



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Fernanda Nienkötter Sardá

Investigação química e biológica do coral-sol (*Tubastraea coccinea* L.)

FLORIANÓPOLIS

2020

Fernanda Nienkötter Sardá

Investigação química e biológica do coral-sol (*Tubastraea coccinea* L.)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação
em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sardá, Fernanda Nienkötter

Investigação química e biológica do coral-sol (*Tubastraea
coccinea* L.) / Fernanda Nienkötter Sardá ; orientador,
Eloir Paulo Schenkel, 2020.

152 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Coral-sol. 3. *Tubastraea coccinea*. 4.
Peróxidos de esteroides. 5. Derivados indólicos. I.
Schenkel, Eloir Paulo. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Fernanda Nienkötter Sardá

Investigação química e biológica do coral-sol (*Tubastraea coccinea* L.)

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Jorge Alejandro Palermo, Dr.

Universidade de Buenos Aires

Prof^a. Miriam de Barcellos Falkenberg, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmácia.

Prof^a. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna, Dra.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Eloir Paulo Schenkel, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2020.

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família: aos meus pais que sempre me ensinaram por meio do bom exemplo e me incentivaram a seguir o caminho dos estudos, e à minha irmã toda a dedicação e acompanhamento em cada decisão.

Ao meu orientador, Dr. Eloir Paulo Schenkel, a orientação no caminho científico com muita disposição e entusiasmo, da iniciação científica ao mestrado.

À Dra. Cintia Lhullier, pós-doutoranda do Programa de Pós-graduação em Farmácia que, desde 2015, acompanha de perto a rotina de laboratório, ajudando em cada detalhe.

À professora Dra. Lilian Sibelle Campos Bernardes a demonstração de que é possível cumprir todas as responsabilidades com esmero e eficiência.

À professora Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg a orientação durante o estágio de docência.

Agradeço aos demais professores da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), especialmente do Centro de Ciências da Saúde (CCS) e do Centro de Ciências Biológicas (CCB), que contribuíram para o meu aprendizado, e aos profissionais envolvidos na realização dos ensaios de atividade biológica desenvolvidos neste trabalho.

Aos colegas do grupo GEPRONAS a presença constante no cotidiano do laboratório, assim como em palestras e congressos.

À UFSC a estrutura física, equipamentos e materiais; à coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmácia da UFSC o suporte e à CAPES o apoio financeiro.

*Estude a natureza. Ame a natureza. Fique perto da
natureza. Ela nunca falhará com você.*

Frank Lloyd Wright

RESUMO

Os produtos naturais marinhos contribuem significativamente para a descoberta de novos fármacos. Assim como algas e esponjas, corais representam uma promissora fonte de metabólitos secundários. Do ponto de vista ecológico, um importante gênero de corais é o *Tubastraea*. Suas principais espécies são *T. coccinea* e *T. tagusensis*, nativas do Oceano Pacífico e consideradas invasoras devido à alta capacidade de desenvolvimento em substratos naturais e artificiais. No litoral catarinense, *T. coccinea* foi encontrada pela primeira vez em 2012, incrustada em costões rochosos na Ilha do Arvoredo, e está inserida no plano de manejo do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar extratos do coral *T. coccinea* do ponto de vista químico e biológico. Para tanto, foram investigados extratos brutos obtidos a partir de seis coletas realizadas entre os anos de 2016 e 2019. Após maceração, os extratos brutos obtidos foram submetidos ao fracionamento cromatográfico utilizando-se colunas em gel de sílica e em resina Sephadex® LH-20. Ao todo, foram isoladas cinco substâncias: três peróxidos de esteroides (CS.PE.01, CS.PE.02, CS.PE.03), dois derivados indólicos (CS.DI.01 e CS.DI.02) e uma fração rica em ésteres de ácidos graxos. Dessas, quatro foram identificadas por meio de técnicas espectroscópicas. Um dos peróxidos de esteroides isolados (CS.PE.03) não pôde ter sua estrutura química identificada devido ao baixo rendimento e maior complexidade. As atividades citotóxica, anti-herpética e antiprotozoária foram avaliadas. Como resultados mais promissores, os peróxidos de esteroides CS.PE.01 e CS.PE.02 mostraram uma CI_{50} de 19,3 $\mu\text{g/mL}$ e 17,3 $\mu\text{g/mL}$ sobre a linhagem de células tumorais HCT-8, respectivamente, e uma baixa citotoxicidade sobre a linhagem não-tumoral Vero (CI_{50} de 37,5 $\mu\text{g/mL}$ e 61,2 $\mu\text{g/mL}$). Com relação à atividade antiprotozoária, a substância CS.PE.01 (testada a 50 $\mu\text{g/mL}$) demonstrou-se bastante promissora, com uma porcentagem de inibição de 96,5% para *Trypanosoma cruzi* e 52,1% para *Leishmania infantum*. Até o momento, não há registros do isolamento de peróxidos de esteroides para corais do gênero *Tubastraea*. Considerando os resultados obtidos na avaliação da atividade citotóxica, estes podem sugerir que os peróxidos de esteroides sejam os responsáveis pela capacidade invasora de *T. coccinea* no ambiente marinho, em particular na Ilha do Arvoredo.

Palavras-chave: Coral-sol. *Tubastraea coccinea*. Peróxidos de esteroides. Derivados indólicos. Atividade biológica.

ABSTRACT

Marine natural products contribute significantly to the discovery of new drugs. Like algae and sponges, corals represent a promising source of secondary metabolites. From an ecological point of view, an important genus of corals is *Tubastraea*. Its main species are *T. coccinea* and *T. tagusensis*, native to the Pacific Ocean and considered invasive due to their high growth capacity on natural and artificial substrates. On the coast of Santa Catarina, *T. coccinea* was first found in 2012, invading rocky shores on Arvoredo Island, and it is part of the management plan of the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMbio). In this context, the objective of this work was to investigate the chemical and biological aspects of the coral *T. coccinea*. For this purpose, crude extracts obtained from six collections between 2016 and 2019 were analyzed. After maceration, the crude extracts obtained were subjected to chromatographic fractionation procedures using silica gel columns and Sephadex® LH-20 resin. Altogether, five substances were isolated: three epidioxysterols (CS.PE.01, CS.PE.02, CS.PE.03), two indole derivatives (CS.DI.01 and CS.DI.02) and a fraction rich in fatty acid esters. Of these, four were identified by spectroscopic techniques. One of the isolated epidioxysterols (CS.PE.03) could not have its chemical structure identified due to its low yield and greater complexity. Cytotoxic, antihyperthermic and antiprotozoal activities were evaluated. As most promising results, the epidioxysterols CS.PE.01 and CS.PE.02 showed an IC₅₀ of 19.3 µg/mL and 17.3 µg/mL on HCT-8 tumor cell lines, respectively, and low cytotoxicity on non-tumor Vero strain (IC₅₀ of 37.5 µg/mL and 61.2 µg/mL). Regarding to antiprotozoal activity, CS.PE.01 (tested at 50 µg/mL) proved to be very promising, with an inhibition percentage of 96.5% for *Trypanosoma cruzi* and 52.1% for *Leishmania infantum*. Until now, there are no records of the isolation of epidioxysterols for corals of the genus *Tubastraea*. Considering the results obtained in the evaluation of cytotoxic activity, these may suggest that steroid peroxides are responsible for the invasive capacity of *T. coccinea* in the marine environment, especially in Arvoredo Island.

Keywords: Sun coral. *Tubastraea coccinea*. Epidioxysterols. Indole derivatives. Biological activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reserva Biológica Marinha do Arvoredo.	23
Figura 2. Estrutura química dos durumolídeos A–E isolados do coral <i>L. durum</i> por Cheng e colaboradores (2008).	28
Figura 3. Estrutura química do diterpeno oxapolicíclico (bipinapterolídeo B) isolado do coral <i>P. bipinnata</i> por Ospina e colaboradores (2007).	29
Figura 4. Estrutura química dos diterpenos sinularcasbanos isolados do coral <i>S. polydactyla</i> por Hegazy e colaboradores (2016).	29
Figura 5. Estrutura química dos esteroides polioxigenados (punicinois A–E) isolados do coral <i>L. punicea</i> por Moritz e colaboradores (2014).	30
Figura 6. Colônias de <i>T. coccinea</i> (A) e <i>T. tagusensis</i> (B).	31
Figura 7. Características visuais do coral <i>T. coccinea</i>	32
Figura 8. Características visuais do coral <i>T. tagusensis</i>	32
Figura 9. Evolução de um pólipó encontrado distante de sua colônia de origem (A) e formação de um esqueleto calcário após desprendimento de um pólipó de <i>T. coccinea</i> (B). ..	33
Figura 10. Reprodução do coral-sol.	34
Figura 11. Carotenoide do tipo astaxantina isolado das espécies <i>T. coccinea</i> e <i>T. tagusensis</i> . ..	36
Figura 12. Alcaloides indólicos tipo aplisinopsina isoladas de <i>Tubastraea</i> sp. 3'-deimino3'-oxoaplisinopsina (16) e 6-bromo-3'-oxoaplisinopsina (17).	37
Figura 13. Aplisinopsinas isoladas de <i>T. coccinea</i> coletada em Oahu, EUA.	38
Figura 14. Estruturas químicas dos compostos tubastrindóis A–H (23–30) isolados de <i>Tubastraea</i> sp. coletado no Japão.	39
Figura 15. Estruturas químicas dos compostos cicloaplisinopsina B (31) e cicloaplisinopsina C (32) isolados de <i>Tubastraea</i> sp.	40
Figura 16. Tubastraina isolada de <i>T. micranthus</i> coletado em Palau.	41
Figura 17. Estruturas químicas do micalolídeo D (34) e micalolídeo E (35) isolados de <i>T. faulkneri</i> coletado na Austrália.	42
Figura 18. Estrutura química do lanosterol.	43
Figura 19. Peróxidos de esteroides isolados dos organismos marinhos <i>Ascidia nigra</i> , <i>Dendrogyra cylindrus</i> , <i>Thalysias juniperina</i> e <i>Aplysia dactylomela</i> (37–52).	44
Figura 20. Peróxidos de esteroides isolados dos tunicados <i>Phallusia mammillata</i> e <i>Ciona intestinalis</i> (53–56).	45

Figura 21. Peróxidos de esteroides isolados de <i>E. cavolini</i> e <i>T. inarmatum</i> (57–68).....	46
Figura 22. Peróxidos de esteroides isolados da esponja <i>Monanchora</i> sp.....	47
Figura 23. Locais de coleta do coral <i>T. coccinea</i>	50
Figura 24. Fluxograma representando a obtenção da substância isolada CS.PE.01 a partir do coral <i>T. coccinea</i> – coleta de abril de 2016.	55
Figura 25. Fluxograma representando a obtenção das substâncias isoladas CS.PE.02, CS.PE.03 e CS.DI.01 a partir do fracionamento cromatográfico do coral <i>T. coccinea</i> – coleta de maio de 2017.....	58
Figura 26. Fluxograma de fracionamento cromatográfico do coral <i>T. coccinea</i> – coleta de maio de 2018 A.	60
Figura 27. Fluxograma da partição líquido-líquido realizada com o extrato bruto do coral <i>T. coccinea</i> – coleta de maio de 2018 B.	62
Figura 28. Fluxograma de fracionamento cromatográfico do coral <i>T. coccinea</i> – coleta de maio de 2018 B.....	63
Figura 29. Fluxograma de fracionamento cromatográfico do coral <i>T. coccinea</i> – coleta de abril de 2019.	64
Figura 30. Fluxograma de fracionamento cromatográfico do coral <i>T. coccinea</i> – coleta de junho de 2019.	66
Figura 31. Esqueleto calcário do coral <i>T. coccinea</i> visualizado microscopicamente (escala: 2000 µm).	72
Figura 32. Cromatograma dos extratos brutos das coletas de maio de 2017, maio de 2018 A, maio de 2018 B, abril de 2019 e junho de 2019. Fase móvel: hexano:acetato de etila (8:2). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento. C: padrão de colesterol.	73
Figura 33. Cromatograma da substância CS.PE.01. Fase móvel: hexano:acetato de etila (6:4). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.	74
Figura 34. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da substância CS.PE.01.	75
Figura 35. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da substância CS.PE.01.	76
Figura 36. Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) da substância CS.PE.01.....	76
Figura 37. Mapa de correlação HSQC da substância CS.PE.01.....	77
Figura 38. Estrutura química do peróxido de esteroide isolado do coral <i>T. coccinea</i> e identificado como (24E)-5 α ,8 α -epidioxi-24-etil-colesta-6,24(28)-dien-3 β -ol.....	78
Figura 39. Cromatograma da substância CS.PE.02. Fase móvel: hexano:acetato de etila (6:4). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.	80

Figura 40. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da substância CS.PE.02.	81
Figura 41. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da substância CS.PE.02.	81
Figura 42. Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) da substância CS.PE.02.	82
Figura 43. Mapa de correlação HSQC da substância CS.PE.02.	82
Figura 44. Estrutura química do peróxido de esteroides isolado do coral <i>T. coccinea</i> e identificado como (22E,24S)-5α,8α-epidioxi-24-metil-colesta-6,22-dien-3β-ol.	83
Figura 45. Acetilação da substância CS.PE.02.	85
Figura 46. Perfil cromatográfico comparativo da substância CS.PE.02 com a substância CS.PE.02 acetilada. Fase móvel: hexano:acetato de etila (6:4). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.	85
Figura 47. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da substância CS.PE.02 acetilada.	86
Figura 48. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da substância CS.PE.02 acetilada.	87
Figura 49. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da substância CS.PE.03.	88
Figura 50. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da substância CS.PE.03.	89
Figura 51. Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) da substância CS.PE.03.	90
Figura 52. Cromatograma da substância CS.DI.01. Fase móvel: hexano:acetato de etila (1:1). A) Visualização da cromatoplaça em luz UV a 254 nm. B) Cromatoplaça revelada com solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.	91
Figura 53. Espectro de UV-Vis da substância CS.DI.01.	92
Figura 54. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância CS.DI.01.	93
Figura 55. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) da substância CS.DI.01.	93
Figura 56. Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) da substância CS.DI.01.	94
Figura 57. Mapa de correlação HSQC da substância CS.DI.01.	94
Figura 58. Espectro de UV-Vis (varredura entre 225 e 400 nm) da substância indol-3-acetaldeído (linha contínua).	96
Figura 59. Estrutura química do derivado indólico isolado do coral <i>T. coccinea</i> e identificado como 6-bromoindol-3-carbaldeído.	96
Figura 60. Cromatograma da substância CS.DI.02. Fase móvel: hexano:acetato de etila (6:4). A) Visualização da cromatoplaça em luz UV a 254 nm. B) Cromatoplaça revelada com solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.	98
Figura 61. Espectro de UV-Vis da substância CS.DI.02.	98
Figura 62. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da substância CS.DI.02.	100

Figura 63. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da substância CS.DI.02.	101
Figura 64. Ampliação da região entre δ _H 7,30 e δ _H 7,48 do espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da substância CS.DI.02.....	101
Figura 65. Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) da substância CS.DI.02.	102
Figura 66. Mapa de correlação HSQC da substância CS.DI.02.	102
Figura 67. Estrutura química do derivado indólico isolado do coral <i>T. coccinea</i> e identificado como indol-3-carbaldeído.....	104
Figura 68. Cromatograma da substância CS.DI.02 obtido por CG/MS.	105
Figura 69. Espectro de massas do pico no tempo de retenção 8,59 (substância CS.DI.02) obtido por CG/MS.	106
Figura 70. Comparação entre os dados de fragmentação de compostos disponíveis na biblioteca <i>NIST</i> e a substância CS.DI.02 (pico no tempo de retenção 8,590) por CG/MS. ...	107
Figura 71. Cromatograma da fração CS.AG. Fase móvel: hexano:acetato de etila (96:4). Cromatoplaça revelada com solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento. C: padrão de colesterol.....	109
Figura 72. Espectro de infravermelho da fração CS.AG.	110
Figura 73. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da fração CS.AG.....	111
Figura 74. Ampliação do espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da fração CS.AG.....	112
Figura 75. Mapa de correlação HSQC da fração CS.AG.	112
Figura 76. Cromatograma da fração CS.AG obtido por CG/MS.	113
Figura 77. Espectro de massas do pico no tempo de retenção 13,81 (fração CS.AG) obtido por CG/MS.....	114
Figura 78. Cromatograma das frações da CLV2 da coleta de abril de 2016 (extrato etanólico). A) Fase móvel: hexano:acetato de etila (9:1). B) Fase móvel: B.A.W. (6:1:2). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.....	115
Figura 79. Cromatograma das frações da CLV4 (extrato acetônico) da coleta de maio de 2017. Fase móvel: hexano:acetato de etila (7:3). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.....	116
Figura 80. Cromatograma das frações da CLV5 (extrato etanólico) da coleta de maio de 2017. A) Fase móvel: hexano:acetato de etila (7:3). B) Fase móvel: B.A.W. (6:1:2). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.....	116

Figura 81. Cromatograma das frações da CLV6 (extrato acetônico) da coleta de maio de 2018 A. Fase móvel: hexano:acetato de etila (7:3). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.....	117
Figura 82. Cromatograma das frações da CLV7 (extrato acetônico) da coleta de abril de 2019. Fase móvel: hexano:acetato de etila (7:3). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.....	117
Figura 83. Cromatograma das frações da CLV8 (extrato acetônico) da coleta de junho de 2019. Fase móvel: hexano:acetato de etila (7:3). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.	118
Figura 84. Cromatograma das frações da partição líquido-líquido (extrato acetônico) da coleta de maio de 2018 B. Fase móvel: hexano:acetato de etila (8:2). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento. C: padrão de colesterol.....	118
Figura 85. Cromatogramas dos extratos brutos das coletas de maio de 2017, maio de 2018 A, maio de 2018 B, abril de 2019 e junho de 2019.....	120
Figura 86. Espectro de massas do pico no tempo de retenção 39,80 (extrato bruto acetônico da coleta de junho de 2019) obtido por CG/MS.....	121
Figura 87. Espectro de massas do colesterol.	122
Figura 88. Peróxido de esteroide isolado do tunicado <i>Cynthia savignyi</i>	130
Figura 89. Esteroides isolados do coral <i>Sinularia gaweli</i>	131
Figura 90. Cromatograma da fração n-butanol do coral <i>T. coccinea</i> , com destaque para as substâncias 5, 6, 9 e 17.	137
Figura 91. Espectro de massas da substância 5 (pico m/z 241,1085).....	138
Figura 92. Possível estrutura química para a substância 5 (2'-dimetilaplisinopsina).	138
Figura 93. Espectro de massas da substância 6 (pico m/z 146,0602).....	139
Figura 94. Estrutura química para a substância 6 (indol-3-carbaldeído).....	139
Figura 95. Espectro de massas da substância 9 (pico m/z 319,0187).....	140
Figura 96. Possível estrutura química para a substância 9 (6-bromo-2'-dimetilaplisinopsina).	140
Figura 97. Espectro de massas da substância 17 (pico m/z 223,9710).....	141
Figura 98. Estrutura química para a substância 17 (6-bromoindol-3-carbaldeído).....	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Datas, locais e coordenadas geográficas das coletas do coral <i>T. coccinea</i> na Ilha do Arvoredo, em Santa Catarina.....	51
Tabela 2. Métodos de extração dos compostos de <i>T. coccinea</i> conforme a data de coleta.	53
Tabela 3. Frações e sistemas de solventes utilizados nas CLVs da coleta de abril de 2016. ...	54
Tabela 4. Frações e sistemas de solventes utilizados nas CLVs da coleta de maio de 2017....	57
Tabela 5. Frações e sistemas de solventes utilizados na CLV6 da coleta de maio de 2018 A.	59
Tabela 6. Frações e sistemas de solventes utilizados na CLV7 da coleta de abril de 2019.	63
Tabela 7. Frações e sistemas de solventes utilizados na CLV8 da coleta de junho de 2019....	65
Tabela 8. Massa de extrato bruto para cada coleta do coral-sol.	71
Tabela 9. Dados espectrais de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância CS.PE.01 em comparação com dados da literatura de Ioannou e colaboradores (2009), para (24E)-5 α ,8 α -epidioxi-24-etil-colesta-6,24(28)-dien-3 β -ol.....	79
Tabela 10. Dados espectrais de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância CS.PE.02 em comparação com dados da literatura de Ioannou e colaboradores (2009), para (22E,24S)-5 α ,8 α -epidioxi-24-metil-colesta-6,22-dien-3 β -ol.....	84
Tabela 11. Dados espectrais de RMN ¹ H e ¹³ C da substância CS.DI.01 em comparação com dados da literatura de Rasmussen e colaboradores (1993), para 6-bromoindol-3-carbaldeído.	95
Tabela 12. Dados espectrais de RMN ¹ H e ¹³ C da substância CS.DI.02 em comparação com dados da literatura de Li e colaboradores (1994), para indol-3-carbaldeído.	103
Tabela 13. Substâncias isoladas dos extratos do coral <i>T. coccinea</i>	123
Tabela 14. Substâncias isoladas dos extratos do coral <i>T. coccinea</i> , conforme cada coleta realizada.....	124
Tabela 15. Efeitos antiproliferativos em linhagens celulares tumorais (A549, HCT-8 e H460) e não-tumoral (Vero) após 48 h de experimento pelo método da Sulforrodamina B.....	125
Tabela 16. Atividade anti-herpética sobre o vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R) após 48 h de experimento por meio do ensaio de redução do número de placas de lises virais.	126
Tabela 17. Atividade anti-herpética da fração 2018 B – Diclorometano sobre o vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R), em 48h de experimento, mediante ensaio de redução do número de placas de lises virais.	127

Tabela 18. Triagem antiprotozoária utilizando amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i> , <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> expressando β -galactosidase.	128
Tabela 19. Efeitos antiproliferativos em linhagens celulares tumorais (A549, HCT-8 e H460) e não-tumoral (Vero) após 48 h de experimento pelo método da Sulforrodamina B.....	129
Tabela 20. Atividade anti-herpética sobre o vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R) após 48 h de experimento por meio do ensaio de redução do número de placas de lises virais.	131
Tabela 21. Atividade anti-herpética da substância CS.PE.02 acetilada sobre o vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R), em 48h de experimento, mediante ensaio de redução do número de placas de lises virais.	132
Tabela 22. Triagem antiprotozoária utilizando amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i> , <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> expressando β -galactosidase.	133

