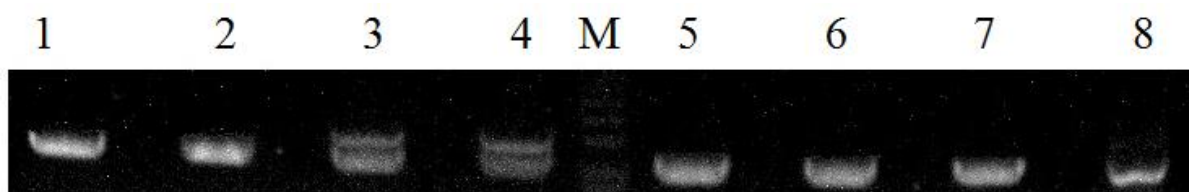


Figura 8: Análise de quebra plasmidial usando gel de agarose a 0,8%, incubando 0,4 µg do plasmídeo pUC18 com o extrato DCM de *Chromonephthea braziliensis*. Colunas: 1 - H₂O; 2 - DMSO; 3 - 100 µg/mL de SnCl₂; 4 - 200 µg/mL de SnCl₂; M - Marcador (1 Kb Plus DNA Ladder); 5 - 28,6 µg/mL de DCM; 6 - 50 µg/mL de DCM; 7 - 100 µg/mL de DCM; 8 - 250 µg/mL de DCM.

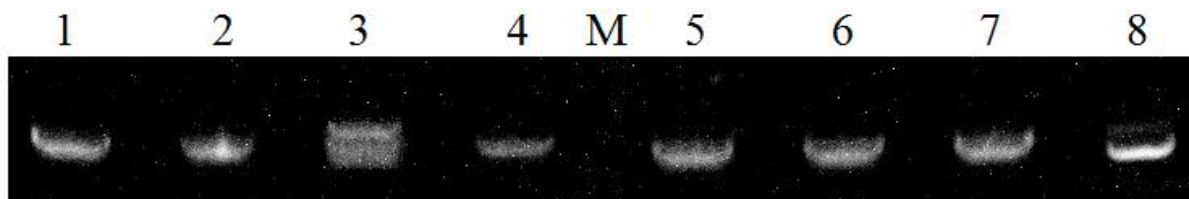


Figura 9: Análise de quebra plasmidial usando gel de agarose a 0,8%, incubando 0,4 µg do plasmídeo pUC18 com o extrato AcOEt de *Chromonephthea braziliensis*. Colunas: 1 - H₂O; 2 - DMSO; 3 - 100 µg/mL de SnCl₂; 4 - 200 µg/mL de SnCl₂; M - Marcador (1 Kb Plus DNA Ladder); 5 - 28,6 µg/mL de AcOEt; 6 - 50 µg/mL de AcOEt; 7 - 100 µg/mL de AcOEt; 8 - 250 µg/mL de AcOEt.

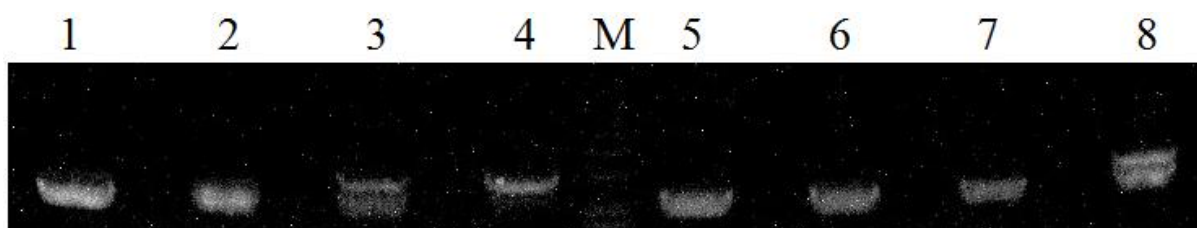


Figura 10: Análise de quebra plasmidial usando gel de agarose 0,8%, incubando 0,4 µg do plasmídeo pUC18 com o extrato MeOH de *Chromonephthea braziliensis*. Colunas: 1 - H₂O; 2 - DMSO; 3 - 100 µg/mL de SnCl₂; 4 - 200 µg/mL de SnCl₂; M - Marcador (1 Kb Plus DNA Ladder); 5 - 28,6 µg/mL de MeOH; 6 - 50 µg/mL de MeOH; 7 - 100 µg/mL de MeOH; 8 - 250 µg/mL de MeOH.

O gráfico 8 é referente às análises desses resultados, considerando somente as concentrações mais altas dos quatro extratos. O gráfico 9 é referente às análises dessas concentrações na presença de melatonina. Essas concentrações foram usadas para serem comparadas com os ensaios de mutagenicidade e citotoxicidade nas maiores concentrações (20 µg/100 µL/placa) e com os ensaios de genotoxicidade com células eucarióticas (WHO, 2012).

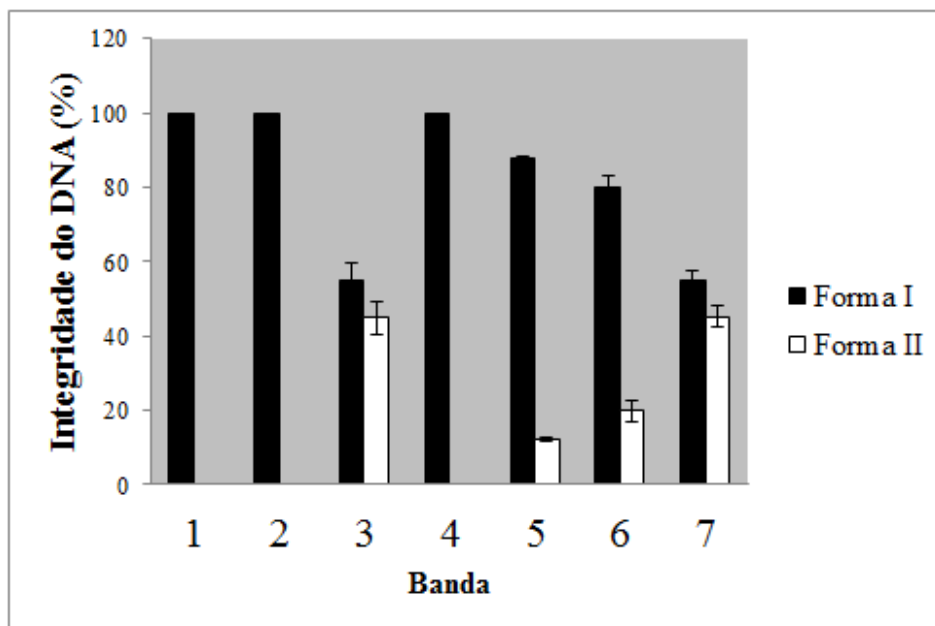


Gráfico 8. Análise da quebra do DNA utilizando gel de agarose 0,8% incubando 0,4 µg do plasmídeo pUC18 com cada um dos quatro extratos de *C. braziliensis*. Banda: (1) - H₂O; (2) - DMSO; (3) - 200 µg/mL de SnCl₂; (4) - 250 µg/mL de extrato n-Hex; (5) - 250 µg/mL de extrato DCM; (6) - 250 µg/mL de extrato AcOEt; (7) - 250 µg/mL de extrato MeOH.

Este ensaio possibilita a interação entre a amostra e o material genético. Este ensaio permite a observação de quebras simples, duplas e múltiplas. A quebra simples leva a forma circular do DNA, enquanto que a quebra dupla leva a forma linear. Ambas as formas podem ser localizadas através de bandas que se encontram entre o pólo negativo da cuba de eletroforese e da banda que representa a forma íntegra do DNA. As quebras múltiplas partem o DNA em vários pontos, formando inúmeros fragmentos com um número reduzido de pares de bases. Logo, a localização destes fragmentos poderá ser através de bandas próximas ao pólo positivo ou ao longo de toda a coluna, como um arrasto.

A melatonina foi capaz de desintoxicar espécies reativas de oxigênio geradas pelos extratos diclorometano, acetato de etila e metanol, evitando a formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxo-dGuo) induzida (BURKHARDT et al., 2001) (Gráfico 9).

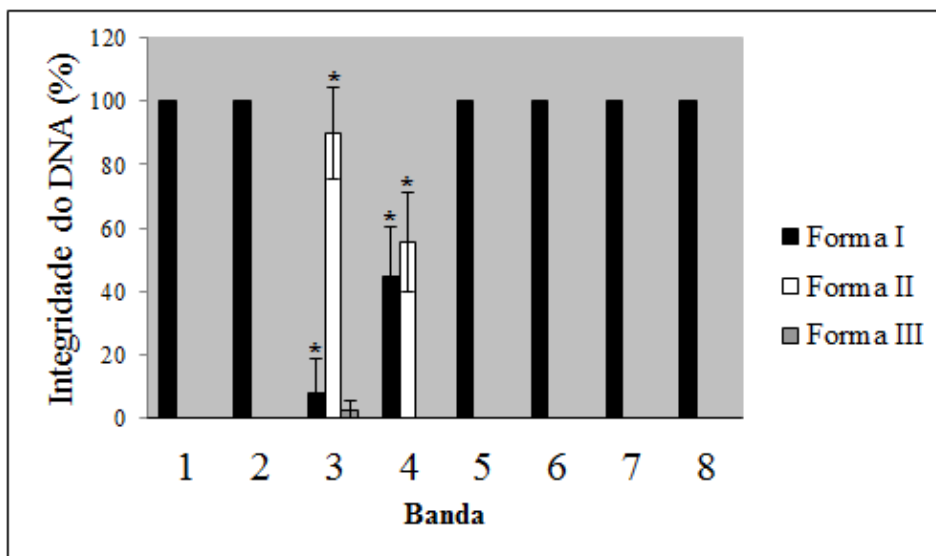


Gráfico 9. Análise de quebra do DNA utilizando gel de agarose a 0,8% incubando 0,4 μg do plasmídeo pUC18 com cada um dos quatro extratos de *C. braziliensis* na presença de melatonina (500 μM). Banda: (1) - DMSO; (2) - DMSO com melatonina; (3) - 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SnCl_2 ; (4) - 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SnCl_2 com melatonina; (5) - 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extrato n-Hex com melatonina; (6) - 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extrato DCM com melatonina; (7) - 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extrato AcOEt com melatonina; (8) - 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extrato MeOH com melatonina. Diferenças estatisticamente significativa entre o controle negativo e concentrações testadas sob as mesmas condições experimentais são identificadas por um * (ANOVA e Tukey's $p < 0,05$).

