



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

Vanessa Gomes Santos


**Estudo da atividade anti-inflamatória e toxicológica
em extratos de corais do gênero *Tubastraea***

Rio de Janeiro

2013

Vanessa Gomes Santos

**Estudo da atividade anti-inflamatória e toxicológica em extratos de corais do
gênero *Tubastraea***



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

G633 Gomes, Vanessa Santos.
Estudo da atividade anti-inflamatória e toxicológica em extratos de corais do gênero *Tubastraea* / Vanessa Santos Gomes. – 2013
76 f.

Orientador: Israel Felzenszwalb.
Coorientador: Claudia Alessandra Fortes Aiub.

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

1. Corais - Teses. 2. Antozoários - Química. 3. Produtos naturais - Teses. 4. Agentes anti-inflamatórios - Síntese química. 5. Invertebrado marinho - Teses. 6. Salmonella - 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 593.6:615.2

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

Assinatura

Data

Vanessa Gomes Santos

Estudo da atividade anti-inflamatória e toxicológica em extratos de corais do gênero *Tubastraea*

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 25 de fevereiro 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. Marsen Garcia Pinto Coelho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

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

Prof.^a Dra. Lenize Fernandes Maia
Universidade Federal de Juiz de Fora

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pelo incentivo e amor;

Ao meu marido pela companhia na aventura da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força;

Aos meus pais pela dedicação, apoio e palavras de incentivo em todos os momentos da minha vida, mesmo não tendo a mínima ideia do que estou fazendo;

Ao meu marido, sem você ao meu lado a caminhada seria mais difícil;

Aos meus irmãos e sobrinhos pelos momentos de tranquilidade e companheirismo;

Às minhas irmãs de coração Larissa, Rosane e Rychelle, uma a uma estamos realizando os nossos sonhos;

Ao prof. Israel por ter me acolhido e por todos os ensinamentos passados nesses dois anos;

À prof. Cláudia Aiub pelo tempo e dedicação na construção desse trabalho;

À prof. Beatriz Fleury por ceder o material e estar sempre disponível;

A todos os colaboradores, sem vocês esse trabalho não seria possível;

À Ana Rosa, minha orientadora para toda a vida, exemplo de pesquisadora e mãe;

Aos amigos do LABMUT, Claudinha, Andréia F., Andrea K., Felipe, Raphael, Chico e Carlos, sem vocês os meus dias seriam sem graça;

A todos os alunos de Iniciação Científica que passaram pelo laboratório nesses anos, que dedicaram seu tempo e atenção;

À Mariana pelo apoio nos ensaios *in vivo*;

E a todos aqueles que de alguma forma somaram para tornar o meu dia mais agradável, seja com um bom dia ou com um sorriso.

Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.

Gosto de ser gente porque, inacabado, sei que sou um ser condicionado, mas consciente do inacabamento, sei que posso ir mais além dele.

Paulo Freire

RESUMO

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

O ambiente marinho é um dos ecossistemas mais diversos e complexos em termos de biodiversidade. As condições químicas, físicas e biológicas desse ambiente favorecem a produção de uma variedade de substâncias pela biota, transformando os produtos naturais marinhos em um dos recursos promissores na pesquisa por novos compostos bioativos. O gênero *Tubastraea* (Scleractinia, Dendrophylliidae) inclui corais ahermatípicos que produzem compostos secundários bioativos em situações de competição. No estado do Rio de Janeiro são encontradas duas espécies invasoras desse gênero, *Tubastraea coccinea* e *Tubastraea tagusensis*. A primeira é amplamente distribuída nas águas tropicais do Atlântico e do Pacífico, e a segunda é nativa do leste do pacífico, ambas invasoras no Atlântico Sul. Este trabalho objetiva avaliar as atividades anti-inflamatória, antioxidante e toxicológica de extratos metanólicos de *T. coccinea* e *T. tagusensis*. As colônias de *Tubastraea* foram coletadas na Baía de Ilha Grande, Rio de Janeiro - Brasil e extraídas com metanol. A caracterização química foi realizada através da espectroscopia ultravioleta, visível e de infravermelho. Ação anti-inflamatória foi avaliada pelo modelo *in vivo* de edema em pata de camundongo induzido por carragenina. Atividade sequestrante de radicais livres foi avaliada pelo método do DPPH. Na avaliação toxicológica utilizamos o ensaio *Salmonella*/microsoma, na presença e ausência de ativação metabólica exógena, o teste *in vitro* de micronúcleo com células de macrófagos de rato e o teste de mortalidade com o microcrustáceo *Artemia salina*. Foi possível a distinção dos grupos químicos presentes nos extratos, com os resultados encontrados sendo corroborados com os presentes na literatura. Os extratos de ambas as espécies apresentaram inibição significativa no edema da pata nas doses testadas, em relação ao veículo. Ambos os extratos demonstraram capacidade pela captura do radical DPPH. Atividades citotóxica e mutagênica na ausência de metabolização exógena não foram observadas para as linhagens TA97, TA98 e TA102 nas duas espécies; para a TA100 o extrato de *T. coccinea* induziu citotoxicidade na concentração de 50 µg/placa. Os dois extratos induziram citotoxicidade na presença de metabolização exógena para a cepa TA98, tendo sido detectada também indução de mutagenicidade nesta linhagem para *T. coccinea*. Os extratos não foram capazes de induzir a formação de micronúcleos e não foram tóxicos para o microcrustáceo *A. salina*. A resposta inibitória do edema após 2 h da indução indica que os compostos presentes nos extratos atuam na segunda fase da inflamação, possivelmente pela inibição da produção de prostaglandinas. Os resultados sugerem que os extratos das espécies *T. coccinea* e *T. tagusensis* apresentam substâncias com potencial uso farmacológico, como agente anti-inflamatório e antioxidante.

Palavras-chave: *Tubastraea*. Produto natural marinho. Ação anti-inflamatória. Ensaio *Salmonella*/microsoma.

ABSTRACT

The marine environment is one of the most diverse and complex ecosystems in terms of biodiversity. The conditions of chemical, physical and biological environment enables the production of a variety of substances by the biota, transforming the marine natural products resources on a promising research for new bioactive compounds. The genus *Tubastraea* (Scleractinia, Dendrophylliidae) includes ahermatypic corals that produce bioactive secondary compounds in competitive situations. In the state of Rio de Janeiro are found two invasive species of this genus, *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*. The first is widely distributed in the tropical waters of the Atlantic and Pacific, and the second is native to the eastern Pacific, both are invasive in the South Atlantic. This study is focused on the anti-inflammatory, antioxidant and toxicological evaluation of methanol extracts of *T. coccinea* and *T. tagusensis*. *Tubastraea* colonies were collected in the Ilha Grande Bay, Rio de Janeiro - Brazil and extracted with methanol. Chemical characterization was performed by spectroscopies ultraviolet, visible and infrared. Anti-inflammatory properties were assessed by *in vivo* carrageenan-induced mouse paw oedema. Radical scavenging was evaluated by DPPH method. In toxicological evaluation *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, in the presence and absence of exogenous metabolic activation, the *in vitro* mammalian cell micronucleus test and mortality test to brine shrimp *Artemia salina* were performed. Distinct chemical groups in extracts were found, with the results being corroborated with the literature. The extracts from both species showed significant inhibition of paw oedema at the doses tested, in relation to the vehicle. Both extracts showed DPPH radicals scavenger capacity. Cytotoxic and mutagenic activities in the absence of exogenous metabolism were not observed for TA97, TA98 and TA102 strains by both species. *T. coccinea* extract induced cytotoxicity in TA100 at 50 µg/placa. Both extracts induced cytotoxicity in the presence of exogenous metabolism for TA98 strain, and was also detected induction of mutagenicity by *T. coccinea* extract. The extracts were unable to induce micronucleus formation and were not toxic to the brine shrimp assay. The inhibitory response of carrageenan-induced mouse paw oedema after two hours indicates that the compounds present in the extracts act on the second stage of inflammation, possibly by inhibiting prostaglandin production. The results suggest that the extracts of the species *T. coccinea* and *T. tagusensis* contain pharmacological substances with potential use as anti-inflammatory and antioxidant.

Keywords: *Tubastraea*. Marine natural products. Anti-inflammatory action. *Salmonella*/microsome assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	A – <i>Tubastraea coccinea</i> e B – <i>Tubastraea tagusensis</i>	23
Figura 2 –	Formação do micronúcleo em uma célula hipotética por atraso na migração de cromossomos inteiros ou de fragmentos durante a divisão celular.....	29
Figura 3 –	Características celulares encontradas no ensaio de micronúcleo. A - micronúcleo; B- índice mitótico; C- apoptose celular, D- necrose.....	30
Figura 4 –	Espectro de absorção de UV/VIS.....	48
Figura 5 –	Espectro de absorção no infravermelho (FTIR) do extrato metanólico de <i>T. coccinea</i>	50
Figura 6 –	Espectro de absorção no infravermelho (FTIR) do extrato metanólico de <i>T. tagusensis</i>	50
Figura 7 –	Perfil cromatográfico dos extratos por CCD.....	51
Figura 8 –	Atividade antioxidante do extrato de <i>T. coccinea</i>	52
Figura 9 –	Atividade antioxidante do extrato de <i>T. tagusensis</i>	52
Figura 10 –	Efeito do tratamento com diferentes concentrações dos extratos de <i>T. coccinea</i> (a) e <i>T. tagusensis</i> (b) no modelo de edema de pata de camundongo induzido por carragenina.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1–	Alguns exemplos de produtos naturais marinhos e seu status clínico.....	21
Quadro 2–	Sequências e sítios de mutação nas linhagens padrão utilizadas no ensaio de reversão <i>Samonella</i> /microsoma.....	39
Quadro 3–	Genótipos das linhagens utilizadas no ensaio de reversão <i>Samonella</i> /microsoma.....	40
Quadro 4–	Controles positivos utilizados no ensaio <i>Salmonella</i> /microsoma na presença e ausência de ativação metabólica.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Rendimento dos extratos de <i>T. coccinea</i> e <i>T. tagusensis</i>	47
Tabela 2–	Porcentagem de inibição da forma radicalar do radical DPPH.....	53
Tabela 3–	Porcentagem de inibição do edema de pata de camundongos induzido por carragenina no pico de 2 horas.....	54
Tabela 4–	Número de colônias revertentes por placa e sobrevivência de cepas de <i>Salmonella entérica</i> sorovar Typhimurium na presença dos extratos de <i>T. coccinea</i> no ensaio de reversão <i>Samonella</i> /microsoma na ausência (-S9) e na presença (+S9) de ativação metabólica exógena com S9 mix.....	56
Tabela 5–	Número de colônias revertentes por placa e sobrevivência de cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> na presença dos extratos de <i>T. tagusensis</i> no ensaio de reversão <i>Samonella</i> /microsoma na ausência (-S9) e na presença (+S9) de ativação metabólica exógena com S9 mix.....	57
Tabela 6–	Teste <i>in vitro</i> de micronúcleo com macrófagos RAW 264.7 para os extratos metanólicos de <i>T. coccinea</i> e <i>T. tagusensis</i>	58
Tabela 7–	Porcentagem de sobrevivência dos náuplius de <i>Artemia salina</i> na presença dos extratos após 24 horas de incubação.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2AA	2- aminoantraceno
Abs _{517nm}	Absorvância em 517nm
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
4NQO	4-Nitroquinolina- <i>N</i> -óxido
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
Apop	Apoptose
AS	Azida sódica
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Hidroxitolueno butilado
COX	Ciclooxigenase
COX-2	Ciclooxigenase -2
CR	Colônias revertentes
CYP	Citocromo P450
DAPI	4'6-Dihidrocloro de 2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio-padrão
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazil
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FCS	Soro fetal bovino
<i>His</i> ⁺	Bactérias independentes do aminoácido histidina
<i>His</i> ⁻	Bactérias dependentes do aminoácido histidina
HTS	Triagem de alta produtividade
ICH	Conferência Internacional sobre Harmonização
IV	Infravermelho
IL-8	Interleucina-8

IM	Índice de mutagenicidade
IMI	Índice mitótico
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
LOX	Lipooxigenase
LC ₅₀	Concentração letal para 50% dos indivíduos
MNNG	1-Metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina;
MIT C	Mitomicina C
MN	Micronúcleo
Necr	Necrose
NO	Óxido nítrico
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PGI	Prostaglandinas
PN	Produto natural
PNM	Produto natural marinho
Sob	Sobrevivência
S9 mix	Metabolização exógena
TNF- α	Fator de necrose tumoral – α
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1	Produtos naturais	17
1.2	Biodiversidade marinha	19
1.3	Produtos naturais de origem marinha	19
1.4	Cnidários como fonte de fármacos	22
1.4.1	<u>Gênero <i>Tubastraea</i></u>	22
1.5	Fármacos anti-inflamatórios	24
1.5.1	<u>Fármacos anti-inflamatórios de origem marinha</u>	24
1.6	Modelo de edema de pata de camundongo induzido por carragenina	25
1.7	Antioxidantes	26
1.8	Ensaio toxicológicos	27
1.8.1	<u>Ensaio de reversão <i>Samonella</i>/microsoma</u>	27
1.8.1.1	Ativação metabólica.....	28
1.8.2	<u>Teste de micronúcleo <i>in vitro</i> com células de mamíferos (macrófago RAW 264.7)</u>	29
1.8.3	<u>Ensaio de toxicidade com o microcrustáceo <i>Artemia salina</i></u>	31
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo geral	32
2.2	Objetivos específicos	32
3	METODOLOGIA	33
3.1	Coleta do material	33
3.2	Preparação e caracterização dos extratos	33
3.2.1	<u>Preparação dos extratos</u>	33
3.2.2	<u>Espectro UV/VIS</u>	34
3.2.3	<u>Espectro Infravermelho</u>	34
3.2.4	<u>Cromatografia de camada delgada</u>	35
3.2.5	<u>Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH</u>	35
3.3	Avaliação da atividade anti-inflamatória	36
3.3.1	<u>Animais</u>	36
3.3.2	<u>Modelo de edema de pata de camundongo induzido por carragenina</u>	37

3.4	Ensaio toxicológicos	38
3.4.1	<u>Ensaio de reversão <i>Salmonella</i>/microsoma</u>	38
3.4.1.1	Linhagens bacterianas.....	38
3.4.1.2	Metabolização enxógena.....	40
3.4.1.3	Controle positivo e negativo.....	41
3.4.1.4	Ensaio de reversão <i>Salmonella</i> /microsoma.....	42
3.4.1.5	Ensaio de sobrevivência.....	42
3.4.2	<u>Teste <i>in vitro</i> de micronúcleo com células de mamíferos (macrófago RAW 264.7)</u>	43
3.4.3	<u>Ensaio de toxicidade com o microcrustáceo <i>Artemia salina</i></u>	44
3.4.3.1	Preparo da água de diluição.....	45
3.4.3.2	Eclosão dos cistos.....	45
3.4.3.3	Preparo das amostras.....	45
3.4.3.4	Avaliação da toxicidade.....	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Preparação e caracterização dos extratos	47
4.1.1	<u>Preparação dos extratos</u>	47
4.1.2	<u>Espectros de absorção UV/VIS</u>	47
4.1.3	<u>Espectro Infravermelho</u>	48
4.1.4	<u>Cromatografia em camada delgada (CCD)</u>	50
4.1.5	<u>Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH</u>	51
4.2	Avaliação da atividade anti-inflamatória	53
4.3	Ensaio toxicológicos	54
4.3.1	<u>Ensaio de reversão <i>Salmonella</i>/microsoma</u>	54
4.3.2	<u>Teste <i>in vitro</i> de micronúcleo com células de mamíferos (macrófago RAW 264.7)</u>	58
4.3.3	<u>Ensaio de toxicidade com o microcrustáceo <i>Artemia salina</i></u>	59
5	DISCUSSÃO	60
6	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais têm sido considerados cada vez mais importantes na pesquisa biomédica e no desenvolvimento de novas drogas. Estudos recentes têm demonstrado que invertebrados marinhos são fontes de inúmeros metabólitos secundários bioativos, devido à capacidade destes em produzir substâncias químicas utilizadas nos mecanismos de competição por espaço, defesa contra bactérias e predadores (BARTOLOTTA et al., 2009; BLUNT et al., 2011). Seus extratos ou substâncias isoladas podem apresentar ação citotóxica, mutagênica, anti-mutagênica, anti-inflamatória, antibactericida, antitumoral, ictiotóxica, anti-incrustante, entre outras (AIUB et al., 2006; STANKEVINCINS et al., 2008; QI et al., 2009; LAGES et al., 2012). A atividade dessas moléculas é potente, principalmente devido a sua função de proteção e a capacidade de diluição do ambiente marinho, refletindo na toxicidade e efeitos colaterais (COSTA-LOTUFO et al., 2009). Assim, as pesquisas capazes de identificar as propriedades bioquímicas das substâncias oriundas de invertebrados marinhos, que podem ser usadas no desenvolvimento de novas drogas, são fundamentais (FAULKNER, 2002).