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

δ_C	Deslocamento químico em ppm no espectro de RMN ^{13}C
δ_H	Deslocamento químico em ppm no espectro de RMN ^1H
B.A.W.	Butanol:ácido acético:água
CCA	Cromatografia em coluna aberta
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CI_{50}	Concentração inibitória 50%
CLMP	Cromatografia líquida de média pressão
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
Hz	Hertz
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IS	Índice de seletividade
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multipleto
MHz	Megahertz
Rebio	Reserva Biológica
Rf	Fator de retenção (<i>Retardation factor</i>)
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
t	Tripleto
WoRMS	<i>World Register of Marine Species</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1	INTRODUÇÃO.....	21
1.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
1.2.1	Produtos naturais marinhos	24
1.2.2	Os corais	26
1.2.2.1	Corais do gênero <i>Tubastraea</i>	31
1.2.2.1.1	<i>Metabólitos secundários isolados de Tubastraea sp.</i>	36
1.2.2.1.1.1	Alcaloides.....	36
1.2.2.1.1.1.1	Alcaloides indólicos tipo aplisinopsina	37
1.2.2.1.1.1.2	Alcaloides bisindólicos tipo tubastrindol	38
1.2.2.1.1.1.3	Alcaloides piperidínicos tipo tubastraina	40
1.2.2.1.1.2	Macrolídeos tipo micalolídeo.....	41
1.2.2.1.1.3	Lipídeos e esteroides.....	42
1.2.2.1.1.4	Peróxidos de esteroides	43
2	OBJETIVOS	48
2.1	OBJETIVO GERAL.....	48
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
3	METODOLOGIA	49
3.1	MATERIAIS	49
3.1.1	Material marinho	49
3.1.2	Solventes e reagentes	51
3.1.3	Equipamentos	52
3.2	MÉTODOS.....	53
3.2.1	Coleta e obtenção do extrato bruto.....	53
3.2.2	Fracionamento cromatográfico.....	53
3.2.2.1	Coleta de abril de 2016: isolamento da substância CS.PE.01	54
3.2.2.2	Coleta de maio de 2017: isolamento das substâncias CS.PE.02, CS.PE.03 e CS.DI.01.....	56

3.2.2.3	Coleta de maio de 2018 A: isolamento das substâncias CS.PE.02, CS.DI.01 e CS.DI.02.....	59
3.2.2.4	Coleta de maio de 2018 B: isolamento da substância CS.PE.02.....	61
3.2.2.5	Coleta de abril de 2019: isolamento das substâncias CS.PE.02 e CS.DI.01	63
3.2.2.6	Coleta de junho de 2019: isolamento das substâncias CS.PE.01, CS.DI.01 e CS.DI.02 e da fração CS.AG.....	65
3.2.3	Acetilação da substância CS.PE.02.....	67
3.2.4	Identificação estrutural.....	67
3.3	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	67
3.3.1	Atividade citotóxica.....	68
3.3.2	Atividade anti-herpética.....	69
3.3.3	Atividade antiprotozoária.....	69
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.1	RENDIMENTO DOS PROCESSOS EXTRATIVOS.....	71
4.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA DO CORAL-SOL.....	72
4.3	FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO, PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO	73
4.3.1	Substância CS.PE.01.....	74
4.3.2	Substância CS.PE.02.....	80
4.3.3	Acetilação da substância CS.PE.02.....	85
4.3.4	Substância CS.PE.03.....	87
4.3.5	Substância CS.DI.01.....	91
4.3.6	Substância CS.DI.02.....	97
4.3.7	Fração CS.AG.....	108
4.4	COMPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA E QUÍMICA ENTRE AS COLETAS ..	115
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA	124
4.5.1	Atividade biológica dos extratos.....	125
4.5.1.1	Atividades citotóxica e anti-herpética.....	125
4.5.1.2	Atividade antiprotozoária.....	128
4.5.2	Atividade biológica das substâncias isoladas.....	128
4.5.2.1	Atividades citotóxica e anti-herpética.....	128
4.5.2.2	Atividades antiprotozoária.....	132

5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	134
6	CONCLUSÕES	142
	APÊNDICE	152

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais vêm sendo utilizados ao longo da história para o alívio de sintomas e para a cura de determinadas doenças. Além do uso medicinal, os recursos naturais também foram utilizados pelas civilizações antigas para outras funções, como a extração de óleos de plantas para aplicação na escrita, por povos mesopotâmicos, e o uso de secreções de moluscos para tingimento de tecidos, pelos fenícios (CRAGG; NEWMAN, 2005, 2013). Os produtos naturais também representam uma importante fonte para o desenvolvimento de distintas classes de fármacos, como anestésicos locais derivados da cocaína, analgésicos análogos à morfina e hipolipêmicos obtidos a partir da mevastatina (BERNARDES et al., 2017).

O estudo de produtos naturais é capaz de contribuir de diversas formas para a sociedade, proporcionando-lhe avanços importantes. Pode-se citar a descoberta de novos agentes terapêuticos, como o citostático paclitaxel, os antibióticos penicilina e tetraciclina e o antimitótico podofilotoxina, além de substâncias bioativas utilizadas como repelentes, herbicidas e pesticidas. Esta é, também, uma área importante para a medicina alternativa, como a fitoterapia e a homeopatia, e que impulsiona a economia, através do desenvolvimento de pigmentos, nutracêuticos e óleos essenciais (KHAN, 2018).

A enorme biodiversidade encontrada em todo o litoral brasileiro contribui para o estudo dos recursos naturais graças à química de produtos naturais. Além da grande variedade natural observada, a própria história do Brasil apresenta registros do uso desses recursos. Um dos motivos da colonização portuguesa no Brasil foi, aliás, a presença da árvore pau-brasil no território nacional, promissora fonte de extração de corantes (PINTO et al., 1995). Essa grande diversidade biológica observada em todo o território brasileiro é também considerada uma promissora fonte de novas moléculas com atividade biológica. Na busca por esses compostos, investigam-se plantas e micro-organismos, como fungos e bactérias, além de organismos marinhos, como esponjas, corais e algas (BARREIRO, 2009).

Uma importante espécie de coral que vem ganhando destaque devido às características observadas no ambiente marinho é *Tubastraea coccinea*, abordada mais

profundamente a seguir. Essa espécie foi encontrada em costões rochosos no sul do Brasil pela primeira vez em janeiro de 2012 e, a partir desse momento, a Reserva Biológica (Rebio) Marinha do Arvoredo iniciou as atividades de retirada do coral invasor.

Diversos estudos vêm sendo realizados sobre a espécie *T. coccinea*, principalmente com o objetivo de assinalar novos locais invadidos pelo organismo. Atualmente, porém, ainda há poucos trabalhos sobre sua composição química e atividade biológica. É nesse contexto que o presente trabalho está inserido, já que *T. coccinea* apresenta uma grande capacidade invasora, a qual pode influenciar na produção de novos metabólitos secundários e, conseqüentemente, na sua atividade biológica. Contudo, pouco se sabe sobre seu perfil químico e biológico.

Para a realização deste trabalho, foi importante a relação com a Rebio Marinha do Arvoredo, Unidade de Conservação criada pelo Decreto Federal 99.142 de 12 de março de 1990, localizada entre Florianópolis e Bombinhas, no estado de Santa Catarina. A Rebio Marinha do Arvoredo é composta, além da Ilha do Arvoredo, pelas ilhas Galé, Deserta e Calhau de São Pedro. Já a Ilha do Arvoredo é composta pelo Saco do Capim, Baía Mansa e Baía do Farol, conforme ilustrado na Figura 1. Está localizada na costa catarinense e apresenta uma área total de 17.600 hectares.

Figura 1. Reserva Biológica Marinha do Arvoredo.



Fonte: ICMBio, 20-?.

O Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), criado em 2007 como parte da Lei 11.516 de 28 de agosto, está vinculado ao Ministério do Meio Ambiente e é responsável pela fiscalização e monitoramento das Unidades de Conservação, das quais a Ilha do Arvoredo (ICMBio, 20-?).

Entre as ações desenvolvidas pelo ICMBio encontram-se a criação e a execução de planos de manejo, visando à conservação da biodiversidade brasileira, à investigação e à caracterização de colônias encontradas no entorno da Ilha do Arvoredo, bem como à remoção de espécies invasoras. Dessa forma, os planos de manejo têm como intuito preservar o

ambiente marinho, proteger as espécies nativas da região, bem como recuperar o ecossistema local (ICMBio, 20-?).

A seguir será abordada uma revisão bibliográfica sobre os produtos naturais marinhos, os corais, o gênero *Tubastraea* e os metabólitos secundários já isolados de espécies pertencentes a esse gênero.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Produtos naturais marinhos

Considerando toda a superfície terrestre, as águas cobrem mais de 70% dessa extensão (CRAGG; NEWMAN, 2013). Em se tratando do território brasileiro, esse apresenta uma costa de aproximadamente 9.200 km (DOMINGUEZ, 2009), desde Cabo Orange, extremo norte do país localizado no estado do Amapá, até Arroio Chuí, extremo sul localizado no estado do Rio Grande do Sul (KNOPPERS; EKAU; FIGUEIREDO, 1999), com seu litoral banhado pelo oceano Atlântico. Toda essa extensão colabora para a biodiversidade do ambiente marinho, representando um enorme potencial para a descoberta de novos fármacos (ALMEIDA; PALERMO, 2017).

A investigação química e biológica de produtos naturais marinhos inclui o estudo de organismos como algas, ascídias, briozoários, corais, esponjas, moluscos e micro-organismos (PINTO et al., 2002), representando uma promissora fonte de agentes antitumorais, analgésicos, antivirais, antibióticos e anti-inflamatórios (ALMEIDA; PALERMO, 2017).

Para realizar atividades essenciais à manutenção da vida, os organismos marinhos necessitam produzir energia a partir de compostos orgânicos. Esse processo recebe o nome de metabolismo intermediário, e as suas vias recebem o nome de vias metabólicas (MARZZOCO; TORRES, 1999). O metabolismo primário, por sua vez, é formado de compostos essenciais ao crescimento e que estão envolvidos em vias mais complexas, como aminoácidos e ácidos graxos (DREW; DEMAIN, 1977).

Alguns organismos podem sintetizar compostos em resposta às condições externas. Esses compostos são chamados de metabólitos secundários (DEWICK, 2002; WINK, 2003). Em organismos marinhos, os metabólitos secundários são mais comumente produzidos por

seres desprovidos de sistema imunológico – a exemplo de esponjas, algas e corais – atuando como forma alternativa de defesa e podendo apresentar promissora atividade biológica. Os metabólitos secundários apresentam uma estrutura química mais complexa e variada quando comparados aos metabólitos primários (MAPLESTONE; STONE; WILLIAMS, 1992) e representam uma animadora fonte de moléculas biologicamente ativas.

Ao final do século XX, os avanços tecnológicos facilitaram a coleta de organismos marinhos graças a mergulhos em grandes profundidades e à elucidação estrutural de substâncias complexas (COSTA-LOTUFO et al., 2009; ALMEIDA; PALERMO, 2017). Um dos primeiros estudos na área foi realizado por Bergmann e Feeney (1951) com o isolamento de nucleosídeos provenientes da esponja *Cryptotethya crypta*, os quais serviram como base para a síntese dos análogos vidarabina (antiviral) e citarabina (citostático) (SAGAR; KAUR; MINNEMAN, 2010). Outro exemplo da importância do estudo com produtos naturais marinhos foi a investigação química do octocoral *Plexaura homomalla* por Alfred J. Weinheimer e Robert L. Spraggins, também nos Estados Unidos, com a consequente descoberta da presença de prostaglandinas (ALMEIDA; PALERMO, 2017).

Diversos fármacos comercializados tiveram sua origem em organismos marinhos. A trabectedina (Yondelis®), por exemplo, é utilizada para o tratamento de sarcoma de tecidos moles. Essa substância é um alcaloide isolado da ascídia *Ecteinascidia turbinata*, capaz de se ligar à guanina presente nas fitas de DNA, dobrando-as e, conseqüentemente, bloqueando a divisão celular. Apesar de seus efeitos terapêuticos, a trabectedina demonstrou diversos efeitos adversos graves. Para diminuir sua toxicidade, estudos foram realizados com o objetivo de compreender seus efeitos e ajustar a dosagem, progredindo nos ensaios clínicos (COSTA-LOTUFO et al., 2009; RANGEL; FALKENBERG, 2015).

A ziconotida (Prialt®) foi isolada pela primeira vez em 1980 do molusco *Comus magus*. Apresenta atividade analgésica devido ao bloqueio de canais de cálcio do tipo N presentes nas fibras A- δ e na raiz dorsal do cordão nervoso, locais responsáveis pela nocicepção. A ziconotida foi liberada para uso clínico em 2004 e sua administração é intratecal (MAYER et al., 2010). Outro composto isolado de organismos marinhos foi a halicondrina B. Essa substância, com atividade antitumoral, foi isolada de diversas espécies de esponjas, assim como do briozoário *Bugula neritina*. Devido à complexidade de sua estrutura química e consequente dificuldade de síntese, estudos foram realizados com o

objetivo de gerar análogos estruturalmente mais simples, originando assim a eribulina (CRAGG; NEWMAN, 2013).

O desenvolvimento de novas técnicas e os avanços nos métodos seguidos para o isolamento de novos compostos possibilitaram o aumento nos estudos com produtos naturais marinhos, área atualmente em expansão (ALMEIDA; PALERMO, 2017) e que já vem sendo desenvolvida no Programa de Pós-graduação em Farmácia (PGFar) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) desde 2004, por meio da investigação de algas, esponjas e corais.

1.2.2 Os corais

Entre os organismos marinhos investigados, os corais produzem os mais variados metabólitos secundários como estratégia de defesa, os quais podem contribuir para a descoberta de novas moléculas com promissora atividade biológica (MARANGONI; MARQUES; BIANCHINI, 2016).

Os corais pertencem ao filo Cnidaria, juntamente com as anêmonas-do-mar, hidroides, gorgônias e águas-vivas. Em geral, os cnidários são animais compostos por células urticantes chamadas de cnidócitos (LINDNER, 2014). Esses animais habitam os recifes de corais, estruturas resistentes que abrigam um sem-número de seres vivos, contribuindo para a diversidade do ambiente marinho e para a produção de metabólitos secundários devido à competição entre predadores pelo espaço (BIRKELAND, 1997).

Atualmente os recifes de corais encontram-se ameaçados por causa das diversas alterações ambientais observadas. Em 2019, o derramamento de petróleo no nordeste brasileiro impactou o meio ambiente, atingindo mangues e corais. Segundo as Cartas SAO (Cartas de Sensibilidade Ambiental ao Óleo), publicadas pelo Ministério do Meio Ambiente, os recifes de corais apresentam nível 10 de sensibilidade, indicando a necessidade de ações para contenção do óleo derramado (BBC NEWS, 2019). As consequências desse evento, contudo, são pouco previsíveis e levarão anos para serem amenizadas.

Os fatores estressantes capazes de afetar as comunidades de corais podem ser categorizados em agudos (ciclones e pesca destrutiva, por exemplo) ou crônicos (como poluição e sedimentação) (OSBORNE et al., 2017). Esses fatores, associados às mudanças climáticas, como aquecimento e acidificação dos oceanos, incidência de radiação solar e

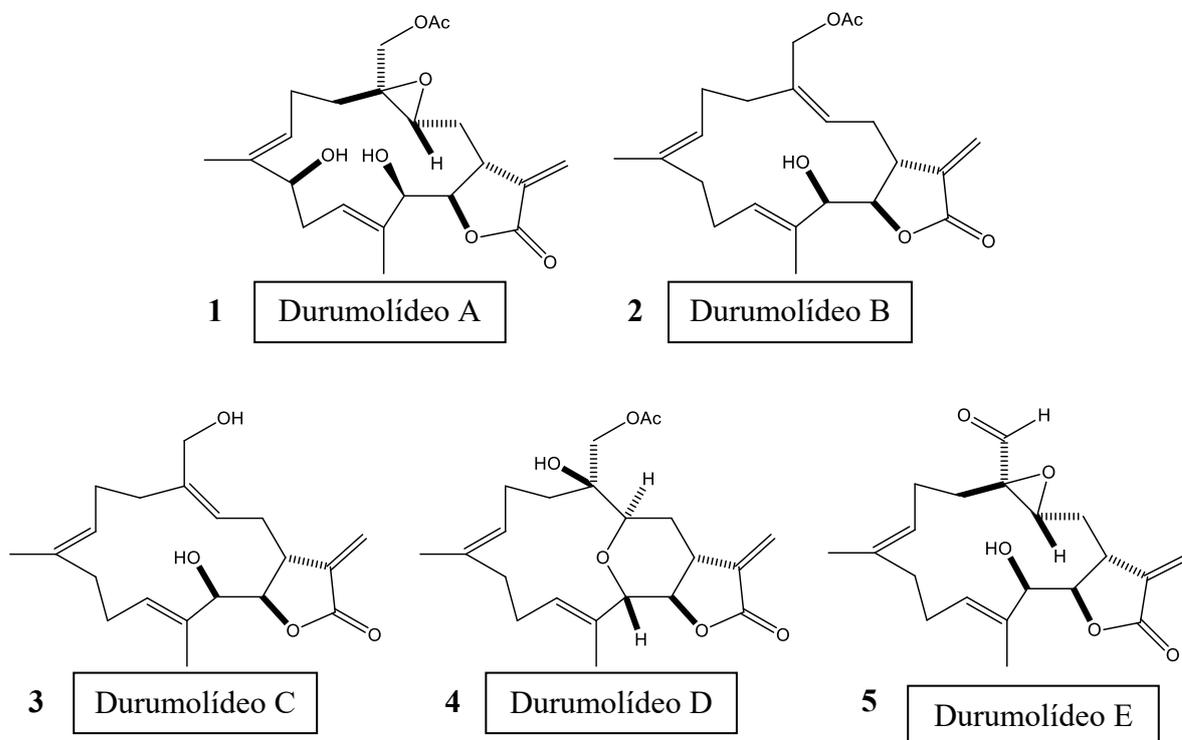
diminuição da salinidade, podem provocar o fenômeno conhecido como branqueamento de corais (BROWN, 1997; OSBORNE et al., 2017).

Segundo a organização NOAA (*National Oceanic and Atmospheric Administration*), por alterarem o ambiente marinho, esses fatores são capazes de interferir na relação simbiótica entre algas e corais. Essas algas, além de servirem de alimento aos corais, também são responsáveis por sua coloração. Em situações de estresse, desprendem-se do esqueleto do coral, deixando-o com aspecto esbranquiçado e mais susceptível às doenças (NOAA, 20-?).

Em 2011, o Instituto de Recursos Mundiais (WRI), na publicação “*Reefs at Risk Revisited*”, identificou os países mais vulneráveis à degradação dos recifes de corais; o Brasil figura nessa lista (BURKE et al., 2011). Na Austrália, por sua vez, conforme relatório publicado em 2019 pelo governo local e pelas autoridades do Parque Marinho de Grande Barreira de Corais, a situação dos recifes de corais passou de “ruim” para “muito ruim”, afetando peixes, tartarugas e aves marinhas (GBRMPA, 2019).

Espécies de corais já foram estudadas com o objetivo de isolar novos compostos e avaliar suas atividades biológicas. A seguir são apresentados alguns exemplos, como o estudo de *Lobophytum durum* por Cheng e colaboradores (2008), com o isolamento de durumolídeos (Figura 2), os quais apresentaram promissora atividade anti-inflamatória com redução significativa nos níveis das proteínas iNOS e COX-2.

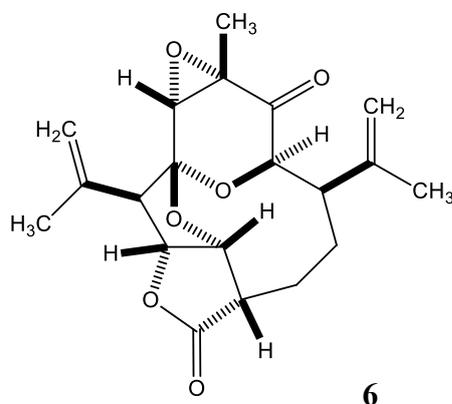
Figura 2. Estrutura química dos durumolídeos A–E isolados do coral *L. durum* por Cheng e colaboradores (2008).



Fonte: CHENG et al., 2008.

Ospina e colaboradores (2007), por sua vez, isolaram um diterpeno oxapolicíclico, denominado de bipinapterolídeo B (Figura 3), do coral *Pseudopterogorgia bipinnata*, coletado na Ilha de Providência, Colômbia. Esse composto demonstrou um percentual de inibição de 66,0% (quando testado a uma concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$) em estudos *in vitro* sobre a bactéria *Mycobacterium tuberculosis*.

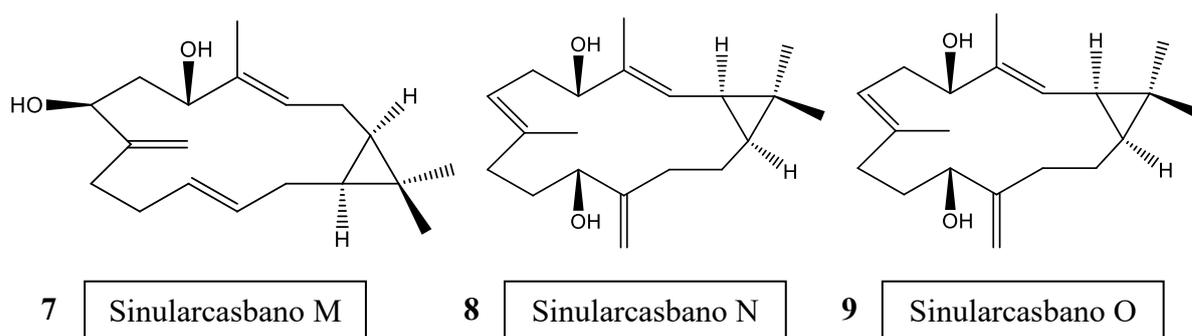
Figura 3. Estrutura química do diterpeno oxapolicíclico (bipinapterolídeo B) isolado do coral *P. bipinnata* por Ospina e colaboradores (2007).



Fonte: OSPINA et al., 2007.

Um estudo mais recente, realizado por Hegazy e colaboradores (2016), investigou quimicamente o coral *Sinularia polydactyla* coletado no Mar Vermelho, Egito. Graças ao uso de análise espectroscópica e de cristalografia de raio-X, foi possível elucidar novos diterpenos denominados sinularcasbanos (Figura 4), os quais, todavia, não tiveram seu potencial biológica analisado.

Figura 4. Estrutura química dos diterpenos sinularcasbanos isolados do coral *S. polydactyla* por Hegazy e colaboradores (2016).