5.2.3 Micronúcleo em macrófagos

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos, utilizando os quatro extratos de *C. braziliensis* nas concentrações finais de 20, 200, 350 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Embora exista um aumento no número de micronúcleos na curva dose-resposta, os valores dos parâmetros analisados não foram significativos quando comparados com o grupo controle com DMSO (CN). Não há indícios de citotoxicidade induzida, uma vez que não foram significativas as diferenças encontradas nas porcentagens de apoptose e necrose entre cada grupo e seus respectivos controles.

Tabela 9: Indução de micronúcleos em ensaio com macrófagos RAW 264,7, utilizando os quatro extratos de *C. braziliensis*.

Extrato	<i>C.braziliensis</i> ($\mu\text{g/mL}$)	% Mitose \pm DP	% Apoptose	% Necrose	% Micronúcleo \pm DP
n-Hex	CN	$3,7 \pm 0,7$	0,2	0,1	$1,4 \pm 0,3$
	20	$2,8 \pm 0,4$	0,1	0,1	$2,1 \pm 0,3$
	200	$3,1 \pm 0,7$	0,2	0,0	$1,5 \pm 0,1$
	350	$2,2 \pm 1,3$	0,1	0,1	$2,3 \pm 0,3$
	500	$2,4 \pm 0,8$	0,1	0,1	$2,0 \pm 1,0$
DCM	20	$1,7 \pm 0,7$	0,3	0,1	$2,1 \pm 0,4$
	200	$2,2 \pm 0,1$	0,3	0,1	$1,8 \pm 0,1$
	350	$4,8 \pm 1,3$	0,0	0,1	$2,4 \pm 0,8$
	500	$2,3 \pm 0,3$	0,2	0,1	$2,3 \pm 0,7$
AcOEt	20	$3,9 \pm 0,3$	0,1	0,0	$2,5 \pm 1,0$
	200	$3,3 \pm 1,1$	0,1	0,0	$1,3 \pm 0,1$
	350	$4,7 \pm 0,4$	0,3	0,1	$1,7 \pm 0,8$
	500	$3,5 \pm 0,1$	0,2	0,1	$1,8 \pm 1,0$
MeOH	20	$2,4 \pm 0,8$	0,2	0,2	$1,9 \pm 0,8$
	200	$2,6 \pm 0,4$	0,1	0,1	$1,3 \pm 0,3$
	350	$3,9 \pm 0,6$	0,3	0,1	$1,6 \pm 0,1$
	500	$3,1 \pm 0,1$	0,2	0,1	$1,8 \pm 0,3$
	CP	$2,5 \pm 0,6$	0,4	0,2	$2,9 \pm 0,1^*$

Valores expressos em média e desvio padrão (DP) de triplicatas; CN: controle negativo (DMSO); CP: controle positivo (MNNG); *Diferença significativa (ANOVA e Tukey's $p < 0,05$).

5.2.4 Ensaio de toxicidade aguda com o microcrustáceo *A. salina*

Para o extrato de AcOEt, a LC_{50} foi encontrada, mas fora do intervalo de confiança. Não foi possível calcular uma LC_{50} para o extrato de MeOH com as concentrações utilizadas, visto que a mortalidade dos náuplios de *A. salina* somente foi observada na maior concentração (1000 $\mu\text{g/mL}$) e com uma baixa porcentagem (Tabela 10).

Tabela 10: Toxicidade aguda com *A. salina* usando os quatro extratos de *C. braziliensis*.

Extrato	Porcentagem de mortalidade em 24 h							LC ₅₀ * (µg/mL)	95%* Intervalo de confiança
	1000 µg/mL	500 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL	0,1 µg/mL	0,01 µg/mL		
n-Hex	96,55	72,41	17,24	0	0	3,57	0	231	161 – 331
DCM	83,33	19,23	40,74	0	0	0	0	428	252 – 729
AcOEt	83,33	38,46	0	0	0	0	0	544	372 – 795
MeOH	13,33	0	0	0	0	0	0	N.E.	N.E.

* Valores obtidos de um período de 24 h de tratamento usando o método de análise de probitos; N.E.: não estabelecido.

6. DISCUSSÃO

Os octocorais são organismos interessantes para estudar estratégias de defesa, pois apresentam defesas físicas e químicas. Algumas espécies da família Nephtheidae (Alcyonacea) usam espículas calcárias como estratégia de defesa, embora sejam mais conhecidas e estudadas por sua defesa química. A proteção física proporcionada por estruturas calcificadas nessa família geralmente está associada à ausência de uma defesa química (COLL, 1992; KOH et al., 2000; LAGES et al., 2006; FLEURY et al., 2008).

Os corais moles são ricas fontes de metabólitos secundários, como diterpenos, sesquiterpenos, furanoditerpenos, terpenoides, capnelenos e esteroides, cujos estudos demonstraram diversas propriedades funcionais de interesse. Os corais da família Nephtheidae são conhecidos por possuírem sesquiterpenos e capnelenos, mas também apresentam outras substâncias com atividades biológicas, como os esteroides (HU et al., 2011; ROCHA et al., 2011).

Os terpenos e seus derivados constituem uma classe de substâncias com elevado grau de diferenciação estrutural na natureza (HILL, 1993; CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000), o que leva a possuírem diversas características e exercerem funções distintas. Por exemplo, as emissões de isopreno e terpenos pela vegetação podem reagir com o ozônio atmosférico e induzir a formação de peróxido de hidrogênio, uma espécie reativa de oxigênio (BECKER; BROCKMANN; BECHARA, 1990). Por outro lado, podem ser fortes atrativos para pesquisas no tratamento do câncer, como o dihidroxicapneleno capnell-9(12)-ene-8 β ,10 α -diol, isolado do coral *Dendronephthya rubeola*, que apresentou citotoxicidade contra células cancerígenas associadas a leucemia humana e inibiu a interação entre o fator de transcrição oncogênico Myc e a proteína ligante Max (interação Myc/Max) (GROTE et al., 2007).

Testes toxicológicos devem ser obrigatoriamente empregados em produtos de origem natural ou sintética no desenvolvimento de um insumo farmacêutico. Uma série de testes padrão é necessária para identificar os mecanismos de ação de uma substância química de interesse. Os estudos toxicológicos fornecem informação sobre uma série de aspectos relacionados à segurança dos medicamentos: toxicidade aguda, sub-crônica e crônica, mutagenicidade, genotoxicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade (OECD, 1997, 2010).

Na avaliação espectrofotométrica dos extratos de *C. braziliensis*, observou-se que não houve absorção na faixa de comprimento de onda referente à luz visível e parte do espectro da

luz UV (360 a 800 nm) em nenhum dos extratos. As leituras de absorção dos extratos n-Hex e DCM apresentam uma semelhança quanto ao comprimento de onda de maior absorção (240 nm). Já os espectros dos extratos AcOEt e MeOH apresentaram os comprimentos de onda de 260 e 270 nm, respectivamente, com maior absorção. O gráfico do extrato DCM demonstra uma influência da região de absorção de 260 nm o que possibilita que substâncias capazes de absorver esse comprimento de onda possam estar presentes. Este raciocínio pode ser aplicado para o espectro de AcOEt em relação à absorção em 240 nm. O espectro de MeOH mostra que este extrato aparentemente consta de classes mais homogêneas de compostos.

A diferença nas curvas dos gráficos pode estar relacionada aos diferentes solventes utilizados no processo de extração das amostras de *C. braziliensis*. As distintas polaridades geram uma seletividade de substâncias extraídas. A absorção de 240 nm, referente aos picos dos extratos n-Hex e DCM, também observada no AcOEt, pode indicar a presença de glicosídeos iridoides, cuja absorção neste comprimento de onda é muito forte, ou ácidos fenólicos (QI; CHEN; LI, 2009). As absorções de 260 nm no extrato AcOEt e 270 nm no extrato MeOH podem sugerir a presença de polifenóis naturais que compreende uma faixa de absorção entre 257 e 281 nm, o que permite a ocorrência desde moléculas simples, como ácidos fenólicos, até compostos com forte polarização, como taninos (SOARES; BRUNS; SCARMINIO, 2012).

Os resultados para a quantificação de polifenóis (14,74% para o extrato n-Hex, 13,74% para o extrato DCM, 10,66% para o extrato AcOEt e 3,53% para o extrato MeOH) podem corroborar às análises espectrofotométricas, embora não haja muitos estudos sobre a quantificação de polifenóis totais em corais alcionáceos na literatura. Em vegetais, frutas e chás, por exemplo, os polifenóis estão associados à prevenção de doenças degenerativas e cardíacas e na prevenção do câncer (HERTOG, et al, 1995).

A avaliação da atividade de captura do radical DPPH demonstrou diferença significativa entre a presença e a ausência de proteinase K. Os extratos de n-Hex e AcOEt apresentaram essa diferença em todas as concentrações utilizadas. O extrato de MeOH demonstrou essa diferença nas concentrações de 0,001 e 0,1 mg/mL. O uso de proteinase K é justificado pela presença de proteínas nos extratos, verificada no ensaio de quantificação de proteínas (309 µg/mL para o extrato n-Hex, 492,5 µg/mL para o extrato DCM, 373 µg/mL para o extrato AcOEt e 69,1 µg/mL para o extrato MeOH). Entretanto, esta hipótese não pode ser aplicada para o extrato de DCM, já que apresenta atividade captadora independente do uso de proteinase K. A análise entre os extratos mostra que os valores de porcentagem da captura do radical DPPH são próximos: de 36% em 0,01 mg/mL com extrato de AcOEt (com

proteínase K) até 51% em 0,001 mg/mL com extrato de MeOH (sem proteínase K). Wu, Chen e Shiau (2003) verificaram que existe uma correlação direta entre a quantidade de peptídeos e atividade antioxidante em ensaios *in vitro*. A espécie vegetal *Cajanus indicus* apresenta uma proteína de 43 kDa com uma atividade citoprotetora que pode ser comparada ao α -tocoferol, um agente antioxidante conhecido (vitamina E) (SARKAR; SIL, 2006). Extratos de quatro espécies do gênero *Dendronephthya* (família Nephtheidae) foram avaliados quanto à capacidade antioxidante e todos apresentaram esta capacidade, porém com efeitos fracos (SHAHBUDIN et al., 2011).