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Produtos naturais

Substâncias químicas derivadas de recursos naturais são utilizadas no tratamento de doenças pelo homem desde a antiguidade. O primeiro composto farmacologicamente ativo isolado de um produto natural foi a morfina, em 1805, oriunda das sementes da papoula *Papaver somniferum* (LI; VEDERAS, 2009).

Os produtos naturais (PNs) incluem compostos orgânicos obtidos de plantas, microrganismos, invertebrados e vertebrados de origem marinha ou terrestre, que podem ser biossintetizados em diferentes rotas metabólicas, possuindo funções biológicas diversas para o organismo produtor (SAMMARCO; COLL, 1997).

Após a segunda guerra houve o aumento das pesquisas nessa área, principalmente na busca de novos antibióticos extraídos de microrganismos, incentivada pela descoberta da penicilina. Assim, a pesquisa dos produtos naturais como fonte de medicamentos, atingiu seu auge na medicina ocidental entre os anos 1970 e 1980, resultando em uma paisagem farmacêutica fortemente influenciada por moléculas não sintéticas (KOEHN; CARTER, 2005; NEWMAN; CRAGG; KINGSTON, 2008; LI; VEDERAS, 2009).

Após esse período houve um grande declínio nas pesquisas dos PNs causado tanto por razões comerciais quanto científicas. O desenvolvimento da química combinatorial aliada a introdução do *high-throughput-screening* ou triagem de alta produtividade (HTS) ofereceu uma perspectiva mais simples com a construção de bibliotecas de moléculas com grande variedade química, testadas em larga escala para alvos moleculares pré-definidos. Considerando que os extratos naturais consistem de misturas complexas, o fracionamento desse material pode gerar pequenas quantidades da substância bioativa diminuindo a possibilidade de detecção por HTS ou resultar em falsos negativos (GRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997; KOEHN; CARTER, 2005; LI; VEDERAS, 2009).

Os avanços na biologia molecular, celular e genômica também aumentaram o número de alvos moleculares e diminuíram os prazos exigidos pelo mercado para a descoberta de drogas. Estima-se que o tempo entre a descoberta do agente terapêutico potencial de origem natural e o seu lançamento no mercado é de aproximadamente uma década ou mais. Outro fato que levou a diminuição nas pesquisas na área dos PNs foi a probabilidade da substância

bioativa de interesse já ser um composto conhecido. Além dos pontos já citados, ainda existem incertezas na questão da coleta e exploração dos materiais biológicos, devido a entraves na legislação. São exemplos destes, o acesso e obtenção, as questões de propriedade intelectual, a influência das variações sazonais ou ambientais na composição química dos organismos vivos, além do risco iminente de extinção (GRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997; KOEHN; CARTER, 2005; LI; VEDERAS, 2009).

Apesar das dificuldades atreladas a descoberta de fármacos oriundos de recursos naturais, a diminuição do número de novos lançamentos no mercado gerou o ressurgimento no interesse por PNs como fonte de novas substâncias bioativas. Os avanços nas técnicas de separação, purificação e identificação de misturas complexas e a diversidade estrutural presente na natureza, são os fatores responsáveis pela renovação do interesse (KOEHN; CARTER, 2005).

O reconhecimento de que as bibliotecas de compostos puros foram desenhadas principalmente com base na acessibilidade química e por isso são limitadas, provocaram o interesse crescente na "síntese orientada pela diversidade" (do inglês "Diversity Oriented Synthesis", DOS) e em bibliotecas de "estruturas privilegiadas" (baseadas em drogas conhecidas ou estruturas de PNs) para produzir moléculas mais complexas e com uma melhor chance de atingir a bioatividade desejável (NEWMAN; GRAGG; SNADER, 2003a; NEWMAN; GRAGG, 2007; KOHEN; CARTER, 2005).

Além disso, as HTS aliadas às bibliotecas de compostos sintéticos trazem a falsa impressão de eficiência pela possibilidade de se avaliar muitos compostos em um curto período de tempo, mas segundo Li e Vederas (2009) utilizando pouco mais de 7000 estruturas conhecidas de PNs foi possível a produção de mais de 20 medicamentos comerciais com uma taxa de sucesso de 0,3%, o que é muito superior a taxa de sucesso de 0,001% para HTS de bibliotecas de compostos sintéticos.

Essa maior eficiência ocorre pelos PNs possuírem uma maior diversidade química quando comparada as moléculas produzidas pela química combinatorial, selecionadas por pressões evolutivas para interagir com uma grande variedade de proteínas e outros alvos biológicos específicos. Além disso, as moléculas naturais não servem apenas por elas mesmas, como também podem ser usadas como moléculas líder direcionando estudos com fins químicos ou genéticos (NEWMAN; GRAGG; SNADER, 2003b; BULL; STACH, 2007; HARVEY, 2008; BHATNAGAR; KIM, 2010).

1.2 Biodiversidade marinha

O ambiente marinho é o ecossistema mais rico e complexo em termos de biodiversidade no mundo, cobrindo aproximadamente 75% da superfície da Terra, e possui representantes de 34 dos 36 filos existentes (COSTA-LOTUFO et al., 2009; YASUHARA-BELL; LU, 2010).

As espécies marinhas (incluindo poríferas, cnidários, bryozoários, tunicados e algas) possuem a habilidade de sintetizar metabólitos. Estes são utilizadas em mecanismos de competição por espaço e de defesa contra bactérias e predadores, tornando-os mais competitivos em um ambiente caracterizado pela limitação dos recursos (DONIA; HAMANN, 2003; LAGES et al., 2006; BARTOLOTTA et al., 2009).

Os metabólitos produzidos pelos organismos marinhos podem ser divididos em dois grupos, primários e secundários. Os primários representam a base do metabolismo, sendo responsáveis pela sobrevivência e incluem carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos e esteroides. Os metabólitos secundários são específicos e responsáveis pela interação do organismo com o ambiente, possuindo função de defesa, comunicação, entre outras (SAMMARCO; COLL, 1997).

A produção dessas substâncias, principalmente os metabólitos secundários, transforma esses organismos em importantes recursos para a bioprospecção farmacológica e podem oferecer novos compostos com múltiplos usos (COSTA-LOTUFO et al., 2006).

1.3 Produtos naturais de origem marinha

Embora as plantas continuem a representar a principal fonte de novos compostos de origem natural, as pesquisas com cianobactérias e organismos marinhos têm aumentado nas últimas décadas, principalmente a partir de meados de 1960 (CARTÉ, 1993; PINTO et al., 2002; ROCHA et al., 2011).

As condições físicas e químicas desse ambiente, como amplitude termal (0-350°C), pressão (1-1.000 atm), nutrientes (oligotróficos a eutróficos) e extensas zonas fóticas e eufóticas, são fatores importantes para a produção de uma variedade de moléculas com

características estruturais únicas (KIJJOA; SAWANGWONG, 2004). A diferença entre os compostos de origem marinha e terrestre se deve, em grande parte, aos elementos químicos disponíveis no mar, principalmente os íons haletos Cl^- 19000 mg/L; Br^- 65 mg/L; I^-/IO_3^- 5×10^{-4} mg/L, o que permitiu aos organismos a incorporação desses elementos em suas estruturas orgânicas, com função especial na biossíntese de terpenos (FENICAL, 1982; HAY; FENICAL, 1996). Além disso, os metabólitos liberados na água são rapidamente diluídos e, portanto, precisam ser potentes para ter efeito (HAEFNER, 2003). Por estas razões, aliadas a grande biodiversidade no ambiente marinho, os produtos naturais marinhos (PNMs) são reconhecidos como material potencial para o desenvolvimento de fármacos (BEAUMONT et al., 2007).

Segundo Blunt e colaboradores (2011), estima-se que dos 153.000 PNs conhecidos, 22.000 são compostos originários de organismos marinhos, mas ainda existem muitos a serem descobertos. As atividades biológicas dos PNs é vasta, incluindo atividade anti-incrustante (BURGESS et al., 2003), antiviral (MARTINEZ; DEL OLMO; BENITO, 2008), citotóxica e mutagênica (AIUB et al., 2006), anti-mutagênica (STANKEVINCINS et al., 2008), antitumoral (SCHWARTSMANN et al., 2001), antibiótica (BHATNAGAR; KIM, 2012), anti-inflamatória (FESTA et al., 2012), entre outras.

Apesar da grande variedade de novos compostos e os múltiplos usos, a aplicação industrial dos PNs ainda é limitada por conta da complexidade no desenvolvimento desses produtos (ROCHA et al., 2011). Um dos obstáculos encontrados é a quantidade de biomassa necessária para o isolamento da substância bioativa, pois em muitos casos os metabólitos são encontrados em quantidades traços no organismo e a coleta na natureza dos volumes de amostras necessárias aos ensaios pré-clínicos é inviável (HAY; FENICAL, 1996).

Estima-se que a cada 5000 substâncias que entram na fase dos testes pré-clínicos (testes *in vitro*, farmacodinâmica, farmacocinética e toxicológicos) apenas 5 passam aos estudos clínicos e apenas uma molécula resulta num medicamento (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

Mesmo com as dificuldades encontradas, existem inúmeros PNs com patentes depositadas, medicamentos em fase clínica e alguns produtos já comercializados (Quadro 1). O potencial comercial desses produtos é alto, tanto que existem companhias especializadas na pesquisa e desenvolvimento desses fármacos, como a PharmaMar e a Nereus Pharmaceuticals (PROKSCH; EDRADA-EBEL; EBEL, 2003; HAEFNER, 2003; COSTA-LOTUFO et al., 2009).

Quadro 1: Alguns exemplos de produtos naturais marinhos e seu status clínico.

Composto	Organismo	Uso	Status
Aciclovir, Zovirax ^{®4}	Esponja <i>Tethya crypta</i>	Antiviral	Mercado
Ara A , vidarabina ^{®2, 4, 5, 6}	Esponja <i>Tethya crypta</i>	Antiviral	Mercado
Ara C, Citarabina ^{®2, 4, 5, 6}	Esponja <i>Tethya crypta</i>	Antitumoral	Mercado
Aplidina, Plitidepsina aplidin ^{®1, 3, 7}	Ascídia <i>Aplidium albicans</i>	Antitumoral	Fase I/II
Avarol ⁴	Esponja <i>Disidea avara</i>	Antiviral	Pré-clínica
Azidotimidina - AZT, zidovudina ^{®2}	Esponja <i>Tethya crypta</i>	Antiviral	Mercado
Crambescidin 800 ⁷	Esponja <i>Crambe crambe</i>	Antimalárico e citotóxico	Mercado
Metopterosina, OAS1000 ¹	Coral <i>Pseudopterogorgia elizabethae</i>	Anti- inflamatório e cicatrizante	Fase I/II
Pseudopterosina A, Resilience [®] (Estée Lauder) ^{2, 7}	Coral <i>Pseudopterogorgia elizabethae</i>	Anti- inflamatório e cicatrizante	Mercado
Salinosporamida A, Marizomib ^{®5, 6}	Bactéria <i>Salinispora tropica</i>	Antitumoral	Pré-clínica
Trabectina, Yondelis ^{®1, 5, 6, 7}	Ascídia <i>Ecteinascidia turbinata</i>	Anticâncer	Mercado
Ziconotídeo, Prialt ^{®1, 2, 5, 7}	Molusco <i>Conus Magus</i>	Antinociceptivo	Mercado

¹HAEFNER (2003); ²KIJJOA; SAWANGWANG (2004); ³COSTA-LOTUFO et al. (2009); ⁴YASUHARA-BELL; LU (2010); ⁵MAYER et al. (2010); ⁶BHATNAGAR; KIM (2010); ⁷RADJASA et al. (2011).

Apesar da grande diversidade encontrada no Brasil, o potencial tecnológico dos PNMs permanece pequeno, com um número reduzido de patentes em comparação com o resto do mundo. Um dos entraves é que a nossa lei de patente não aceita apenas a descoberta de um princípio ativo natural, mas exige que ele possua uma aplicação industrial e seja uma novidade inventiva, enquanto no exterior apenas o emprego de extratos/substâncias ativas na forma de composições farmacêuticas pode ser utilizada para o reconhecimento da patente (PUPO; GALLO; VIEIRA, 2007; BRASIL, 2010).

1.4 Cnidários como fonte de fármacos

O filo Cnidaria é um grupo grande e diverso de invertebrados marinhos que possui mais de 11000 espécies, entre hidras, águas-marinhas, esponjas e corais. A pesquisa desse grupo foi, por muito tempo, limitada pelo habitat, com grande parte dos estudos restritos às regiões rasas ou entre-marés (ROCHA et al., 2011).

Embora os cnidários não sejam os organismos marinhos mais pesquisados no campo dos PNM, eles são considerados um dos grupos mais promissores como fonte de novas drogas de interesse médico, científico e econômico. Mais de 3000 compostos já foram descritos para esse filo, apenas na última década (SOTKA et al., 2009; ROCHA et al., 2011).

Dentre os cnidários, os corais da classe Anthozoa são os animais dominantes no filo, com 7500 espécies (2/3 do total), divididos nas subclasses Octocorallia (corais moles) e Hexacorallia (corais duros). Os corais moles não possuem um esqueleto externo de carbonato de cálcio e o suporte estrutural da colônia é dado por espículas calcáreas, enquanto os corais duros possuem um esqueleto calcário que pode atuar como proteção contra predação. Até pouco tempo, imaginava-se que apenas os octocorais produzissem metabólitos secundários com função defensiva, mas estudos têm mostrados que os hexacorais, principalmente da ordem Scleratinia, produzem esses metabólitos (alcalóides, sesquiterpenos, entre outros) e são importantes fontes de compostos bioativos (BAE et al., 2000; EPIFANIO; MAIA; FENICAL, 2000; SHEU; CHANG; DUH, 2000; ALAM et al., 2001a; CHANGYUN et al., 2008).

1.4.1 Gênero *Tubastraea*

O gênero *Tubastraea* (Classe Anthozoa, Ordem Scleratinia, Família Dendrophylliidae) é caracterizado por apresentar corais azooxantelados, que não possuem algas simbiotes, e ahermatípicos, não produzem recifes. Estes corais residem em águas rasas, recifes de coral e costões rochosos tropicais (CAIRNS, 2000; MANGELLI; CREED, 2012). Esse gênero possui seis espécies: *Tubastraea coccinea* Lesson, 1829; *Tubastraea micranthus* (Ehrenberg, 1834); *Tubastraea diaphana* Dana, 1846; *Tubastraea faulkneri* Wells, 1982; *Tubastraea floreana* Wells, 1982 e *Tubastraea tagusensis* Wells, 1982.

Dessas, apenas a *T. coccinea* é cosmopolita, com as outras ocorrendo no Indo-pacífico, sendo que *T. tagusensis* pode ser observada no sudoeste do Atlântico. Colônias de *T. micranthus* foram descritas em uma plataforma de petróleo no Golfo do México (DE PAULA; CREED, 2004; SAMMARCO; PORTER; CAIRNS, 2010).

Segundo De Paula e Creed (2004) o gênero *Tubastraea* foi provavelmente introduzido na costa brasileira por navios e/ou plataformas de petróleo no final da década de 1980, quando foram realizados os primeiros registros de incrustações em plataformas de petróleo na Bacia de Campos, região norte do estado do Rio de Janeiro. Contudo esse gênero foi reconhecido nos costões rochosos da Baía de Ilha Grande apenas no final da década de 1990, sendo que após essa data, passou a ser observado em várias regiões do estado (CASTRO; PIRES, 2001; DE PAULA, 2002).

No estado do Rio de Janeiro podem ser encontradas duas espécies desse gênero, *T. coccinea* (Figura 1A) e *T. tagusensis* (Figura 1B) (MANGELLI; CREED, 2012).



Figura 1: **Espécies do gênero *Tubastraea*.** A – *Tubastraea coccinea* e B – *Tubastraea tagusensis*.

T. coccinea

Coral de cor laranja, ahermatípico, comum em águas rasas de baixas latitudes nos oceanos Atlântico e Pacífico. Originário do Pacífico foi introduzido no Caribe em 1943 e possui hoje distribuição circumtropical (CAIRNS, 1994; PAZ-GARCÍA et al., 2007; DE PAULA; CREED, 2004; SHEEHY; VIK, 2010). O seu grande potencial invasor pode ser explicado por seu comportamento oportunista e alta fecundidade, colonizando todos os tipos de substrato. Ele se mostra como uma grande ameaça para espécies nativas (CREED; DE PAULA, 2007).

T. tagusensis

Coral de cor amarela, ahermatípico, é endêmico do Arquipélago de Galápagos e agora ocorre na Ilha Grande, sendo mais abundante nessa região do que a espécie *T. coccinea* (DE PAULA; CREED, 2004; CREED; DE PAULA, 2007). Lages e colaboradores (2012) demonstraram que o extrato metanólico de *T. tagusensis* possui substâncias capazes de impedir a predação por peixes, podendo esse fato explicar o motivo de sua maior abundância na região de Ilha Grande.