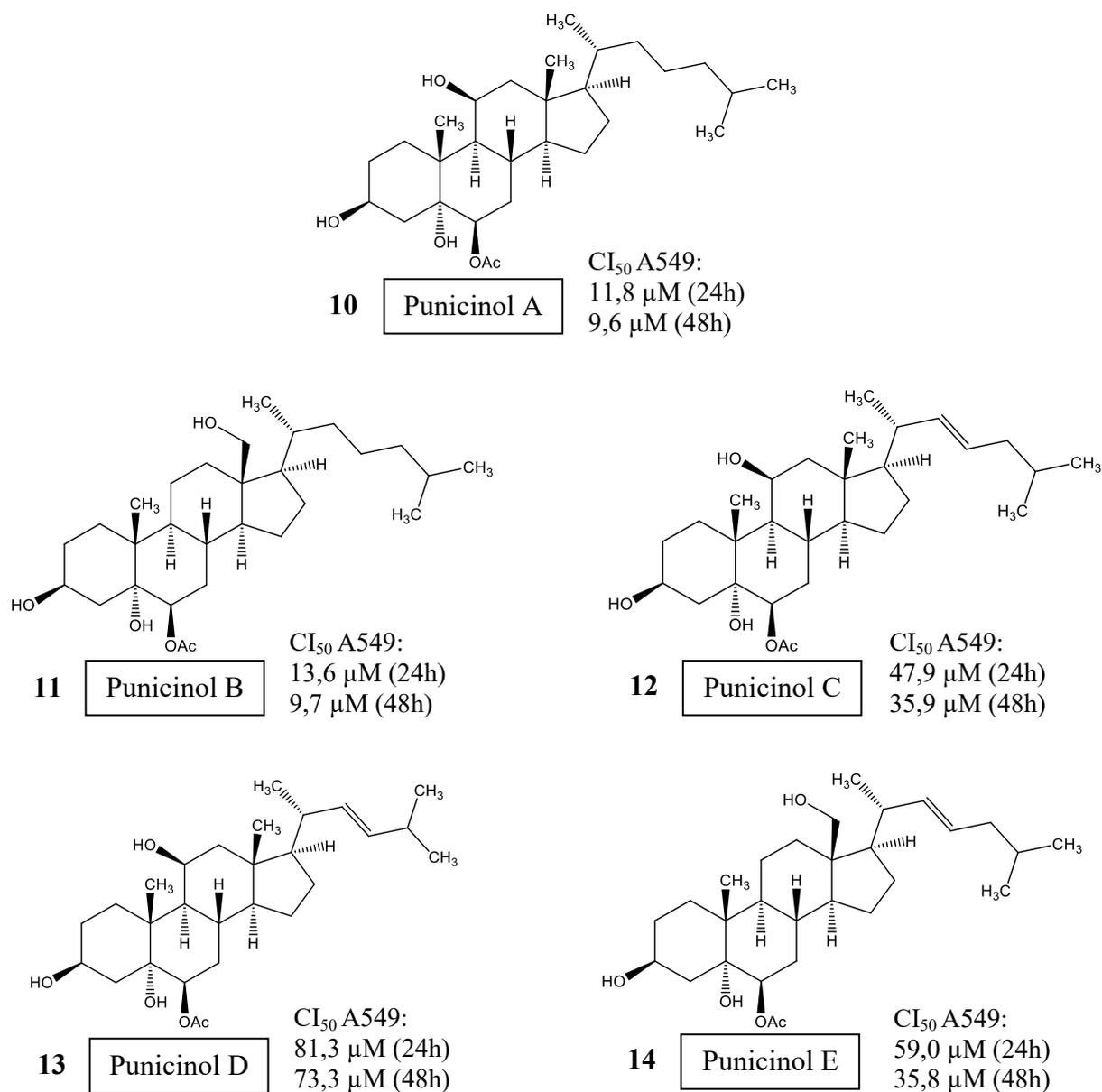


Fonte: HEGAZY et al., 2016.

Algumas espécies de corais já foram estudadas pelo Programa de Pós-graduação em Farmácia da UFSC, conforme apresentado na revisão “*Chemical and biological aspects of octocorals from the Brazilian coast*” de Almeida e colaboradores (2014), principalmente

abrangendo octocorais das ordens Alcyonacea e Pennatulacea. Moritz e colaboradores (2014) analisaram química e biologicamente o octocoral *Leptogorgia punicea*, coletado na Ilha das Aranhas (SC), com o conseqüente isolamento de esteroides polioxigenados denominados punicinóis A–E (Figura 5), os quais apresentaram promissora atividade citotóxica diante da proliferação de células cancerígenas de pulmão (células A549).

Figura 5. Estrutura química dos esteroides polioxigenados (punicinóis A–E) isolados do coral *L. punicea* por Moritz e colaboradores (2014).



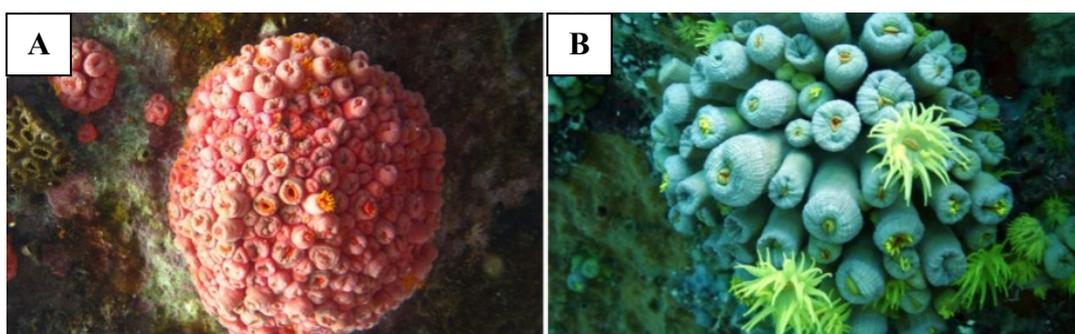
Fonte: MORITZ et al., 2014.

1.2.2.1 Corais do gênero *Tubastraea*

Um dos gêneros abrigados em recifes de corais é o *Tubastraea*, pertencente ao reino Animalia, filo Cnidaria, classe Anthozoa, subclasse Hexacorallia, ordem Scleractinia e família Dendrophylliidae. Segundo a base de dados WoRMS (*World Register of Marine Species*), esse gênero é composto pelas espécies *Tubastraea coccinea* (= *Tubastraea aurea*), *Tubastraea tagusensis*, *Tubastraea faulkneri*, *Tubastraea micranthus*, *Tubastraea floreana*, *Tubastraea diaphana* e *Tubastraea caboverdiana*.

Do ponto de vista ecológico, as duas principais espécies do gênero *Tubastraea* são *T. coccinea* Lesson (mais encontrada em regiões de clima tropical) e *T. tagusensis* Wells (nativa do Arquipélago de Galápagos), ambas oriundas do Oceano Pacífico e popularmente conhecidas como coral-sol (Figura 6) (WELLS, 1982). A vinda dessas espécies ao Brasil aconteceu ao final do século XX, possivelmente incrustadas em navios e plataformas de petróleo. Foram encontradas pela primeira vez no Brasil na Bacia de Campos, no Rio de Janeiro (PAULA; CREED, 2004). São consideradas espécies invasoras devido ao alto poder de competição e capacidade de se desenvolverem sobre substratos artificiais, como plataformas de petróleo e navios (MANGELLI; CREED, 2012).

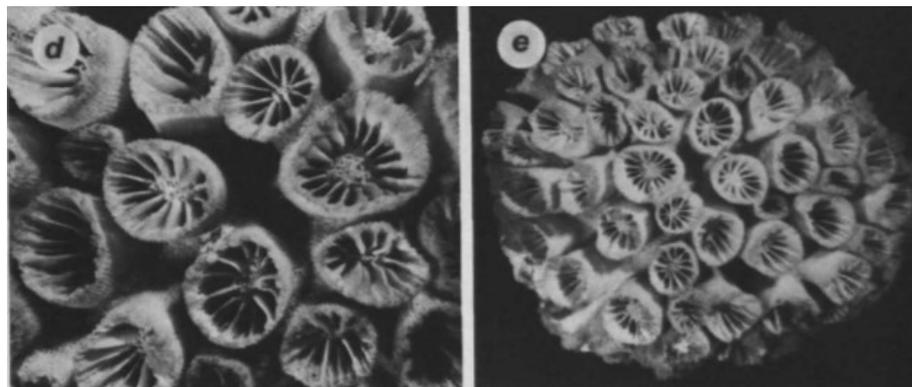
Figura 6. Colônias de *T. coccinea* (A) e *T. tagusensis* (B).



Fonte: CREED et al., 2016.

A espécie *T. coccinea* é composta por colônias em formato esférico, com diâmetro de até 12 cm. Seus coralitos medem de 10 a 12 mm e seus pólipos apresentam coloração vermelha-alaranjada (CAIRNS, 1991). Suas características podem ser observadas na Figura 7.

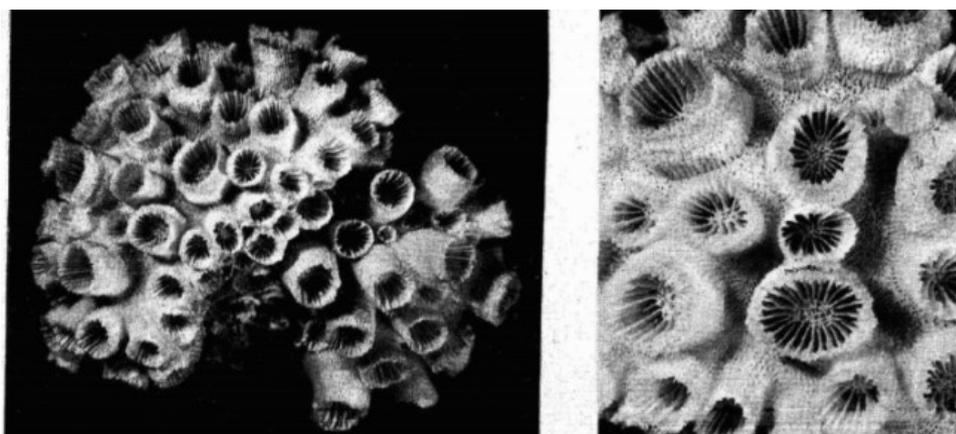
Figura 7. Características visuais do coral *T. coccinea*.



Fonte: CAIRNS, 1991.

O coral *T. tagusensis*, por sua vez, apresenta formato geralmente cilíndrico com coralitos medindo cerca de oito milímetros, paredes lisas ou, mais raramente, granulares (Figura 8). Os pólipos podem ter coloração amarelo-limão com prolongamentos variando de vermelho a violeta (WELLS, 1982). O formato e o tamanho dos coralitos, bem como as demais características estruturais, são de grande importância na identificação taxonômica de espécies pertencentes ao gênero *Tubastraea*.

Figura 8. Características visuais do coral *T. tagusensis*.



Fonte: WELLS, 1982.

A capacidade de propagação e sobrevivência de corais da espécie *T. coccinea* já foi objeto de estudo de Capel e seus colaboradores (2014). Os autores demonstraram, mediante simulação em aquários, que os pólipos do coral-sol são capazes de se desprender de suas

colônias de origem e de formar um novo esqueleto calcário, responsável pela sua aderência em substratos (Figura 9).

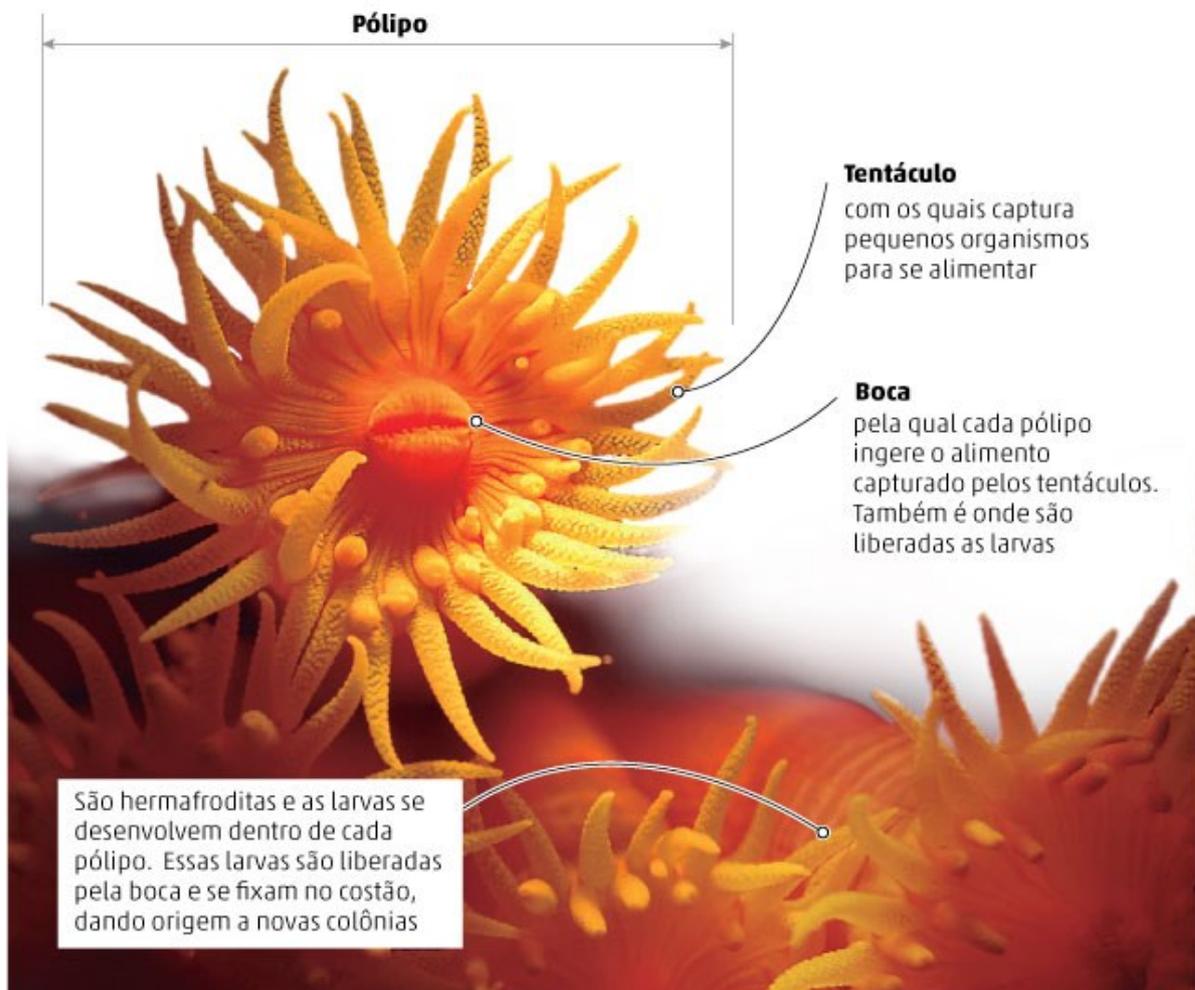
Figura 9. Evolução de um pólipo encontrado distante de sua colônia de origem (A) e formação de um esqueleto calcário após desprendimento de um pólipo de *T. coccinea* (B).



Fonte: CAPEL et al., 2014.

Quanto à reprodução, o coral *T. coccinea* é capaz de produzir larvas de maneira sexuada e assexuada (Figura 10), sendo considerada uma espécie oportunista comumente encontrada em substratos artificiais em diversas localidades (PRECHT et al., 2014).

Figura 10. Reprodução do coral-sol.



Fonte: MAArE – Monitoramento Ambiental da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo e Entorno.

Ainda que as espécies *T. coccinea* e *T. tagusensis* tenham se notabilizado com a invasão de diversos ambientes, pouco se sabe dos metabólitos secundários produzidos por elas. A preocupação com a invasão desses corais em diversas localidades já vinha sendo demonstrada por Castro (2001, p. 367) em seus primeiros estudos, conforme mostrado no trecho a seguir:

Existe também a preocupação com a introdução de espécies exóticas de corais. No final da década de 80, algumas colônias de *Tubastraea* foram registradas em plataformas de petróleo, em Campos, norte do Estado do Rio de Janeiro (dados não

publicados). Esta espécie é agora encontrada em muitas margens rochosas do sul do Rio de Janeiro (P. S. Young e F. B. Pitombo, pers. comm.) [...] Há uma preocupação com as consequências da introdução de espécies exóticas em comunidades com baixa diversidade de corais no Brasil (tradução nossa).¹

Com base em relatos na literatura e considerando que as espécies *T. coccinea* e *T. tagusensis* são nativas do Oceano Pacífico, pode-se afirmar que o processo de invasão por parte destas provavelmente seguiu uma sequência geográfica através do Golfo do México, Caribe, Curaçao, Equador e Brasil. Neste último, essas espécies podem ser encontradas invadindo uma grande extensão, desde a costa de Santa Catarina até Sergipe. No Rio de Janeiro há uma série de localidades invadidas pelo coral-sol, com destaque para a Ilha Grande, conforme relatado por Paula e Creed (2005), Lages e colaboradores (2010) e Silva e colaboradores (2011 e 2014). Já no litoral de São Paulo, já foi descrita a presença de *Tubastraea* sp. na Ilha Vitória, por Mantelatto e colaboradores (2011).

Mais recentemente, em 2012, *T. coccinea* foi encontrada em costões rochosos na Ilha do Arvoredo, em Santa Catarina, sendo identificada pelo professor Dr. Alberto Lindner, do Departamento de Ecologia e Zoologia, do Centro de Ciências Biológicas da UFSC. Desde então, a Rebio Marinha do Arvoredo, juntamente com a UFSC e o projeto coral-sol, realizam o manejo do coral invasor no entorno da Ilha.

A disseminação de *Tubastraea* sp. pode causar prejuízos para populações nativas e para a economia, afetando a pesca e o turismo. Medidas de controle da invasão são necessárias, como o controle de vetores que auxiliam na propagação do organismo invasor. No caso do coral-sol, seus principais vetores são a bioincrustação e a água de lastro, já que a disseminação do gênero *Tubastraea* está relacionada principalmente com a navegação (OIGMAN-PSZCZOL et al., 2017).

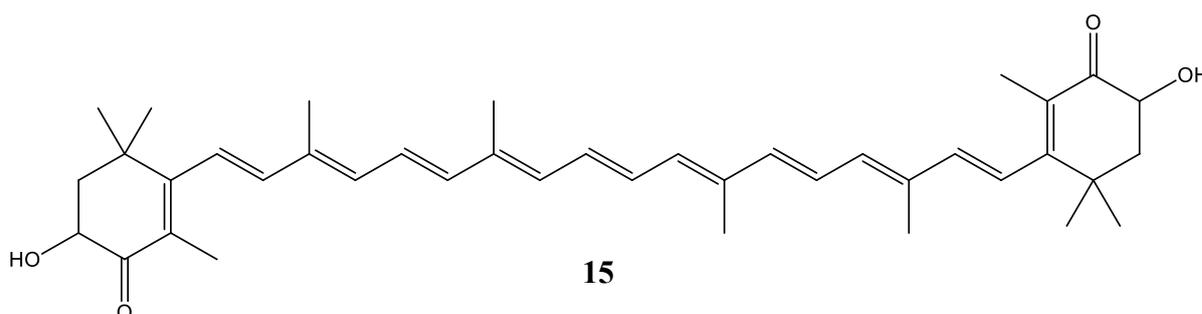
¹ No original: There is also concern about the introduction of alien coral species. In the late 80s, a few colonies of *Tubastraea* were recorded on offshore oil platforms, in Campos, northern Rio de Janeiro State (unpubl. data). This species is now found on many rocky shores south of Rio de Janeiro (P. S. Young and F. B. Pitombo, pers. comm.) [...] There is concern about the consequences of introducing alien species into Brazilian low diversity coral communities.

1.2.2.1.1 Metabólitos secundários isolados de *Tubastraea* sp.

Considerando o contexto ecológico em que o coral-sol está inserto, grande parte dos estudos demonstra sua capacidade invasora e apresenta as novas localidades em que foi observado. Estudos químicos com o objetivo de caracterizar os metabólitos secundários (produzidos por corais do gênero *Tubastraea*) existem em menor número, todavia.

Com o objetivo de investigar quimicamente as espécies *T. coccinea* e *T. tagusensis*, Maia e colaboradores (2014) analisaram os extratos desses corais (coletados em Angra dos Reis, RJ) por meio de espectroscopia de Raman, revelando a presença de carotenoides do tipo astaxantina (Figura 11), responsáveis pela coloração amarelada desses organismos.

Figura 11. Carotenoide do tipo astaxantina isolado das espécies *T.cocinea* e *T. tagusensis*.



Fonte: MAIA et al., 2014.

Atualmente, sabe-se que corais do gênero *Tubastraea* produzem alcaloides indólicos tipo aplisinopsina, alcaloides piperídnicos tipo tubastraina, alcaloides bisindólicos tipo tubastrindol, além de macrolídeos tipo micalolídeo, lipídeos e esteroides, os quais serão mostrados a seguir.

1.2.2.1.1.1 Alcaloides

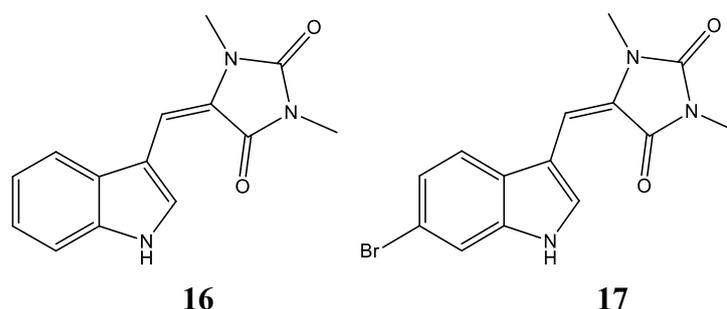
Alcaloides são metabólitos encontrados em plantas, fungos, animais e organismos marinhos, geralmente derivados de aminoácidos, de característica básica e apresentando em sua estrutura química átomos de nitrogênio (KLEIN-JÚNIOR e HENRIQUES, 2017). Conforme relatos na literatura, os alcaloides já isolados de corais do gênero *Tubastraea*

podem se apresentar como derivados da piperidina (amina heterocíclica composta por um anel de seis membros) e do indol (sistema bicíclico composto por um anel benzênico acoplado a um pirrol).

1.2.2.1.1.1 Alcaloides indólicos tipo aplisinopsina

Os alcaloides indólicos apresentam em sua estrutura um sistema indólico derivado do aminoácido L-triptofano. Um dos seus representantes é a aplisinopsina, metabólito isolado pela primeira vez de esponjas do gênero *Aplysinopsis* e com atividades citostática e antimicrobiana já relatadas. Essa classe de alcaloides já foi isolada de corais do gênero *Tubastraea*, conforme publicado por Guella e colaboradores (1988) e Meyer e colaboradores (2009) (Figura 12).