As capacidades citotóxicas e mutagênicas foram analisadas através do ensaio de mutação reversa bacteriana (*Salmonella/microsoma*), na ausência e na presença de metabolização exógena. Os efeitos mutagênicos não foram observados em nenhum dos extratos de *C. braziliensis*, independente da presença de S9. A citotoxicidade foi observada para o extrato de DCM com a linhagem TA102 na maior concentração (20 μ g/100 μ L/placa) na presença de S9 mix. Como descrito, a linhagem TA102 possui uma mutação no locus *hisG428*, ou seja, possui o par de base A:T no local crítico da reversão, identificando mutações por substituição de pares de bases A:T por G:C. Esta linhagem também sofre reversão por mutágenos capazes de induzir dano oxidativo e a manutenção do seu sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (gene *uvrB chl bio*) permite a detecção de agentes *cross-linking*. A partir dos resultados obtidos podemos determinar como melhor concentração de trabalho 10 μ g/100 μ L/placa, visto que não foi observado efeito mutagênico e/ou citotóxico nesta concentração (LEVIN et al., 1982; MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

O efeito citotóxico também foi observado para o extrato de MeOH com a linhagem TA97 nas concentrações de 5 e 20 μ g/100 μ L/placa, na presença de metabolização exógena. Isso sugere que no extrato de MeOH existem substâncias capazes de interagir com pares de base G:C (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

A atividade clastogênica foi avaliada pelos ensaios de formação de micronúcleo em macrófagos e pela análise de quebra plasmidial. No primeiro ensaio, as células foram incubadas com os extratos. No segundo, houve interação direta com compostos eletrofílicos (DNA plasmidial, pUC18). Observou-se a geração de quebra simples da fita de DNA com os extratos de DCM, AcOEt e MeOH. Uma vez que estes solventes têm polaridades diferentes, moléculas extraídas por eles devem, em geral, ser diferentes. Quantitativamente, o extrato de metanol apresentou maior quebra de DNA do que os outros. Isto pode sugerir que as substâncias mais polares do extrato apresentam este potencial.

Nos ensaios com melatonina, o efeito genotóxico não é observado. A melatonina se apresenta como um potente eliminador de radicais livres e antioxidante (REITER et al., 1995). Pode desintoxicar radical hidroxila e radical peróxido altamente tóxicos *in vitro* (REITER et al., 2001). Desta forma, a melatonina exerce um efeito protetor sob certas condições patológicas, tais como os danos causados pela toxicidade da droga, onde uma característica comum é a existência de danos mitocondriais (KARBOWNIK; REITER, 2000; REITER et al., 1995). Efeitos citotóxicos de terpenos e terpenoides sobre organelas diferentes, tais como mitocôndrias, já são conhecidos. Eles geram reações em cadeia a partir da parede da célula ou da membrana celular externa e invadem toda a célula. Isso afeta atividades como o potencial de membrana, canais iônicos e gradiente de pH, levando à morte celular por apoptose e necrose (BAKKALI et al., 2008).

Fleury e colaboradores (2008) descreveram a composição de uma fração de extrato bruto com solvente hexano de *C. brazilensis*, com o isolamento de um novo esteroide (23-ceto-cladiellin-A). Esse extrato apresentou atividade anti-predatória contra peixes generalistas. Entretanto, é improvável que algum desses compostos descritos esteja associado à quebra de DNA, pois eles foram identificados no extrato de hexano, composto portanto, de substâncias com baixa polaridade. Porém, extratos de corais da família Nephtheidae possuem substâncias que demonstraram citotoxicidade, principalmente para células tumorais. Duh e colaboradores (1999) isolaram diterpenos cembranoides, sesquiterpeno e terpenoides de extratos de diclorometano da espécie *Nephthea brassica* e observaram que, dentre esses compostos, alguns possuíam citotoxicidade para células tumorais de pulmão, cólon e de pele humana e linfócitos de ratos. Nove esteroides foram identificados em *Stereonephthya crystalliana*, cujo potencial citotóxico foi observado em quatro desses esteroides para a linhagem celular P-388 (leucemia linfóide aguda) e dois para a linhagem HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano) (WANG; DAI; DUH, 2006). A substância 24-metilenocolesterol, isolada do extrato metanólico do coral *Nephthea* sp., apresentou atividade citotóxica para linhagens bacterianas patológicas de *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteridis* and *S. Typhimurium* (ISHII et al., 2009).

Embora a formação de micronúcleo na linhagem de macrófago RAW264,7 não fosse observada, a presença de dano ao DNA em partes celulares (DNA plasmidial) foi verificada. O resultado negativo no ensaio de micronúcleo é explicado pelas estruturas celulares, como a membrana, sistemas de reparo do DNA e outras defesas naturais que o macrófago possui, diferente da molécula de DNA plasmidial que é exposta diretamente às amostras. Sugere-se que entre os metabólitos secundários produzidos pelo coral alcionáceo *C. brazilensis* existe

alguma substância, possivelmente, um terpeno ou terpenoide, capaz de gerar o estresse oxidativo. Esta atividade pode estar ligada a alguma das interações ecológicas desse coral, permitindo a sua proliferação na região de Arraial do Cabo.

A. salina é um microcrustáceo que compõe a fauna de ecossistemas aquáticos marinhos e salinos. Possui um papel importante no fluxo de energia e na cadeia alimentar e pode ser utilizado em ensaios de laboratório (PARRA et al., 2001). Os ensaios de toxicidade com *A. salina* são muito usados para avaliar a qualidade das águas e a carga poluidora de efluentes, uma vez que somente as análises físico-químicas não são capazes de diferenciar as substâncias que afetam os sistemas biológicos e as que são inertes no ambiente (COSTA; OLIVI, 2008).

As LC_{50-24} h foram calculadas através da análise de regressão de probitos, utilizando o método Trimmed Spearman-Kärber. De acordo com a Tabela 9, o extrato de n-Hex apresentou a menor LC_{50-24} h (231 $\mu\text{g/mL}$) em comparação aos extratos de DCM (428 $\mu\text{g/mL}$) e AcOEt (544 $\mu\text{g/mL}$). Isso indica que esse extrato é o mais tóxico para náuplios de *A. salina*. A LC_{50-24} h do extrato de MeOH não foi estabelecida porque não houve um número de mortes de organismos-teste suficiente para ser calculada. Este cálculo é baseado no número de indivíduos mortos em relação ao número de indivíduos expostos à substância-teste.

Em relação ao extrato de MeOH de *C. braziliensis*, Li e colaboradores (2012) investigaram o extrato de etanol do coral *Sinularia* sp., do qual isolaram seis esteroides polioxigenados. Observou-se um forte efeito tóxico em *A. salina* em um desses esteroides (24-metilenocolestano-3 β ,5 α ,6 β -triol-6-monoacetato) com LC_{50-24} h equivalente à 0,96 μM . O meroterpeno sarcofitonona, isolado do coral *Sarcophyton crassocaule*, também demonstrou toxicidade, embora fraca, para *A. salina* (LI et al., 2009).

7. CONCLUSÕES

- Verificou-se a presença de terpenoides nos extratos de n-Hex, DCM e AcOEt.
- A atividade captadora sobre o radical livre DPPH foi observada nos extratos de n-Hex, AcOEt e MeOH e foi reduzida quando os extratos foram incubados com proteinase K.
- Os quatro extratos de *C. braziliensis* não apresentaram indução mutagênica, independente da presença de metabolização exógena.
- Os extratos DCM e MeOH induziram citotoxicidade, na presença de S9 mix, para as linhagens de *S. Typhimurium* TA102 e TA97, respectivamente. A citotoxicidade não foi observada para nenhum extrato na ausência de S9 mix.
- Os extratos DCM, AcOEt e MeOH apresentaram atividade genotóxica na quebra de DNA (plasmídeo pUC18), mas não induziram a formação de micronúcleo em macrófagos RAW 264,7. A quebra de DNA não foi observada quando os extratos foram incubados com melatonina.
- Os extratos n-Hex, DCM e AcOEt mostraram efeitos tóxicos para náuplios do microcrustáceo *A. salina*.

REFERÊNCIAS

- ADEY, W. H. Coral reef ecosystems and human health: biodiversity counts! *Ecosystem Health*, v. 6, n. 4, p. 227-236, 2000.
- AIUB, C. A. F. et al. Genotoxic evaluation of a vinifera skin extract that present pharmacological activities. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, n. 6, p. 969-973, 2004.
- AMAROWICZ, R.; NACZK, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 7, p. 2755-2759, 2000.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BECKER, K. H.; BROCKMANN, K. J.; BECHARA, J. Production of hydrogen peroxide in forest air by reaction of ozone with terpenes. *Nature*, v. 346, n. 256-258, 1990.
- BHAKUNI, D. S.; RAWAT, D. S. Bioactive metabolites of marine invertebrates. In: _____. (Eds.). *Bioactive marine natural products*. New Delhi: Anamaya Publishers, 2005. p. 26-63.
- BHALE, S. D. Oregano and rosemary extracts inhibit oxidation of long-chain n-3 fatty acids in menhaden oil. *Journal of Food Science C: Food Chemistry and Toxicology*, v. 72, n. 9, p. 504-508, 2007.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 28, n. 2, p. 196-268, 2011.
- 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.
- BURKHARDT, S. et al. DNA oxidatively damaged by chromium(III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N(1)-acetyl-N(2)-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 33, n. 8, p. 775-783, 2001.
- COATES, J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, p. 10815-10837, 2000.
- COLL, J. C. The chemistry and chemical ecology of octocorals (Coelenterata, Anthozoa, Octocorallia). *Chemical Reviews*, v. 92, n. 4, p. 613-631, 1992.
- COLL, J. C. et al. Chemical aspects of mass spawning in corals. II. (-)-Epi.thunbergol, the sperm attractant in the eggs of the soft coral *Lobophytum crassum* (Cnidaria: Octocorallia). *Marine Biology*, v. 123, n. 1, p. 137-143, 1995.
- 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.

COSTA, C. R.; OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEN, W.; JONES, R. (Eds.). *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

DI SOTTO, A.; EVANDRI, M. G.; MAZZANTI, G. Antimutagenic and mutagenic activities of some terpenes in the bacterial reverse mutation assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 653, n. 1-2, p. 130-133, 2008.

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.

DUH, C. Y. et al. Cytotoxic terpenoids from the formosan soft coral *Nephthea brassica*. *Journal of Natural Products*, v. 62, n. 11, p. 1518-1521, 1999.

ECKL, P. M. et al. Effects of EGF and calcium on adult parenchymal hepatocyte proliferation. *Journal of Cellular Physiology*, v. 132, n. 2, p. 363-366, 1987.

FAULKNER, D. J. Marine pharmacology. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 77, n. 2, p. 135-145, 2000.

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

FELZENSZWALB, I. et al. Shark cartilage-containing preparation: protection against reactive oxygen species. *Food and Chemical Toxicology*, v. 36, n. 12, p. 1079-1084, 1998.

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

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.