1.5 Fármacos anti-inflamatórios

O mercado de analgésicos representa parte importante da receita para as indústrias farmacêuticas, com participação especial dos anti-inflamatórios não esteroides (AINES) (NORRIE PEARCE et al., 2007a). Muitos dos tratamentos atuais envolvem a utilização desses AINES, cujo alvo são as enzimas da cascata inflamatória ciclooxigenase (COX) e as fosfolipases, impedindo a formação das prostaglandinas, com ação analgésica, antipirética e anti-inflamatória. Apesar de essas terapias serem eficazes, algumas pessoas não respondem ao tratamento ou experimentam efeitos colaterais cardiovasculares e gastrointestinais (WILLOUGHBY; MOORE; COLVILLE-NASH, 2000; NORRIE PEARCE et al., 2007a; VONKEMAN; VAN DE LAAR, 2010), sendo por isso necessários estudos capazes de encontrar fármacos que sejam alternativos a estes.

1.5.1 Fármacos anti-inflamatórios de origem marinha

Em umas das últimas revisões publicadas sobre os cnidários como fonte de substâncias bioativas, Rocha e colaboradores (2011) relataram que 22% dos compostos marinhos com potencial biotecnológico estudados na última década apresentaram atividade anti-inflamatória. Alguns destes compostos já se encontram no mercado ou na fase dos testes clínicos.

Um dos exemplos mais interessantes é o caso do coral *Pseudopterogorgia elisabethae* coletado nas Bahamas, cujo extrato semi-purificado, rico em pseudopterossinas, é incorporado

em uma linha de produtos para cuidados da pele comercializados pela empresa Estée Lauder, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas. Um derivado da pseudopterosina A, chamado de metopterosina (OAS1000) está em ensaios clínicos fase I/II com a atuação de cicatrizante e anti-inflamatório (CORREA et al., 2009).

Os mecanismos de ação anti-inflamatória dos PNM's são variados. As pseudopterosinas encontradas na gorgonácea *P. elisabethae* são mais eficientes que a droga comercial indometacina. Elas atuam inibindo a biossíntese de eicosanoides por inibir a fosfolipase A₂, 5-lipooxigenase (5-LOX) e ciclooxigenase (COX), a desgranulação de leucócitos e a consequente liberação de enzimas lisossomais (CORREA et al., 2009). O Perthamide C, o componente mais abundante no extrato polar da esponja *Theonella swinhoei*, atua na regulação de TNF- α e na liberação de IL-8, dois biomarcadores chave na resposta inflamatória de células primárias de queratinócitos humanos (FESTA et al., 2012).

1.6 Modelo de edema de pata de camundongo induzido por carragenina

O modelo de edema induzido por carragenina foi inicialmente descrito por Winter e colaboradores, em 1962, na pata de ratos, e em 1969 foi adaptado por Levy para camundongos. Desde então, esse modelo de inflamação aguda tem sido utilizado para testar novas drogas anti-inflamatórias (CASTARDO et al., 2008). Esse método está baseado na capacidade da substância teste inibir a formação ou a progressão do edema, formado pela aplicação de carragenina, nos animais pré-tratados com a referida substância teste.

A carragenina é uma substância capaz de gerar a liberação de mediadores inflamatórios e pró-inflamatórios, como prostaglandinas, leucotrienos, histamina, bradicinina, TNF- α , entre outros (AMDEKAR et al., 2012).

O edema (extravasamento vascular) é causado pelo aumento do fluxo de fluido rico em proteínas (exsudato) do compartimento intravascular para o interstício, e é resultado da atuação de leucotrienos, histamina, bradicinina, componentes do complemento, substância P e fator ativador de plaquetas (PAF). Estes fatores alteram as funções de barreira de pequenos vasos sanguíneos e aumentam a permeabilidade dos capilares e vênulas para água e proteínas. (ROBBINS; COTRAN, 2010).

1.7 Antioxidantes

Radical livre é qualquer átomo ou molécula que possui um ou mais elétrons não emparelhados. Esses elétrons desemparelhados implicam em uma alta reatividade química, tornando-o, geralmente, mais reativo do que o correspondente não radical (ANDERSON, 1996).

Os radicais livres possuem funções biológicas importantes na manutenção da homeostase: Por exemplo: neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos podem gerar grandes quantidades de íon superóxido com a finalidade de gerar a morte de organismos invasores, como bactérias. Outro radical livre produzido no processo inflamatório é o óxido nítrico, com a função de relaxamento do endotélio vascular, além de atuar na regulação da produção de ciclooxygenases para a formação das prostaglandinas (ANDERSON, 1996; ROBBINS; COTRAN, 2010).

Apesar das atuações benéficas, os radicais livres desempenham função importante em doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo, como diabetes, câncer, patologias cardiovasculares e envelhecimento (WILLCOX; ASH; CATIGNANI, 2004; LOARCA-PIÑA et al., 2010).

Antioxidantes são compostos que protegem os sistemas biológicos contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva, envolvendo ERO (Espécies reativas de oxigênio) e ERN (Espécies reativas de nitrogênio), e podem ser encontrados em uma grande variedade de frutas, vegetais, extratos de plantas, bebidas, ervas, especiarias e produtos semissintéticos (ARNAO, 2000; REDDY; ODHAV; BHOOLA, 2003). Seus mecanismos de ação podem ser a supressão da formação das espécies reativas por inibição enzimática ou por quelar elementos-traço envolvidos na produção dos radicais livres, eliminar as espécies reativas diretamente (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Há evidências de que compostos antioxidantes e anti-inflamatórios podem ser utilizados para modificar o ambiente redox das células cancerosas e, portanto, o seu comportamento. Assim como o estresse oxidativo pode estimular o fenótipo mutante, sugere-se que os antioxidantes são potencialmente capazes de reduzir a instabilidade genética das células cancerosas, podendo ser útil no tratamento (REDDY; ODHAV; BHOOLA, 2003).

Substâncias sintéticas como butil-hidroxianisol (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT) são amplamente utilizados como antioxidantes em alimentos.

1.8 Ensaios toxicológicos

Apesar da quantidade de material (biomassa) necessária aos ensaios clínicos ser um entrave no estudo dos PNMs como fonte de fármacos, um dos grandes limitantes associados ao lançamento desses medicamentos no mercado é a toxicidade associada ao seu uso (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

No Brasil, a agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) é o órgão regulador responsável por regulamentar e fiscalizar a qualidade dos medicamentos que chegam ao mercado, incluindo qualidade, eficiência e toxicidade (KLEIN et al., 2009). No âmbito internacional temos a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) e a Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH), que reúnem protocolos científicos padronizados para a identificação e avaliação dos possíveis riscos de substâncias químicas de origem natural ou sintética para a saúde humana (OECD, 2012; ICH, 2012).

Como citado anteriormente, são necessárias várias fases para o desenvolvimento de um fármaco de origem natural desde a descoberta da bioatividade até o seu lançamento no mercado (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

Os estudos toxicológicos fornecem informações importantes quanto à segurança dos medicamentos. Assim, para a análise da qualidade e do grau de risco do produto, as agências regulatórias nacionais e internacionais indicam que sejam realizados testes capazes de avaliar o risco mutagênico e genotóxico associado aos agentes químicos que podem, em última instância, levar a consequências adversas para a saúde, incluindo câncer, infertilidade, anomalias no desenvolvimento ou doenças genéticas. Essa bateria de testes geralmente inclui a avaliação da mutagenicidade em modelos bacterianos e de genotoxicidade em células de mamífero *in vitro* (SUTER, 2006; CIMINO, 2006; LYNCH et al., 2011; ANVISA, 2012).

1.8.1 Ensaio de reversão *Samonella*/microssoma

Produtos químicos capazes de induzir mutações podem danificar as células germinativas, levando ao surgimento de mutações em gerações futuras. Essas mutações

podem ser pontuais, com a troca de apenas um par de bases, envolver vários pares de bases, com a inserção ou deleção, gerando rearranjos no DNA, ou ainda, com o ganho ou perda de cromossomos inteiros (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Com o intuito de avaliar a ação mutagênica de compostos químicos, os modelos bacterianos apresentam vantagens em comparação a outros modelos, dada a sua alta taxa de replicação. O ensaio de mutação reversa bacteriana ou reversão *Salmonella*/microssoma é amplamente aceito como *screening* inicial para identificar substâncias ou extratos capazes de produzir danos genéticos que levam a mutações nos genes (MORTELMANS; ZEIGER, 2000; RANG et al., 2004).

O ensaio é baseado em linhagens de *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium ou *Escherichia coli* mutantes deficientes na produção do aminoácido essencial histidina (His^-) e que só são capazes de sobreviver no meio contendo esse aminoácido. Assim, a presença do agente mutagênico induz a reversão da mutação. A capacidade funcional das bactérias em produzir o aminoácido essencial é restaurada (His^+) possibilitando que elas dupliquem na ausência do referido aminoácido. A presença das colônias revertentes (His^+) pode demonstrar a capacidade mutagênica do composto testado (MARON; AMES, 1983; OECD, 1997; RANG et al., 2004).

Existem protocolos internacionais, como o OECD 471, que garantem a uniformidade dos procedimentos experimentais e possibilitam que esse ensaio seja utilizado como padrão pelas agências reguladoras no registro e aprovação de fármacos (OECD, 1997; EASTMOND et al., 2009).

1.8.1.1 Ativação metabólica

Alguns carcinogênicos possuem a capacidade de gerar alterações de maneira direta no DNA, mas a maioria deles precisa ser convertido em metabólitos ativos. Como as bactérias são incapazes de metabolizar compostos químicos via citocromos P450, como mamíferos e outros vertebrados, um componente chave a ser utilizado nos ensaios de mutagenicidade com modelos bacterianos é a introdução de um sistema de metabolização exógena, como exemplo o S9 mix (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000; RANG et al., 2004).

A fração S9 é normalmente obtido a partir de um homogenato de fígado de ratos tratados com substâncias capazes de induzir a produção das enzimas hepáticas, como o Aroclor (mistura de bifenilas policloradas), fenobarbital e/ou b-naftoflavona. Outros animais também podem ser utilizados para a obtenção de frações microssomais, como camundongos, hamsters, macacos, além de outros órgãos como os rins. O mix S9 é obtido com a mistura da fração S9 e co-fatores (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

1.8.2 Teste de micronúcleo *in vitro* com células de mamíferos (macrófago RAW 264.7)

Os micronúcleos (MNs) podem surgir durante a mitose celular quando fragmentos ou cromossomos inteiros são incapazes de migrar para os polos durante a anáfase e, por isso, não integram o núcleo principal nas células filhas, podendo ser formados pela ação de substâncias que geram uma quebra direta no DNA, dano na replicação da fita molde, inibição da síntese do DNA, falhas na produção do fuso mitótico, entre outros (Figura 2). Assim, o aumento de células micronucleadas é considerado um biomarcador de efeitos genotóxicos dessas substâncias (ALBERTINI et al., 2000; FENECH; CROTT, 2002; OECD, 2010).

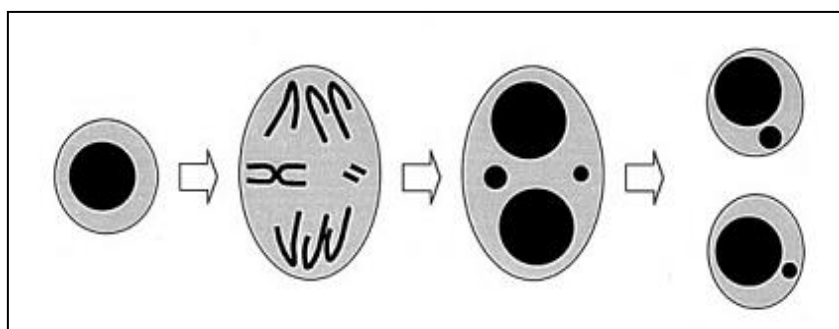


Figura 2: Formação do micronúcleo em uma célula hipotética por atraso na migração de cromossomos inteiros ou de fragmentos durante a divisão celular. Adaptado de Fenech, 2000.

O ensaio de micronúcleo *in vitro* é um teste de genotoxicidade para a detecção de substâncias clastogênicas e/ou aneugênicas que determinam o aumento da frequência de MNs no citoplasma de células na interfase, devido a atividade de. (FENECH, 2000; OECD, 2010).

Nesse ensaio pode ser observado genotoxicidade (pela visualização dos MNs e da presença de divisões celulares Figura 3 A e B) e citotoxicidade (pela determinação das taxas de apoptose e necrose Figura 3 C e D) em diferentes tipos celulares, primários ou secundários, desde que tenham completado uma divisão nuclear, o que permite formar o MN (FENECH et al., 1999; AIUB et al., 2011).

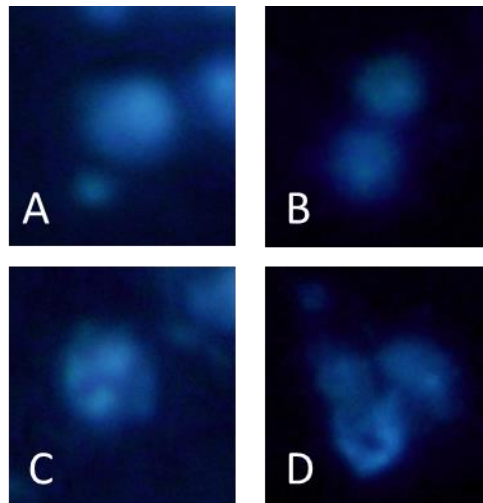


Figura 3: Características celulares encontradas no ensaio de micronúcleo. A- micronúcleo; B- divisão celular; C- apoptose celular, D- necrose (Fotos próprias).

Também é possível analisar a presença de MNs em modelos experimentais *in vivo*, com o tratamento de animais (ratos e camundongos) com a substância em análise ou de humanos expostos a determinadas condições, analisando células sanguíneas ou medula óssea e linfócitos, ou células epiteliais (ALBERTINI et al., 2000; OECD, 2010).

1.8.3 Ensaio de toxicidade com o microcrustáceo *Artemia salina*

Invertebrados têm sido amplamente utilizados para avaliar a toxicidade de substâncias químicas, principalmente por suas características toxicológicas e biológicas. Esses organismos são facilmente cultivados em laboratório, mantidos em condições controladas, e por isso têm sido usados por décadas em testes de toxicidade aguda e crônica para a identificação de risco (LAGADIC; CAQUET, 1998).

O ensaio de mortalidade do microcrustáceo *Artemia salina* foi inicialmente proposto por Michael e colaboradores (1956) e se baseia na habilidade de extratos e substâncias em levar náuplius de *Artemia* cultivados em laboratório à morte. Esse ensaio é considerado uma ferramenta rápida, de baixo custo e útil nos *screenings* toxicológicos iniciais em diferentes amostras, como extratos de plantas (PARRA et al., 2001), toxinas de cianobactérias (HISEM et al., 2011), produtos naturais marinhos (SENG et al., 2007; ORDAZ et al., 2010), entre outros.

Alguns autores sugerem que existe correlação entre a toxicidade contra *A. salina* e a citotoxicidade contra algumas linhagens celulares tumorais (PICCARDI et al., 2000; PARRA et al., 2001; CARBALLO et al., 2002; MCLAUGHLIN; ROGERS, 1998; DHAMIJA et al., 2011). Apesar disso ainda não há consenso sobre o tema com outros autores refutando essa hipótese (JAKI et al., 1999; MIAN et al., 2003; BERRY et al., 2004; HISEM et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade anti-inflamatória, antioxidante e toxicológica de extratos metanólicos de espécies de coral do gênero *Tubastraea* (*Tubastraea coccinea* e *Tubastraea tagusensis*).

2.2 Objetivos específicos

- Distinguir grupos químicos presentes nos extratos metanólicos obtidos dos corais *Tubastraea coccinea* e *Tubastraea tagusensis*;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório *in vivo* dos extratos;
- Investigar a ação antioxidante dos extratos metanólicos;
- Avaliar a capacidade mutagênica e citotóxica dos extratos;
- Investigar a capacidade genotóxica dos extratos.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta do material

O gênero *Tubastraea* (família Dendrophylliidae, ordem Scleratinia) possui corais azooxantelados e ahermatípicos. Esse gênero foi introduzido na costa brasileira no final da década de 1980 e as espécies *T. coccinea* e *T. tagusensis* podem ser atualmente encontradas nos costões rochosos da Baía de Ilha Grande no estado do Rio de Janeiro (CAIRNS, 2000; DE PAULA, 2002; CREED; OLIVEIRA; DE PAULA, 2008). Os extratos brutos de *Tubastraea spp* foram cedidos pela Prof^a. Beatriz Grosso Fleury, do Departamento de Ecologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

As colônias das espécies *T. coccinea* (665 g) e *T. tagusensis* (666 g) foram coletadas sobre costões rochosos da Ilha de Itacoatiba (23° 4'00 "S e 44° 15'00" W), em Ilha Grande/RJ a três metros de profundidade, em maio de 2004.

Após as coletas as colônias foram imediatamente congeladas e mantidas a -25°C até o momento de preparação dos extratos.

3.2 Preparação e caracterização dos extratos

3.2.1 Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados com metanol PA (MeOH) como solvente, de acordo com Lages et al. (2010). Os corais foram cortados em pedaços e liofilizados. O metanol foi adicionado na amostra seca. Extraídos três vezes consecutivas, com o auxílio de ultrassom, por 15 minutos, para aumentar a eficiência de extração. O sobrenadante foi coletado e o solvente dos extratos foi evaporado sob pressão reduzida, formando os extratos brutos, que forma mantidos a -25°C até o momento dos ensaios.