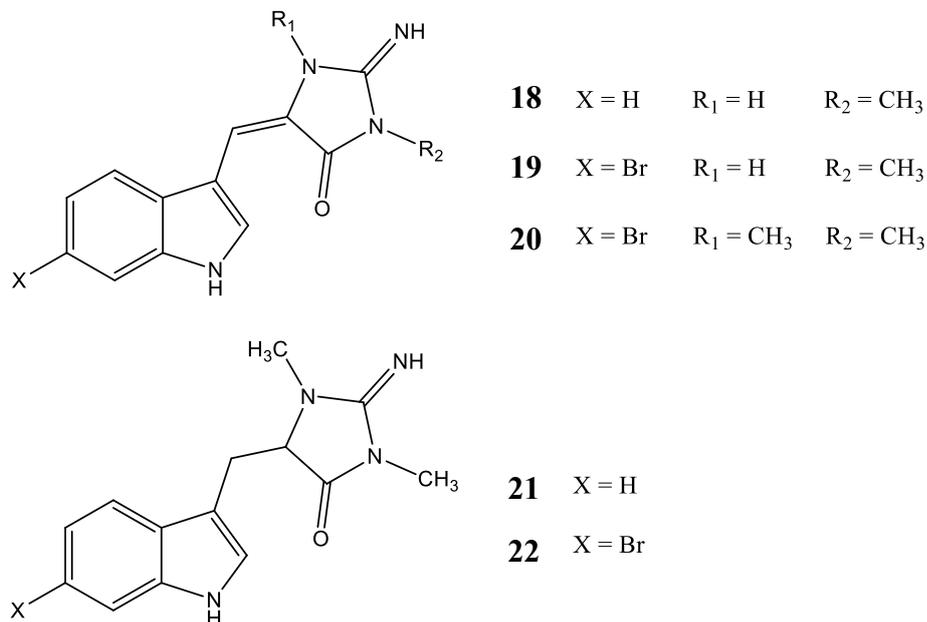
Figura 12. Alcaloides indólicos tipo aplisionopsina isoladas de *Tubastraea* sp. 3'-deimino3'-oxoaplisinopsina (**16**) e 6-bromo-3'-oxoaplisinopsina (**17**).



Fonte: GUELLA et al., 1988, MEYER et al., 2009.

Para a espécie *T. coccinea*, coletada em uma região da Pupukea, no Oahu, EUA, Okuda e colaboradores (1982) relataram o isolamento de cinco aplisinopsinas (**18–22**), representadas na Figura 13 a seguir. Essas substâncias foram isoladas a partir do extrato etanólico, fazendo-se uso de resina Sephadex® LH-20 ou de alumina como fase estacionária durante a separação cromatográfica.

Figura 13. Aplisinopsinas isoladas de *T. coccinea* coletada em Oahu, EUA.

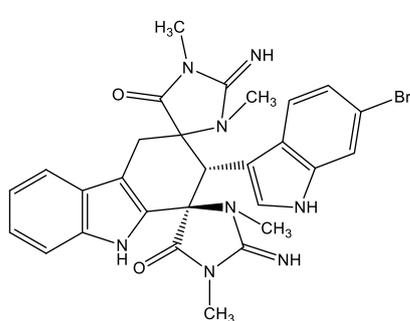


Fonte: OKUDA et al., 1982.

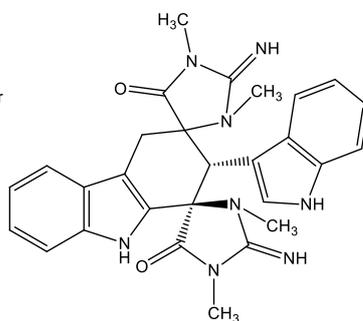
1.2.2.1.1.2 Alcaloides bisindólicos tipo tubastrindol

Os alcaloides bisindólicos caracterizam-se pela presença de dois grupamentos indólicos. O isolamento desse tipo de alcaloide, a partir de *Tubastraea* sp. coletado no Japão, foi relatado por Iwagawa e colaboradores (2003 e 2008), sendo denominados de tubastrindol A, tubastrindol B, tubastrindol C, tubastrindol D, tubastrindol E, tubastrindol F, tubastrindol G e tubastrindol H (Figura 14).

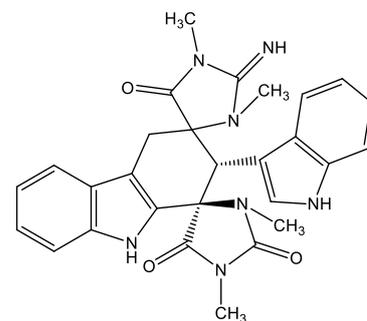
Figura 14. Estruturas químicas dos compostos tubastrindóis A–H (23–30) isolados de *Tubastraea* sp. coletado no Japão.



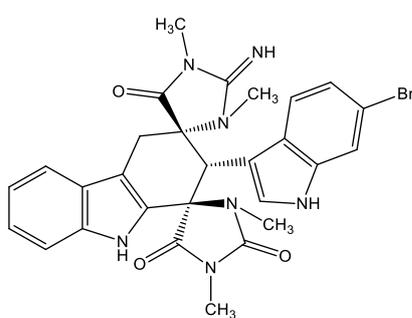
23 $C_{28}H_{27}O_2N_8Br$
Tubastrindol A



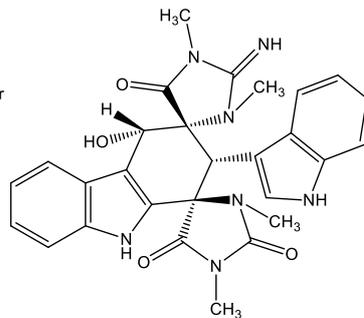
24 $C_{28}H_{28}O_2N_8$
Tubastrindol B



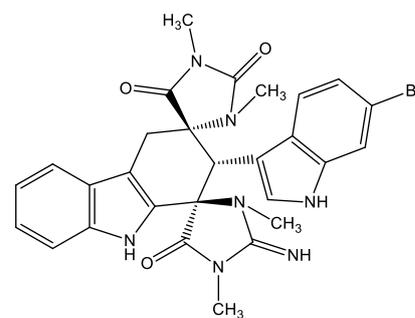
25 $C_{28}H_{27}O_3N_7$
Tubastrindol C



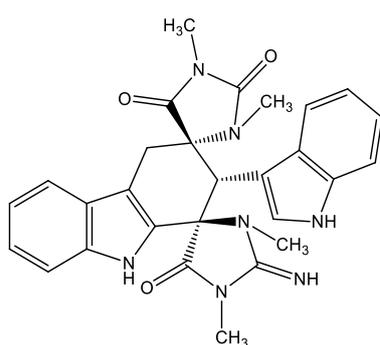
26 $C_{28}H_{26}O_3N_7Br$
Tubastrindol D



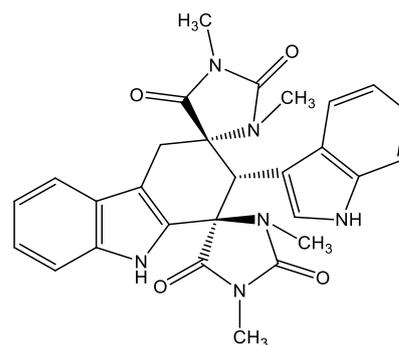
27 $C_{28}H_{27}O_4N_7$
Tubastrindol E



28 $C_{28}H_{26}O_3N_7Br$
Tubastrindol F



29 $C_{28}H_{27}O_3N_7$
Tubastrindol G

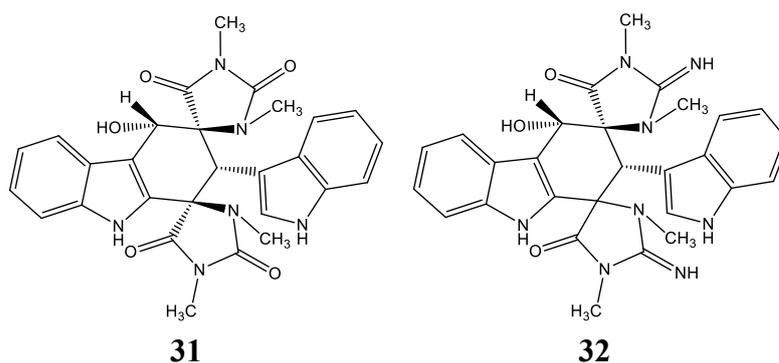


30 $C_{28}H_{26}O_4N_6$
Tubastrindol H

Fonte: IWAGAWA et al., 2003 e 2008.

Mancini e colaboradores (2003), por sua vez, isolaram de *Tubastraea* sp. coletado nas Filipinas um novo composto dessa mesma classe, porém denominaram-no de cicloaplisinopsina B. Posteriormente, Meyer e colaboradores (2009) investigaram um coral do gênero *Tubastraea* coletado no Yemen, isolando a cicloaplisinopsina C (Figura 15).

Figura 15. Estruturas químicas dos compostos cicloaplisinopsina B (**31**) e cicloaplisinopsina C (**32**) isolados de *Tubastraea* sp.



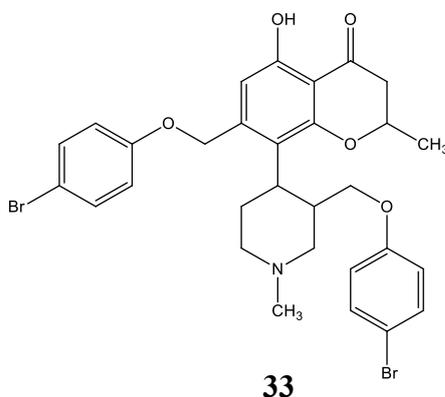
Fonte: MANCINI et al., 2003; MEYER et al., 2009.

1.2.2.1.1.1.3 Alcaloides piperidínicos tipo tubastraina

Os alcaloides piperidínicos são caracterizados pela presença de uma piperidina (anel heterocíclico saturado com seis membros, um dos quais nitrogênio). Como exemplos clássicos da presença de alcaloides piperidínicos pode-se citar a cicuta (substância tóxica extraída de *Conium maculatum*) e a lobelina (alcaloide extraído da *Lobelia inflata*).

Tratando-se da presença de alcaloides piperidínicos em organismos marinhos, Alam e colaboradores (1988) investigaram o coral da espécie *T. micranthus* coletado em Palau, com o isolamento de um novo alcaloide chamado tubastraina (Figura 16).

Figura 16. Tubastráina isolada de *T. micranthus* coletado em Palau.

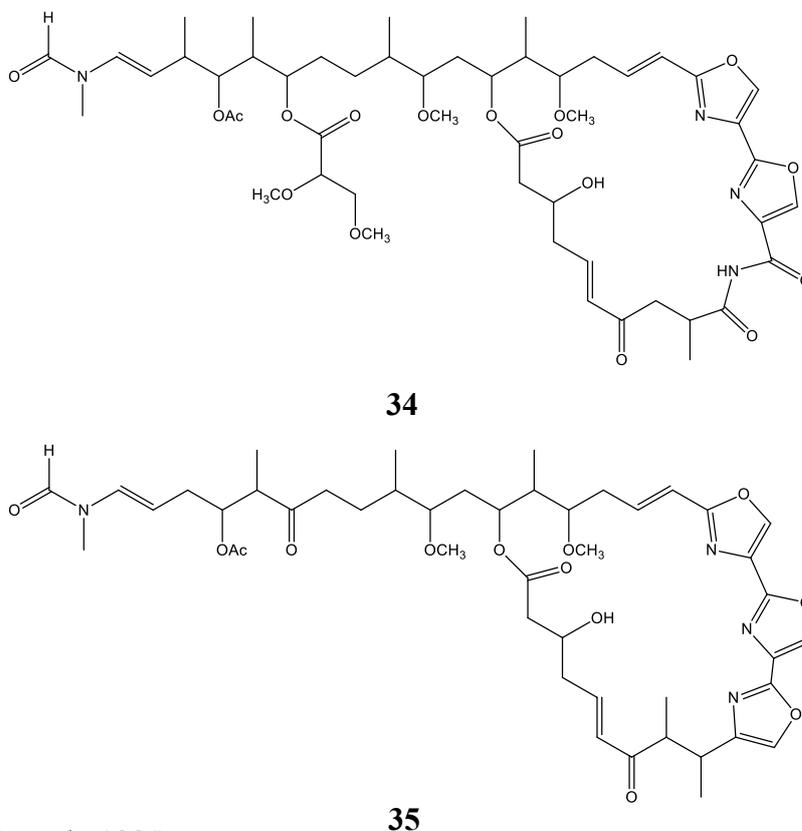


Fonte: ALAM et al., 1988.

1.2.2.1.1.2 Macrolídeos tipo micalolídeo

Os macrolídeos são metabólitos que contêm em sua estrutura uma lactona em um anel macrocíclico. Um dos compostos pertencentes à classe dos macrolídeos é o micalolídeo, isolado pela primeira vez da esponja *Mycale* sp. (micalolídeos A, B e C), com atividade citotóxica sobre células de melanoma B-16 com CI_{50} entre 0,5 e 1,0 ng/mL (FUSETANE et al., 1989). Compostos dessa classe já foram isolados por Rashid e colaboradores (1995), ao investigarem a espécie *T. faulkneri* coletada na Austrália, com o isolamento de um micalolídeo já relatado previamente (micalolídeo C) e dois novos (micalolídeos D e E) (Figura 17).

Figura 17. Estruturas químicas do micalolídeo D (**34**) e micalolídeo E (**35**) isolados de *T. faulkneri* coletado na Austrália.



Fonte: RASHID et al., 1995.

1.2.2.1.1.3 Lipídeos e esteroides

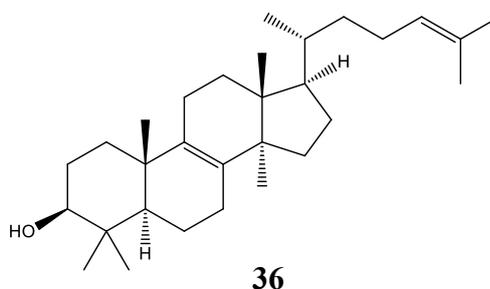
Os lipídeos são moléculas orgânicas hidrofóbicas responsáveis pelo fornecimento de energia para o corpo, além de apresentarem funções regulatórias, atuarem no controle da homeostase e estarem presentes nos componentes estruturais das membranas biológicas. Entre as classes mais comuns de lipídeos pode-se citar os triglicerídeos, os fosfolipídeos, os esteroides e os glicolipídeos (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006), estando presentes no metabolismo de diversos organismos marinhos, como peixes, esponjas e corais. Como exemplo, Yamashiro e colaboradores (1999) encontraram em *Tubastraea* sp. fosfolipídeos, esteroides, ácidos graxos livres, triglicerídeos, monoalquildiacilgliceróis, ésteres e álcoois graxos superiores e ésteres de esteroides.

1.2.2.1.1.4 Peróxidos de esteroides

Até o presente momento, não há relatos do isolamento dessa classe de compostos de corais do gênero *Tubastraea*. Uma revisão de seus aspectos químicos e biológicos é importante, no entanto, para a compreensão dos resultados apresentados nesta dissertação.

Os esteroides são compostos que apresentam o anel tetracíclico do lanosterol (Figura 18). Variações na cadeia lateral são responsáveis pela grande diversidade de esteroides encontrados, sendo o colesterol o de maior ocorrência em organismos marinhos e em animais (DEWICK, 2009).

Figura 18. Estrutura química do lanosterol.

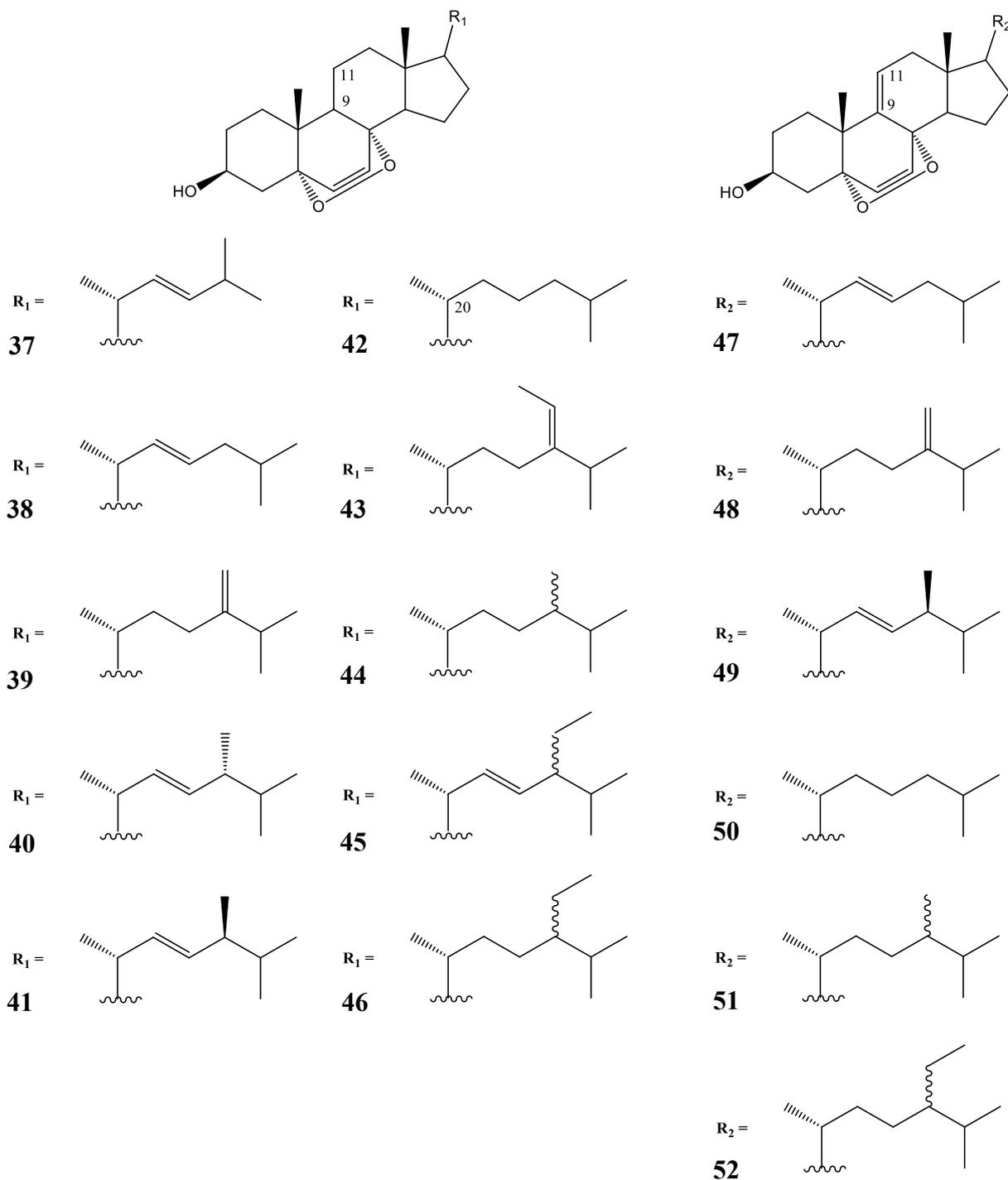


Fonte: DEWICK, 2009.

Quando um composto apresenta o grupo peróxido ($-O-O-$), formando uma ponte entre dois átomos de carbono de um anel, este é chamado de “epidioxi” (SOCIETAT CATALANA DE QUÍMICA, 2013). Estando presente na estrutura de esteroides são denominados de “epidioxiesteroides” ou “peróxido de esteroides”.

Um dos primeiros trabalhos com peróxidos de esteroides foi publicado por Gunatilaka e colaboradores (1981), com o isolamento de 16 substâncias pertencentes a essa classe, provenientes dos organismos marinhos *Ascidia nigra*, *Dendrogyra cylindrus*, *Thalysias juniperina* e *Aplysia dactylomela* (Figura 19).

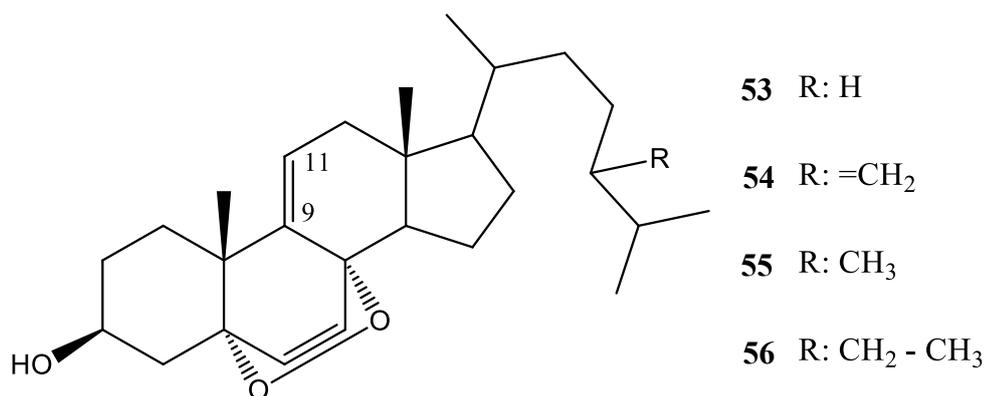
Figura 19. Peróxidos de esteroides isolados dos organismos marinhos *Ascidia nigra*, *Dendrogyra cylindrus*, *Thalysias juniperina* e *Aplysia dactylomela* (37–52).



Fonte: GUNATILAKA et al., 1981.

Na mesma época, Guyot e Durgeat (1981) isolaram quatro peróxidos de esteroides dos tunicados *Phallusia mammillata* e *Ciona intestinalis*, coletados na costa francesa (Figura 20).