FLEURY, B.; COLL, J.; SAMMARCO, P. Complementary (secondary) metabolites in a soft coral: sex-specific variability, inter-clonal variability, and competition. *Marine Ecology*, v. 27, n. 3, p. 204-218, 2006.

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.

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.

- GOMES, E. M.; SOUTO, P. R. F.; FELZENSZWALB, I. Shark-cartilage containing preparation protects cells against hydrogen peroxide induced damage and mutagenesis. *Mutation Research*, v. 367, n. 4, p. 203-208, 1996.
- GROTE, D. et al. Capnellenes from the soft coral *Dendronephthya rubeola*. *Chemistry & Biodiversity*, v. 5, n. 9, p. 1683-1693, 2007.
- HERTOG, M. G. et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*, v. 155, n. 4, p. 381-386, 1995.
- HILL, R. A. Terpenoids. In: THOMSON, R. H. (Ed.). *The chemistry of natural products*. New York: Chapman & Hall, Blackie Academic & Professional, 1993. p. 106.
- HOOPER, G. J.; COLEMAN, M. T. D. New Metabolites from the south african soft coral *Capnella thyrsoidea*. *Tetrahedron*, v. 51, n. 36, p. 9973-9984, 1995.
- HU, J. et al. Chemical and biological studies of soft corals of the Nephtheidae family. *Chemistry and Biodiversity*, v. 8, n. 6, p. 1011-1032, 2011.
- ISHII, T. et al. A new norsesquiterpenoid from a bornean soft coral genus *Nephthea*. *Molecules*, v. 14, n. 11, p. 4591-4596, 2009.
- JIMENO, J. M. A clinical armamentarium of marine-derived anti-cancer compounds. *Anti-cancer Drugs*, v. 13, n. 1, p. 15-19, 2002.
- JÚNIOR, C. V. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.
- KARBOWNIK, M.; REITER, R. J. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 225, n. 1, p. 9-22, 2000.
- KHIEV, P. et al. Cytotoxic terpenes from the stems of *Dipterocarpus obtusifolius* collected in Cambodia. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 60, n. 8, p. 955-961, 2012.
- KIJJOA, A.; SAWANGWONG, P. Drugs and cosmetics from the sea. *Marine Drugs*, v. 2, n. 2, p. 73-82, 2004.
- KOH, L. L. et al. Chemical and physical defenses of Singapore gorgonians (Octocorallia: Gorgonacea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 251, n. 1, p. 103-115, 2000.
- LAGES, B. G. *Avaliação do potencial invasor do coral alcionáceo Stereonephthya aff. curvata (Nephtheidae - Alcyonacea) na Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo (RJ)*. 2003. 61 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha) – Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2003. 41 p. il. color.

- LAGES, B. G. et al. Chemical defense of an exotic coral as invasion strategy. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 328, n. 1, p. 127-135, 2006.
- LEE, T. H.; CHEN, Y, M.; CHOU, H. N. Toxicity assay of cyanobacterial strains using *Artemia salina* in comparison with the mouse bioassay. *Acta Zoologica Taiwanica*, v. 10, n. 1, p. 1-8, 1999.
- 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.
- LI, L. et al. Two new metabolites from the Hainan soft coral *Sarcophyton crassocaule*. *Journal of Asian Natural Products Research*, v. 11, n. 10, p. 851-855, 2009.
- LI, R. et al. Polyoxygenated sterols from the south China sea soft coral *Sinularia* sp. *Marine Drugs*, v. 10, n. 7, p. 1422-1432, 2012.
- LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.
- 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.
- MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 26, n.2, p. 231-238, 2003.
- MAZZAFERA, P. Mate drinking: caffeine and phenolic acid intake. *Food Chemistry*, v. 60, n. 1, v. 67-71, 1997.
- MCCLINTOCK, J. B.; BAKER, B. J. *Marine chemical ecology*. New York: CRC Press, 2001. p.14-17.
- MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. *Organic chemistry*. 6^a ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1995. p. 1360.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, v. 455, n. 1-2, p. 26-60, 2000.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD *Guideline for the testing of chemicals: In vitro* mammalian cell gene mutation test. 1997. 10 p.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD *Guideline for the testing of chemicals: In vitro* mammalian cell micronucleus test. 2010. 23 p.
- OLIVEIRA, A. E. S.; MEDEIROS, M. S. What we must do – An exotic invasive species in paradise. *Biotemas*, v. 21, n. 3, p. 149-151, 2008.
- ONUKEI, J. et al. Inhibition of 5-aminolevulinic acid-induced DNA damage by melatonin, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, quercetin or resveratrol. *Journal of Pineal Research*, v. 38, n. 2, p. 107-115, 2005.
- PARRA, A. L. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.
- PAWLIK, J. R. Marine invertebrate chemical defenses. *Chemical Reviews*, v. 93, n. 5, p. 1911-1922, 1993.
- POMPONI, S. A. The bioprocess–technological potential of the sea. *Journal of Biotechnology*, v. 70, n. 1-3, p. 5-13, 1999.
- QI, L. W.; CHEN, C. Y.; LI, P. Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in Flos *Lonicerae Japonicae* by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 23, n. 9, p. 3227-3242, 2009.
- REITER, R. J. et al. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*, v. 18, n. 1, p. 1-11, 1995.
- REITER, R. J. et al. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 34, n. 2, p. 237-256, 2001.
- 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.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. *Invertebrate zoology*. 6^a ed. New York: Saunders College Publishing, 1994. p. 95-170.
- SAKAKIBARA, H. et al. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n.3, p. 571-581, 2003.
- SAMMARCO, P. W.; COLL, J. C. Chemical adaptations in the Octocorallia: evolutionary considerations. *Marine Ecology Progress Series*, v. 88, p. 93-104, 1992.

- SARKAR, K.; SIL, P. C. A 43 kDa protein from the herb *Cajanus indicus* L. protects thioacetamide induced cytotoxicity in hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, v. 20, n. 5, p. 634-640, 2006.
- SHAHBUDIN, S. et al. Antioxidant properties of soft coral *Dendronephthya* sp. *International Journal of Pharmacology*, v. 7, n. 2, p. 263-267, 2011.
- SHEN, S. et al. Pavidolides A–E, new cembranoids from the soft coral *Sinularia pavida*. *Tetrahedron Letters*, v. 53, n. 43, p. 5759-5762, 2012.
- SINGH, H. B.; ZIMMERMAN, P. Atmospheric distributions and sources of non-methane hydrocarbons. *Advances in Environmental Science and Technology*, v. 24, n. 1, p. 177-235, 1990.
- SINGH, H. P. et al. α -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. *Annals of Botany*, v. 98, n. 6, p. 1261-1269, 2006.
- SIPKEMA, D. et al. Marine sponges as pharmacy. *Marine Biotechnology*, v. 7, n. 3, p. 142-162, 2005.
- SOARES, P. K.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Principal component and Tucker3 analyses of high performance liquid chromatography with diode-array detection fingerprints of crude extracts of *Erythrina speciosa* Andrews leaves. *Analytica Chimica Acta*, v. 736, p. 36-44, 2012.
- 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. 2008.
- STANKEVICINS, L. et al. Genotoxic and antigenotoxic evaluation of extracts from *Arenosclera brasiliensis*, a brazilian marine sponge. *Toxicology In Vitro*, v. 22, n. 8, p. 1869-1877, 2008.
- TONA, L. et al. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 61, n. 1, p. 57-65, 1998.
- TURK, T.; KEM, W. R. The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon*, v. 54, n. 8, p. 1031-1037, 2009.
- VANHAECKE, P. et al. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 5, n. 3, p. 382-387, 1981.
- 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.
- WANG, S. K.; DAI, C. F.; DUH, C. Y. Cytotoxic pregnane steroids from the formosan soft coral *Stereonephthya crystalliana*. *Journal of Natural Products*, v. 69, n. 1, p. 103-106, 2006.

WILSANAND, V.; WAGH, A. B.; BAPUJI, M. Antifouling activities of octocorals on some marine microfoulers. *Microbios*, v. 104, n. 409, p. 131-140, 2001.

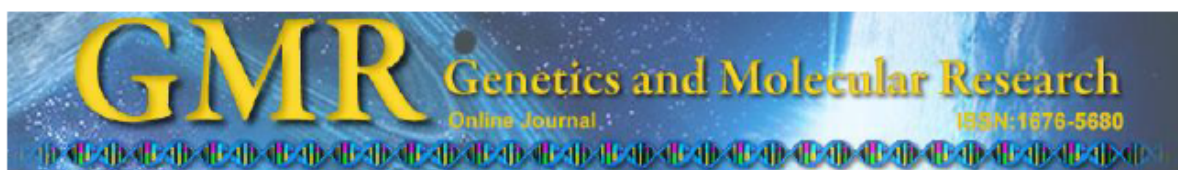
WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. *Environmental Health Risk Assessment: Guidelines for assessing human health risks from environmental hazards: Chapter 3 – Hazard identification and dose–response assessment*. Canberra, 2012. 18p.

WU, H. C.; CHEN, H. M.; SHIAU, C. Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, v. 36, n. 9-10, p. 949-957, 2003.

XU, J. et al. Cytotoxic sesquiterpenes and lignans from *Saussurea deltoidea*. *Fitoterapia*, v. 83, n. 6, p. 1125-1130, 2012.

ZEIGER, E.; CHHABRA, R. S.; MARGOLIN, B. H. Effects of the hepatic S9 fraction from aroclor-1254-treated rats on the mutagenicity of benzo[alpha]pyrene and 2-aminoanthracene in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutation Research*, v. 64, n. 6, p. 379-389, 1979.

APÊNDICE – Mutagenicity, genotoxicity, and scavenging activities of extracts from the soft coral *Chromonephthea braziliensis*: a possibility of new bioactive compounds.



Ribeirão Preto, 04 de Dezembro de 2012.

Prezados Autores,

Informamos que o artigo "Mutagenicity, genotoxicity, and scavenging activities of extracts from the soft coral *Chromonephthea braziliensis*: a possibility of new bioactive compounds", GMR 2495, de autoria de: R.M. Carpes, B.G. Fleury, B.G. Lages, A.C. Pinto, C.A.F. Aiub and I. Felzenszwalb, foi aceito para publicação na *Genetics and Molecular Research (GMR)*.

Aproveitamos a oportunidade para informar que a GMR está indexada em 74 bases de dados, entre elas: Index Medicus, PubMed, Medline e ISI. E tem fator de impacto 1,184, segundo JCR - junho 2012.