3.2.2 Espectro UV/Visível

A espectrofotometria UV/Vis (ultravioleta-visível) é um dos métodos mais utilizados nas determinações analíticas de compostos, por ser um teste preliminar a outros de maior sensibilidade. Considerando a Lei de Lambert-Beer, existe uma relação de proporcionalidade entre a quantidade de radiação luminosa absorvida por uma determinada espécie química e a concentração dessa espécie. Para a avaliação dos espectros de absorção UV/Vis em via úmida é necessário realizar uma varredura que inclua os comprimentos de onda, UV próximo na faixa de 190 a 400 nm, e visível na faixa de 400 a 800 nm (VINADÉ; VINADÉ, 2005).

Para a avaliação dos perfis espectrofotométricos UV/VIS, os extratos foram diluídos em acetonitrila (CH_3CN), grau de pureza 99,9% e água, na proporção de 5:1 (v/v), ambos com *Cut Off* 190 nm, na concentração de 0,1 mg/mL.

Os espectros UV/VIS foram obtidos com a varredura de 200 nm a 800 nm em um espectrofotômetro Shimadzu UV-160A, com cubetas de quartzo, 1 cm de caminho ótico, em colaboração com o Dr. Jayme da Cunha Bastos do Departamento de Bioquímica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

3.2.3 Espectro infravermelho

O espectro de infravermelho é originado de diferentes modos de vibração e rotação das moléculas nas faixas entre 4000 a 400 cm^{-1} . Essas vibrações possuem frequências que dependem, primariamente, das massas dos dois átomos e da força constante da ligação entre eles. Os modos vibracionais são característicos dos grupos na molécula e são úteis na identificação de um composto, particularmente no estabelecimento de uma estrutura desconhecida (VOGEL et al., 1989; SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994; SILVERSTEIN et al., 2005).

Para a produção dos espectros na faixa do infravermelho (*Fourier Transform Infrared-FTIR*), os extratos brutos foram depositados sob uma janela de KBr, formando um filme pastoso, e analisado em um instrumento Perkin Elmer Spectrum One (resolução de 4 cm^{-1}).

As análises foram realizadas em colaboração com a Dr. Mônica Regina Marques e

Rita Maria de Sá no Instituto de Química - Departamento de Química Orgânica na Universidade do Estado do Rio de Janeiro. A interpretação dos espectros foi baseada nos trabalhos de Silverstein; Bassler; Morrill (1994), Coates (2000) e Lopes e Fascio (2004).

3.2.4 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia de camada delgada (CCD) foi utilizada para avaliar os perfis dos extratos (WAGNER; BLADT, 1995). Os extratos na concentração de 10 mg/mL (diluídos em metanol 100%) foram aplicadas com um capilar em uma placa de sílica gel 60 F₂₅₄. As placas foram, então, colocadas em cubas verticais, contendo eluentes de polaridades crescentes: acetato de etila:hexano 1:1 (v/v); acetato de etila: metanol 19:1 (v/v); metanol:diclorometano 1:9 (v/v). Após a retirada da cuba, as placas foram secas à temperatura ambiente. A revelação inespecífica foi realizada com sulfato cérico, enquanto a revelação para terpenóides foi realizada de acordo com Wagner e Bladt (1995). Nesta metodologia, o ácido sulfúrico (1% em etanol) foi borrifado em toda a placa, que após seca a temperatura ambiente, foi aspergida com vanilina (1% em etanol). As placas foram levadas à estufa a 100°C para a revelação do teste.

3.2.5 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH

O método DPPH é baseado na capacidade captadora de radicais livres, no caso o radical DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil), pela amostra ou por antioxidantes conhecidos, produzindo um decréscimo da absorvância a 517 nm (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). O radical DPPH é estável, de coloração violeta, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela, a capacidade captadora de radicais livres da amostra é medida espectrofotometricamente e é inversamente proporcional a porcentagem de DPPH oxidado, forma radicalar, restante no sistema. Esse método não mede a capacidade de detectar agentes pró-oxidantes, apenas o poder redutor dos compostos analisados (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Foram preparados diluições dos extratos nas concentrações 0,01; 0,1; 0,5; 1,0 mg/mL em DMSO. O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 100 µL da diluição, em triplicata. Em ambiente escuro, foram adicionados 100 µL DPPH a 25 mM em etanol em cada poço, e homogeneizados com o auxílio da pipeta. Para a curva padrão foi utilizado o Butil-hidroxi-tolueno (BHT) diluído em metanol nas concentrações 0,01; 0,1; 0,5; 1,0 mg/mL. As leituras foram realizadas em leitor de microplacas no comprimento de onda de 517 nm, após 20 minutos de incubação. As absorções dos extratos e dos solventes foi descontadas.

A atividade antioxidante foi calculada de acordo com Marinova e Batcharov (2011):

$$\text{Inibição (\%)} = [1 - (\text{Abs}_{517 \text{ nm}} \text{ amostra} / \text{Abs}_{517 \text{ nm}} \text{ branco})] \times 100 \quad (1)$$

Onde,

$\text{Abs}_{517 \text{ nm}} \text{ amostra}$: Absorção em 517 nm amostra + DPPH

$\text{Abs}_{517 \text{ nm}} \text{ branco}$: Absorção em 517 nm DMSO + DPPH

3.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

3.3.1 Animais

Os experimentos de avaliação da atividade anti-inflamatória foram realizados em colaboração com a MSc. Mariana Vieira Vigliano e a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho do Departamento de Bioquímica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss Webster (SW), machos, pesando de 25 a 35 g, criados no Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro ou doados pelo Instituto Vital Brazil.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética para uso de Animais (CEA) do IBRAG, segundo protocolo 05/2009.

3.3.2 Modelo de edema de pata de camundongo induzido por carragenina

No modelo de edema de pata induzido por carragenina (WINTER et al., 1962), camundongos SW, pesando entre 25-35 g foram divididos em seis grupos (5 animais cada), sendo cada grupo pré-tratado intra-peritonealmente (i.p.) com 100 µL de:

Grupo 1 – Controle negativo (DMSO)

Grupo 2 – Indometacina (10 mg/kg – droga referência)

Grupo 3 – Extrato *T. coccinea* (20 mg/kg)

Grupo 4 – Extrato *T. coccinea* (200 mg/kg)

Grupo 5 – Extrato *T. tagusensis* (20 mg/ kg)

Grupo 6 - Extrato *T. tagusensis* (200 mg/ kg)

Os volumes das patas foram medidos no pletismômetro Ugo basile no início do experimento (t_0). Após uma hora do pré-tratamento os animais receberam uma injeção subplantar de 50 µL de carragenina (6 mg/mL) na pata traseira direita. Os volumes das patas foram medidos em t_1 (1 h), t_2 (2 h), t_3 (3 h) e t_4 (4 h) após a indução do edema pela carragenina.

Para cálculo do índice de edema foi utilizada fórmula a seguir:

$$\text{Índice de edema (\%)} = (\text{valor edema } t_x \times 100 / \text{valor edema } t_0) - 100 \quad (2)$$

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

$$\text{Inibição do edema (\%)} = 100 - [(\text{valor edema da amostra } t_x \times 100) / \text{média dos edemas do controle}] \quad (3)$$

Onde t_x = volume da pata nos diferentes tempos avaliados; t_0 = volume de pata antes da indução da inflamação pela carragenina.

Cada grupo foi composto de cinco animais e o experimento foi realizado em triplicata. Após o experimento os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂.

3.4 Ensaios toxicológicos

3.4.1 Ensaio de reversão *Samonella*/microsoma

O ensaio de reversão *Salmonella*/microsoma é utilizado como *screening* inicial na identificação de substâncias mutagênicas, principalmente para substâncias capazes de gerar mutações pontuais (OECD, 1997; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

3.4.1.1 Linhagens bacterianas

Foram utilizadas quatro linhagens padrão (TA97, TA98, TA100 e TA102), checadas periodicamente, que possuem mutações em diferentes pontos do *operon* de produção do aminoácido histidina, sugeridas por Maron e Ames (1983) (Quadro 2).

Quadro 2: Sítios de mutação nas linhagens utilizadas no ensaio de reversão *Samonella*/microsossoma.

Linhagem	Sítio da mutação <i>his</i>	Sequência alvo no DNA	Evento de reversão
TA97	<i>hisD6610</i>	C-C-C-C-C-C	Alteração no quadro de leitura pela deleção de pares de base G-C.
TA98	<i>hisD3052</i>	C-G-C-G-C-G-C-G	Alteração no quadro de leitura pela adição ou deleção de pares de base G-C.
TA100	<i>hisG46</i>	G-G-G	Substituição de pares de base G-C por T-A.
TA102	<i>hisG428</i>	TAA	Substituição de pares de base T-A para G-C, transições e transversões.

Adaptado de Maron; Ames (1983); Mortelmans; Zeiger (2000); Aiub; Felzenszwalb (2011).

A TA97 apresenta mutação no gene *hisD6610*, gerada pela adição de um par GC, e por isso identifica substâncias capazes de alterar o quadro de leitura, por deletar pares de base G-C. A mutação presente na TA98 está posicionada no gene *hisD3052* que codifica a enzima histidinol desidrogenase. Essa linhagem detecta substâncias capazes de alterações do quadro de leitura, que podem atuar adicionando um par de base C-G em uma região repetitiva ou *hot spot*. A TA100 possui a mutação *hisG46* que codifica a primeira enzima da biossíntese da histidina. Essa mutação gerou a substituição do par de base AT para GC, ocasionando a troca do aminoácido leucina pelo prolina. Essa linhagem atua identificando substâncias que gerem substituição de pares de base GC para AT. A linhagem TA102 possui um par AT extra no sítio *hisG428* inserido no plasmídio pAQ1, essa mutação ocre pode ser revertida por transições e transversões. (MARON; AMES, 1983; OECD, 1997; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Além dessas mutações, cada cepa possui mutações adicionais/alterações genéticas que as torna mais sensíveis para os mutágenos (Quadro 3).

Quadro 3: Genótipos das linhagens utilizadas.

Linhagem	Bio/uvrB	LPS	Plasmídeo
TA97	Deleção Mutação	<i>rfa</i>	pKM101
TA98	Deleção Mutação	<i>rfa</i>	pKM101
TA100	Deleção Mutação	<i>rfa</i>	pKM101
TA102	- -	<i>rfa</i>	pKM101, pAQ1

Adaptado de Mortelmans; Zeiger (2000).

A deleção do gene *uvrB/bio* torna as cepas deficientes no sistema de reparo por excisão de nucleotídeos e as deixa mais suscetíveis ao erro. Junto com essa mutação foi retirado o gene de produção da biotina e por isso as linhagens que possuem essa deleção são dependentes deste aminoácido. A mutação *rfa* leva a um defeito na barreira lipopolissacarídica (LPS) que reveste a superfície da bactéria, permitindo a entrada da substância-teste. A introdução do plasmídeo pKM101 aumenta a sensibilidade do sistema na detecção de substâncias mutag nicas, através do aumento da via de reparo de DNA propenso a erros e confere resistência ao antibiótico ampicilina, enquanto o plasmídeo pAQ1 confere resistência ao antibiótico tetraciclina e aumenta os sítios alvos de substâncias mutag nicas (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

3.4.1.2 Metabolização exógena

Algumas substâncias necessitam de ativação metabólica para se tornarem biologicamente ativas. Os sistemas bacterianos não possuem capacidade de metabolização similar a dos mamíferos, por isso é necessário que seja adicionado ao ensaio um sistema exógeno de ativação metabólica. Esse sistema, chamado de fração S9, é composto por um homogenato de fígado de ratos machos Sprague-Dawley pré-tratados com bifenil-policlorinato (Aroclor 1254), que estimula a produção de enzimas de metabolização, principalmente CYP1A e CYP2B (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

A fração S9 liofilizada foi adquirida do laboratório Molecular Toxicology Inc. (MoltoxTM, USA). O S9 mix foi preparado de acordo com Maron e Ames (1983). Para

preparar cada 50 mL de S9 mix 4% utilizou-se 19,75 mL de água destilada; 25,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,4; 2,0 mL de solução NADP 0,1M; 0,25 mL de glicose-6-fosfato 1 M, 1 mL de sais $MgCl_2$ e KCl, e 2,1 mL da fração S9 reconstituída com água destilada.

3.4.1.3 Controle positivo e negativo

O controle negativo utilizado no ensaio foi o DMSO a 2%, a mesma substância utilizada para a diluição das amostras. Os controles positivos para os ensaios na ausência e presença da metabolização exógena foram os indicados por Maron e Ames (1983) e Mortelmans e Zeiger (2000) e apresentados no Quadro 4. Os controles positivos foram fornecidos pela Sigma Co.

Quadro 4: Controles positivos utilizados no ensaio *Salmonella*/microsossoma na ausência (-S9) e na presença (+S9) de ativação metabólica.

Linhagem	- S9	+ S9
TA97	4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) CAS# 7608-65-0, pureza \geq 97%, 100 μ g/mL	2-amino-antraceno (2AA) CAS# 613-13-8, pureza \geq 96%, 100 μ g/mL
TA98	4-nitroquinolina-1-oxido (4NQO) CAS# 7608-65-0, pureza \geq 97%, 100 μ g/mL	2-amino-antraceno (2AA) CAS# 613-13-8, pureza \geq 96%, 100 μ g/mL
TA100	Azida sódica (AS), CAS# 26628-22-8, pureza \geq 99,5%, 100 μ g/mL	2-amino-antraceno (2AA) CAS# 613-13-8, pureza \geq 96%, 100 μ g/mL
TA102	Mitomicina-C (MitC) CAS# 50-07-7, pureza \geq 99%, 50 μ g/mL	2-amino-antraceno (2AA) CAS# 613-13-8, pureza \geq 96%, 100 μ g/mL

3.4.1.4 Ensaio de reversão *Salmonella*/microsossoma

O ensaio de reversão *Salmonella*/microsossoma foi realizado seguindo o protocolo proposto por Maron e Ames (1983), com adaptações. Alíquotas de 100 μL obtidas de culturas das linhagens de *S. typhimurium* TA97, TA98, TA100 e TA102 cultivadas *overnight* ($2,0 \times 10^9$ cels.mL⁻¹) foram pré-incubadas (20 min, 37°C, 150 rpm) com 100 μL dos extratos nas concentrações 50; 250; 500; 2500 e 5000 $\mu\text{g/placa}$ de 30mL e 500 μL de tampão fosfato de sódio 0,2 mM pH 7,4 (ausência de ativação metabólica) ou o mesmo volume de S9 mix 4% (presença de ativação metabólica).

Após a pré-incubação foram retirados 10 μL da mistura para o ensaio de sobrevivência. 2,0 mL de ágar de superfície (0,7% ágar, 0,6% NaCl, 50 μM L-histidina, 50 μM biotina, pH 7,4, 45°C) foram adicionados aos tubos de ensaio e plaqueados em placas de petri contendo meio agar mínimo (1,5 % ágar, meio Vogel-Bonner E, contendo 2% de glicose). O ensaio foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas por 72 h, a 37°C e as colônias revertentes (CR) foram contadas.

O extrato foi considerado mutagênico se o índice mutagênico (IM) foi superior ou igual a 2,0, se foi encontrada resposta significativa (Test t, $p < 0,05$) e o extrato não apresentou citotoxicidade (AIUB; PINTO; FELZENSZWALB, 2004).

$$\text{IM} = \text{CR amostra} / \text{CR controle negativo} \quad (4)$$

3.4.1.5 Ensaio de sobrevivência

Para a determinação da citotoxicidade foram retiradas alíquotas de 10 μL da mistura da pré-incubação do ensaio acima descrito e realizada diluição seriada (10^5) em NaCl 0,9%. Uma alíquota de 100 μL da diluição final foi dispersa em placas de petri contendo meio Louria-Bertani (0,8% de nutriente para crescimento bacteriano, 0,5% NaCl e 1,5% de ágar). O ensaio foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e as colônias contadas. O extrato foi considerado citotóxico se a porcentagem de colônias presentes foi

inferior a 70% em comparação ao controle negativo (AIUB; PINTO; FELZENSZWALB, 2004).

3.4.2 Teste *in vitro* de micronúcleo com células de mamíferos (macrófago RAW 264.7)

O teste de micronúcleo foi realizado de acordo com a OECD (2010), utilizando-se macrófagos de camundongos BALB/c transformados pelo retrovírus da leucemia em camundongo Abelson (A-MuLV). As culturas foram cedidas pela Dra. Márcia Cristina Paes, do departamento de Bioquímica do IBRAG-UERJ.

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos de 150 mL para meio de cultura, com 100 mL de meio de cultura MEM-Eagle (11,875 g Meio Mínimo Essencial base de Eagle; 2,2 g NaHCO₃; 1,1 g piruvato de cálcio; 27 mg ácido aspártico; 21 mg L-serina) com 10% de soro fetal bovino (FCS), por 72 h em estufa com atmosfera de 5% CO₂ à 37°C.