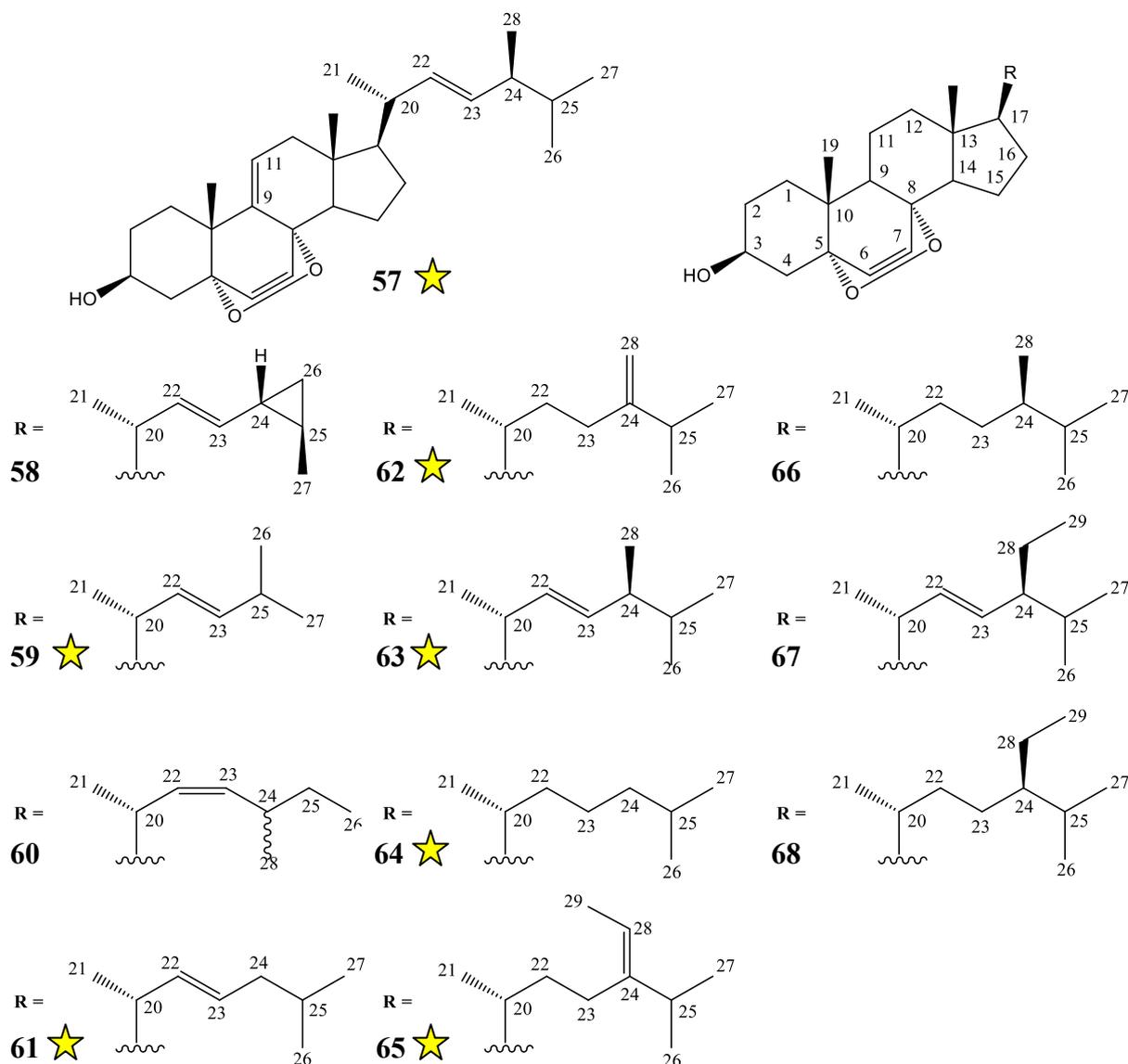
Figura 20. Peróxidos de esteroides isolados dos tunicados *Phallusia mammillata* e *Ciona intestinalis* (**53–56**).



Fonte: GUYOT e DURGEAT, 1981.

Ioannou e colaboradores (2009), posteriormente, investigaram os extratos da gorgônia *Eunicella cavolini* e da ascídia *Trididemnum inarmatum*, coletados no Golfo de Mália (Grécia) com consequente isolamento de doze esteroides pertencentes à classe dos peróxidos de esteroides (Figura 21).

Figura 21. Peróxidos de esteroides isolados de *E. cavolini* e *T. inarmatum* (57–68).



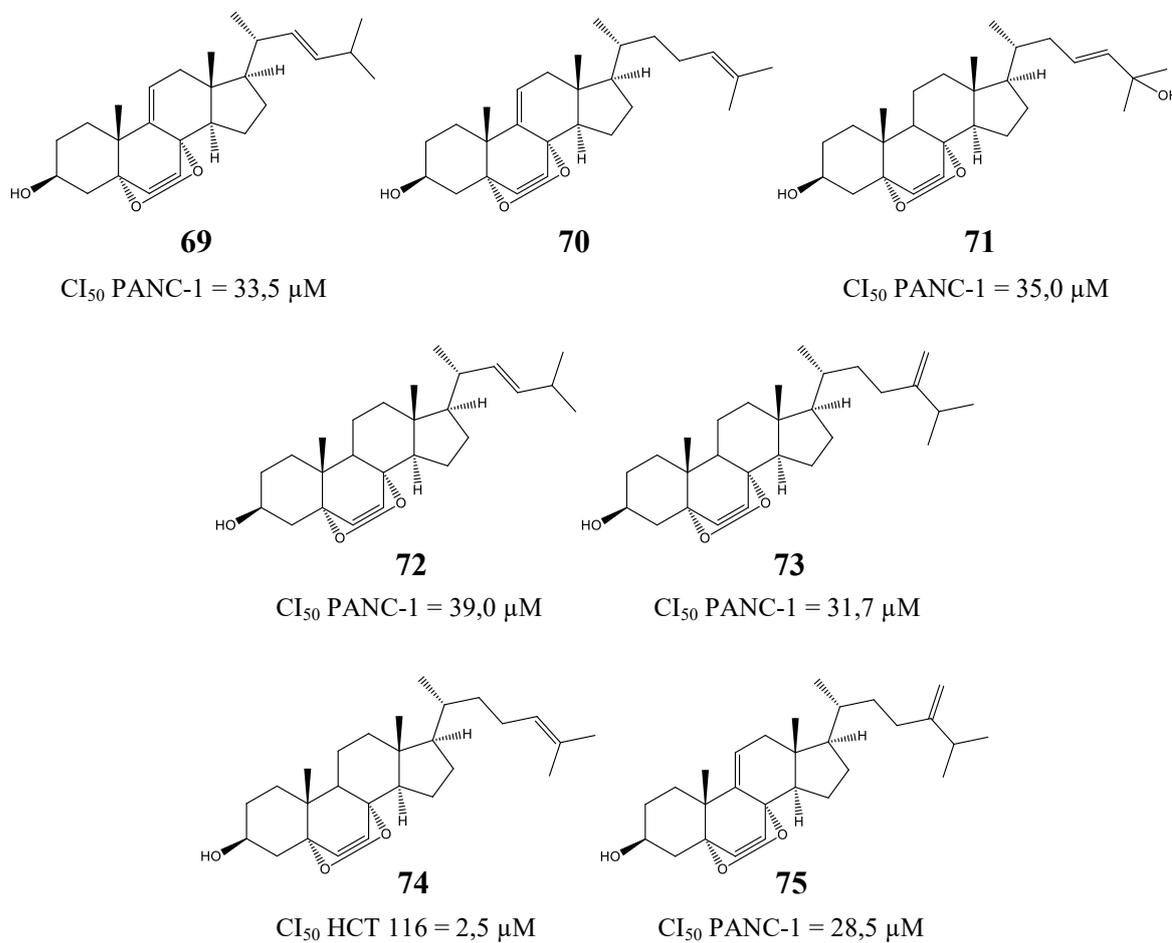
Fonte: IOANNOU et al., 2009.

Legenda: ★ = Peróxidos de esteroides isolados anteriormente por Gunatilaka e colaboradores (1981).

Num estudo mais recente, Mun e colaboradores (2014) investigaram a esponja *Monanchora* sp., isolando sete peróxidos de esteroides (Figura 22, compostos 69–73), três deles inéditos: $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi-24-norcolesta-6,9(11),22-trien-3 β -ol (**69**), $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi-colesta-6,9(11),24-trien-3 β -ol (**70**) e $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi-colesta-6,23-dien-3 β ,25-diol (**71**), os quais tiveram sua citotoxicidade avaliada pelo ensaio do MTT. Dos sete esteroides isolados, cinco foram citotóxicos para as células de câncer de pâncreas PANC-1, e um composto

apresentou promissora atividade citotóxica sobre as células de câncer colorretal HCT 116 (CI_{50} apresentadas na Figura 22).

Figura 22. Peróxidos de esteroides isolados da esponja *Monanchora* sp.



Fonte: MUN et al., 2014.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os aspectos químicos e a atividade biológica de extratos do coral *T. coccinea* presente na Ilha do Arvoredo, em Santa Catarina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar o fracionamento cromatográfico de extratos obtidos a partir de material coletado entre os anos de 2016 e 2019 na Ilha do Arvoredo, visando ao isolamento dos metabólitos secundários predominantes;
- b) Elucidar a estrutura química dos metabólitos secundários isolados;
- c) Avaliar as atividades citotóxica, anti-herpética e antiprotozoária, por intermédio da cooperação com grupos de pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina.

3 METODOLOGIA

A investigação química dos extratos do coral *T. coccinea* foi realizada no laboratório Central Analítica, no Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina (CIF/CSS/UFSC), utilizando a infraestrutura disponível nesse laboratório e nos laboratórios do Departamento de Ciências Farmacêuticas.

A avaliação das atividades biológicas foi realizada em colaboração com laboratórios parceiros. A avaliação das atividades citotóxica e anti-herpética foi desenvolvida no laboratório de Virologia Aplicada, no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (MIP/CCB/UFSC), pela Dra. Naira Fernanda Zanchett Schneider, sob a coordenação da professora Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões. A avaliação da atividade antiprotozoária foi realizada no laboratório de Protozoologia, no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (MIP/CCB/UFSC), pela Dra. Milene Hoehr de Moraes, sob a coordenação do professor Dr. Mário Steindel.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Material marinho

As coletas do coral-sol foram realizadas pelo ICMBio na Ilha do Arvoredo, em Santa Catarina (Figura 23), nas datas, locais e coordenadas geográficas descritas na Tabela 1.

Figura 23. Locais de coleta do coral *T. coccinea*.



Fonte: Google Earth®, modificado pela autora.

Legenda: ★ = Locais de coleta do coral *T. coccinea*.

Tabela 1. Datas, locais e coordenadas geográficas das coletas do coral *T. coccinea* na Ilha do Arvoredo, em Santa Catarina.

Data da coleta	Local da coleta	Coordenada geográfica
Abril de 2016	Saco do Vidal	27°17'48"S e 48°21'42"O
Maior de 2017	Saco do Vidal	27°17'48"S e 48°21'42"O
Maior de 2018 A	Baia do Engenho	27°17'37"S e 48°22'01"O
Maior de 2018 B	Rancho Norte	27°17'44"S e 48°21'36"O
Abril de 2019	Baia do Engenho	27°17'37"S e 48°22'01"O
Junho de 2019	Rancho Norte	27°17'44"S e 48°21'36"O

3.1.2 Solventes e reagentes

Os extratos brutos foram obtidos por maceração com etanol e/ou acetona P.A. O fracionamento cromatográfico e as análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizados utilizando-se solventes P.A. das marcas Qhemis®, Sigma®, Neon®, Synth® e Vetec®.

As colunas de cromatografia líquida a vácuo (CLV), cromatografia líquida de média pressão (CLMP) e cromatografia em coluna aberta (CCA) foram realizadas fazendo-se uso de gel de sílica SiliaFlash® G60 com partículas de granulometria entre 0,040 e 0,063 mm e eluentes em ordem crescente de polaridade, contendo predominantemente hexano e acetato de etila. As frações que apresentavam espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) sugerindo a presença de compostos interessantes (sinais acima de δ 6,0 sugerindo hidrogênios em anéis aromáticos ou hidrogênios possivelmente ligados a carbonos halogenados ou oxigênio acima de δ 3,0) foram purificadas sequencialmente através de cromatografia em coluna aberta e/ou resina de Sephadex® LH-20. As colunas preenchidas com resina de Sephadex® LH-20 foram realizadas fazendo-se uso de clorofórmio:metanol (1:1) como fase móvel.

Para avaliação do perfil cromatográfico, foram utilizadas cromatoplacas, com suporte de alumínio e cobertas com gel de sílica 60 F₂₅₄ da Silicycle®, reveladas com solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento. Quando necessário, utilizou-se padrão de colesterol 95% da marca Sigma® para comparação cromatográfica. Para a obtenção de espectros por RMN as amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl₃) da marca CIL®.

3.1.3 Equipamentos

A concentração dos extratos brutos e de frações obtidas após procedimentos cromatográficos foi realizada por meio de rotaevaporador da marca Büchi®. Frações de maior polaridade e de menor volume foram evaporadas fazendo-se uso de equipamento Syncore®.

O fracionamento cromatográfico foi feito através de colunas em sistemas abertos ou fechados (Sepacore® da marca Büchi®) utilizando gel de sílica de fase normal.

As cromatoplasmas foram visualizadas sob luz UV em comprimento de onda de 254 e 366 nm em câmara de luz ultravioleta modelo Prodicil®.

Os espectros de RMN foram obtidos por espectrômetros Bruker® de 300 MHz (modelo Fourier 300) e 500 MHz (modelo Fourier 500) e os espectros de ultravioleta foram obtidos por espectrofotômetro UV/Vis da PerkinElmer® (modelo Lambda 25).

A análise espectroscópica de absorção no infravermelho foi realizada por espectrofotômetro Shimadzu® (modelo IRPrestige-21).

As análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foram realizadas utilizando-se cromatógrafo a gás (Clarus 680) acoplado ao espectrômetro de massas (Clarus SQ85) da PerkinElmer®. O método consistiu no seguinte programa de temperatura: detector a 280 °C, injetor a 250 °C, gradiente de temperatura de 170 °C nos primeiros quatro minutos até atingir uma temperatura de 300 °C (3 °C/min). As amostras foram dissolvidas em acetonitrila grau HPLC e, como gás carreador, fez-se uso de hélio. O tempo de cada corrida foi de 47,33 minutos.

A análise microscópica do esqueleto calcário de *T. coccinea* (após extração de seus compostos) foi realizada por Microscópio Zeiss Axio Zoom V.16 (lente de aumento 16x). O processamento da imagem obtida foi realizado utilizando-se o *software* ZEN Lite.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Coleta e obtenção do extrato bruto

Para a investigação química e biológica do coral *T. coccinea* foram utilizados os materiais marinhos disponibilizados pelo ICMBio. Como parte do plano de manejo do coral-sol, os profissionais do ICMBio realizaram a contagem dos pólipos com o intuito de quantificar o número de colônias de *T. coccinea* presentes na Ilha do Arvoredo. Após esse procedimento, o coral foi encaminhado para a UFSC, sendo armazenado em solvente para extração dos compostos por meio de macerações sucessivas, conforme descrito na Tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2. Métodos de extração dos compostos de *T. coccinea* conforme a data de coleta.

Data da coleta	Método	Solvente extrator
Abril de 2016	Maceração (3 x)	Etanol
Maior de 2017	Maceração (1 x)	Acetona
	Maceração (3 x)	Etanol
Maior de 2018 A	Maceração (3 x)	Acetona
Maior de 2018 B	Maceração (3 x)	Acetona
Abril de 2019	Maceração (3 x)	Acetona
Junho de 2019	Maceração (3 x)	Acetona

Ao final, os extratos foram concentrados, separadamente, por meio de rotaevaporador, sob pressão reduzida e em banho-maria com temperatura de 40 °C. A variação na utilização de solventes para a extração e obtenção do extrato bruto se deu na tentativa de aprimorar o método de extração, aumentando o rendimento e reduzindo a quantidade de carbonato de cálcio (característico de corais) e de sal nos extratos.

3.2.2 Fracionamento cromatográfico

O fracionamento cromatográfico dos extratos brutos e frações foi realizado por meio de colunas cromatográficas (CLV, CLMP e CCA), preenchidas com gel de sílica, utilizando-

se solventes em ordem crescente de polaridade, ou resina Sephadex® LH–20. O processo de fracionamento variou conforme as características do extrato bruto de cada coleta. A metodologia mais detalhada para cada extrato bruto será abordada a seguir.

3.2.2.1 Coleta de abril de 2016: isolamento da substância CS.PE.01

Após evaporação de todo o solvente extrator, o extrato bruto seco foi misturado ao gel de sílica e macerado com auxílio de gral e pistilo. A pastilha obtida foi utilizada em uma primeira separação cromatográfica, realizando-se ao todo três CLVs (CLV1, CLV2 e CLV3). Como fase estacionária, fez-se uso de gel de sílica de fase normal, e como fase móvel foram utilizados solventes em ordem crescente de polaridade, contendo hexano, acetato de etila, metanol e butanol. As proporções de cada solvente foram definidas por meio de testes prévios, as quais se mostraram adequadas diante da polaridade dos compostos presentes nos extratos. Ao final, as frações geradas foram analisadas por CCD e reunidas conforme semelhança cromatográfica, resultando em sete frações, denominadas de A a G (Tabela 3).

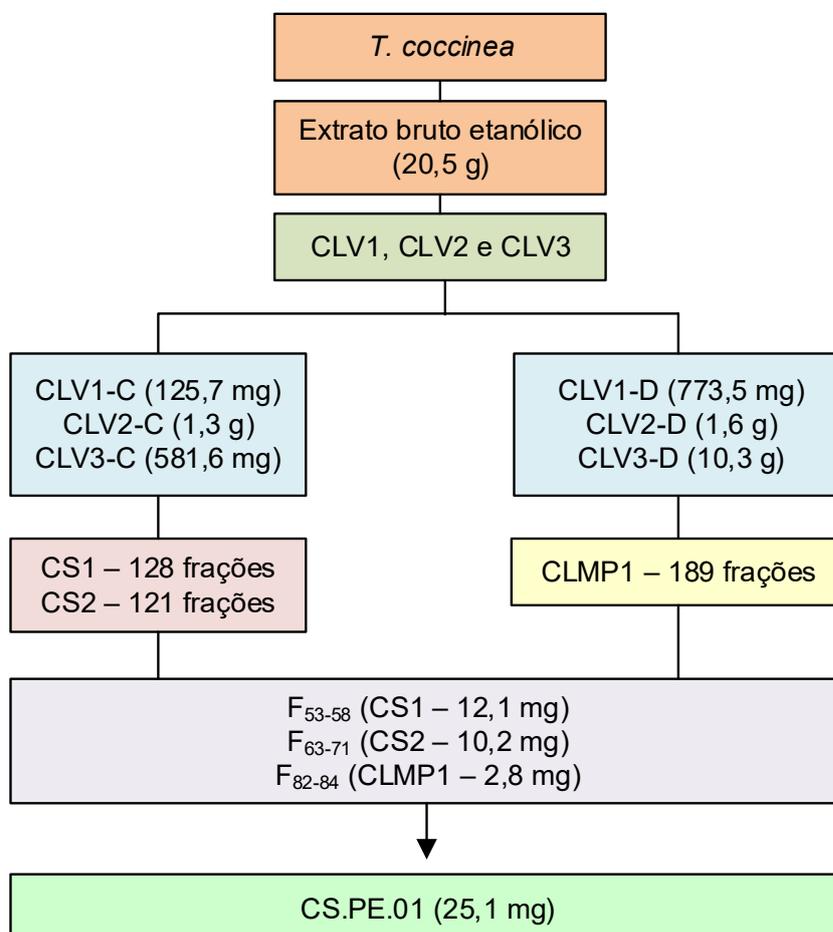
Tabela 3. Frações e sistemas de solventes utilizados nas CLVs da coleta de abril de 2016.

Fração	Fase móvel
A	Hexano:Acetato de etila (9:1)
B	Hexano:Acetato de etila (1:1)
C	Acetato de etila 100%
D	Acetato de etila:Metanol (7:3)
E	Acetato de etila:Metanol (1:1)
F	Metanol 100%
G	Butanol 100%

A partir das frações obtidas nas CLVs, foram realizadas, ao todo, sete colunas cromatográficas abertas (CS1 a CS7), duas colunas líquidas de média pressão (CLMP1 e CLMP2) e 15 colunas Sephadex® LH–20 (SPH1 a SPH15).

O fracionamento cromatográfico do extrato bruto da coleta de abril de 2016, que levou à substância isolada (CS.PE.01), é apresentado de forma esquemática no fluxograma a seguir (Figura 24).

Figura 24. Fluxograma representando a obtenção da substância isolada CS.PE.01 a partir do coral *T. coccinea* – coleta de abril de 2016.



Fonte: Autoria própria.

Conforme mostrado no fluxograma da Figura 24, o fracionamento cromatográfico realizado se deu da seguinte maneira:

Fração C: A fração resultante da reunião das frações C (fase móvel acetato de etila 100%) provenientes das três CLVs foi fracionada por meio de duas colunas cromatográficas em gel de sílica (CS1 e CS2). Como fase móvel, foi utilizado hexano, acetato de etila e etanol em diferentes proporções, resultando em 52 frações (25 na CS1 e 27 na CS2).

Fração D: Com a fração resultante da reunião das frações D (fase móvel acetato de etila:metanol 7:3) foi realizada uma coluna líquida de média pressão Sepacore® (CLMP1), resultando em 15 frações.

Após avaliação preliminar por CDD e por RMN ^1H , as frações F₅₃₋₅₈ (CS1, com 12,1 mg), F₆₃₋₇₁ (CS2, com 10,2 mg) e F₈₂₋₈₄ (CLMP1, com 2,8 mg), obtidas nas três colunas em gel de sílica, foram reunidas, originando a substância isolada denominada CS.PE.01, com 25,1 mg. A substância CS.PE.01 foi analisada por meio de RMN, obtendo-se os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C e mapa de correlação HSQC.

3.2.2.2 Coleta de maio de 2017: isolamento das substâncias CS.PE.02, CS.PE.03 e CS.DI.01

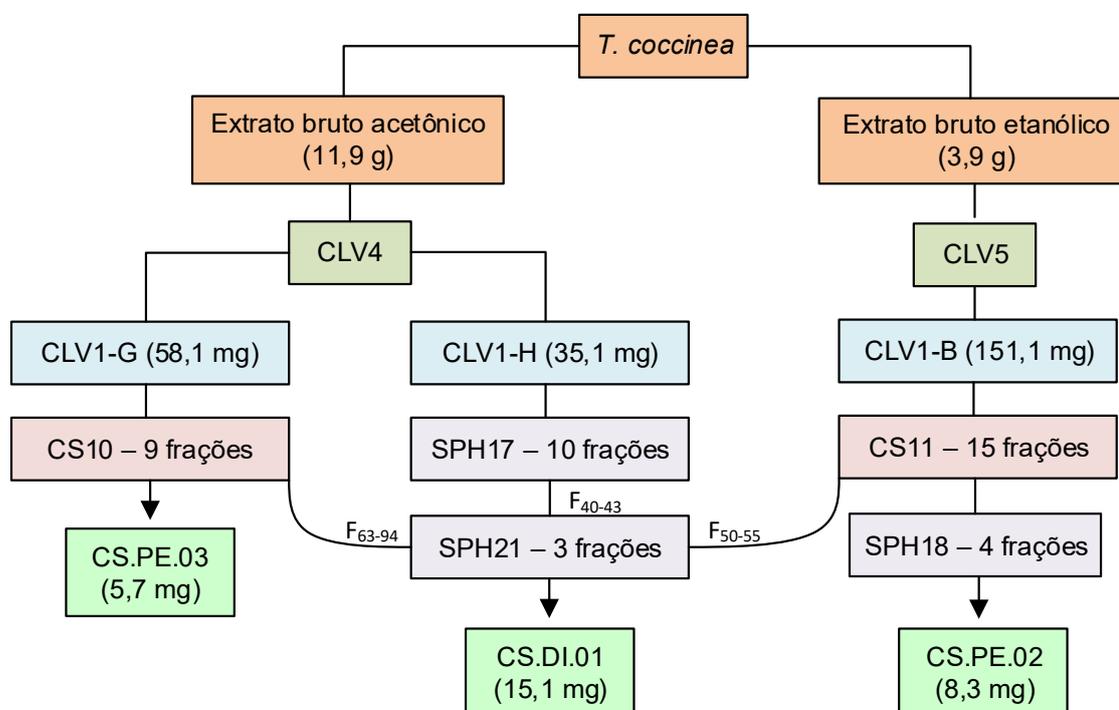
Com os extratos brutos secos (acetônico e etanólico) obtidos do material marinho coletado em maio de 2017, foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente. Após evaporação do solvente extrator, os extratos foram misturados ao gel de sílica e macerados com auxílio de gral e pistilo. Com as pastilhas obtidas foram realizadas duas CLVs (CLV4 com o extrato acetônico e CLV5 com o extrato etanólico), utilizando-se como fase estacionária gel de sílica de fase normal. Como fase móvel foram utilizados solventes em ordem crescente de polaridade, contendo hexano, acetato de etila, metanol e butanol, resultando em 11 frações (A a K) para a CLV4 e sete frações (A a G) para a CLV5 (Tabela 4).