Atenciosamente,

Francine Muniz
Coordenadora editorial (Mtb 44.300)
Genetics and Molecular Research
www.funpecrp.com.br/gmr
Tel. (16) 3620-1251 - Fax. (16) 3621-1991

Running title: Toxicological studies of extracts of *C. braziliensis*

R.M. Carpes¹, B.G. Fleury², B.G. Lages², A.C. Pinto³, C.A.F. Aiub⁴ and I. Felzenszwalb¹

¹ Laboratório de Mutagênese Ambiental, Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

² Departamento de Ecologia, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

³ Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

⁴ Laboratório de Genotoxicidade, Departamento de Genética e Biologia Molecular, Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Corresponding author: Felzenszwalb I.

¹ Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Departamento de Biofísica e Biometria, 20551-030, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: uerj.felzen@gmail.com Tel./Fax: +55 21 23342058/28688430

ABSTRACT

Coral reefs are diverse ecosystems that have a high density of biodiversity leading to intense competition among species. These species may produce unknown substances, many with pharmacological value. *Chromonephthea braziliensis* is an invasive soft coral from the Indo-Pacific Ocean that is possibly transported by oil platforms and whose presence can be a threat to a region's biodiversity. This species produces secondary metabolites that are responsible for inducing damage to the local ecosystem. In the present work, extracts were prepared from dried colonies of *C. braziliensis* (solvents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol). We evaluated their mutagenicity using the *Salmonella* reverse mutation assay (TA97, TA98, TA100, and TA102 strains), their genotoxicity using the DNA breakage analysis and micronucleus assay, and scavenging activity using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical assay. Cytotoxicity and mutagenicity were not observed for any of the extracts. Genotoxicity was observed for the dichloromethane, ethyl acetate, and methanol extracts at high concentrations, but no DNA damage was observed in the micronucleus assay. Scavenging activity was not detected.

Key words: *Chromonephthea braziliensis*; Mutagenicity; Toxicity; Secondary metabolites

INTRODUCTION

The marine environment contains an as of yet untapped wealth of useful products for the treatment of infectious diseases (Donia and Hamann, 2003). It can be argued that pharmacological research involving marine organisms is intrinsically slower and has disadvantages compared to programs based on synthesis, but the number and quality of leads generated more than justify research in marine pharmacology (Faulkner, 2000).

A growing number of discoveries have been made of marine compounds with biological activity or properties of great interest. In the marine environment, sponges are responsible for the highest proportion of these findings (Sipkema et al., 2005; Stankevics et al., 2008). However, coral reefs are the most diverse ecosystems in the sea and have the highest density of biodiversity globally. High species diversity gives rise to intense competition amongst species, with the surviving organisms having the capability to construct exotic defensive and offensive chemicals, many with pharmacological value (Adey, 2000).

Soft corals are very common in the Indo-Pacific reefs and in certain areas of the Great Barrier Reef. Although common species of corals are potentially rich in proteins, carbohydrates, and lipids, they are subject to relatively low levels of predation since they produce large amounts of protective secondary metabolites (Coll, 1992; Sammarco and Coll, 1992). Studies of the chemical defenses of corals have been limited to species of the Anthozoa class, comprising the Gorgonacea and Alcyonacea orders (Octocorallia subclass) (Pawlik, 1993).

Terpenes and their derivatives (terpenoids) comprise the prevailing class of substances in Octocorallia, and therefore in Alcyonacea. Studies of these substances have identified functional properties of great interest. For example, compounds like limonene, perillyl alcohol, and carvone that can act in the prevention of degenerative diseases, among others that are being studied as chemotherapeutic agents (Maróstica, 2008). Research in other properties, such as natural insecticides and antimicrobials, are examples of the importance that these chemicals have received (Maróstica, 2008).

The soft coral *Chromonephthea braziliensis* (Alcyonacea, Nephtheidae; Ofwegen, 2005) was first recorded in Arraial do Cabo, southeastern Brazil (Ferreira, 2003). Studies have shown that the presence of *C. braziliensis* in Brazilian waters can be a real threat to the region's biodiversity, especially endemic species of corals, such as the gorgonian *Phyllogorgia dilatata* (Lages et al., 2006). This exotic coral produces secondary metabolites that confer it with beneficial action against native species, contributing to its defense against

fish predators and increasing its success in competition for space (Fleury et al., 2008; Lages et al., 2006; Oliveira and Medeiros, 2008).

This study aimed to carry out qualitative and quantitative cytotoxic, mutagenic, genotoxic, and scavenging evaluations of hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol extracts from *C. braziliensis*. The motivation of this analysis is the development of future drugs for general chemotherapy based on the structure of bioactive compounds.

MATERIAL and METHODS

Collection and extraction

The *C. braziliensis* colonies were collected by scuba diving to 8 m depth in May 2004 in a marine reserve in the Arraial do Cabo region of Rio de Janeiro state (23° 44' S - 42° 02' W), southeastern Brazil. The samples generated a total mass of 286 g freeze-dried coral and were extracted in three consecutive times, then sonicated with each solvent sequentially. The results are shown in Table 1.

TABLE 1

Bacterial strains

The features of *S. Typhimurium* strains TA97, TA98, TA100, and TA102 (from our stock) are shown in Table 2.

TABLE 2

Bacterial reverse mutation test

The test tube contained a mixture of 100 µL of one of the four extracts of *C. braziliensis* concentrations (0.5, 5, 10 and 20 µg/plate), 500 µL sodium-phosphate buffer (27.6 g/L NaH₂PO₄.H₂O and 28.4 g/L Na₂HPO₄; 0.2 M, pH 7.4) and 100 µL bacterial suspension (2 x 10⁹ cells/mL). Then, 2 mL top agar (7 g/L agar; 5 g/L NaCl; 0.0105 g/L L-histidine; 0.0122 g/L biotin, pH 7.4, 45°C) was added to the test tube and the final mixture was poured onto a Petri dish with minimal agar (15 g/L agar, Vogel-Bonner E medium 10X [10 g/L MgSO₄.7H₂O; 100 g/L C₆H₈O₇.H₂O; 500 g/L K₂HPO₄; 175 g/L

Na(NH₄)HPO₄·4H₂O] containing 20 g/L glucose. This final mixture was incubated at 37°C for 72 h, and the *His*⁺ revertant colonies were counted.

The positive controls for assays in the absence of S9 mix were as follows: 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) (CAS: 56-57-5) at 1.0 µg/plate for TA97; 4-NQO at 0.5 µg/plate for TA 98; sodium azide (SA) (CAS: 26628-22-8) at 0.5 µg/plate for TA100; and mitomycin C (Mict C) (CAS: 50-07-7) at 0.5 µg/plate for TA102. All the chemicals used were from Sigma (USA).

The substance or sample was considered positive for mutagenicity when: (a) the number of revertant colonies in the test assay was at least twice the number of spontaneous revertants (mutagenicity induction, MI ≥ 2), calculated as the number of *His*⁺ induced in the sample divided by the number of spontaneous *His*⁺ in the negative control; (b) a significant response for the analysis of variance (ANOVA, P ≤ 0.05) and the Student *t*-test was found; and (c) a reproducible positive dose-response curve (P ≤ 0.01) was present. All experiments were done in triplicate (Maron and Ames, 1983).

Survival experiments

Quantitative evaluations were made to determine the cytotoxic effects of the concentrations of the four extracts of *C. braziliensis*. In the assay, 10 µL bacterial suspension treated as described for the Ames test was diluted with a saline solution (NaCl 9 g/L). Then, 100 µL mix solution was put on a Petri dish with solid LB medium. The total dilution was 10⁷ fold. These dishes were incubated at 37°C for 24 h. The colonies were counted and a percentage calculation was made relative to the negative control.

DNA breakage analysis

The plasmid pUC18 was extracted from *Escherichia coli* DH5α strain using a kit for plasmid DNA extraction (Miniprep Kit for plasmid) from Axygen Biosciences (USA). Electrophoresis was performed on 0.8% agarose gel in order to separate different structural conformations of pUC18: form I, supercoiled native conformation; form II, open circle resulting from single strand breaks; and form III, linear resulting from double-strand breaks. The electrophoresis assay was also used to verify if there was a delay in DNA migration. Aliquots (5 µL) of each extract at different concentrations (28.6, 50, 100, and 250 µg/mL) with the plasmid (0.4 µg) were incubated for 10 min at 37°C and submitted to electrophoretic

migration for 15 min (E-Gel[®] iBase[™] Power System) and visualized by ultraviolet transilluminator (E-Gel[®] Safe Imager[™] Real-time Transilluminator) both from Invitrogen (USA). The images were digitalized in a photo documentation system using ImageJ 1.36b software to perform the quantification of the bands. The quantitative analysis was done only once.

The assay included a positive control using stannous chloride (SnCl₂, CAS: 7772-99-8) at 100 and 200 µg/mL concentrations (Sigma) (Felzenszwalb et al., 1998; Gomes et al., 1996).

Micronuclei in macrophages

The RAW264.7 macrophage strain was used from a confluence culture. 950 µL Minimum Essential Medium Eagle (MEM; 1.8 mM Ca⁺⁺, pH 7.6; Gibco, USA) was supplemented with 1.76 g/L NaHCO₃, 0.88 g/L pyruvate, 21.6 mg/L aspartic acid, and 16.8 mg/L L-serine, with fetal bovine serum (FBS) (10%), both at 37°C. Next, 50 µL suspended cells (2 x 10⁵ cells/mL) was added to 24 wells of a microtiter plate containing a coverslip that had been pre-treated with nitric acid 0.1 M for 15 min. This suspension was maintained in MEM Eagle Ca⁺⁺ 1.8 mM, containing FBS (10%), streptomycin (100 mg/L), and penicillin (70 mg/L). The plates were placed in an incubator with an atmosphere of 5% CO₂ for 24 hours.

For cell treatment, 100 µL of the four concentrations (20, 200, 350, and 500 µg/mL) of the four extracts of *C. braziliensis* (n-Hex, DCM, EtOAc and MeOH) was added, equivalent to 10% of total volume, and the plates were incubated for 24 h. After the incubation period, the medium was removed and the cells were rinsed with 1 mL MEM. The medium supplemented with FBS (10%) was added (1 mL) and the cells were re-incubated for an additional 24 h in an incubator with an atmosphere of 5% of CO₂. The positive control was N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) at a concentration of 0.5 mM.

The MEM was replaced with cold fixative solution methanol-glacial acetic acid (3:1) for 15 min. The fixed cells were rinsed with McIlvaine buffer (MI buffer: 21.01 g/L citric acid and 35.60 g/L Na₂HPO₄, pH 7.5) for 2 min and dried at room temperature. The fixed cells were stained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.2 µg/mL) dissolved in MI buffer for 40 min. Cells were washed with MI buffer for 2 min followed by distilled water and dried again at room temperature. To determine the mitotic index, the number of cells with micronuclei and the percentages of necrosis and apoptosis (1000 cells per concentration,

triplicate) were analyzed in a fluorescence microscope (Reichert Univar) with an excitation wavelength of 350 nm (Eckl et al., 1987).