As células aderidas na base do frasco foram removidas por ação mecânica e centrifugadas por 5 min a 5000 rpm juntamente com o meio de crescimento. O sobrenadante foi removido e o sedimento contendo as células foi suspenso em 4,0 mL de meio de cultura MEM-Eagle com 10% FCS. As células foram contadas em uma câmara de Neubauer. Após a contagem, as células restantes foram diluídas em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino até a concentração final de 1,0 a 2,0 x 10⁶ cels/mL.

O ensaio foi realizado em placas de cultura celular de 24 poços de fundo chato, contendo lamínulas circulares de 13 mm estéreis, pré-tratadas com ácido nítrico 1 N por 15 min. Foram adicionados 900 µL de meio de cultura MEM-Eagle com 10% de FCS e 100 µL da solução com as células por poço. As placas de cultura permaneceram na estufa com atmosfera de 5% CO₂, 37°C, por 24 h.

O tratamento foi realizado com a adição de 100 µL do extrato (nas concentrações 50; 500 e 5000 µg/mL, diluídos em DMSO), do controle negativo (DMSO) ou do controle positivo (1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina - MNNG a 0,5 µM), em seus respectivos poços. Em seguida, as placas contendo as células permaneceram por 3 h em estufa com 5% CO₂ a 37°C. Após o tratamento, foi retirado o meio contendo os extratos e os poços foram lavados com 1,0 mL de meio de cultura MEM-Eagle. Em seguida, foi adicionado 1 mL

de meio de cultura MEM-Eagle com 10% FCS nos poços, as placas permaneceram na estufa com 5% CO₂ a 37°C, por 24 h.

Após esse período, o meio de cultura MEM-Eagle presente nos poços foi retirado e iniciado o processo de fixação com a adição de 1,0 mL de fixador (3:1, metanol: ácido acético glacial), mantido por 15 min. Foi realizada uma nova lavagem com 1,0 mL de tampão McIlvaine (ácido crítico - 0,1 M; Na₂HPO₄, 0,2 M; pH 7,5).

A coloração foi realizada em ambiente escuro, com a adição de 500 µL de solução de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido, 3 mM) por poço e mantida por 40 min. Em seguida, as lamínulas foram lavadas por duas vezes com 1,0 mL de tampão McIlvaine para a exclusão do corante residual. Por fim, as lamínulas circulares com as células aderidas foram removidas de cada poço e analisadas quanto a contagem de células com micronúcleo, em apoptose, necrose ou divisão mitótica, em microscópio de fluorescência no comprimento de onda de 430 nm.

O experimento foi realizado em quintuplicata (5 poços por concentração) e foram contadas 1000 células por réplica. Os resultados são expressos em % MN (células micronucleadas); % Apop. (apoptose); % Necr. (necrose); % Mit. (Mitose) e Sob. (Sobrevivência). O resultado foi considerado positivo quando a formação de micronúcleos foi superior a 50%, em relação ao controle negativo, e quando $p < 0,05$ (OECD, 2010).

3.4.3 Ensaio de toxicidade com o microcrustáceo *Artemia salina*

O ensaio de mortalidade do microcrustáceo *Artemia salina* foi realizado segundo Meyer et al. (1982), Carballo et al. (2002) e Caldwell; Bentley; Olive (2003). Este experimento tem sido utilizado para determinar a toxicidade aguda de substâncias químicas e produtos naturais. É um ensaio rápido, de baixo custo, que requer uma pequena quantidade de amostra e pode ser usado com uma grande população de organismos-teste (PARRA et al., 2001).

3.4.3.1 Preparo da água de diluição

A água de diluição foi preparada com 33 g de sal marinho para cada 1000 mL de água destilada até a salinidade 35 ± 1 , medida em salinómetro, e mantida por 24 h sob aeração constante para a estabilização dos parâmetros químicos. Após esse período foram aferidos o pH ($8,0 \pm 0,5$) e a saturação de oxigênio (90%). Antes do uso a água foi filtrada em membrana de nylon de 1 μm , Millipore.

3.4.3.2 Eclosão dos cistos

Os cistos secos foram comprados na empresa BioArtemia Cultivo e Beneficiamento e mantidos em local seco para a manutenção de sua viabilidade.

Para a eclosão foram incubados 100 mg de cistos em 100 mL de água de diluição em um erlenmeyer (1 g de cistos por litro) por 24 h em temperatura entre 25°C e 30°C sob aeração e iluminação contínua. Após esse período as Artemias viáveis foram recolhidas com uma pipeta e mantidas em outro erlenmeyer contendo 200 mL de água de diluição, com aeração e iluminação constantes por 24 h. Após esse período de crescimento, os náuplios utilizados encontravam-se nos estágios de crescimento II e/ou III.

3.4.3.3 Preparo das amostras

Foram preparadas soluções dos extratos na concentração de 125 mg/L em DMSO, e diluídas sequencialmente na água de diluição (0,01; 0,1; 1; 10; 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$). A concentração máxima de DMSO em cada concentração foi de 0,8%, essa concentração máxima é necessária para a não interferência do solvente no ensaio (ORTLEPP et al., 2007).

3.4.3.4 Avaliação da toxicidade

O ensaio foi realizado em placas de titulação com 24 poços de fundo chato, com cada poço contendo 2 mL dos extratos diluídos na água artificial marinha com 10 náuplios do microcrustáceo. Foram preparadas 3 poços para cada concentração. O controle negativo foi realizado com a água de diluição contendo 0,8% de DMSO, em triplicata.

Após 24 h no escuro e temperatura ambiente, foi realizada a contagem das larvas mortas e vivas com auxílio de lupa e iluminação incandescente. As larvas foram avaliadas quanto a mobilidade apresentada por 30 segundos de observação.

A LC_{50} 24 h, concentração letal para 50% dos indivíduos em 24 h, foi calculada utilizando método de análise por probitos descrito por Finney (MEYER et al., 1982). O extrato foi considerado tóxico caso a LC_{50} 24 h fosse menor que 250 $\mu\text{g/mL}$ (MORTADA et al., 2011).

4 RESULTADOS

4.1 Preparação e caracterização dos extratos

4.1.1 Preparação dos extratos

A extração das colônias dos corais das espécies *T. coccinea* (665 g) e *T. tagusensis* (666 g) realizada com metanol originou extratos brutos com massas de 11,0 g e 9,6 g, respectivamente. O rendimento calculado foi de 1,65% para *T. coccinea* e 1,44% para *T. tagusensis* (Tabela 1).

Tabela 1: Rendimento dos extratos

Espécie	Peso das colônias (g)	Peso do extrato (g)	Rendimento(%)
<i>T. coccinea</i>	665	11,0	1,65
<i>T. tagusensis</i>	666	9,6	1,44

4.1.2 Espectros de absorção UV/VIS

Os espectros de absorção ultravioleta e visível (Figura 4) foram realizados para caracterização dos extratos. Observamos que o extrato metanólico de *T. coccinea* apresentou uma maior absorção em comparação ao de *T. tagusensis*, evidenciando que a primeira possui maior concentração das substâncias absorptivas a partir de 290 nm. O perfil das curvas foi semelhante, com absorção nos comprimentos de onda na faixa do ultravioleta, sendo os principais picos no UVC para ambos os extratos (230 e 280 nm) e no UVA para *T. coccinea* (350 e 390 nm) e para *T. tagusensis* (340 e 370 nm). As absorções encontradas são características de alcaloides, como o Tubastrindole A2 (284 e 294 nm) e Aplysinopisin (387 nm) descritas em *Tubastraea sp.* (IWAGAWA et al., 2003).

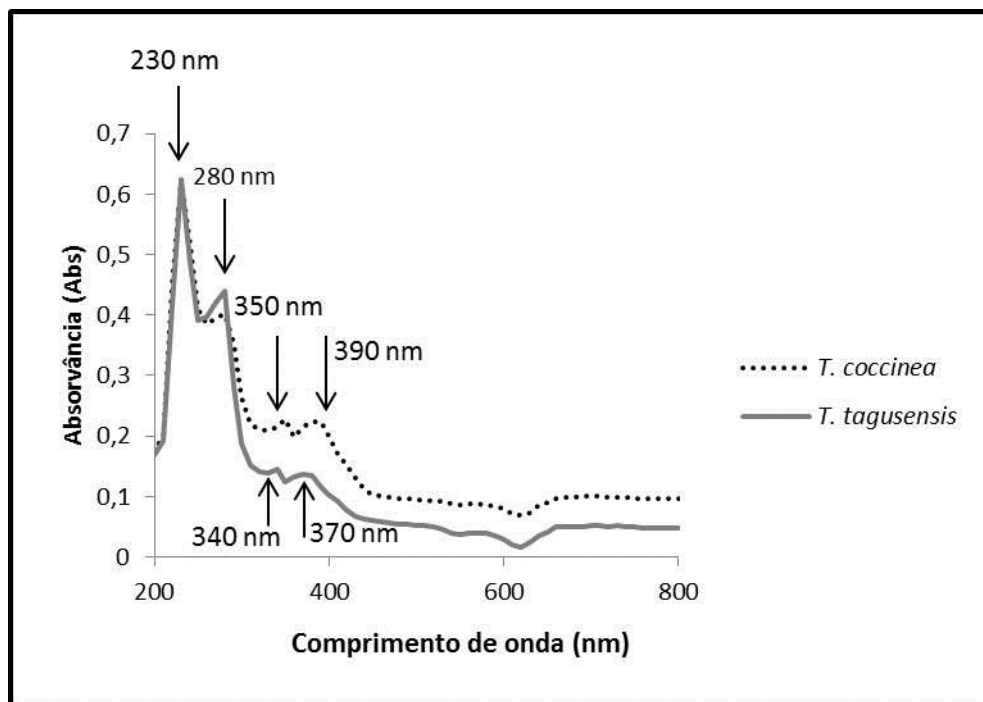


Figura 4: Espectros de absorção de UV/VIS em função do comprimento de onda. As amostras foram diluídas em acetonitrila (CH_3CN): água (H_2O) na proporção de 5:1 (v/v) na concentração de 0,1 mg/mL. A linha tracejada representa o extrato metanólico da espécie *T. coccinea* e a linha contínua representa *T. tagusensis*.

4.1.3 Espectro infravermelho

Os espectros dos extratos de *T. tagusensis* e *T. coccinea* (Figuras 5 e 6) na faixa do infravermelho foram semelhantes evidenciando que a composição dos mesmos parece similar. Os espectros de infravermelho foram analisados buscando os grupos funcionais presentes, com base nos fluxogramas e tabelas publicados nos trabalhos de Silverstein et al. (1994), Coates (2000) e Lopes e Fascio (2004).

A presença de absorção em 1633 cm^{-1} indica a presença de uma ligação $\text{C}=\text{O}$, esta adicionada aos picos encontrados entre $3200\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ representa a possível presença de uma hidroxila, formando um ácido carboxílico. Como o material utilizado foi um extrato composto de inúmeras substâncias, podemos inferir que existam outros possíveis compostos ligados a $\text{C}=\text{O}$, as quais podem ser amida primária ou secundária, representada pelo estiramento forte a médio em $3391\text{-}3390\text{ cm}^{-1}$ ou, amida terciária devido ao estiramento forte

entre 1700 e 1630 (1633 cm^{-1}). As frequências entre 1055 e 1000 (1054) e entre 1005 e 925 (932 e 981) indicam vibrações do anel ciclohexano.

O estiramento de forte a médio encontrado em $3391\text{-}3390\text{ cm}^{-1}$ também pode indicar a presença de outro grupo nitrogenado podendo ser amina primária (dubleto) ou amina secundária (singleto), enquanto que o estiramento de forte a médio de $1230\text{-}1030$ (1054 , 1090 e 1091 cm^{-1}) representa uma possível alquil-amina.

Outro grupo funcional presente nas amostras é o grupamento álcool devido ao somatório dos estiramentos fortes encontrados entre 1000 e 1300 (1239 , 1091 e 1054 cm^{-1}), entre 3650 e 3100 ($3391/3390\text{ cm}^{-1}$) e os pontos de absorção localizados em 1054 e 1091 , significando a presença de álcoois primário e secundário, respectivamente.

Podemos ainda inferir a presença de cadeias carbônicas com trechos saturados e insaturados, pelos estiramentos de forte a médio encontrados entre $3000\text{-}2840$ (2959 , 2925 e 2852 cm^{-1}) com o pico em 1488 e 1633 , respectivamente. Por fim os picos encontrados entre 1400 e 500 indicam a presença de haletos de alquila, sendo os halogênios presentes são o flúor (1091 cm^{-1} e 1054 cm^{-1}) e bromo (622 cm^{-1}).

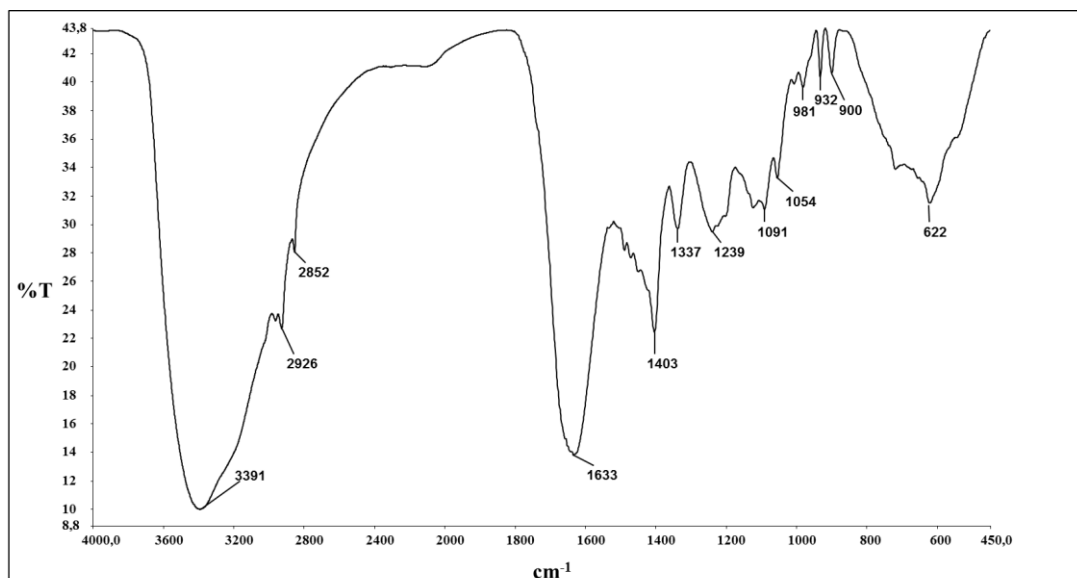


Figura 5: Espectro de absorção no infravermelho (FTIR) do extrato metanólico de *T. coccinea*, depositado sob janela de KBr (filme seco).

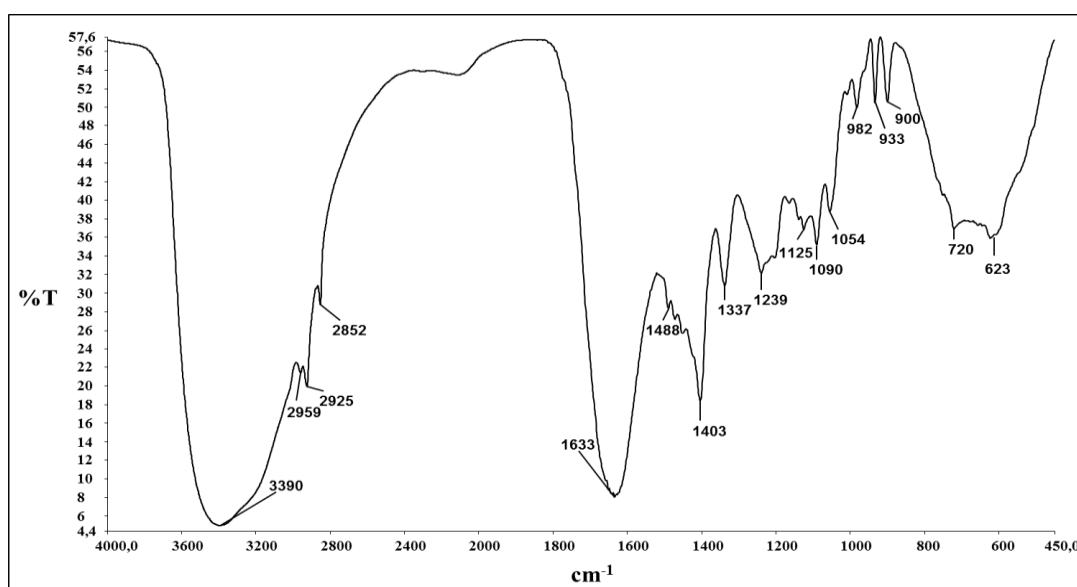


Figura 6: Espectro de absorção no infravermelho (FTIR) do extrato metanólico de *T. tagusensis*, depositado sob janela de KBr (filme seco).

4.1.4 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O eluente que apresentou a melhor separação das bandas foi o acetato de etila:hexano (1:1 v/v) de baixa polaridade (Figura 7A), seguido pelo acetato de etila: metanol (19:1 v/v) com polaridade intermediária (Figura 7B) e o diclorometano:metanol (9:1 v/v) (Figura 7C)

com característica polar. As bandas na revelação com ácido sulfúrico e vanilina podem indicar a presença de terpenoides na amostra.