Tabela 4. Frações e sistemas de solventes utilizados nas CLVs da coleta de maio de 2017.

CLV4:		CLV5:	
Extrato acetônico		Extrato etanólico	
Fração	Fase móvel	Fração	Fase móvel
A	Hexano 100%	A	Hexano:Acetato de etila (9:1)
B	Hexano:Acetato de etila (95:15)	B	Hexano:Acetato de etila (1:1)
C	Hexano:Acetato de etila (9:1)	C	Acetato de etila 100%
D	Hexano:Acetato de etila (85:15)	D	Acetato de etila:Metanol (7:3)
E	Hexano:Acetato de etila (8:2)	E	Acetato de etila:Metanol (1:1)
F	Hexano:Acetato de etila (7:3)	F	Metanol 100%
G	Hexano:Acetato de etila (6:4)	G	Butanol 100%
H	Hexano:Acetato de etila (1:1)		
I	Acetato de etila 100%		
J	Acetato de etila:Metanol (1:1)		
K	Metanol 100%		

Com as frações obtidas nas duas CLVs foram realizadas, ao todo, sete colunas cromatográficas abertas (CS8 a CS14), seis colunas Sephadex® LH-20 (SPH6 a SPH21) e quatro extrações em fase sólida. O fracionamento cromatográfico do extrato bruto da coleta de maio de 2017, que levou ao isolamento de três substâncias (CS.PE.02, CS.PE.03 e CS.DI.01) é apresentado no fluxograma da Figura 25.

Figura 25. Fluxograma representando a obtenção das substâncias isoladas CS.PE.02, CS.PE.03 e CS.DI.01 a partir do fracionamento cromatográfico do coral *T. coccinea* – coleta de maio de 2017.



Fonte: Autoria própria.

Como mostrado na Figura 25, os extratos brutos obtidos foram fracionados da seguinte forma:

Fração B: Após observar o perfil cromatográfico em CCD com a fração B (fase móvel hexano:acetato de etila 1:1) da CLV5, foi realizada uma coluna cromatográfica aberta (CS11 – 15 frações), resultando na fração CSCS11 F₂₇₋₃₅, com a qual foi realizada uma coluna Sephadex® LH-20 (SPH18), que por sua vez deu origem à substância isolada denominada CS.PE.02 (8,3 mg).

Fração G: Com a fração G (fase móvel hexano:acetato de etila 6:4) da CLV4 foi realizada uma coluna cromatográfica aberta (CS10 – 9 frações), resultando na substância isolada CS.PE.03 (5,7 mg).

Fração H: Com a fração H (fase móvel hexano:acetato de etila 1:1) da CLV4 foi realizada uma coluna Sephadex® LH-20 (SPH17), dando origem à fração SPH17 F₄₀₋₄₃ (2,2 mg). Devido à semelhança cromatográfica, a fração SPH17 F₄₀₋₄₃ foi reunida às frações CS10 F₆₃₋₉₄ (21,2 mg) e CS11 F₅₀₋₅₅ (26,7 mg), sendo realizada uma nova coluna Sephadex® LH-20 (SPH21). A fração SPH21 F₁₆₋₂₃ deu origem à substância isolada denominada CS.DI.01, com 15,1 mg.

3.2.2.3 Coleta de maio de 2018 A: isolamento das substâncias CS.PE.02, CS.DI.01 e CS.DI.02

Com o extrato bruto seco da coleta de maio de 2018 A foi realizada uma CLV (CLV6), utilizando-se, como fase estacionária, gel de sílica de fase normal e, como fase móvel, solventes em ordem crescente de polaridade, contendo hexano, acetato de etila, metanol e água. Ao todo foram obtidas 11 frações, denominadas de A a K (Tabela 5).

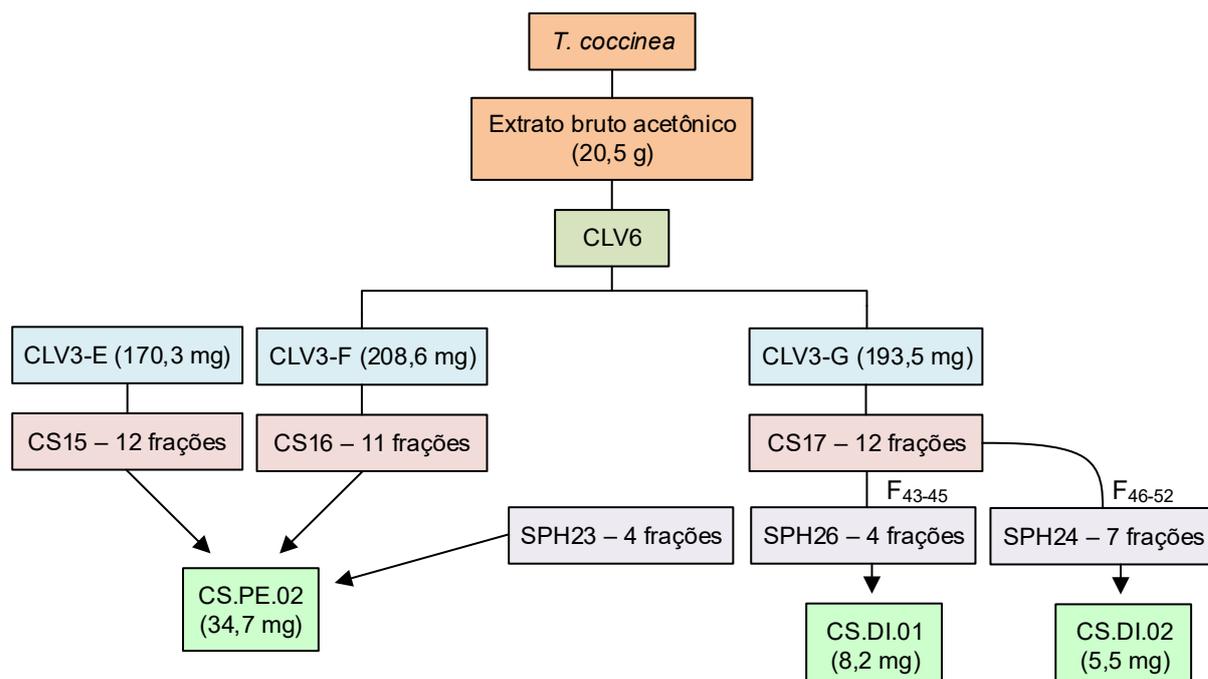
Tabela 5. Frações e sistemas de solventes utilizados na CLV6 da coleta de maio de 2018 A.

CLV6	
Fração	Fase móvel
A	Hexano 100%
B	Hexano:Acetato de etila (95:15)
C	Hexano:Acetato de etila (9:1)
D	Hexano:Acetato de etila (85:15)
E	Hexano:Acetato de etila (8:2)
F	Hexano:Acetato de etila (7:3)
G	Hexano:Acetato de etila (6:4)
H	Hexano:Acetato de etila (1:1)
I	Acetato de etila 100%
J	Acetato de etila:Metanol (1:1)
K	Metanol 100%

Com as frações obtidas na CLV6 foram realizadas, ao todo, cinco colunas cromatográficas abertas (CS15 a CS19) e cinco colunas Sephadex® LH-20 (SPH22 a SPH26). Em seguida, será dada ênfase às frações em que as substâncias foram isoladas. O

fracionamento cromatográfico do extrato bruto da coleta de maio de 2018 A, com consequente isolamento de três substâncias (CS.PE.02, CS.DI.01 e CS.DI.02) é apresentado no fluxograma da Figura 26.

Figura 26. Fluxograma de fracionamento cromatográfico do coral *T. coccinea* – coleta de maio de 2018 A.



Fonte: Autoria própria.

Conforme apresentado na Figura 26, o extrato bruto obtido a partir da coleta de maio de 2018 A foi fracionado da seguinte maneira:

Fração E: Após observar o perfil cromatográfico em CCD com a fração E (fase móvel hexano:acetato de etila 8:2), fez-se uma coluna cromatográfica aberta (CS15 – 12 frações), resultando na substância CS.PE.02 (16,0 mg).

Fração F: Com a fração F (fase móvel hexano:acetato de etila 7:3) foi realizada uma nova coluna cromatográfica aberta (CS16 – 11 frações), resultando na substância CS.PE.02 (87,4 mg). Uma fração desta coluna, a CS16 F₃₃₋₃₄, foi submetida a uma coluna Sephadex® LH-20 (SPH22), na qual também foi isolada a substância CS.PE.02 (18,7 mg).

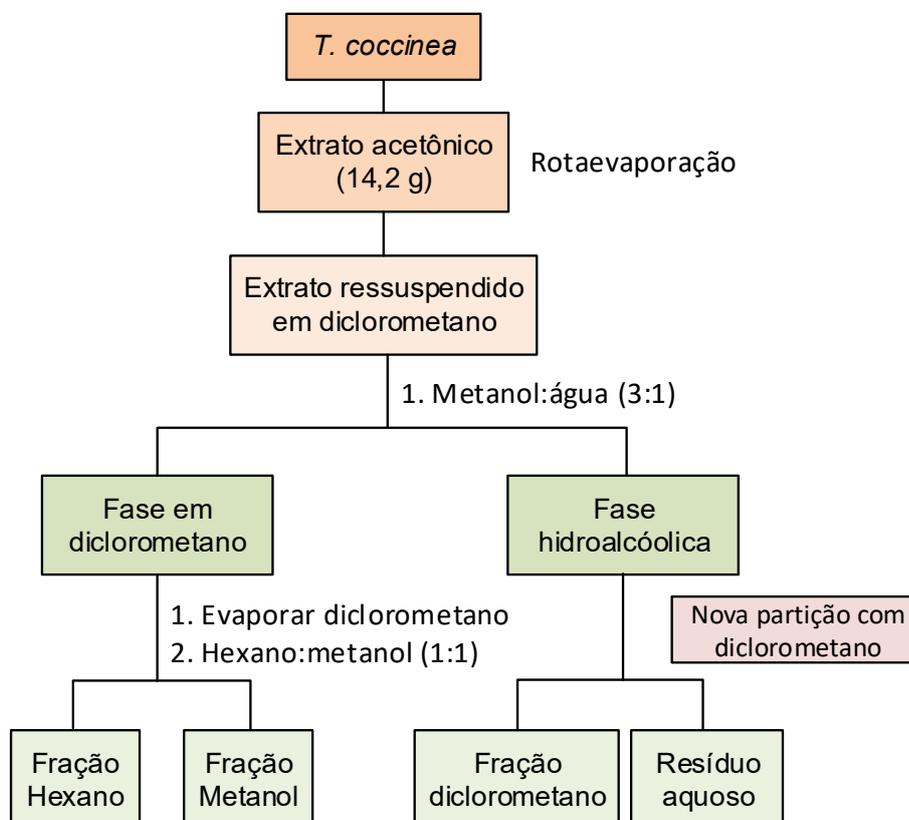
Fração G: Com a fração G (fase móvel hexano:acetato de etila 6:4) foi realizada uma coluna cromatográfica aberta (CS17 – 12 frações), resultando em diversas frações promissoras. Com a fração CS10 F₃₀₋₃₇ foi realizada uma coluna com resina Sephadex® LH-20 (SPH23), isolando-se novamente a substância CS.PE.02 (8,0 mg). Com a fração CS10 F₄₃₋₄₅ foi feita uma nova coluna Sephadex® LH-20 (SPH26), com a qual foi possível isolar a substância chamada CS.DI.01 (8,2 mg). Já a fração CS10 F₄₆₋₅₂ foi aplicada em uma nova Sephadex® LH-20 (SPH24), dando origem a uma nova substância, denominada CS.DI.02 (5,5 mg).

3.2.2.4 Coleta de maio de 2018 B: isolamento da substância CS.PE.02

Visto que em maio de 2018 foram realizadas duas coletas (coleta 2018 A e coleta 2018 B), optou-se por utilizar uma nova maneira de fracionamento dos componentes do extrato bruto, mediante uma partição líquido-líquido, na tentativa de aprimorar o processo de separação dos compostos.

Desse modo, após evaporação do solvente extrator (acetona), o extrato bruto ainda úmido foi ressuscitado em diclorometano, ao qual foi adicionado uma mistura de metanol:água na proporção 3:1, a partir do qual se prosseguiu com a partição líquido-líquido, conforme mostrado no fluxograma a seguir (Figura 27).

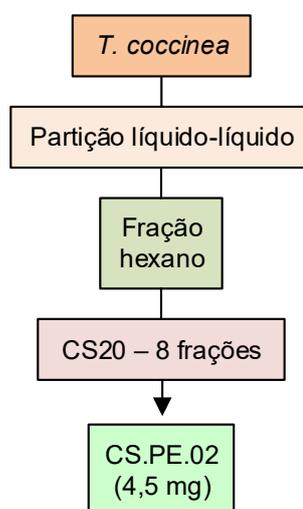
Figura 27. Fluxograma da partição líquido-líquido realizada com o extrato bruto do coral *T. coccinea* – coleta de maio de 2018 B.



Fonte: Autoria própria.

Pelo fluxograma acima (Figura 27) é possível perceber que, com a partição líquido-líquido, foram geradas três frações de interesse: fração hexano (168,4 mg), fração metanol (143,9 mg) e fração diclorometano (246,8 mg). A partir dessas frações foram realizadas, ao todo, três colunas cromatográficas abertas (CS20 a CS22). Na coluna CS20 (8 frações), realizada a partir da fração hexano, foi isolada novamente a substância CS.PE.02 com 4,5 mg (Figura 28).

Figura 28. Fluxograma de fracionamento cromatográfico do coral *T. coccinea* – coleta de maio de 2018 B.



Fonte: Autoria própria.

3.2.2.5 Coleta de abril de 2019: isolamento das substâncias CS.PE.02 e CS.DI.01

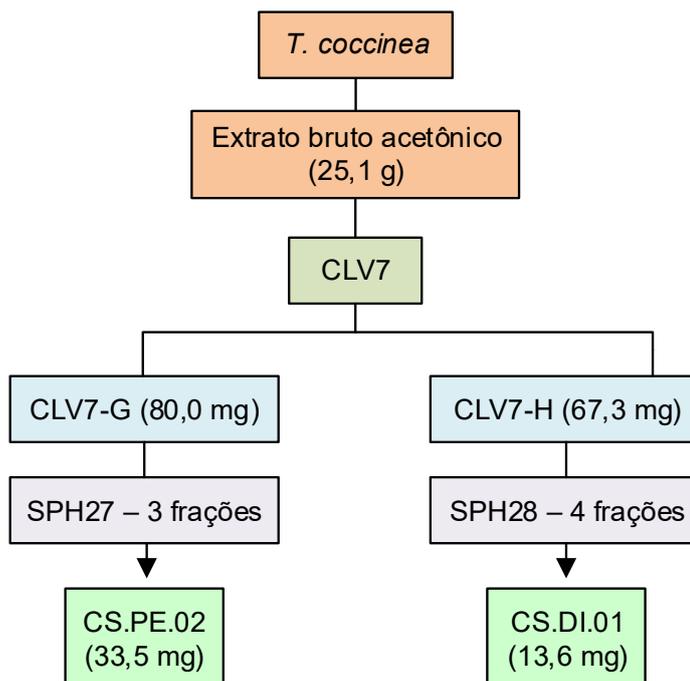
Com o extrato bruto seco da coleta de abril de 2019 foi realizada uma CLV (CLV7), utilizando-se gel de sílica de fase normal como fase estacionária, e solventes em ordem crescente de polaridade, contendo hexano e acetato de etila, como fase móvel. Ao todo foram obtidas nove frações, denominadas de A a I (Tabela 6).

Tabela 6. Frações e sistemas de solventes utilizados na CLV7 da coleta de abril de 2019.

CLV7	
Fração	Fase móvel
A	Hexano 100%
B	Hexano:Acetato de etila (95:15)
C	Hexano:Acetato de etila (9:1)
D	Hexano:Acetato de etila (85:15)
E	Hexano:Acetato de etila (8:2)
F	Hexano:Acetato de etila (7:3)
G	Hexano:Acetato de etila (6:4)
H	Hexano:Acetato de etila (1:1)
I	Acetato de etila 100%

Com as frações obtidas na CLV7 foram realizadas duas colunas com resina Sephadex® LH-20 (SPH27 e SPH28), que levaram ao isolamento das substâncias CS.PE.02 e CS.DI.01, conforme apresentado no fluxograma a seguir (Figura 29).

Figura 29. Fluxograma de fracionamento cromatográfico do coral *T. coccinea* – coleta de abril de 2019.



Fonte: Autoria própria.

Como mostrado no fluxograma acima (Figura 29), o extrato bruto obtido a partir da coleta de abril de 2019 foi fracionado da seguinte maneira:

Fração G: Com a fração G (fase móvel hexano:acetato de etila 6:4) da CLV7 foi realizada a Sephadex® LH-20 de número 27 (SPH27), dando origem a três frações, sendo uma delas a substância já isolada anteriormente e denominada como CS.PE.02 (33,5 mg).

Fração H: Com a fração H (fase móvel hexano:acetato de etila 1:1) foi feita uma nova coluna Sephadex® LH-20 (SPH28 – quatro frações) com o isolamento da substância CS.DI.01 (13,6 mg).

3.2.2.6 Coleta de junho de 2019: isolamento das substâncias CS.PE.01, CS.DI.01 e CS.DI.02 e da fração CS.AG

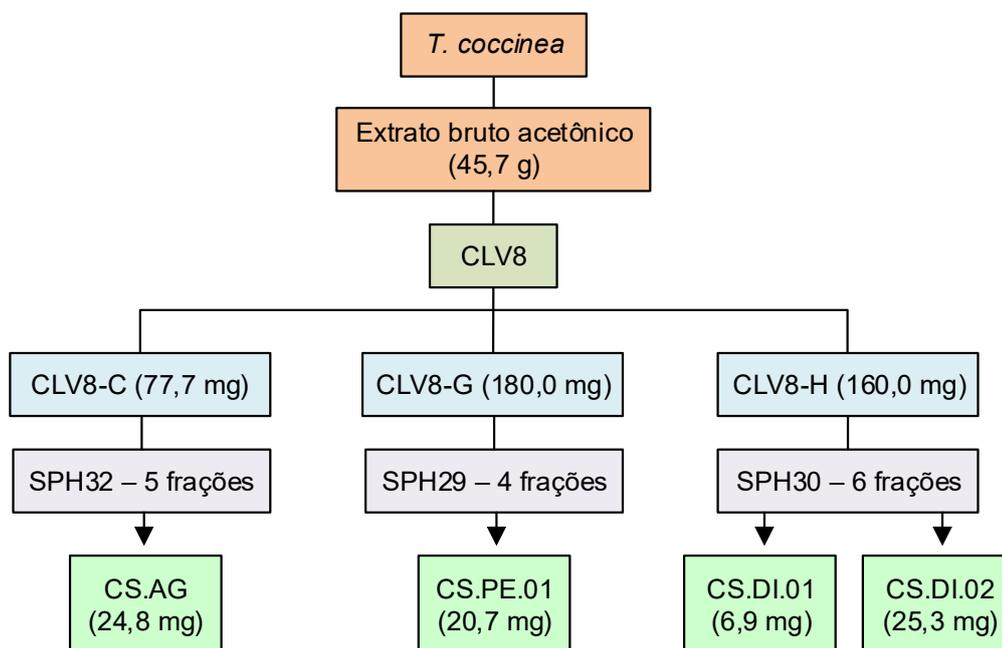
O extrato bruto seco da coleta de junho de 2019 foi submetido a uma CLV (CLV8), utilizando-se como fase estacionária gel de sílica de fase normal, e como fase móvel solventes em ordem crescente de polaridade, contendo hexano e acetato de etila. Ao todo, foram obtidas nove frações denominadas de A a I (Tabela 7).

Tabela 7. Frações e sistemas de solventes utilizados na CLV8 da coleta de junho de 2019.

CLV8	
Fração	Fase móvel
A	Hexano 100%
B	Hexano:Acetato de etila (95:15)
C	Hexano:Acetato de etila (9:1)
D	Hexano:Acetato de etila (85:15)
E	Hexano:Acetato de etila (8:2)
F	Hexano:Acetato de etila (7:3)
G	Hexano:Acetato de etila (6:4)
H	Hexano:Acetato de etila (1:1)
I	Acetato de etila 100%

Com as frações obtidas na CLV8 foram realizadas duas colunas cromatográficas abertas (CS23 e CS24) e quatro colunas com resina Sephadex® LH-20 (SPH29 a SPH32), que levaram ao isolamento das substâncias CS.PE.02, CS.DI.01 e CS.DI.02, conforme apresentado no fluxograma esquemático a seguir (Figura 30). Durante o fracionamento cromatográfico do extrato bruto acetônico, da coleta realizada em junho de 2019, também foi obtida uma fração de maior complexidade denominada CS.AG.

Figura 30. Fluxograma de fracionamento cromatográfico do coral *T. coccinea* – coleta de junho de 2019.



Fonte: Autoria própria.

Como apresentado na Figura 30, o fracionamento cromatográfico do extrato bruto acetônico, obtido a partir da coleta de junho de 2019 se deu da seguinte maneira:

Fração C: Com a fração C (fase móvel hexano:acetato de etila 9:1) foi feita uma Sephadex® LH-20 (SPH32 – cinco frações), resultando em uma fração denominada CS.AG (24,8 mg).

Fração G: Com a fração G (fase móvel hexano:acetato de etila 6:4) foi realizada uma coluna Sephadex® LH-20 (SPH29 – quatro frações) com o isolamento da substância CS.PE.01 (20,7 mg).