Protein quantification

We evaluated the protein composition using Qubit™ Protein Assay Kit (Q33211) as recommended by Invitrogen. Three different considerations can be made regarding the protein concentration: (i) the increased protein concentration was related to the decreased bioavailability of secondary metabolites in the form of free secondary metabolites; (ii) the decrease in the protein concentration could be due to sequential extraction; and (iii) the proteins present in the extracts could act as scavengers.

DPPH free radical scavenging activity assay

An aliquot of 1.0 mL 0.25 mM DPPH solution in ethanol and 1.0 mL of one of the four concentrations (0.001; 0.01; 0.1; 1.0 mg/mL) for each extract were mixed. The mixture was vigorously shaken and allowed to reach a steady state at room temperature for 30 min. Decolorization of DPPH was determined by measuring spectrophotometric absorbance at 517 nm. The capability to scavenge DPPH radicals was calculated by the following equation: scavenging rate = $[1 - (\text{absorbance of the sample at 517 nm} / \text{absorbance of the control at 517 nm})] \times 100\%$. The same procedure was done using Proteinase K in order to isolate substances from proteins present in the extracts. The samples were incubated with Proteinase K (250 µg/mL) for 60 min at 50°C. 1.0 mL DPPH (0.25 mM) was added to the final mix and the decolorization of DPPH was measured at 517 nm after 30 min at room temperature (Amarowicz, 2000).

Statistical analysis

For the *S. Typhimurium* reverse mutation assay, mutagenicity was identified when the mutagenic index (M.I.) was at least twice the spontaneous rate (in the negative control). Survival rates of 70% less than the negative control indicated cytotoxicity. Significant statistical differences between negative and tested concentrations under the same experimental conditions were verified using the Student *t*-test ($P < 0.05$) (Stankevicius et al., 2008).

The data for micronuclei were analyzed using a one-way ANOVA and the Tukey-Kramer multiple comparison test using GraphPad InStat® software, version 3.01 (GraphPad Software, Inc., USA). Results were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS and DISCUSSION

Quantitative survival and bacterial reverse mutation assays

We used the four bacterial strains in the mutagenic and cytotoxic assays due to their high sensitivity to various compounds. TA97 presents a mutation which, when altered by base pair deletion (frameshift), generates resistance to mutagens. This mutation allows growth on minimal medium. TA98 has a spontaneous mutation that decreases its level of nitroreductase activity. TA100 detects agents that induce methylation and cause the replacement of base pairs. The replacement of A:T by G:C triggers the start of the biosynthesis of histidine, restoring the wild phenotype. TA98 and TA100 are used to study the metabolism and mutagenicity of carcinogens, even though they are nitroreductase deficient. TA102 has an auxotrophic nature; it contains an A:T base pair at the critical site for reversion (the other strains have G:C base pairs). It detects a variety of oxidative mutagens and crosslink agents that preferentially attack A:T base pairs (Levin et al., 1982; Maron and Ames, 1983). However, no positive response was observed for mutagenic and cytotoxic assays.

Tables 3 and 4 present the analysis of the mutagenic and/or cytotoxic response for hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol extracts of *C. braziliensis*.

The hexane extract did not show a mutagenic response, but a toxicity signal was observed for TA102 at the highest concentration by a decrease in the percentage of survival. In the dichloromethane extract, the mutagenic and cytotoxic effects were negative, but the survival rate decreased in a dose-dependent fashion when the extract was in contact with the TA97 strain.

TABLE 3

Ethyl acetate extract did not induce cytotoxic or mutagenic effects, although the survival rate did decrease when the extract was in contact with the TA97 and TA100 strains. The methanol extract followed the patterns of the dichloromethane and ethyl acetate extracts, without mutagenic or cytotoxic effects.

TABLE 4

DNA breakage analysis

The results shown in Figure 1 are for the highest concentrations of the extracts of *C. braziliensis* (250 µg/mL). No positive response was observed for the other concentrations (28.6, 50, and 100 µg/mL; data not shown). These concentrations were used to compare with the mutagenic and cytotoxic assays at the highest concentration (20 µg/plate) and the genotoxic assay with eukaryotic cells (WHO, 2002).

FIGURE 1

Melatonin has a potent free radical scavenger and antioxidant effect (Reiter et al., 1995). It can detoxify highly toxic hydroxyl radicals and peroxy radicals *in vitro* (Reiter et al., 2001). In this way, melatonin exerts a protective effect under certain pathological conditions such as damage caused by drug toxicity in which a common feature is the existence of mitochondrial damage (Karbownik and Reiter, 2000; Reiter et al., 1995). 1 mM melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) was dissolved in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) with 10% methanol (Onuki et al., 2005). The reaction mixtures were incubated at 37°C for 2 h. Melatonin was able to detoxify reactive oxygen species generated by dichloromethane, ethyl acetate, and methanol extracts avoiding the formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dGuo) (Burkhardt et al., 2001) (Figure 2).

Cytotoxic effects of terpenes and terpenoids on different organelles, such as mitochondria, was already known. They generate chain reactions from the cell wall or the outer cell membrane and invade the whole cell, which affects activities such as membrane potential, ionic channels, and regulation of pH gradients, ultimately leading to cell death by apoptosis and necrosis (Bakkali et al., 2008).

FIGURE 2

Micronuclei in macrophages

Table 5 shows the results obtained using the four extracts of *C. braziliensis* at final concentrations of 20, 200, 350, and 500 µg/mL. Although there is a dose-dependent increase there is no evidence of cytotoxicity being induced, as no significant differences were found between each group and its control.

TABLE 5

Protein concentration and DPPH activity

The protein concentration measured in each extract was: 309 µg/mL for n-Hex; 492.5 µg/mL for DCM; 373 µg/mL for EtOAc; and only 69.1 µg/mL for MeOH. The decrease in the protein concentration observed in the extracts could be due to the sequential extraction.

The incubation of the extracts at different concentrations could suggest the ability of proteins to act as scavengers or form complexes with secondary metabolites, which would lead to decreases in antioxidant activity of the extracts. No significant differences ($P > 0.05$) were detected in the presence or absence of proteinase K (250 µg/mL), suggesting that the proteins present in the extracts did not interfere with the antioxidant ability of the secondary metabolites (Figure 3).

FIGURE 3

In the Nephtheidae family, some species can be distinguished by their terpene distribution. *Nephthea* spp produce sesquiterpenes and/or diterpenes (70% of cembranoid skeletons), *Litophyton* spp produce up to 100% cembranoid diterpenes, and *Lemmalia*, *Paralemmalia*, and *Capnella* spp produce 100% sesquiterpenes (Coll, 1992). These secondary metabolites play various ecological roles for octocorals, namely in antipredation activity, and in the production of allelopathic agents, antifouling agents, and sex pheromones (Lages, 2003).

Terpene activity in *Sinularia* spp (Alcyonacea), soft corals, has been described as having antipredation activity when in its colonial form, and dependent on inorganic compounds. Allelopathy is also a feature of the secondary metabolites and has been studied in parallel with antipredation activity. Soft corals have proved to be aggressive competitors in the race for space, leading to neighboring scleractinian coral mortality (Lages, 2003).

Terpenes can react with atmospheric ozone inducing hydrogen peroxide, a highly reactive oxygen species (Becker et al., 1990). In the same way, α -pinene, a monoterpene, can cause oxidative damage (Singh et al., 2006). Assays for the antimutagenic and mutagenic activity of linalool, linalyl acetate, and β -caryophyllene—all terpenes—showed positive responses to mutagenicity for linalyl acetate and antimutagenic activity for linalool and β -caryophyllene (Di Sotto et al., 2008).

Different end points were evaluated in the present study. The negative mutagenicity and cytotoxicity responses were evaluated by *Salmonella* reverse assays, while genotoxicity was evaluated by MN and DNA breakage. For the first assay, cells were incubated with the extracts. In the second one, there was direct interaction with the electrophilic compounds (plasmid DNA).

We only observed induced DNA breakage for dichloromethane, ethyl acetate, and methanol extracts. As these solvents have different polarities, the products extracted by them should in general be different. Quantitatively, methanol extract presented greater DNA breakage than the others. This means that more polar substances in the extract present this potential. Recently, new composition of the monohydroxylated sterol fraction has been described: (22(E)-cholesta-5,22-dien-3 β -ol; cholesta-5-en-3 β -ol; 22(E), 24 (S)-Ergosta-5,22-3 β -ol; 22(E)-24(S)-24-methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol; 24(R)-24-methylcholesta-5,24-dien-3 β -ol; 24(Z)-24-ethylcholesta-5-24(28)-dien-3 β -ol; 28(E)-ethylcholesta-5,22-dien-3 β -ol; 24-ethylcholesterol(24 ξ)-ethylcholesta-5-3 β -ol; 24(E)-propylcholesta-5,24-dien-3 β -ol or 24(E)-isopropylcholesta-5,24-dien-3 β -ol). A new hemiketal steroid, 23-keto-cladiellin-A, has also been isolated from the unpalatable hexane extract of *C. braziliensis* (Fleury et al., 2008). We now believe that the above mentioned products are not involved in DNA breakage.

Although macrophage micronucleus formation was not observed, the presence of DNA damage in free cell extracts (plasmid incubation) with the dichloromethane, ethyl acetate, and methanolic extracts suggests that simple DNA breaks were induced. We suggest that among the secondary metabolites produced by the coral *C. braziliensis*, there is some substance, possibly a terpene or terpenoid, capable of generating oxidative stress that may be linked to some of its ecological interactions, enabling its continuation elsewhere.

Conclusions

The hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol extracts of *C. braziliensis* showed no cytotoxicity or mutagenicity, but genotoxicity was found for the dichloromethane, ethyl acetate, and methanol extracts. However, factors like the process of fractioning or test

conditions to which these samples were subjected could have prevented their activation. Therefore, a methodology which includes these questions is needed for a more complete toxicological evaluation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, “Ciências do Mar” 1137/2010) and Sub-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (SR2-UERJ).