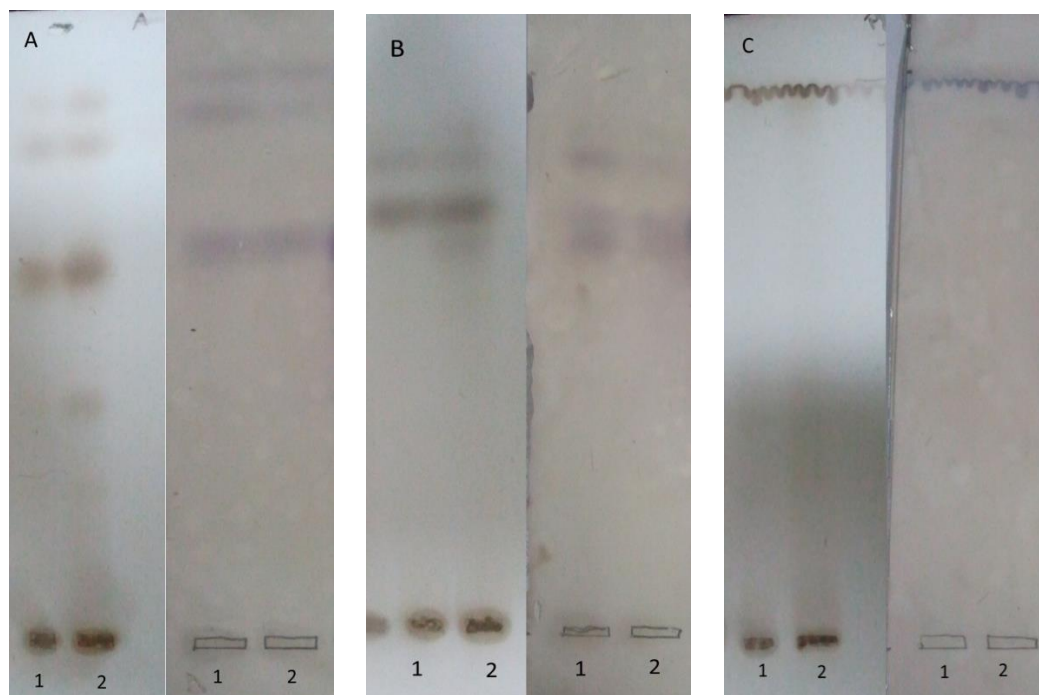


Figura 7: Perfil cromatográfico dos extratos 1- *T. coccinea* e 2- *T. tagusensis* por CCD. A cromatografia foi desenvolvida com os eluentes A (acetato de etila:hexano 1:1 v/v); B (acetato de etila: metanol 19:1 v/v) e C (metanol:diclorometano 1:9 v/v) A revelação foi realizada com sulfato cérico (esquerda) e com ácido sulfúrico 1% e vanilina 1% (direita).

4.1.5 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH

O resultado da atividade antioxidante está representado nas Figuras 8 e 9. Da observação das mesmas pode-se perceber que os extratos de *T. coccinea* e *T. tagusensis* apresentaram um comportamento semelhante ao BHT até a concentração de 0,5 mg/mL.

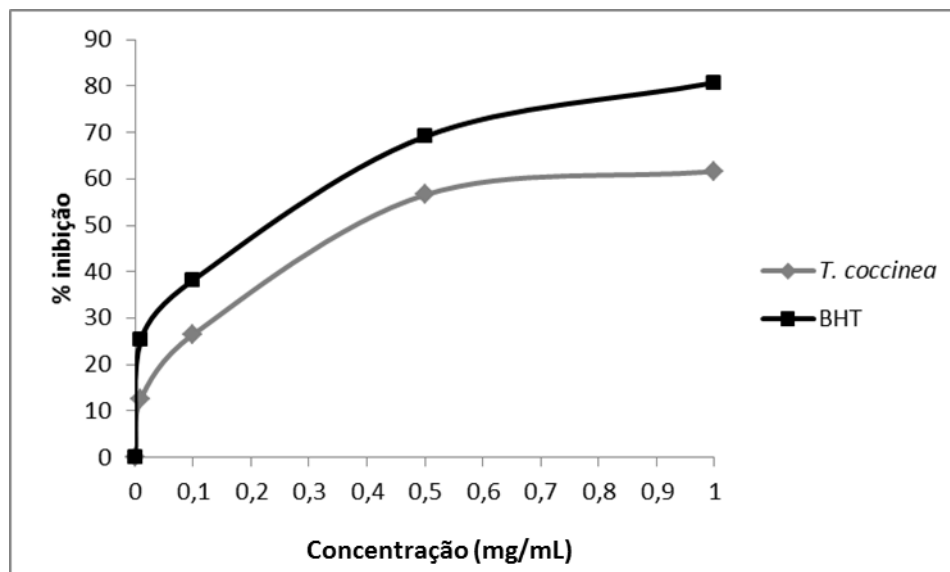


Figura 8: Atividade sequestrante de radical DPPH do extrato de *T. coccinea* e do BHT. Os resultados são expressos em porcentagem de inibição da forma radicalar do DPPH.

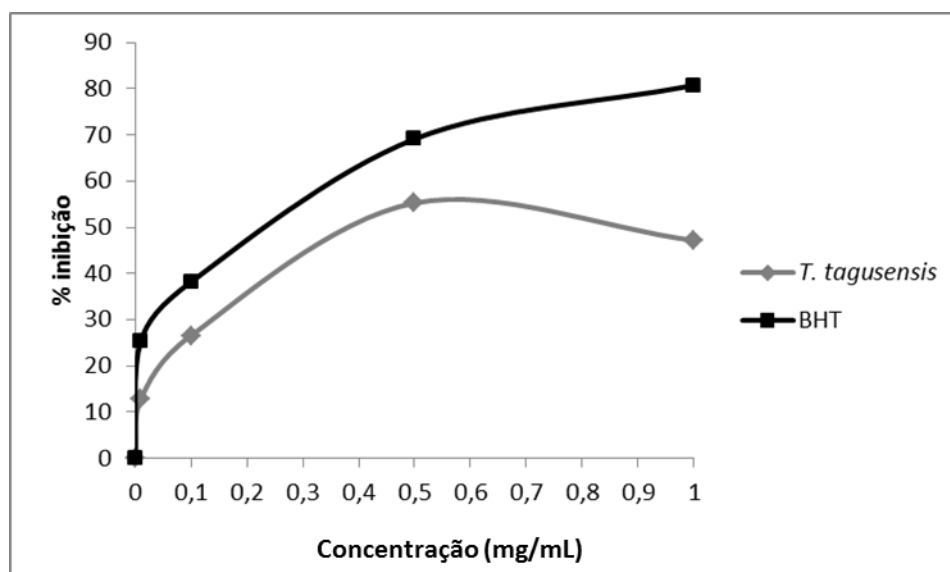


Figura 9: Atividade sequestrante de radical DPPH do extrato de *T. tagusensis* e do BHT. Os resultados são expressos em porcentagem de inibição da forma radicalar do DPPH.

As porcentagens de inibição da forma radicalar para os extratos de *T. coccinea* e *T. tagusensis* são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Porcentagem de inibição da forma radicalar do DPPH a 517 nm.

Concentração (mg/mL)	% inibição		
	BHT	<i>T. coccinea</i>	<i>T. tagusensis</i>
0,01	25,3	12,6	12,8
0,1	38,2	26,5	26,6
0,5	69,1	56,5	55,3
1,0	80,7	61,6	47,1

4.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Os extratos metanólicos das espécies *T. coccinea* e *T. tagusensis* apresentaram atividade anti-inflamatória em camundongos tratados no modelo de edema de pata induzido por carragenina (6 mg/mL). As concentrações testadas geraram redução no índice de edema, segundo a fórmula 2, duas horas após a indução (t_2) em relação a t_0 ($p < 0,05$) (Figuras 10a e 10b).

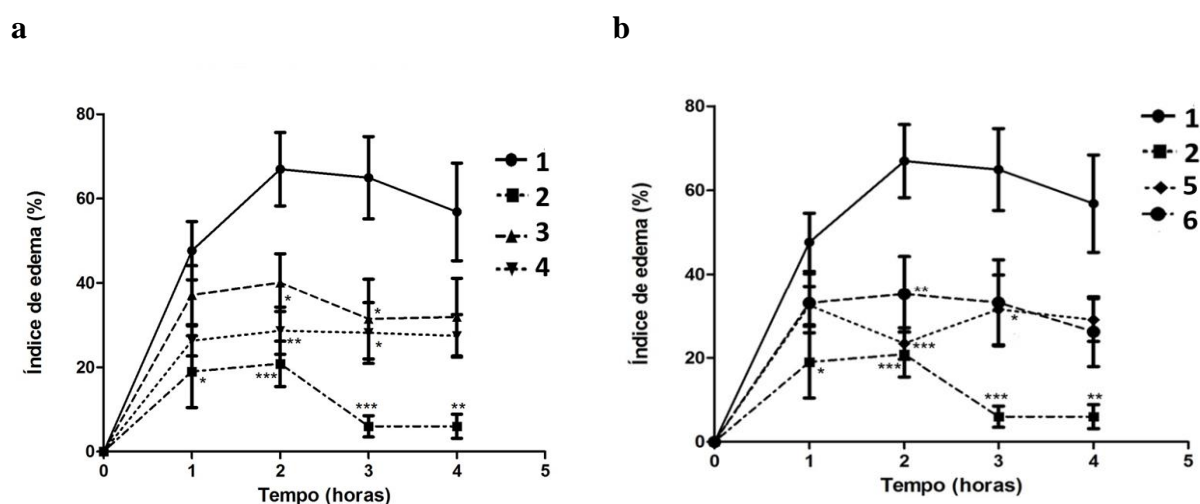


Figura 10 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações dos extratos de *T. coccinea* (a) e *T. tagusensis* (b) no modelo de edema de pata de camundongo induzido por carragenina. 1- controle negativo (DMSO); 2 - tratados com indometacina (10 mg/kg); 3 - *T. coccinea* (20 mg/kg); 4 - *T. coccinea* (200 mg/kg); 5 - *T. tagusensis* (20 mg/kg); 6 - *T. tagusensis* (200 mg/kg). Os resultados ($n = 5$ /grupo) representam a média \pm DP de três experimentos independentes, expressos através do índice de edema. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett's (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), em relação ao grupo controle com carragenina.

Na Tabela 3 podem ser observadas as porcentagens de inibição do edema (2 h), quando comparados ao controle tratado apenas com o veículo. O extrato de *T. coccinea* apresentou porcentagem de inibição de 44,89% e 55,15%, nas concentrações de 20 mg/kg e 200 mg/kg, respectivamente. O extrato de *T. tagusensis* apresentou porcentagem de inibição de 64,13% e 47,82% nas concentrações de 20 mg/kg e 200 mg/kg, respectivamente. Os animais tratados com a droga controle, indometacina, apresentaram inibição de 62,61%. Não foi observada diferença significativa entre os extratos.

Tabela 3: Porcentagem de inibição do edema de pata de camundongos induzido por carragenina T₂ (2 h).

% Inibição 2 h				
Indometacina	<i>T. coccinea</i> 20 mg/kg	<i>T. coccinea</i> 200 mg/kg	<i>T. tagusensis</i> 20 mg/kg	<i>T. tagusensis</i> 200 mg/kg
62,61	44,89	55,15	64,13	47,82

4.3 Ensaios toxicológicos

4.3.1 Ensaio de reversão Samonella/microsoma

Os resultados do ensaio de reversão *Samonella*/microsoma, utilizando-se as linhagens padrão sugeridas por Maron e Ames (1983) e Mortelmans e Zeiger (2000) na presença e na ausência de metabolização exógena S9 mix estão representados nas Tabelas 4 e 5.

Os extratos de *T. coccinea* e *T. tagusensis* não apresentaram efeito mutagênico na ausência de metabolização exógena para as linhagens TA97, TA98, TA100 e TA102. Em relação à sobrevivência, foi observada mortalidade maior que 30% na linhagem TA100 para o extrato de *T. coccinea* a 50 µg/placa.

Na presença de S9 mix, não foi observado efeito mutagênico e citotóxico para as linhagens TA97, TA100 e TA102 em nenhum dos extratos analisados. Entretanto, para a

cepa TA98 foi observado efeito citotóxico nas menores concentrações dos extratos de *T. coccinea* (50 µg/placa e 250 µg/placa) e *T. tagusensis* (exceto 5000 µg/placa). Quanto à resposta mutagênica essa pode ser observada na cepa TA98 para o extrato de *T. coccinea* na concentração de 2500 µg/placa.

Tabela 4: Número de colônias revertentes por placa e sobrevivência de cepas de *Salmonella typhimurium* na presença dos extratos de *T. coccinea* no ensaio de reversão *Samonella*/microsoma na ausência (-S9) e na presença (+S9) de ativação metabólica exógena com S9 mix.

Cepa	µg/placa	- S9			+ S9		
		I.M.	Rev. ± D.P.	Sob. %	I.M.	Rev. ± D.P.	Sob. %
TA97	0	1,0	135 ± 2	100,0	1,0	2234 ± 11	100,0
	50	1,0	135 ± 2	75,9	1,3	294 ± 3	100,0
	250	1,1	146 ± 10	87,4	1,3	291 ± 3	100,0
	500	1,2	156 ± 1	100,0	1,3	286 ± 9	100,0
	2500	1,1	145 ± 3	82,3	1,2	272 ± 15	100,0
	5000	0,6	80 ± 7	99,0	1,4	319 ± 3	100,0
	4NQO/2AA	9,4*	1276 ± 40	100,0	2,6*	586 ± 11	100,0
TA98	0	1,0	26 ± 5	100,0	1,0	22 ± 7	100,0
	50	0,8	21 ± 11	71,2	0,8	17 ± 7	30,4*
	250	0,9	24 ± 3	76,7	1,3	29 ± 5	62,1*
	500	0,9	24 ± 1	100,0	1,8	41 ± 7	85,1
	2500	0,9	24 ± 6	100,0	2,4*	52 ± 6	82,6
	5000	1,0	27 ± 3	100,0	1,8	39 ± 5	78,9
	4NQO/2AA	25,9*	712 ± 40	100,0	6,9*	152 ± 1	100,0
TA100	0	1,0	200 ± 11	100,0	1,0	112 ± 9	100,0
	50	0,9	181 ± 211	69,0*	1,1	128 ± 1	100,0
	250	1,0	207 ± 21	100,0	1,1	127 ± 6	100,0
	500	1,0	210 ± 28	93,1	1,2	139 ± 4	100,0
	2500	1,1	213 ± 13	100,0	1,2	135 ± 7	96,4
	5000	1,1	230 ± 12	100,0	1,2	135 ± 5	96,0
	AS/2AA	3,2*	641 ± 32	100,0	6,4*	718 ± 20	100,0
TA102	0	1,0	581 ± 9	100,0	1,0	160 ± 6	100,0
	50	1,0	563 ± 13	100,0	1,3	209 ± 15	75,9
	250	1,0	568 ± 28	100,0	1,5	237 ± 20	100,0
	500	1,0	585 ± 31	100,0	1,5	238 ± 22	100,0
	2500	1,0	591 ± 13	100,0	1,5	238 ± 14	100,0
	5000	1,0	606 ± 15	74,2	1,7	265 ± 6	100,0
	Mit C/2AA	7,5*	4368 ± 57	100,0	2,0*	328 ± 6	100,0

Valores expressos em média e desvio padrão (DP) de triplicatas; I.M.: índice mutagênico em relação ao controle negativo (DMSO); Sob.: sobrevivência; Rev.: número de colônias revertentes; - S9 (4NQO - 4-nitroquinolina-1-óxido, 10 µg/placa; AS - Azida sódica, 5 µg/placa; Mit C - mitomicina C, 10 µg/placa; +S9 (2AA - 2-amino-antraceno, 10 µg/placa); *Diferença significativa ($p < 0,05$) no test t ; Indicação em **negrito** dos resultados quando I.M. ≥ 2 e sobrevivência celular $< 70\%$.

Tabela 5: Número de colônias revertentes por placa e sobrevivência de cepas de *Salmonella typhimurium* na presença dos extratos de *T. tagusensis* no ensaio de reversão *Samonella*/microsossoma na ausência (-S9) e na presença (+S9) de ativação metabólica exógena com S9 mix.