Fração H: Com a fração H (fase móvel hexano:acetato de etila 1:1) foi feita uma coluna Sephadex® LH-20 (SPH30 – seis frações), dando origem a duas substâncias já isoladas, a CS.DI.01 (6,9 mg) e CS.DI.02 (25,3 mg).

3.2.3 Acetilação da substância CS.PE.02

Após isolamento e identificação da substância CS.PE.02, isolada em maior quantidade, esta foi acetilada, reagindo a substância CS.PE.02 (11,9 mg) com anidrido acético (15,8 µL), utilizando-se piridina (150,0 µL) como catalizador. Os reagentes necessários para a síntese foram adicionados em balão volumétrico e mantidos sob agitação pelo tempo reacional de 12 horas. Após esse período, a reação foi cessada vertendo-se os reagentes em água gelada, seguido da adição de diclorometano para partição líquido-líquido. Ao final foram obtidas duas frações: a fração orgânica, contendo a substância CS.PE.02 acetilada e o resíduo aquoso. O produto da acetilação (CS.PE.02 acetilado) foi analisado por RMN ¹H e teve sua atividade citotóxica e anti-herpética avaliada.

3.2.4 Identificação estrutural

As substâncias isoladas foram analisadas através de espectros de UV-Vis, IV, RMN ¹H, RMN ¹³C e mapas de correlação HSQC. A identificação dos metabólitos secundários obtidos foi realizada por meio da análise de tais espectros e comparação com os dados publicados na literatura. Para auxiliar na identificação estrutural, foram utilizadas tabelas de deslocamento químico (*Introduction to Spectroscopy*, Pavia, D. L., et al., 4ª edição, 2009) e de absorção no infravermelho (*Instrumentelle Pharmazeutische Analytik*, Rücker, G.; Neugebauer, M.; Willems, G. G., 5ª edição, 2013).

3.3 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A avaliação das atividades citotóxica e anti-herpética foi realizada no laboratório de Virologia Aplicada da UFSC (MIP/CCB/UFSC), pela pós-doutoranda Dra. Naira Fernanda Zanchett Schneider e supervisão da professora Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões. A avaliação da atividade antiprotozoária foi realizada pela pós-doutoranda Dra. Milene Hoehr de Moraes, no laboratório de Protozoologia da UFSC (MIP/CCB/UFSC), sob a coordenação do professor Dr. Mário Steindel. A metodologia utilizada em cada ensaio é apresentada de forma sucinta a seguir.

3.3.1 Atividade citotóxica

A atividade citotóxica *in vitro* foi avaliada utilizando-se o método da Sulforrodamina B², investigando-se os efeitos antiproliferativos dos extratos e substâncias isoladas em linhagens celulares tumorais (células H460: carcinoma de derrame pleural de pulmão humano; células A549: células não pequenas de tumor de pulmão humano; HCT-8: adenocarcinoma ileotecal humano) e não tumoral (células Vero: fibroblasto de rim de macaco verde da África). Foram incluídos nesse ensaio os extratos brutos das coletas de abril de 2016, maio de 2017, maio de 2018 A e maio de 2018 B. Com relação às substâncias isoladas, os peróxidos de esteroides CS.PE.01, CS.PE.02 e a substância CS.PE.02 acetilada tiveram sua atividade citotóxica avaliada. Uma fração contendo uma mistura dos dois derivados indólicos (CS.DI.01 e CS.DI.02) também foi analisada.

O método da Sulforrodamina B é utilizado na avaliação *in vitro* da citotoxicidade e se baseia na medida da viabilidade celular. É um ensaio colorimétrico em que a Sulforrodamina B (corante rosa) se liga aos resíduos de aminoácidos básicos presentes em células viáveis. Desse modo, a quantidade de Sulforrodamina B capaz de se ligar ao conteúdo proteico de uma célula é proporcional à massa celular. Para tanto, as amostras e os controles são dissolvidos em DMSO e diluídos conforme concentrações padronizadas. Para preparação das placas, as células são lavadas com PBS e soltas das cavidades com tripsina-EDTA para determinação da concentração celular. Posteriormente, as amostras são adicionadas aos seus respectivos poços, e a placa é incubada a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ por 72 horas. Após esse período, adiciona-se ácido tricloroacético 10% a cada poço, para fixação das células, e incuba-se a placa a 4 °C por uma hora. Em seguida, são adicionados 100 µL de Sulforrodamina B (0,057%), mantendo a placa a temperatura ambiente por 30 minutos e lavando-a, logo após, com solução de ácido acético para remoção de todo o corante que não tenha se ligado ao conteúdo proteico celular. Para solubilização do conteúdo de cada poço, é adicionado trisaminometano básico (Tris Base) e a placa é agitada por cinco minutos. A leitura da densidade óptica, por fim, é realizada a 510 nm em leitor de microplacas.

² Conforme metodologia descrita no trabalho de Vichai e Kirtikara (2006).

3.3.2 Atividade anti-herpética

A atividade anti-herpética *in vitro* foi avaliada por meio do ensaio de redução do número de placas de lises virais³ sobre o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1 – cepas KOS: sensível ao aciclovir e 29R: resistente ao aciclovir). Nesse ensaio, os extratos brutos das coletas de abril de 2016, maio de 2017, maio de 2018 A e maio de 2018 B foram investigados, bem como dois peróxidos de esteroides (CS.PE.01 e CS.PE.02), substância CS.PE.02 acetilada e uma fração contendo uma mistura dos dois derivados indólicos (CS.DI.01 e CS.DI.02).

Primeiramente, a citotoxicidade das amostras foi determinada pelo método da Sulforrodamina B, já descrito anteriormente, obtendo-se os valores de concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀). Em seguida, com os valores de CC₅₀, as amostras tiveram sua atividade anti-herpética avaliada utilizando-se o ensaio de redução do número de placas de lises virais. Nesse ensaio, células Vero são cultivadas em placas (2,5 × 10⁵ células/cavidade) e incubadas durante 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂ até a confluência. Em seguida, as cavidades são lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) e infectadas com suspensões de HSV-1 (cepas KOS e 29R) (100 UFP/cavidade), com exceção das cavidades contendo o controle. Após nova lavagem com PBS, adiciona-se solução de carboximetilcelulose (CMC) contendo as diferentes amostras e incuba-se a placa por 48 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A coloração celular é realizada utilizando-se solução de preto de naftaleno, e a contagem celular é feita visualizando-se a placa em microscópio estereoscópio. Por fim, calculam-se a concentração inibitória a 50% (CI₅₀) e o índice de seletividade (IS – relação entre os valores de CC₅₀ e CI₅₀).

3.3.3 Atividade antiprotozoária

A atividade antiprotozoária foi avaliada utilizando-se amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*, de *Leishmania amazonensis* e de *Leishmania infantum*, todos expressando o gene da β-galactosidase, com o objetivo de determinar a porcentagem de

³ Conforme metodologia descrita no trabalho de Boff e colaboradores (2019).

inibição de crescimento desses parasitos⁴. Somente o extrato de abril de 2016 teve sua atividade antiprotozoária avaliada. Das substâncias isoladas, por sua vez, o peróxido de esteroide CS.PE.01 foi o único testado (em uma concentração de 50 µg/mL).

O ensaio foi realizado adicionando-se os parasitos às monocamadas celulares que, uma vez infectadas, são cultivadas por 24 horas. Em seguida, as amostras são adicionadas em diferentes concentrações, e a placa é incubada por 72 horas. Por fim, após remover o sobrenadante, é adicionado PBS e avaliada a viabilidade dos parasitos. Como controle positivo, utilizaram-se os fármacos benznidazol para os experimentos com *T. cruzi* e anfotericina B para os experimentos com *L. amazonensis* e de *L. infantum*. Os resultados obtidos são expressos por percentagem de inibição do crescimento dos parasitos.

⁴ Conforme metodologia descrita no trabalho de Pizzolatti e colaboradores (2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RENDIMENTO DOS PROCESSOS EXTRATIVOS

Ao realizar o manejo do coral-sol, a forma de armazenamento do material marinho coletado pelo ICMBio variou conforme as condições disponíveis no momento da coleta.

O material coletado em abril de 2016 foi disposto diretamente no solvente extrator (etanol P.A.). Para as demais coletas (maio de 2017, maio de 2018 A, maio de 2018 B, abril de 2019 e junho de 2019), no entanto, o material foi encaminhado *in natura* até a sede do ICMBio, onde foi congelado e, posteriormente, encaminhado para a UFSC, onde procedeu-se ao descongelamento e processo de maceração.

Por não se tratar de um organismo passível primeiramente de secagem e, em seguida, da extração, a medida da “massa seca” do coral é impossibilitada (além de não ser representativa), dado que o coral apresenta grande quantidade de água em sua estrutura, evidenciada após congelamento, além de uma enorme quantidade de carbonato de cálcio. Desse modo, as massas abaixo (Tabela 8) servem apenas para comparação entre a quantidade de material de partida e a massa das substâncias isoladas.

Tabela 8. Massa de extrato bruto para cada coleta do coral-sol.

Data da coleta	Extrato	Massa (g)*
Abril de 2016	Extrato etanólico	20,5
Mai de 2017	Extrato acetônico	11,9
	Extrato etanólico	3,9
Mai de 2018 A	Extrato acetônico	20,5
Mai de 2018 B	Extrato acetônico	14,2
Abril de 2019	Extrato acetônico	25,1
Junho de 2019	Extrato acetônico	45,7

* Massas obtidas a partir dos extratos brutos semissólidos.

4.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO CORAL-SOL

Após realização do processo de extração de seus compostos, a estrutura do coral *T. coccinea* foi visualizada microscopicamente, conforme mostrado na Figura a seguir (Figura 31). Essa análise foi realizada pelo grupo ZEISS®, durante o evento “LAMEB 10 anos e VI Simpósio de Integração das Pós-Graduações do Centro de Ciências Biológicas”, realizado na UFSC em novembro de 2018.

Figura 31. Esqueleto calcário do coral *T. coccinea* visualizado microscopicamente (escala: 2000 μm).



Fonte: Grupo ZEISS®⁵.

Na Figura acima (Figura 31) é possível visualizar o esqueleto calcário de uma colônia do coral-sol após extração. É possível observar, ainda, a presença de coralitos e de cristais, possivelmente de carbonato de cálcio. Essas características são relevantes na identificação e diferenciação de espécies pertencentes ao gênero *Tubastraea*, auxiliando na realização do plano de manejo do coral-sol.

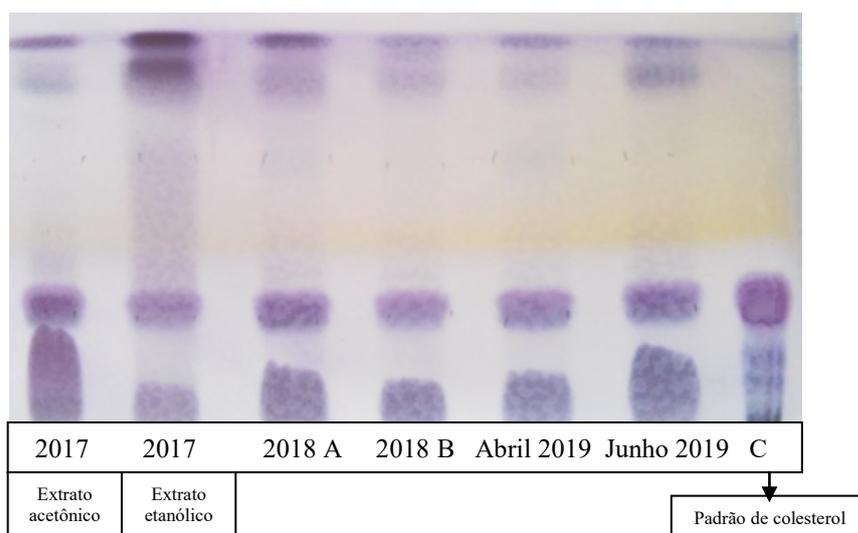
⁵ Grupo ZEISS® do Brasil, empresa alemã na área óptica e optoeletrônica com filial em São Paulo.

4.3 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO, PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO

Com o fracionamento cromatográfico dos materiais marinhos coletados em abril de 2016, maio de 2017, maio de 2018 A, maio de 2018 B, abril de 2019 e junho de 2019 foram isoladas cinco substâncias, pertencentes a duas classes químicas distintas.

Apesar dos cromatogramas dos extratos brutos mostrarem, aparentemente, uma baixa complexidade, bem como a predominância do colesterol (Figura 32), as substâncias isoladas puderam ser detectadas após procedimentos de fracionamento cromatográfico.

Figura 32. Cromatograma dos extratos brutos das coletas de maio de 2017, maio de 2018 A, maio de 2018 B, abril de 2019 e junho de 2019. Fase móvel: hexano:acetato de etila (8:2). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento. C: padrão de colesterol.



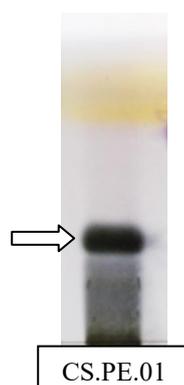
Fonte: Autoria própria.

A seguir serão apresentados os resultados das análises das substâncias isoladas, através de seus espectros de RMN uni- e bidimensionais, bem como das análises por CCD, UV-Vis e IV, quando realizadas. Os processos de fracionamento dos extratos e isolamento de tais substâncias encontram-se no item 3.2.2 *Fracionamento cromatográfico*, em materiais e métodos.

4.3.1 Substância CS.PE.01

A substância denominada CS.PE.01 foi isolada a partir do extrato bruto etanólico da coleta de abril de 2016 e do extrato bruto acetônico da coleta de junho de 2019, na quantidade total de 45,8 mg. Em CCD o fator de retenção (R_f) observado para esta substância é de 0,32 quando utilizado hexano:acetato de etila (6:4) como fase móvel (Figura 33). A mancha correspondente ao composto apresenta coloração verde-escuro quando a placa é revelada com solução de anisaldeído sulfúrico. Ao ser visualizada em luz ultravioleta a 254 nm, não é observada extinção de fluorescência.

Figura 33. Cromatograma da substância CS.PE.01. Fase móvel: hexano:acetato de etila (6:4). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.



Fonte: Autoria própria.

Na análise por RMN ^1H e RMN ^{13}C observaram-se sinais correspondentes a seis metilas e, adicionalmente, sinais diferenciados em δ_{H} 6,24 (d, $J = 8,4$ Hz) e δ_{H} 6,49 (d, $J = 8,4$ Hz), com a multiplicidade de dupletos, bem como os sinais em δ_{C} 130,7 e δ_{C} 135,4. Tendo em vista o comportamento cromatográfico similar ao colesterol (polaridade e coloração após o uso de reveladores), presente em elevada quantidade no extrato e utilizado como comparação, foi realizada uma busca na literatura de características de espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C de esteroides, o que permitiu concluir que compostos com esses sinais são característicos para grupos H-C quando ligados ao grupo peróxido. Desse modo, a fração foi caracterizada como um peróxido de esteroide, iniciando-se uma busca na

literatura por compostos semelhantes. Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C e o mapa de correlação HSQC do composto CS.PE.01 são mostrados a seguir (Figuras 34 a 37).

Figura 34. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância CS.PE.01.

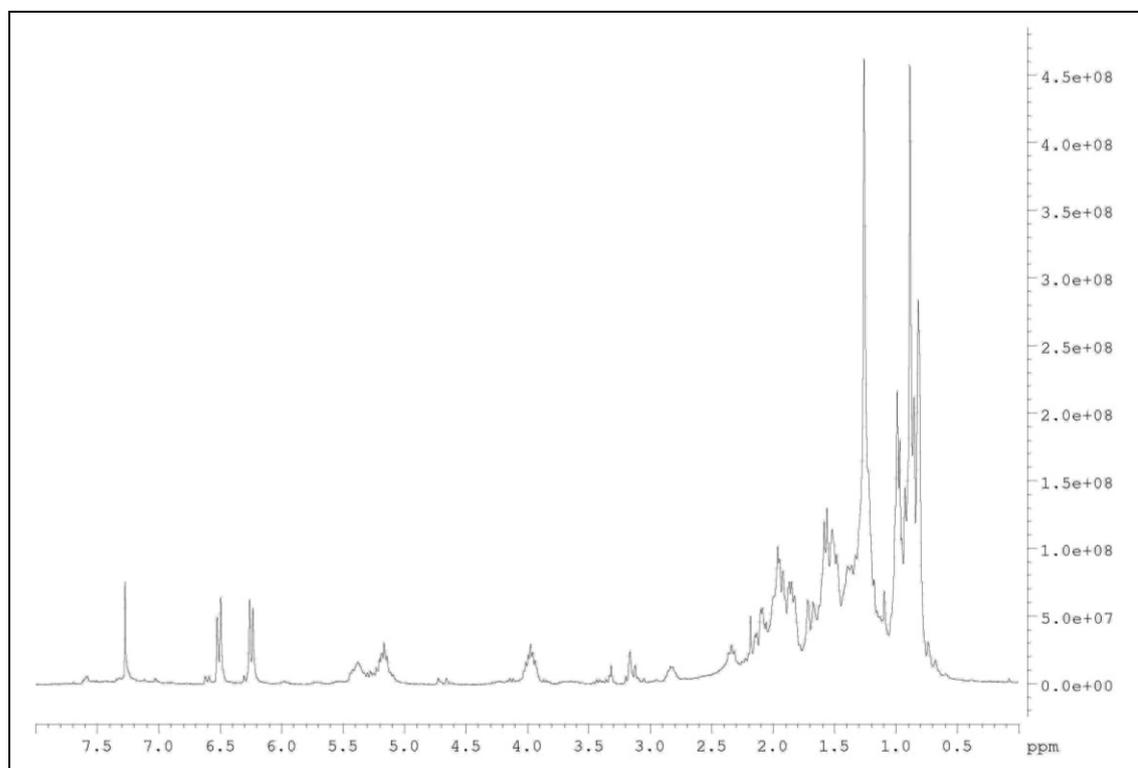


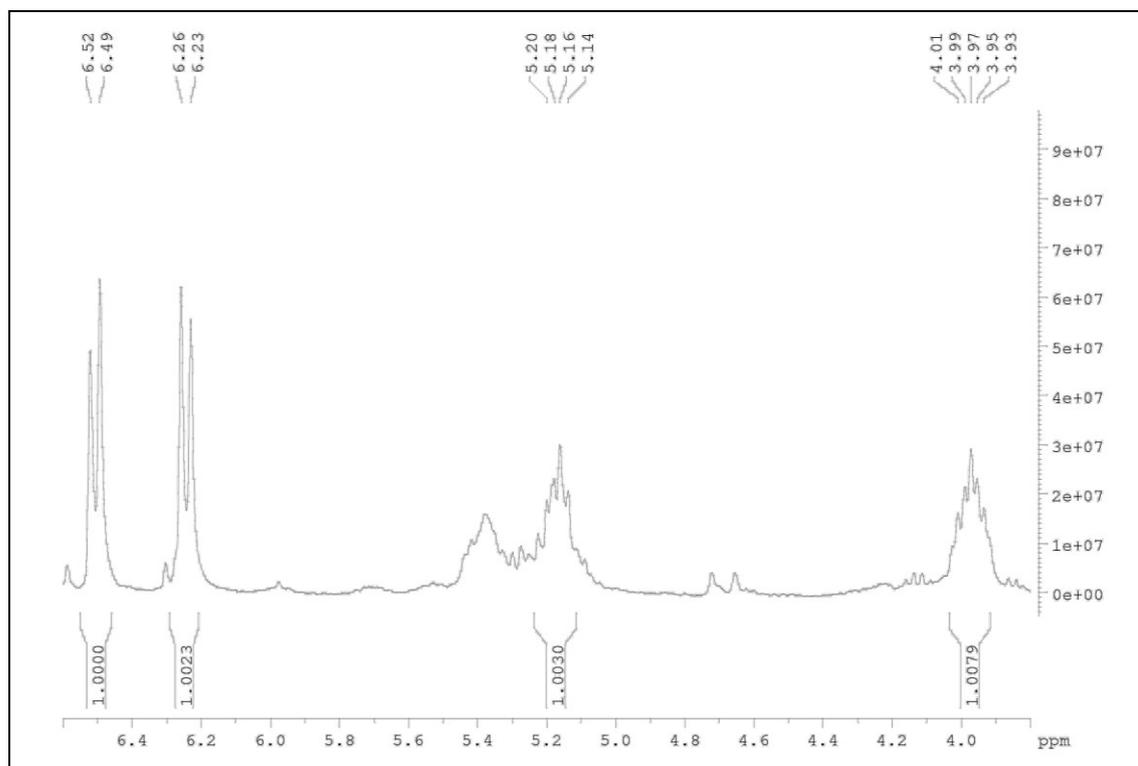
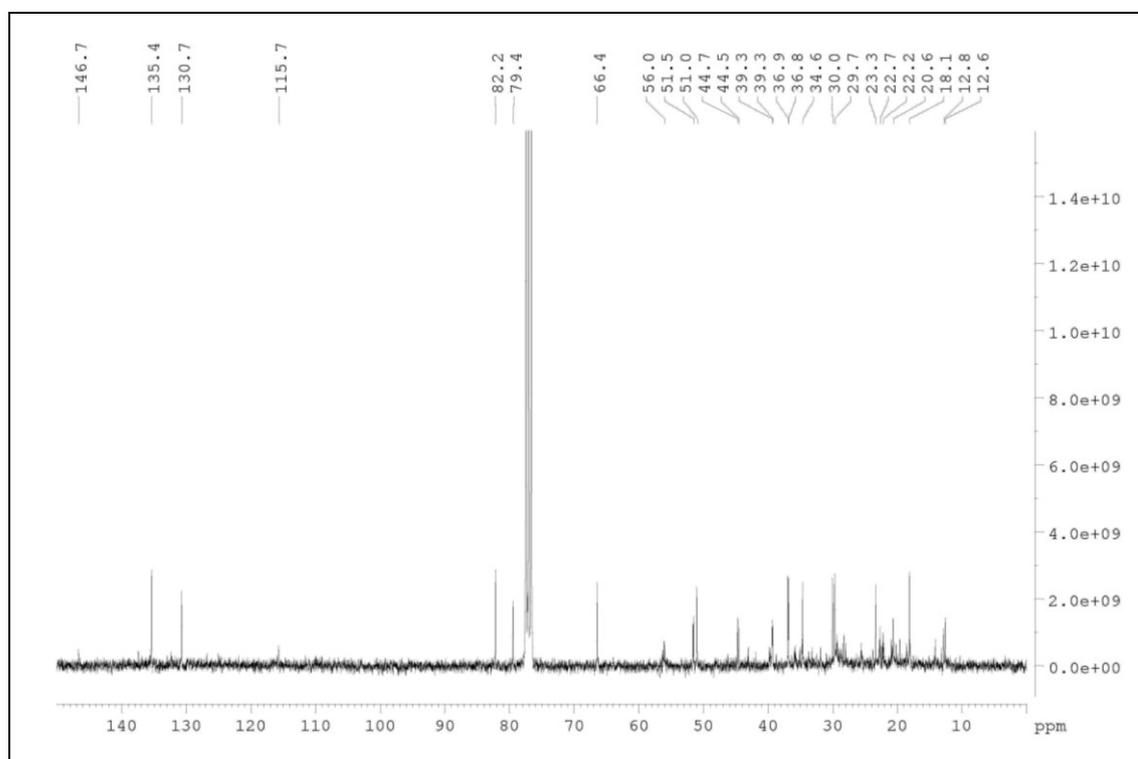
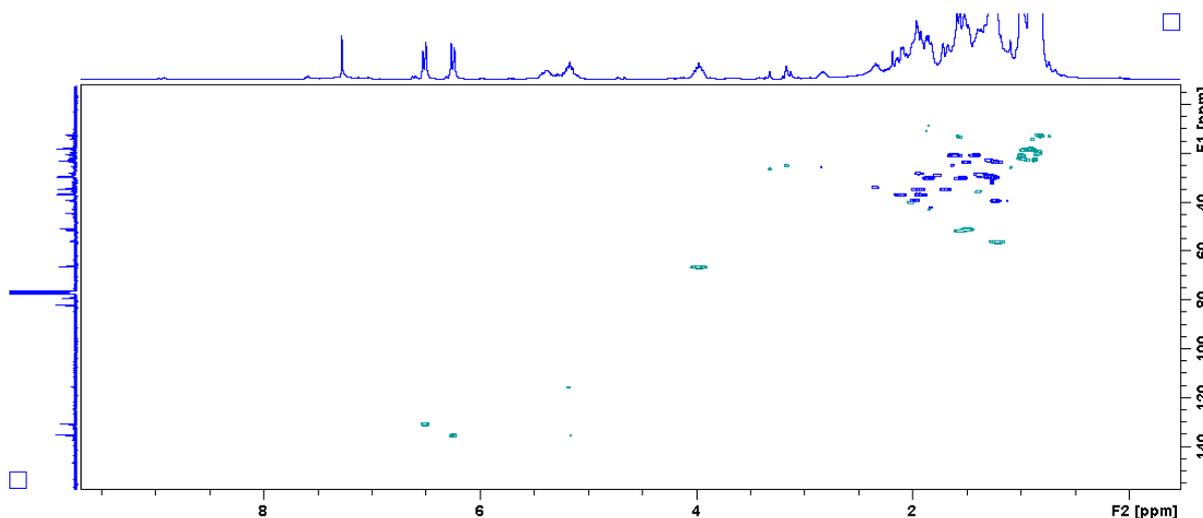
Figura 35. Ampliação do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância CS.PE.01.Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância CS.PE.01.