References

- Adey WH (2000). Coral reef ecosystems and human health: biodiversity counts! *Ecosystem Health*. 6: 227-236.
- Awarowicz R, Naczek M, Shahidi F (2000). Antioxidant activity of various fractions of non-tanin phenolics of canola hulls. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2755-2759.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46: 446-475.
- Becker KH, Brockmann KJ, Bechara J (1990). Production of hydrogen peroxide in forest air by reaction of ozone with terpenes. *Nature*. 346: 256-258.
- Burkhardt S, Reiter JR, Tan DX, Hardeland R, et al. (2001). DNA oxidatively damaged by chromium(III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N(1)-acetyl-N(2)-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. *Int J Biochem Cell Biol.* 33: 775-783.
- Coll JC (1992). The chemistry and chemical ecology of octocorals (Coelenterata, Anthozoa, Octocorallia). *Chem. Rev.* 92: 613-631.
- Di Sotto A, Evandri MG, Mazzanti G (2008). Antimutagenic and mutagenic activities of some terpenes in the bacterial reverse mutation assay. *Mutat. Res.* 653: 130-133.
- Donia M and Hamann MT (2003). Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infect. Dis.* 3: 338-348.
- Eckl PM, Whitcomb WR, Michalopoulos G, Jirtle RL (1987). Effects of EGF and calcium on adult parenchymal hepatocyte proliferation. *J. Cell. Physiol.* 132: 363-366.
- Faulkner DJ (2000). Marine pharmacology. *Antonie van Leeuwenhoek.* 77: 135-145.

- Felzenszwalb I, Pelielo de Mattos JC, Bernardo-Filho M, Caldeira-de-Araújo A (1998). Shark cartilage-containing preparation: protection against reactive oxygen species. *Food Chem. Toxicol.* 36: 1079-1084.
- Ferreira CEL (2003). Non-indigenous corals at marginal sites. *Coral Reefs.* 22: 498.
- Fleury BG, Lages BG, Barbosa JP, Kaiser CR, et al. (2008). New hemiketal steroid from the introduced soft coral *Chromonephthea braziliensis* is a chemical defense against predatory fishes. *J. Chem. Ecol.* 34: 987-993.
- Gomes EM, Souto PRF, Felzenszwalb I (1996). Shark-cartilage containing preparation protects cells against hydrogen peroxide induced damage and mutagenesis. *Mutat. Res.* 367: 203-208.
- Karbownik M, Reiter RJ (2000). Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 225: 9-22.
- Lages BG (2003). Avaliação do potencial invasor do coral alcionáceo *Stereonephthya aff. curvata* (Nephtheidae - Alcyonacea) na Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo (RJ). Master's thesis, UFF, Rio de Janeiro.
- Lages BG, Fleury BG, Ferreira CEL, Pereira RC (2006). Chemical defense of an exotic coral as invasion strategy. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 328: 127-135.
- Levin DE, Hollstein M, Christman MF, Schwiers EA, et al. (1982). A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A:T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 7445-7449.
- Maron DM and Ames BN (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215.
- Maróstica Júnior MR (2008). Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma e funcionais. Doctoral thesis, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas.
- Oliveira AES and Medeiros MS (2008). What we must do – An exotic invasive species in paradise. *Biotemas.* 21: 149-151.
- Onuki J, Almeida EA, Medeiros MHG, Di Mascio P (2005). Inhibition of 5-aminolevulinic acid-induced DNA damage by melatonin, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, quercetin or resveratrol. *J. Pineal Res.* 38: 107-115.
- Pawlik JR (1993). Marine invertebrate chemical defenses. *Chem. Rev.* 93: 1911-1922.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W (2001). Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell Biochem. Biophys.* 34: 237-256.

- Reiter RJ, Melchiori D, Sewerynek E, Poeggeler B, et al. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.* 18: 1-11.
- Sammarco PW and Coll JC (1992). Chemical adaptations in the Octocorallia: evolutionary considerations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 88: 93-104.
- Singh HP, Batish DR, Kaur S, Arora K, et al. (2006). α -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. *Ann. Bot.* 98: 1261-1269.
- Sipkema D, Franssen M, Osinga O, Tramper J, et al. (2005). Marine sponges as pharmacy. *Mar. Biotechnol.* 7: 142-162.
- Stankevics L, Aiub CAF, De Santa Maria LC, Lobo-Hajdu G, et al. (2008). Genotoxic and antigenotoxic evaluation of extracts from *Arenosclera brasiliensis*, a Brazilian marine sponge. *Toxicol. In Vitro.* 22: 1869-1877.
- WHO (2002). Hazard Assessment – Part 3: Dose-Response Assessment. In Guidelines for assessing human health risks from environmental hazards. Environmental Health Risk Assessment. World Health Organization

Table 1: Yield from the extracts.

<i>Chromonephtea braziliensis</i>
Freeze dried coral = 286 g
Hexane extract (n-Hex) = 9.20 g
Dichloromethane extract (DCM) = 3.00 g
Ethyl acetate extract (EtOAc) = 0.387 g
Methanol extract (MeOH) = 2.93 g

Table 2: Genotypic and phenotypic characteristics of standard strains derived from *S. Typhimurium* LT2:

Strain	<i>His</i> Mutation	Plasmids	Other Mutations	Type of mutation detected
TA97	<i>hisD6610; hisO1242</i>	pKM101	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB chl bio</i>)	<i>Frameshift</i> G:C pair addition
TA98	<i>hisD3052</i>	pKM101	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB chl bio</i>)	<i>Frameshift</i> G:C pair deletion
TA100	<i>his G46</i>	pKM101	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB chl bio</i>)	<i>Substitution</i> G:C to A:T
TA102	pAQ1(<i>hisG428</i>)	pKM101,pAQ1	<i>rfa</i>	<i>Substitution</i> A:T to G:C

Table 3. Mutagenicity and cytotoxicity for hexane and dichloromethane extracts of *C. braziliensis*.

Strain	<i>C. braziliensis</i> µg/plate	Hexane Extract			Dichloromethane Extract		
		M.I. ^a	<i>His</i> ⁺ ± SD ^b	% Survival ^c	M.I. ^a	<i>His</i> ⁺ ± SD ^b	% Survival ^c
TA97	DMSO	1.0	132 ± 5	100	1.0	176 ± 49	100
	0.5	0.7	94 ± 9 *	100	0.9	162 ± 52	95
	5	0.8	100 ± 11 *	100	0.9	162 ± 34	90
	10	0.8	110 ± 16	100	1.0	170 ± 38	80
	20	1.0	131 ± 13	100	0.9	165 ± 12	80
	4-NQO 1.0 µg/plate	2.8	368 ± 27		5.3	934 ± 361	
TA98	DMSO	1.0	18 ± 3	100	1.0	28 ± 4	100
	0.5	1.4	26 ± 7	100	1.1	29 ± 8	100
	5	1.1	21 ± 2	100	1.0	28 ± 6	100
	10	0.7	12 ± 3	87	1.1	30 ± 2	100
	20	0.8	14 ± 7	100	1.0	28 ± 7	100
	4-NQO 0.5 µg/plate	10	183 ± 0		35.9	993 ± 272	
TA100	DMSO	1.0	146 ± 12	100	1.0	246 ± 16	100
	0.5	0.7	100 ± 8 *	89	1.0	248 ± 25	100
	5	0.9	131 ± 12	86	1.1	262 ± 21	100
	10	0.9	133 ± 20	96	1.1	263 ± 34	100
	20	0.7	96 ± 18 *	88	0.9	227 ± 18	100
	SA 0.5 µg/plate	5.1	751 ± 61		11	2673 ± 805	
TA102	DMSO	1.0	229 ± 43	100	1.0	346 ± 65	100
	0.5	0.7	170 ± 36	90	1.1	370 ± 95	100
	5	1.0	220 ± 19	90	1.1	390 ± 72	100
	10	0.9	216 ± 99	90	1.1	372 ± 90	100
	20	1.0	230 ± 162	84	0.8	277 ± 78	100
	MitC 0.5 µg/plate	4.3	989 ± 95		3.0	1036 ± 464	

^a Mutagenic index: no. of *His*⁺ induced in the sample/number of spontaneous *His*⁺ in the negative control (DMSO).

^b *His*⁺/plate: mean values of at least three replicate plates.

^c Percent survival relative to the negative control: Toxicity is considered when percent survival <70% related to the control group. Positive controls are described in the Experimental section. Significant statistical differences between negative control and tested concentrations under the same experimental conditions are identified by * (p < 0.05).

Table 4. Mutagenicity and cytotoxicity for ethyl acetate and methanol extracts of *C. braziliensis*.

Strain	<i>C. braziliensis</i> µg/plate	Ethyl Acetate Extract			Methanol Extract		
		M.I. ^a	<i>His</i> ⁺ ± SD ^b	% Survival ^c	M.I. ^a	<i>His</i> ⁺ ± SD ^b	% Survival ^c
TA97	DMSO	1.0	128 ± 25	100	1.0	112 ± 30	100
	0.5	1.4	174 ± 33	95	1.1	128 ± 8	100
	5	1.3	164 ± 31	95	0.8	91 ± 5	100
	10	1.2	151 ± 20	90	0.9	99 ± 6	100
	20	1.0	135 ± 10	80	1.1	126 ± 40	100
	4-NQO 1.0 µg/plate	6.6	853 ± 188		8.7	974 ± 108	
TA98	DMSO	1.0	37 ± 2	100	1.0	24 ± 1	100
	0.5	1.1	39 ± 7	100	1.0	23 ± 5	100
	5	0.8	30 ± 4	100	1.1	26 ± 4	100
	10	0.9	31 ± 9	100	0.7	17 ± 3	100
	20	1.1	39 ± 12	100	0.9	20 ± 2	100
	4-NQO 0.5 µg/plate	9.9	362 ± 42		20	479 ± 97	
TA100	DMSO	1.0	201 ± 35	100	1.0	195 ± 7	100
	0.5	1.0	208 ± 4	100	0.8	160 ± 3 *	100
	5	0.9	184 ± 22	95	0.9	182 ± 12	100
	10	0.9	184 ± 27	90	1.0	193 ± 5	100
	20	1.1	218 ± 25	90	1.0	186 ± 18	95
	SA 0.5 µg/plate	15	2929 ± 478		14	2680 ± 103	
TA102	DMSO	1.0	329 ± 27	100	1.0	334 ± 9	100
	0.5	1.1	361 ± 19	100	1.0	350 ± 29	100
	5	0.7	229 ± 93	100	0.9	310 ± 34	100
	10	0.8	265 ± 6	100	0.9	293 ± 48	100
	20	0.9	295 ± 6	100	0.9	297 ± 25	100
	MitC 0.5 µg/plate	5.2	1703 ± 120		3.2	1067 ± 219	

^a Mutagenic index: no. of *His*⁺ induced in the sample/number of spontaneous *His*⁺ in the negative control (DMSO).