Cepa	µg/placa	- S9			+ S9		
		I.M.	Rev. ± D.P.	Sob. %	I.M.	Rev. ± D.P.	Sob. %
TA97	0	1,0	108 ± 6	100,0	1,0	223 ± 11	100,0
	50	1,0	107 ± 6	100,0	1,3	284 ± 2	100,0
	250	1,0	112 ± 10	100,0	1,4	318 ± 8	100,0
	500	1,2	127 ± 10	100,0	1,5	346 ± 7	100,0
	2500	1,0	105 ± 4	100,0	1,5	332 ± 8	82,8
	5000	1,0	107 ± 6	100,0	1,5	331 ± 8	100,0
	4NQO/2AA	8,3*	901 ± 57	100,0	3,0*	668 ± 224	100,0
TA98	0	1,0	47 ± 4	100,0	1,0	25,5 ± 3	100,0
	50	1,2	57 ± 1	90,1	1,3	34,0 ± 3	28,6*
	250	1,3	63 ± 2	99,7	1,3	33,0 ± 4	40,4*
	500	1,3	62 ± 3	100,0	1,2	30,0 ± 1	34,8*
	2500	1,5	71 ± 11	100,0	1,0	25,0 ± 16	67,1*
	5000	1,2	56 ± 2	100,0	1,3	33,3 ± 4	90,1
	4NQO/2AA	13,7*	643 ± 1	98,4	6,0*	152,5 ± 1	100,0
TA100	0	1,0	160 ± 13	100,0	1,0	112 ± 10	100,0
	50	1,1	170 ± 10	100,0	1,0	115 ± 19	100,0
	250	1,1	174 ± 5	98,2	1,1	118 ± 14	100,0
	500	1,1	185 ± 13	100,0	1,1	123 ± 16	100,0
	2500	1,2	189 ± 8	100,0	1,0	115 ± 32	100,0
	5000	1,2	197 ± 10	100,0	1,1	123 ± 14	82,2
	AS/2AA	2,9*	476 ± 24	100,0	6,4*	718 ± 20	100,0
TA102	0	1,0	487 ± 3	100,0	1,0	160 ± 6	100,0
	50	1,0	489 ± 27	100,0	1,5	245 ± 3	100,0
	250	1,2	570 ± 16	100,0	1,4	221 ± 26	100,0
	500	1,2	589 ± 8	100,0	1,3	208 ± 23	100,0
	2500	1,1	534 ± 29	100,0	1,3	208 ± 42	100,0
	5000	1,1	542 ± 20	96,6	1,0	165 ± 4	100,0
	Mit C/2AA	5,4*	2620 ± 99	100,0	2,0*	328 ± 6	100,0

Valores expressos em média e desvio padrão (DP) de triplicatas; I.M.: índice mutagênico em relação ao controle negativo (DMSO); Sob.: sobrevivência; Rev.: número de colônias revertentes; - S9 (4NQO - 4-nitroquinolina-1-óxido, 10 µg/placa; AS - azida sódica, 5 µg/placa; Mit C - mitomicina C, 10 µg/placa; +S9 (2AA - 2-amino-antraceno, 10 µg/placa); *Diferença significativa ($p < 0,05$) no test t ; Indicação em **negrito** dos resultados quando I.M. ≥ 2 e sobrevivência celular $< 70\%$.

4.3.2 Teste *in vitro* de micronúcleo com células de mamíferos (macrófago RAW 264.7)

Os extratos metanólicos de *T. coccinea* e *T. tagusensis* foram avaliados quanto à genotoxicidade utilizando o teste *in vitro* de micronúcleo com macrófago RAW 264.7.

O extrato de *T. coccinea* reduziu, em relação ao controle negativo, a formação de micronúcleos na menor concentração (0,5 mg/mL, $p < 0,05$). No entanto, a citotoxicidade aumentou, em especial pelo processo de apoptose (5 mg/mL, $p < 0,05$) e de necrose ($p < 0,05$) em todas as concentrações. Observou-se diminuição de células em divisão ($p < 0,05$) na concentração 5 mg/mL (Tabela 6).

O extrato de *T. tagusensis* reduziu a formação de micronúcleos na concentração intermediária (5 mg/mL, $p < 0,05$). Observou-se aumento no número de células em apoptose ($p < 0,05$) em todas as concentrações, e em necrose ($p < 0,05$) exceto na concentração 5 mg/mL. Foi encontrado aumento no número de células em divisão na maior concentração testada (5 mg/mL, $p < 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6: Teste *in vitro* de micronúcleo com macrófagos RAW 264.7 para os extratos metanólicos de *T. coccinea* e *T. tagusensis*

Solução-teste	mg/mL	% MN \pm D.P.	% Apop. \pm D.P.	% Nocr. \pm D.P.	% Mit. \pm D.P.	% Sob
DMSO	-	4,51 \pm 1,05	0,64 \pm 0,41	2,64 \pm 0,66	10,81 \pm 1,54	96,73
MNNG 0,5 μ M	-	11,05 \pm 2,90*	2,01 \pm 0,67*	4,04 \pm 1,15*	8,84 \pm 0,97*	93,95*
<i>T. coccinea</i>	0,5	2,19 \pm 0,49*	1,01 \pm 0,44	4,16 \pm 0,95*	11,02 \pm 3,89	94,83*
	5	4,54 \pm 1,04	2,08 \pm 0,75*	3,68 \pm 0,50*	14,29 \pm 2,72*	94,24*
	50	3,60 \pm 1,37	1,91 \pm 0,34	4,57 \pm 1,97*	10,15 \pm 2,05	93,52*
<i>T. tagusensis</i>	0,5	5,69 \pm 1,94	1,68 \pm 0,94*	3,47 \pm 0,88*	12,61 \pm 2,52	94,84*
	5	3,34 \pm 1,57*	2,37 \pm 0,68*	2,55 \pm 0,40	10,94 \pm 1,03	95,08*
	50	4,96 \pm 2,15	3,0 \pm 1,49*	4,78 \pm 1,98*	12,93 \pm 0,26*	92,22*

Valores expressos em média e desvio padrão (D.P.) das quintuplicatas; MN – células micronucleadas; Apop. - Apoptose; Nocr. - necrose; Mit. - Mitose; Sob - Sobrevivência; DP: desvio padrão; MNNG: 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina; *Diferença significativa ($p < 0,05$) no teste *t*, em relação ao controle negativo (DMSO).

4.3.3 Ensaio de toxicidade com o microcrustáceo *Artemia salina*

Os extratos de *T. coccinea* e *T. tagusensis* não demonstraram propriedades citotóxicas contra as larvas de *Artemia salina* em 24 h, em nenhuma das concentrações testadas. As porcentagens de sobrevivência estão representadas na Tabela 8. Não foi possível calcular o CL₅₀ por não ter havido morte de 50% das larvas em nenhuma das concentrações testadas (0,001 – 1000 µg/ml).

Tabela 7: Porcentagem de sobrevivência dos náuplius de *Artemia salina* na presença dos extratos após 24 horas de incubação.

Concentração do extrato (µg/mL)	% de sobrevivência	
	<i>T. coccinea</i>	<i>T. tagusensis</i>
Controle negativo*	100	100
0,001	100	100
0,01	100	100
0,1	100	100
1,0	100	100
10	100	100
100	100	96,6
1000	93,3	73,3

*O controle negativo foi preparado com água de diluição com DMSO a 0,8%.

5 DISCUSSÃO

Em revisão recente sobre o status mundial da pesquisa dos produtos naturais marinhos, Blunt et al. (2011) descreveram a descoberta de 1011 novos compostos, citados em 352 artigos para o ano de 2009. A presença de empresas dedicadas à pesquisa dos recursos marinhos como fontes de fármacos demonstra que existe o interesse do mercado.

Dados da literatura demonstram que os corais esclerátíneos são capazes de produzir metabólitos secundários, inclusive com função ecológica (FUSETANI et al., 1986; BAE et al., 2000; KOH; SWEATMAN 2000; TARRANT et al., 2003; LAGES et al., 2010; ROCHA et al., 2011; LAGES et al., 2012).

Lages et al. (2010) demonstraram que os extratos metanólicos de *T. tagusensis* e *T. coccinea* produzem substâncias químicas com função defensiva contra a predação por peixes generalistas e contra a incrustação de competidores. A presença predominante da espécie *T. tagusensis* na região de Ilha Grande pode estar relacionada à sua natureza química agressiva. Em outro estudo, Lages et al. (2012) demonstraram que essas espécies são competitivamente dominantes sobre a espécie de coral endêmico *Mussismilia hispida*, com a proximidade desses corais podendo gerar necrose nos tecidos da espécie nativa.

Do ponto de vista farmacológico, alguns estudos têm demonstrado que espécies do gênero *Tubastraea* são capazes de produzir substâncias bioativas. Fusetani et al. (1986) isolaram a substância aplysinopsina do coral *T. aurea*. Essa substância foi capaz de inibir a divisão celular em ovos fertilizados de ouriço (*Hernicentrotus pulcherrimus*) podendo ser usada pelo coral nos mecanismos de defesa contra microrganismos. Koh (1997) demonstrou que *T. faukneri* produz compostos com ação antimicrobiana. Essa espécie também produz compostos tóxicos a corais competidores, inibindo seu assentamento e crescimento (KOH; SWEATMAN, 2000). Outro composto isolado de *Tubastraea sp.*, o alcalóide Cicloaplysinopsina C com ação antimicrobiana, foi capaz de inibir o crescimento de duas linhagens de *Tripanosoma falciparum* (MEYER et al., 2009).

Os compostos bioativos encontrados no ambiente marinho incluem esteróis, terpenóides, isoprenoides, alcalóides, quinonas, compostos bromados, compostos heterocíclicos de nitrogênio e nitrogênio-enxofre, e toxinas (ABAD; BERMEJO, 2001; BHAKUNI; RAWAT, 2005). Destes, já foi descrito que os corais esclerátíneos são recursos

de derivados de antraquinonas, sesteterpenos, fenois, alcalóides, macrolides e acetilenos (BAE et al., 2000; ALAM et al., 2001 a e b; IWAGAWA et al., 2003).

Os perfis espectroscópicos de UV/VIS e infravermelho fornecem dados para a identificação de compostos. Os espectros originários de misturas complexas são considerados a soma dos espectros dos componentes individuais (VOGEL et al., 1989; COATES, 2000; LOPES; FASCIO, 2004; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005; VINADÉ; VINADÉ, 2005).

Lages et al. (2012) observaram que a fração orgânica dos extratos metanólicos de *T. coccinea* e *T. tagusensis* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, continham 28 e 26 substâncias, respectivamente, sendo encontrados esteróis, ácidos graxos, hidrocarbonetos, alcalóides, ésteres e álcoois. Os grupos funcionais presentes nos compostos descritos são coincidentes com os encontrados na análise dos espectros IV e UV/VIS, incluindo a presença dos alcalóides indólicos bromados. As absorções na região do UV sugerem a presença de cromóforos indólicos. Segundo Bialonska e Zjawiony (2009), metade dos compostos derivados do alcalóide aplyonopsina, característicos dos corais escleractíneos, são halogenados com bromo (IWAGAWA et al., 2003).

Os nossos dados mostram (Figura 7) que as amostras analisadas também podem possuir terpenóides na sua composição. Esses compostos possuem diversidade química e propriedades fisiológicas interessantes, representando 61% dos casos de compostos bioativos de cnidários (FONTANA, 1998; ROCHA et al., 2011). Fontana (1998) mostrou que o hexacoral *Cladocora cespitosa* contem sesteterpenos associados com atividade anti-inflamatória, que foi relacionada à inibição da fosfolipase A₂. Tubastrina, um alcalóide isolado da ascídia *Aplidium orthium*, também encontrado em *T. aurea* (SAKAI, 1987) possui ação anti-inflamatória, com inibição de radical superóxido (NORRIE PEARCE et al., 2008).

Alguns trabalhos têm demonstrado que substâncias extraídas de cnidários apresentam atividade inibidora da produção de superóxido, redução da expressão da oxido nítrico sintetase induzível (iNOS), inibição na liberação de fator de necrose tumoral – α (TNF- α) e Interleucina-8 (IL-8), entre outros mecanismos (NORRIE PEARCE et al., 2008; BIALONSKA; ZJAWIONY, 2009; BLUNT et al., 2011; FESTA et al., 2012).

Os extratos estudados apresentaram um comportamento captador de radicais semelhante ao BHT, um antioxidante sintético, no ensaio de atividade com DPPH (Figuras 8 e 9). A capacidade sequestrante de radicais livres pode estar envolvida nas atividades anti-inflamatória, anticancerígena e cicatrizante (ASSIMOPOULOU; SINAKOS; PAPAGEORGIU, 2005; AMDEKAR, 2012).

A inflamação aguda é bifásica, a primeira fase inicia-se com a liberação de histamina, serotonina e quininas, após a administração do agente inflamatório até poucas horas. Os níveis de substância P também ficam aumentados após 15 minutos da indução do edema até a segunda hora do processo inflamatório. A segunda fase está relacionada com a liberação de prostaglandinas entre duas e três horas (CASTARDO et al., 2008; AMDEKAR et al., 2012).

Os extratos de *T. coccinea* e *T. tagusensis* apresentaram ação anti-inflamatória no modelo de edema de pata de camundongo induzido por carragenina, a partir de duas horas da aplicação desse agente, o que evidencia a participação do extrato na segunda fase da resposta inflamatória (Figura 10). O extrato que apresentou as maiores porcentagens de inibição foi o da espécie *T. coccinea* (Tabela 2).

Doenças inflamatórias, como artrite e asma, são associadas com a infiltração de neutrófilos e a produção subsequente de danos causados por superóxido. Portanto, a inibição da produção de superóxido pelos neutrófilos é uma alternativa no combate da resposta inflamatória aguda (NORRIE PEARCE et al., 2007a). Outra espécie reativa importante no processo inflamatório é o óxido nítrico, o qual inibe a produção de agentes pró-inflamatórios levando a efeitos anti-inflamatórios. No entanto, sua produção contínua juntamente com a do superóxido pode levar a efeitos deletérios (CORREA et al., 2009).

Alguns estudos indicam a importância das espécies reativas na realização da reação inflamatória e também o potencial terapêutico da mistura de antioxidantes para reduzir a inflamação, a expressão de COX-2, iNOS e os níveis de estresse oxidativo através da indução de apoptose em células inflamatórias (JOHAR et al., 2004).

Sugerimos que provavelmente a via de inibição do processo inflamatório observado se dá pela inibição de COX, conforme descrito por Amdekar et al. (2012). Assim, pode haver relação entre as atividades anti-inflamatória e captadora de radicais dos extratos analisados nesse trabalho.

Dos compostos encontrados nos extratos de *T. coccinea* e *T. tagusensis* descritos em Lages et al. (2010) e Lages et al. (2012), foi reportado que 1-H-indol-3-carboxaldeído apresentou mutagenicidade para as linhagens TA98 (0-1,8 µmol/placa, -S9; 0-1,8 µmol/placa, + S9) e TA100 (0-1,0 µmol/placa, -S9; 0-1,8 µmol/placa, + S9), na ausência e presença de metabolização exógena, no ensaio de incorporação em placa (HRELIA et al., 1993). A TA98 é utilizada para a detecção de agentes que geram alteração no quadro de leitura pela adição ou deleção de pares de base G-C e a TA100 para substâncias capazes de induzir metilação e causar substituição de pares de bases G-C (MORTELMANS; ZEIGER,

2000; AIUB; FELZENSZWALB, 2011). Assim, sugerimos que o 1-H-indol-3-carboxaldeído seja o possível responsável pela atividade mutagênica e citotóxica encontrada (Tabelas 4 e 5).

As respostas positivas no ensaio *Salmonella*/microsoma foram encontradas nas menores concentrações, esse fato pode estar relacionado ao possível efeito antagônico das substâncias presentes nos extratos nas maiores concentrações.

Apesar do resultado mutagênico encontrado, os extratos não apresentaram atividade genotóxica no ensaio *in vitro* de micronúcleo com macrófagos RAW 264.7 (Tabela 6 e 7), não sendo observado aumento significativo na formação de células micronucleadas, necrose, apoptose celular e em divisão celular.

O ensaio de mortalidade do microcrustáceo *Artemia salina* tem sido utilizado nos últimos 30 anos como ferramenta para avaliar citotoxicidade, assim como para a detecção de atividade antitumoral de compostos naturais, sendo fundamental na descoberta de uma série de produtos naturais atualmente em testes pré-clínicos como anticancerígenos (CARBALLO et al., 2002; SENG et al., 2007). Essa correlação pode ser realizada pela *A. salina* apresentar o mesmo metabolismo de purinas que as células de mamíferos. Apesar disso, as substâncias que requerem ativação metabólica no fígado não podem ser detectadas por esse ensaio (SHARIFIFAR et al., 2009). Os extratos metanólicos de *T. coccinea* e *T. tagusensis* não apresentaram propriedades citotóxicas contra as larvas de *Artemia salina* em 24 horas, em nenhuma das concentrações testadas (Tabela 8). Esse resultado demonstra que os extratos não possuem substâncias citotóxicas corroborando os resultados encontrados no experimento de citotoxicidade do ensaio *Salmonella*/microsoma, na ausência de metabolização exógena, e no ensaio de micronúcleo, uma vez que as células usadas não são metabolicamente competentes.

Os resultados sugerem que os extratos das espécies *T. coccinea* e *T. tagusensis* apresentam substâncias com potencial uso farmacológico, como agente anti-inflamatório e no combate de radicais livres, estando as suas concentrações limitadas para uso farmacológico até a maior concentração não mutagênica observada.