^b *His*⁺/plate: mean values of at least three replicate plates.

^c Percent survival relative to the negative control: Toxicity is considered when percent survival <70% related to the control group. Positive controls are described in the Experimental section. Significant statistical differences between negative control and tested concentrations under the same experimental conditions are identified by * (p < 0.05).

Table 5. Micronucleus induction in macrophage assay using the four extracts of *C. braziliensis*.

Extract	<i>C. braziliensis</i> ($\mu\text{g/mL}$)	% Mi.I. ^a \pm SD	% Apoptosis	% Necrosis	% Micronucleus \pm SD
n-Hex	DMSO	3.7 \pm 0.7	0.2	0.1	1.4 \pm 0.3
	20	2.8 \pm 0.4	0.1	0.1	2.1 \pm 0.3
	200	3.1 \pm 0.7	0.2	0.0	1.5 \pm 0.1
	350	2.2 \pm 1.3	0.1	0.1	2.3 \pm 0.3
	500	2.4 \pm 0.8	0.1	0.1	2.0 \pm 1.0
DCM	20	1.7 \pm 0.7	0.3	0.1	2.1 \pm 0.4
	200	2.2 \pm 0.1	0.3	0.1	1.8 \pm 0.1
	350	4.8 \pm 1.3	0.0	0.1	2.4 \pm 0.8
	500	2.3 \pm 0.3	0.2	0.1	2.3 \pm 0.7
EtOAc	20	3.9 \pm 0.3	0.1	0.0	2.5 \pm 1.0
	200	3.3 \pm 1.1	0.1	0.0	1.3 \pm 0.1
	350	4.7 \pm 0.4	0.3	0.1	1.7 \pm 0.8
	500	3.5 \pm 0.1	0.2	0.1	1.8 \pm 1.0
MeOH	20	2.4 \pm 0.8	0.2	0.2	1.9 \pm 0.8
	200	2.6 \pm 0.4	0.1	0.1	1.3 \pm 0.3
	350	3.9 \pm 0.6	0.3	0.1	1.6 \pm 0.1
	500	3.1 \pm 0.1	0.2	0.1	1.8 \pm 0.3
	Positive Control	2.5 \pm 0.6	0.4	0.2	2.9 \pm 0.1

^a Mitotic index per thousand.

Positive control: MNNG 0.5 μM

Figure

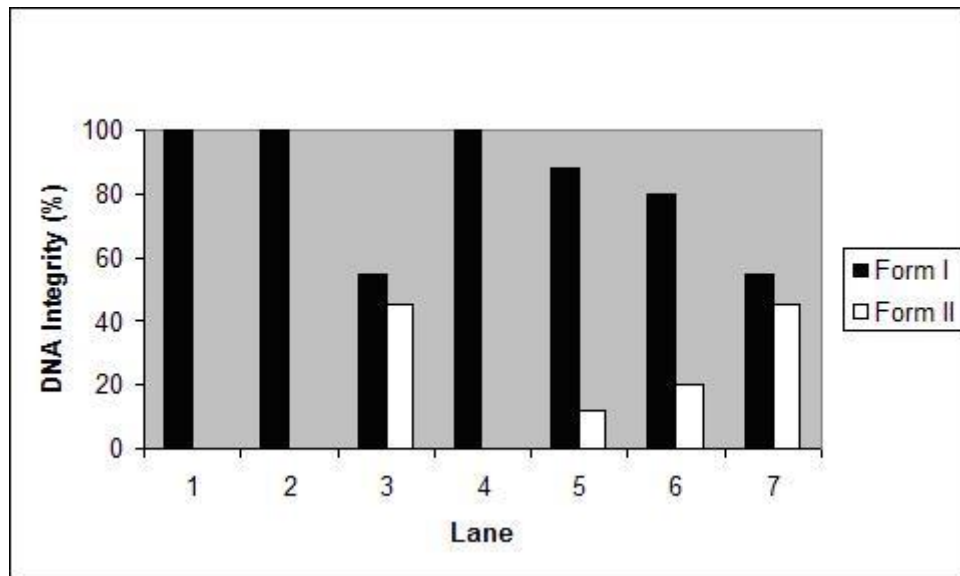


Figure 1. DNA breakage analysis using agarose gel 0.8% incubating 0.4 µg pUC18 plasmid with each of the four extracts of *C. braziliensis*. Lane: (1) – H₂O; (2) – DMSO; (3) – 200 µg/mL SnCl₂; (4) – 250 µg/mL hexanic extract; (5) – 250 µg/mL dichloromethane extract; (6) – 250 µg/mL ethyl acetate extract; (7) – 250 µg/mL methanol extract. Form I, supercoiled native conformation; form II, open circle resulting from single strand breaks; and form III, linear resulting from double-strand breaks.

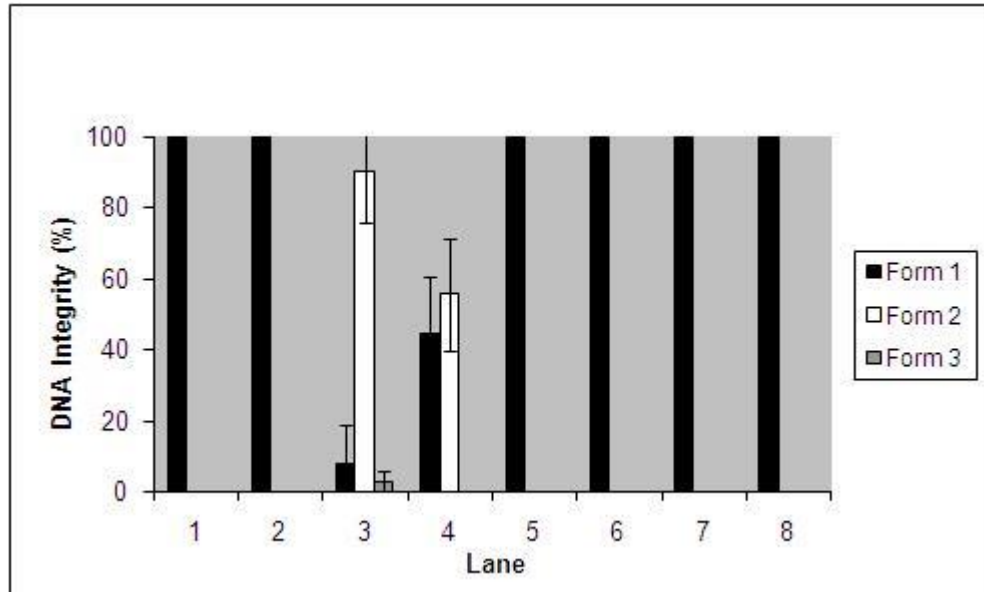


Figure 2. DNA breakage analysis using agarose gel 0.8% incubating 0.4 μg pUC18 plasmid with each of the four extracts of *C. braziliensis* with melatonin (500 μM). Lane: (1) – DMSO; (2) – DMSO with melatonin; (3) – 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SnCl_2 ; (4) – 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SnCl_2 with melatonin; (5) – 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hexanic extract; (6) – 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dichloromethane extract; (7) – 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethyl acetate extract; (8) – 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ methanol extract. Significant statistical differences between negative control and tested concentrations under the same experimental conditions are identified by * ($p < 0.05$). Form I, supercoiled native conformation; form II, open circle resulting from single strand breaks; and form III, linear resulting from double-strand breaks.

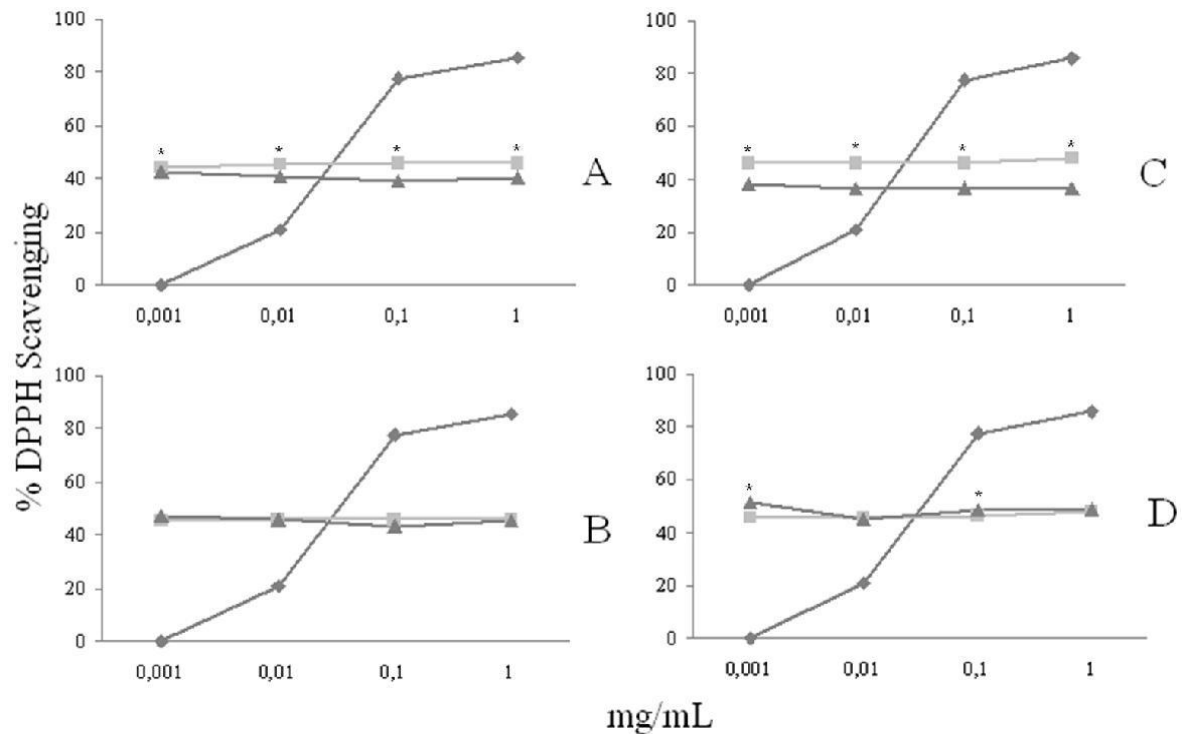


Figure 3. % of DPPH (◆) scavenging in the absence (■) or in the presence (▲) of proteinase K (250 µg/mL) at different concentrations (0.001, 0.01, 0.1 and 1 mg/mL) (A) hexane extract; (B) dichloromethane extract; (C) ethyl acetate extract and (D) methanol extract. Significant statistical differences between absence and presence of proteinase K under the same concentrations are identified by * ($p < 0.05$).