6 CONCLUSÃO

- Foi possível a distinção dos grupos químicos presentes nos extratos metanólicos obtidos dos corais *Tubastraea coccinea* e *Tubastraea tagusensis*, com os resultados encontrados sendo corroborados com os presentes na literatura;
- O tratamento com os extratos de *T. coccinea* e *T. tagusensis* foi capaz de reduzir o índice de edema no modelo de inflamação aguda, demonstrando ação anti-inflamatória *in vivo*;
- Os extratos metanólicos de *Tubastraea coccinea* e *Tubastraea tagusensis* apresentaram ação antioxidante, devido à capacidade sequestrante do radical DPPH;
- O extrato de *T. coccinea* apresentou atividade citotóxica na ausência de metabolização exógena para a cepa TA100. Esse mesmo extrato foi citotóxico e mutagênico na linhagem TA98, na presença de metabolização.
- O extrato de *T. tagusensis* apresentou citotoxicidade para a linhagem TA98 na presença de ativação metabólica;
- Os extratos não exibiram efeito genotóxico para a linhagem celular avaliada;
- Os extratos não apresentaram toxicidade contra o microcrustáceo *Artemia salina*;
- Com este trabalho foi possível demonstrar que os extratos metanólicos de *T. coccinea* e *T. tagusensis* possuem substâncias com potencial biotecnológico, com ação anti-inflamatória e antioxidante.

REFERÊNCIAS

ABAD, M. J.; BERMEJO, D. P. Bioactive natural products from marine source. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 25, p. 683-755, 2001.

AIUB, C. A.; PINTO, L. F.; FELZENSZWALB, I. Standardization of conditions for the metabolic activation of *N*-nitrosodiethylamine in mutagenicity tests. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 2, p. 264-272, 2004.

AIUB, C. et al. Genotoxic evaluation of extracts from *Aplysina fulva*, a brazilian marine sponge. **Mutation Research**, v. 611, n. 1-2, p. 34-41, 2006.

AIUB, C. A. F. et al. *N*-nitrosodiethylamine genotoxicity evaluation: a cytochrome P450 induction study in rat hepatocytes. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 2340-2348, 2011.

AIUB, C. A. F.; FELZENSZWALB, I. Os princípios do teste de Ames (*Salmonella*/microsomo) e sua aplicabilidade. **Genética na escola**, v. 6, n.2, p. 11-16, 2011.

ALAM, N. et al. Cytotoxic diacetylenes from the stony coral *Montipora* species. **Journal of Natural Products**, v. 64, p.1059-1063, 2001a.

ALAM, N. et al. Montipyridine, a new pyridinium alkaloid from the stony coral *Montipora* species. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 956-957, 2001b.

ALBERTINI, R. J. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, v. 463, p. 111-172, 2000.

AMDEKAR, S. et al. Anti-inflammatory activity of *Lactobacillus* on carrageenan-induced paw edema in male Wistar rats. **International Journal of Inflammation**, v. 2012, art. ID 752015, v. 1-6, 2012.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v. 350, p. 103-108, 1996.

Agência Nacional de vigilância sanitária - ANVISA, <http://portal.anvisa.gov.br>, acessado em 08 de setembro de 2012.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

ASSIMOPOULOU, A. N.; SINAKOS, Z.; PAPAGEORGIOU, V. P. Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 997-1000, 2005.

BAE, B. H. et al. New acetylenic compounds from the stony coral *Montipora sp.* **Journal of Natural Products**, v.63, p. 1511-1514, 2000.

BARTOLOTTA, S. A. et al. Evaluation of genotoxic biomarkers in extracts of marine sponges from Argentinean South Sea. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 369, p. 144-147, 2009.

BEAUMONT, N. J. et al. Identification, definition and quantification of goods and services provided by marine biodiversity: Implications for the ecosystem approach. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, p. 253-265, 2007.

BERRY, J.P. et al. Pharmacology and toxicology of pahayokolide A, a bioactive metabolite from a freshwater species of *Lyng* by isolated from the Florida Everglades. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 139, p. 231-238, 2004.

BHAKUNI, D. S.; RAWAT, D. S. **Bioactive marine natural products**. Ed. Springer, Índia, 2005.

BHATNAGAR, I; KIM, S. K. Marine antitumor drugs: Status, shortfalls and strategies. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2702-2720, 2010.

BHATNAGAR, I; KIM, S. K. Pharmacologically prospective antibiotic agents and their sources: A marine microbial perspective. **Environmental, toxicology and pharmacology**, v. 34, p. 631-643, 2012.

BIALONSKA, D.; ZJAWIONY, J. K. Aplysinopsins - Marine indole alkaloids: Chemistry, bioactivity and ecological significance. **Marine Drugs**, v. 7, p. 166-183, 2009.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Products Report**, v. 27, n. 165, p. 198-268, 2011.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Caracterização do estado da arte em biotecnologia marinha no Brasil** / Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde, Ministério da Ciência e Tecnologia. – Brasília: Ministério da Saúde, 134 p, 2010.

BULL, A. T.; STACH, J. E. M. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. **Trends in Microbiology**, v.15, n.11, p. 491-499, 2007.

BURGESS, J. G. et al. The development of a marine natural product-based antifouling paint. **Biofouling**, v. 19, p. 197-205, 2003.

CAIRNS, S. D. Scleractinia of the temperate North Pacific. **Smithsonian Contributions to Zoology**, v. 557, 150 pp., 1994.

CAIRNS, S. D. A revision of the shallow-water azooxanthellate Scleractinia of the Western Atlantic. **Studies of Natural History Caribbean**, v. 75, 321 pp., 2000.

CALDWELL, G. S.; BENTLEY, M. G.; OLIVE, P. J. W. The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. **Toxicon**, v. 42, p. 301-306, 2003.

CARBALLO, J. L. et al. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, v. 2, n. 17, p. 1-5, 2002.

CARTÉ, B. K. Marine natural products as a source of novel pharmacological agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v.4, p. 275-279, 1993.

CASTARDO, J.C. et al. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 405-411, 2008.

CASTRO, C. B.; PIRES, D. O. Brazilian coral reefs: What we already know and what is still missing. **Bulletin of Marine Science**, v.69, n. 2, p. 357-371, 2001.

CHANGYUN, W. et al. Chemical defensive substances of soft corals and gorgonians. **Acta Ecologica Sinica**, v. 28, p. 2320-2328, 2008.

CIMINO, M. C. Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purposes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 47, p. 362-390, 2006.

COATES, J. Interpretation of infrared spectra: A practical approach. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, Ed. RA Meyers, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, p. 10815-10837, 2000.

CORREA, H. et al. Anti-inflammatory effects of the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at the Islands of Providencia and San Andrés (SW Caribbean). **Journal of Inflammation**, v. 6, n. 5, p. 1-10, 2009.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Marine organisms from Brazil as source of potential anticancer agents. **Lead molecules from natural products: discovery and new trends**. Eds. M.T.H. Khan and A. Ather, p. 181-195, 2006.

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

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

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

DE PAULA, A. F. Abundância e distribuição espacial do coral invasor *Tubastraea* na Baía da Ilha Grande, RJ e o registro de *T. tagusensis* e *T. coccinea* para o Brasil, Dissertação de mestrado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 87 p., 2002.

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

DHAMIJA, I. et al. Preliminary evaluation of *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* antitumor activity of *Premna herbacea* Roxb. in Ehrlich ascites carcinoma model and Dalton's lymphoma ascites model. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 3, p. 235-242, 2011.

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

EASTMOND, D. A. et al. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. **Mutagenesis**, v. 24, n. 4, p. 341-349, 2009.

EPIFANIO, R. A.; MAIA, L. M. FENICAL, W. Chemical defenses of the endemic Brazilian gorgonian *Lophogorgia violacea* Pallas (Octocorallia, Gorgonacea). **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 11, n. 6, p. 584-591, 2000.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Products Report**, v. 19; p. 1-48, 2002.

FENECH, M. et al. The HUMAN MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, v. 28, p. 271-283, 1999.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 504, p. 131-136, 2002.

FENICAL, W. Natural products chemistry in the marine environment. **Science**, v. 215, n. 4535, p. 923-928, 1982.

FESTA, C. et al. Anti-inflammatory cyclopeptides from the marine sponge *Theonella swinhoei*. **Tetrahedron**, v. 68, p. 2851-2857, 2012.

FONTANA, A.; CIAVATTA, M. L.; CIMINO, G. Cladocoran A and B: Two novel γ -hydroxybutenolide sesterterpenes from the mediterranean coral *Cladocora cespitosa*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 63, p. 2845-2849, 1998.

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

GRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 52 – 60, 1997.

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

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3^a ed. Oxford: Clarendon Press, 1999.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.

HAY, M. E.; FENICAL, W. Chemical ecology and marine biodiversity: Insights and products from the sea. **Oceanography**, v. 9, n. 1, p. 10-20, 1996.

HISEM, D. et al. Cyanobacterial cytotoxicity *versus* toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. **Toxicon**, v. 57, p. 76-83, 2011.

HRELIA, P. et al. Synthesis of a series of 5-nitro-(benzimidazoles and indoles) as novel antimycotics and evaluation as genotoxins in the Ames test. **Mutagenesis**, v. 8, n. 3, p. 183-188, 1993.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). Disponível em <http://www.ich.org>. Acesso em: set. 2012.

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

JAKI, B. et al. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, p. 138-143, 1999.

JOHAR, D. et al. Inflammatory response, reactive oxygen species, programmed (necrotic-like and apoptotic) cell death and cancer. Inflammatory response, reactive oxygen species. **Annales Academiae Medicae Bialostovensis**, v. 49, p. 31-39, 2004.

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

KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature**, v. 4, p. 206-220, 2005.

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

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

LAGADICL, L.; CAQUET, T. Invertebrates in testing of environmental chemicals: Are they alternatives? **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. 2, p. 593-611, 1998.

LAGES, B. G. et al. Chemical defense of an exotic coral as invasion strategy. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 328, p. 127-135, 2006.

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

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

LEVY, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Science**, v. 8, p. 601-606, 1969.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.

LOARCA-PIÑA, G. et al. Antioxidant, antimutagenic, and antidiabetic activities of edible leaves from *Cnidocolus chayamansa* Mc. Vaugh. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 2, p. 68-72, 2010.

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.

LYNCH, A. M. et al. New and emerging technologies for genetic toxicity testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 52, p. 205-223, 2011.

MANGELLI, T. S.; CREED, J. C. Análise comparativa da abundância do coral invasor *Tubastraea spp.* (Cnidaria, Anthozoa) em substratos naturais e artificiais na Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 102, n. 2, p.122-130, 2012.

MARINOVA, G; BATCHVAROV, V. Evaluation of the methods for determination of the free radicals scavenging activity by DPPH. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 17, n. 1, p. 11-24, 2011.

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

MARTINEZ, M. J. A.; DEL OLMO, L. M. B.; BENITO, P. B. Natural marine antiviral products. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 35, p. 101-134, 2008.

MAYER, A. M. S. et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 255-265, 2010.

MCLAUGHLIN, J.; ROGERS, L. L. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 513-524, 1998.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

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

MIAN, P. et al. Biological screening of terrestrial and freshwater cyanobacteria for antimicrobial activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, p. 243-247, 2003.

MICHAEL, A. S.; THOMPSON, C. G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. **Science**, v. 123, p. 464, 1956.

MORTADA et al. Cytotoxic activity of *Vitex trifolia purpurea* extracts. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 41, n. 2, 2011.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29-60, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. **The Practice of Medicinal Chemistry**, p. 91-109, 2003a.

NEWMAN, D. J. et al. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003b.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. **The Practice of Medicinal Chemistry**, p. 159-186, 2008.

NORRIE PEARCE, A. et al. Anti-inflammatory thiazine alkaloids isolated from the New Zealand ascidian *Aplidium sp.*: Inhibitors of the neutrophil respiratory burst in a model of gouty arthritis. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 936-940, 2007a.

NORRIE PEARCE, A. et al. E/Z-Rubrolide O, an Anti-inflammatory halogenated furanone from the New Zealand ascidian *Synoicumn. sp.* **Journal of Natural Products**, v. 70, p.111-113, 2007b.

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

ORDAZ, G. et al. Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de los extractos de tres corales y tres moluscos marinos de Sucre, Venezuela. **Revista de Biología Tropical**, v. 58, n. 2, p. 677-688, 2010.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Disponível em: <http://www.oecd.org>. Acesso em: set. 2012.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD guideline for testing of chemicals: bacterial reverse mutation test, 1997. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation-test_9789264071247-en. Acesso em: set. 2012.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD guideline for testing of chemicals: in vitro mammalian cell micronucleus test, 2010. Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264091016-en. Acesso em: set. 2012.

ORTLEPP et al. Antifouling Activity of Bromotyrosine-Derived Sponge Metabolites and Synthetic Analogues. **Marine Biotechnology**, v. 9, p. 776–785, 2007.

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.

PAZ-GARCÍA, D. A. et al. Larval release from *Tubastraea coccinea* in the Gulf of California, Mexico. **Coral Reefs**, v. 26, p.433, 2007.

PICCARDI, R. et al. Bioactivity in free-living and symbiotic cyanobacteria of the genus *Nostoc*. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 543-547, 2000.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PROKSCH, P.; EDRADA-EBEL, R; EBEL, R. Drugs from the sea - Opportunities and Obstacles. **Marine Drugs**, v. 1, p. 5-17, 2003.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: Uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

QI, S. H. et al. Antifeedant and antifouling briaranes from the south China sea gorgonian *Junceella juncea*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 1, 2009.

RADJASA, O, K. et al. Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: Their biomedical potential and possible production by microbial associants. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 6658-6674, 2011.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5ª ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 904 pp., 2004.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. B. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, p. 1-13, 2003.
ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8ª ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 1480 pp., 2010.

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, p. 1860-1886, 2011.

SAKAI, R.; HIGA, T. Tubastrine, a new guanidino styrene from the coral *Tubastrea aurea*. **Chemistry Letters**, p. 127-128, 1987.

SAMMARCO, P. W.; COLL, J. C. Secondary metabolites or primary? Re-examination of a concept through a marine example. **Proc.8th International Coral Reef Symposium**, v. 2, p. 1245-1250, 1997.

SAMMARCO, P. W.; PORTER, S. A.; CAIRNS, S. D. A new coral species introduced into the Atlantic Ocean - *Tubastraea micranthus* (Ehrenberg 1834) (Cnidaria, Anthozoa, Scleractinia): An invasive threat? **Aquatic Invasions**, v. 5, n. 2, p. 131-140, 2010.

SCHWARTSMANN, G. et al. Marine organisms as a source of new anticancer agents. **Oncology**, v. 2, p. 221-225, 2001.

SENG, A. W. P. et al. Biomedical potentials of intertidal marine organisms from Singapore. **Journal of Coastal Development**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2007.

SHARIFIFAR, F. et al. Bioassay screening of the essential oil and various extracts from 4 spices medicinal plants. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 3, p. 317-322, 2009.

SHEEHY, D. J.; VIK, S. F. The role of constructed reefs in non-indigenous species introductions and range expansions. **Ecological Engineering**, v. 36, p. 1-11, 2010.

SHEU, J. H.; CHANG, K.; DUH, C. A cytotoxic 5R,8R-epidioxysterol from a soft coral *Sinularia* species. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 149-151, 2000.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 69 pp., 1994.

SILVERSTEIN, R. M. ; WEBSTER, F. X. ; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. John Wiley & Sons INC, 5° ed, 502 pp., 2005.

SOTKA, E. E. et al. The emerging role of pharmacology in understanding consumer-prey interactions in marine and freshwater systems. Symposium PharmEcology: A Pharmacological Approach to Understanding Plant-Herbivore Interactions. **Annual Meeting of the Society for Integrative and Comparative Biology**, 2009.

STANKEVICINS, L. et al. Cytotoxic, mutagenic and antimutagenic screening of *Arenosclera brasiliensis* acetone and ethanol extracts. **Genetics and Molecular Research** (on line), v. 7, n. 2, p. 542-548, 2008.

SUTER, W. Predictive value of *in vitro* safety studies. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 362-366, 2006.

TARRANT, A. M. et al. Metabolism of estrogens and androgens by scleractinian corals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 136, p. 473-485, 2003.

VINADÉ, M. E. C.; VINADÉ, E. R. C. **Métodos Espectroscópicos de Análise Quantitativa**, Editora UFSM, Universidade Federal de Santa Maria, 272 pp., 2005.

VOGEL, A. I., FURNISS, B. S. **Textbook of Practical Organic Chemistry**. Longman ed. 877 pp., 1989.

VONKEMAN, H. E.; VAN DE LAAR, M. A. F. J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Adverse effects and their prevention. **Seminars in Arthritis Rheumatism**, v. 39, p. 294-312, 2010.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin-Layer Chromatography Atlas**. Springer 2ªEd., Berlin, 384 pp., 1995.

WILLCOX, J. K.; ASH, S. L.; CATIGNANI, G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 4, p. 275-295, 2004.

WILLOUGHBY, D.A.; MOORE, A.R.; COLVILLE-NASH, P.R. COX-1, COX-2, COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. **Lancet**, v. 335, p. 646-648, 2000.

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

YASUHARA-BELL, J.; LU, Y. Marine compounds and their antiviral activities. **Antiviral Research**, v. 86, p. 231-240, 2010.