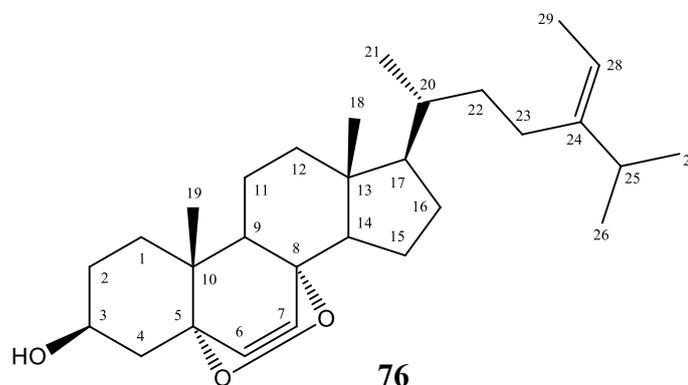
Figura 37. Mapa de correlação HSQC da substância CS.PE.01.



Na ampliação do espectro de RMN ^1H (Figura 35) é possível observar os sinais em δ_{H} 6,24 (d, $J = 8,4$ Hz) e δ_{H} 6,49 (d, $J = 8,4$ Hz), bastante característicos dos peróxidos de esteroides. Esse sistema de dupletos é formado devido à ausência de hidrogênios vizinhos aos carbonos com grupo $-\text{O}-\text{O}-$. No mapa de correlação HSQC (Figura 37) observa-se que esses sinais presentes no espectro de RMN ^1H correlacionam com os sinais em δ_{C} 130,7 e δ_{C} 135,4, visíveis no espectro de RMN ^{13}C . Também na ampliação do espectro de RMN ^1H (Figura 35) pode-se observar o multipletto em δ_{H} 3,97 que, conforme visualizado no HSQC, correlaciona com o sinal em δ_{C} 66,4 presente no espectro de RMN ^{13}C . Esse sinal em δ_{H} 3,97 corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C3 do anel, ao qual está também ligado a hidroxila.

Comparando-se os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C com aqueles descritos no trabalho publicado por Ioannou e colaboradores (2009), foi possível identificar a substância CS.PE.01 isolada como o peróxido de esteroide (24E)-5 α ,8 α -epidioxi-24-etil-colesta-6,24(28)-dien-3 β -ol (Figura 38), composto de fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_3$ e de massa molecular de 442,67 g/mol. A comparação dos dados espectrais pode ser observada na Tabela 9.

Figura 38. Estrutura química do peróxido de esteroide isolado do coral *T. coccinea* e identificado como (24E)-5 α ,8 α -epidioxi-24-etil-colesta-6,24(28)-dien-3 β -ol.



Outro aspecto importante visível no mapa de correlação HSQC (Figura 37) é a correlação entre os sinais δ_H 5,17 (q, $J = 6,0$ Hz) e δ_C 115,7, característicos da dupla ligação presente na cadeia lateral. O sinal em δ_H 5,17, com multiplicidade sugerindo um quarteto, pode ser atribuído ao grupo C–H em C28. Sinais bastante semelhantes foram descritos por Ioannou e colaboradores (2009), mostrados na Tabela 9, com destaque para os dupletos em δ_H 6,22 e δ_H 6,48, bem como os sinais dos átomos 20 a 29, correspondentes aos grupamentos da cadeia lateral.

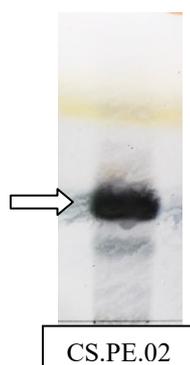
Tabela 9. Dados espectrais de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância CS.PE.01 em comparação com dados da literatura de Ioannou e colaboradores (2009), para (24E)-5 α ,8 α -epidioxi-24-etil-colesta-6,24(28)-dien-3 β -ol.

Átomo	CS.PE.01		Ioannou e colaboradores (2009)		
	RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3)	RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)	RMN ^1H (400 ou 600 MHz, CDCl_3)	RMN ^{13}C (50,3 ou 75 MHz, CDCl_3)	
1	α	1,94 m	34,6	1,94 m	34,6
	β	1,69 m	-	1,68 m	-
2	α	1,82 m	30,0	1,83 m	30,1
	β	1,52 m	-	1,52 m	-
3		3,97 m	66,4	3,95 m	66,5
4	α	2,09 m	36,9	2,10 m	36,9
	β	1,91 m	-	1,89 m	-
5		-	82,2	-	82,1
6		6,24 d (8,4)	135,4	6,23 d (8,5)	135,4
7		6,49 d (8,4)	130,7	6,49 d (8,5)	130,8
8		-	79,4	-	79,4
9		1,48 m	51,1	1,48 m	51,1
10		-	36,8	-	37,0
11	α	1,49 m	23,3	1,49 m	23,4
	β	1,20 m	-	1,20 m	-
12	α	1,95 m	39,3	1,97 m	39,4
	β	1,21 m	-	1,21 m	-
13		-	44,6	-	44,5
14		1,54 m	51,6	1,54 m	51,7
15	α	1,59 m	20,5	1,63 m	20,6
	β	1,38 m	-	1,42 m	-
16	α	1,78 m	28,3	1,93 m	28,2
	β	1,37 m	-	1,38 m	-
17		1,18 m	56,3	1,19 m	56,2
18		0,82 s	12,5	0,79 s	12,5
19		0,88 s	18,1	0,86 s	18,2
20		1,39 m	35,6	1,39 m	35,8
21		0,97 d (6,6)	18,7	0,96 d (6,7)	18,7
22		1,94 m, 1,68 m	34,8	1,40 m, 1,09 m	34,9
23		2,04 m, 1,85 m	25,6	2,04 m, 1,85 m	25,5
24		-	146,7	-	146,7
25		2,33 m	33,6	2,17 m	34,8
26		0,97 d (6,6)	22,2	0,96 d (6,7)	22,0
27		1,00 s	20,1	0,95 d (6,9)	21,9
28		5,17 q (6,0)	115,7	5,17 q (6,3)	115,8
29		1,57 d (6,9)	12,8	1,55 d (6,7)	13,2

4.3.2 Substância CS.PE.02

A substância CS.PE.02 foi isolada de praticamente todos os extratos: do extrato bruto acetônico da coleta de maio de 2017, do extrato bruto acetônico da coleta de maio de 2018 A, do extrato bruto acetônico da coleta de maio de 2018 B e do extrato bruto acetônico da coleta de abril de 2019, na quantidade total de 176,5 mg. Essa substância só não foi detectada no extrato bruto da coleta de abril de 2016 e no extrato bruto acetônico da coleta de junho de 2019. Ao analisá-la por meio de CCD, revelada com solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento, é possível observar uma mancha verde-escuro bastante semelhante à substância CS.PE.01, não sendo visualizada extinção de fluorescência em UV a 254 nm. O seu R_f é de 0,32 quando utilizado hexano:acetato de etila (6:4) como fase móvel (Figura 39).

Figura 39. Cromatograma da substância CS.PE.02. Fase móvel: hexano:acetato de etila (6:4). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.



Fonte: Autoria própria.

Assim como para a substância CS.PE.01, os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C mostraram a presença de sinais em δ_{H} 6,25 (d, $J = 8,4$ Hz) e δ_{H} 6,51 (d, $J = 8,4$ Hz), com a multiplicidade de dupletos, bem como os sinais em δ_{C} 130,7 e δ_{C} 135,4, e o elevado número de grupos metileno e metilas. Dessa forma, sugeriu-se a possibilidade de também ser um peróxido de esteroide, iniciando-se uma busca na literatura por compostos semelhantes. Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C e o mapa de correlação HSQC da substância CS.PE.02 são mostrados a seguir (Figuras 40 a 43).

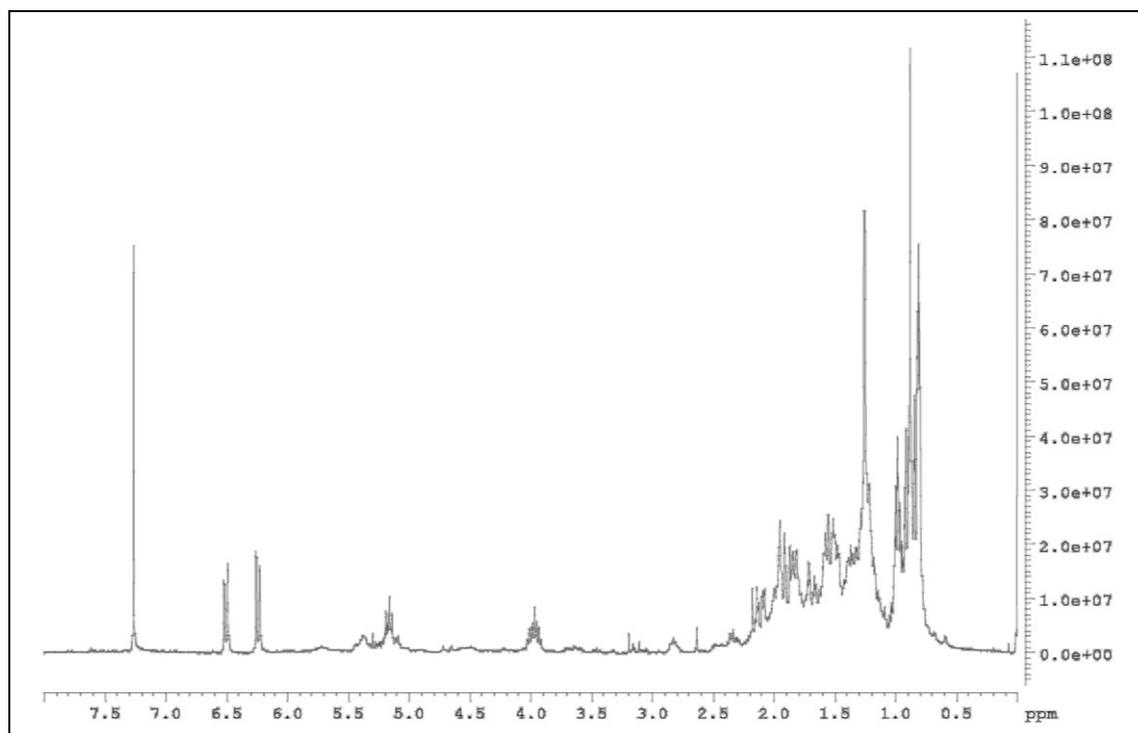
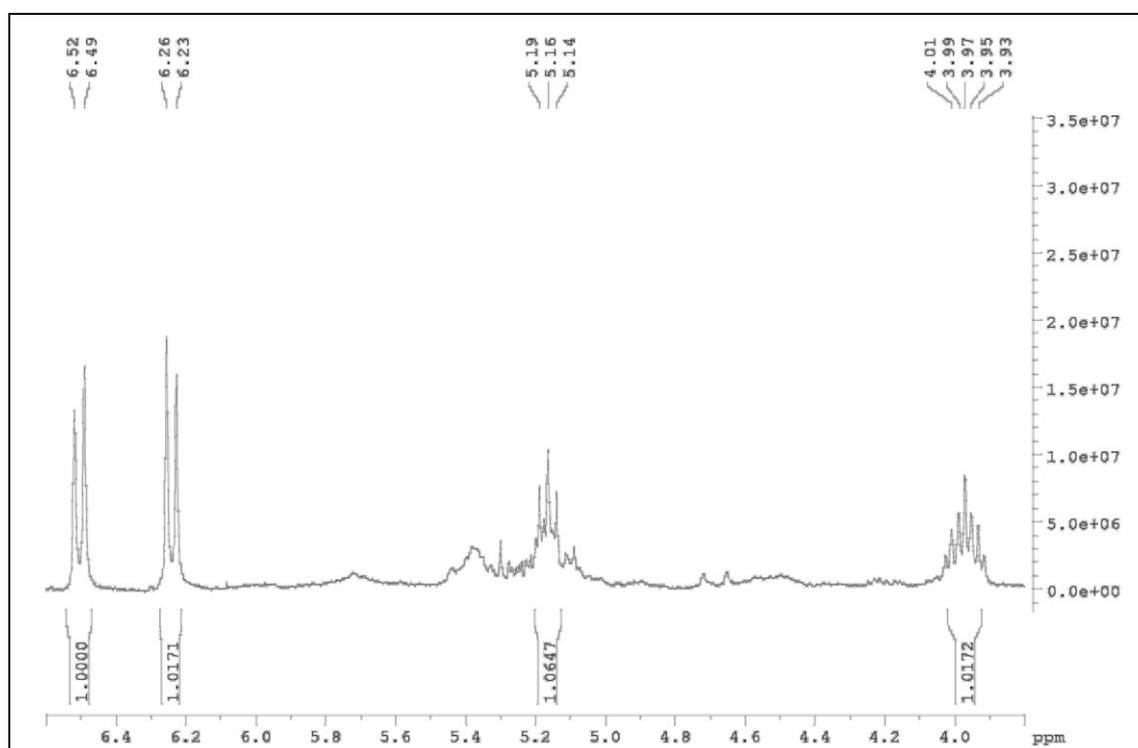
Figura 40. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância CS.PE.02.Figura 41. Ampliação do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância CS.PE.02.

Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância CS.PE.02.

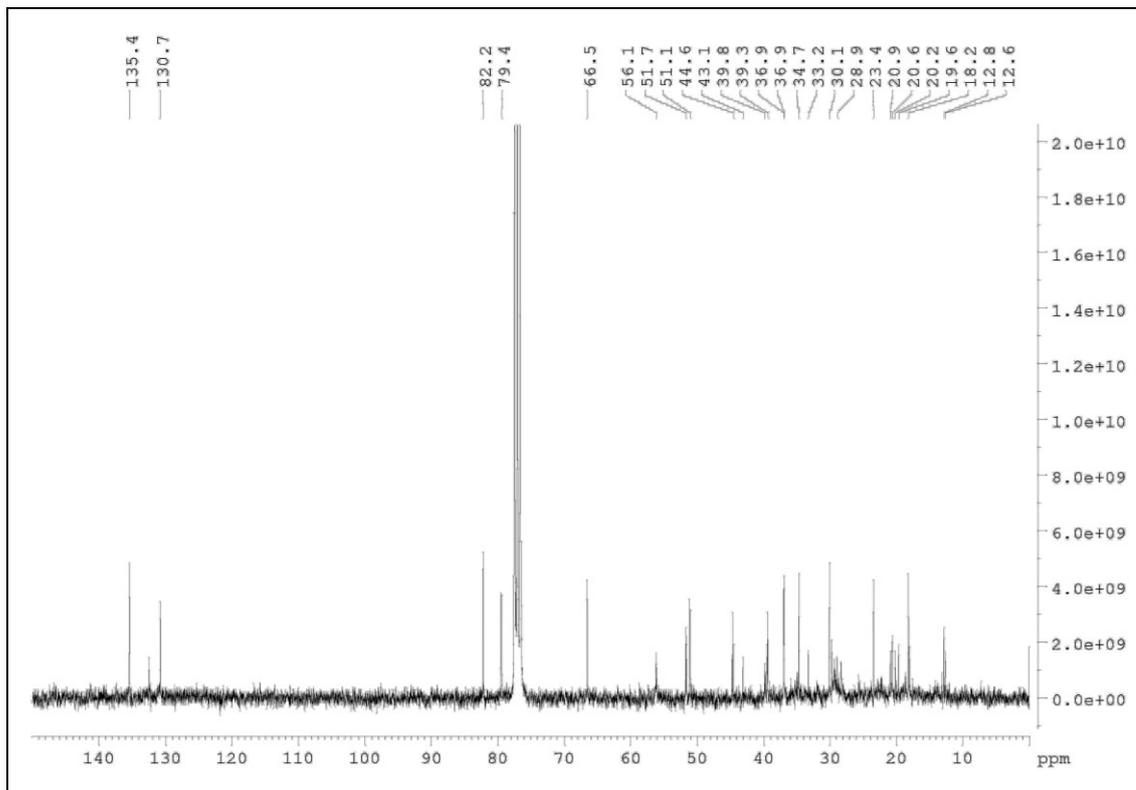
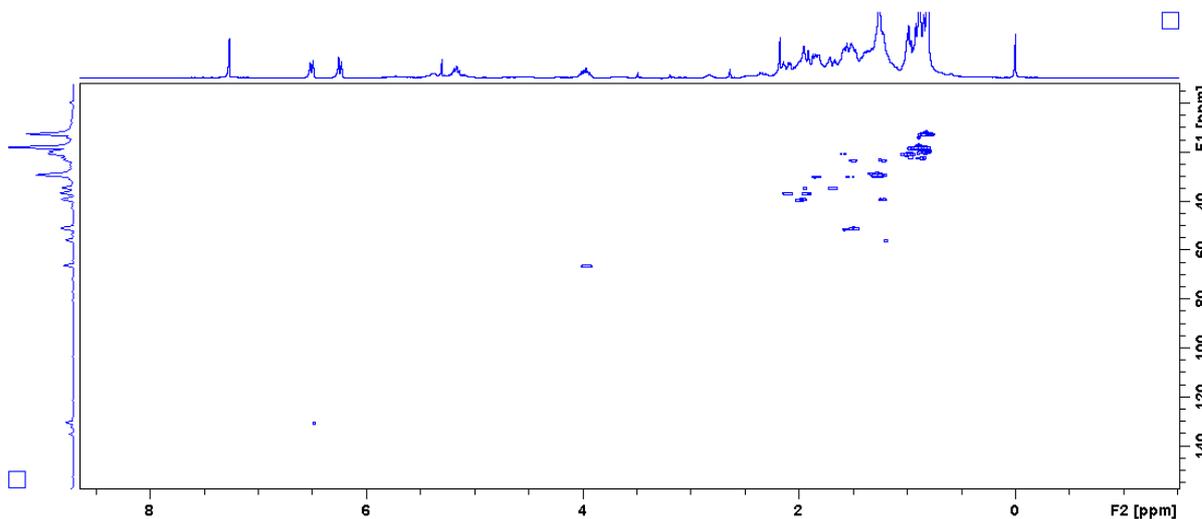


Figura 43. Mapa de correlação HSQC da substância CS.PE.02.

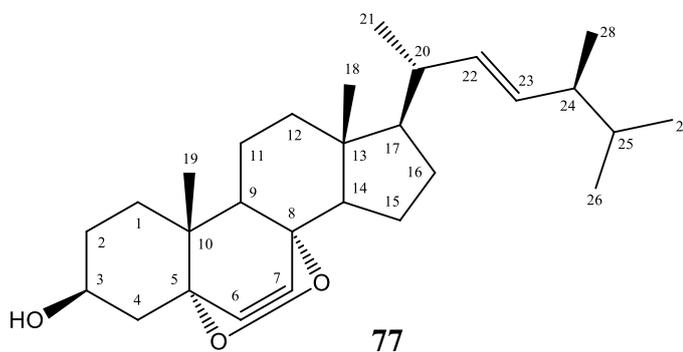


Na ampliação do espectro de RMN ^1H (Figura 41) observam-se novamente os sinais em δ_{H} 6,25 (d, $J = 8,4$ Hz) e δ_{H} 6,51 (d, $J = 8,4$ Hz), característicos dos peróxidos de esteroides. No mapa de correlação HSQC (Figura 43) observam-se as correlações entre

δ_H 6,25 e δ_C 135,4 e entre δ_H 6,51 e δ_C 130,7. Outro aspecto importante visível no HSQC é a correlação entre os sinais δ_H 5,17 (dd, $J = 14,7, 7,3$ Hz) e δ_C 115,7, já observados para o peróxido CS.PE.01, característicos de uma dupla ligação na cadeia lateral. Novamente se observa, na ampliação do espectro de RMN 1H (Figura 41), o multipletto em δ_H 3,97, correspondente ao hidrogênio ligado ao carbono C3 do anel, estando também ligado à hidroxila. No mapa de correlação HSQC pode-se perceber que o sinal em δ_H 3,97 correlaciona com o sinal em δ_C 66,4 presente no espectro de ^{13}C .

Comparando-se os dados de RMN 1H e ^{13}C com aqueles descritos no trabalho publicado por Ioannou e colaboradores (2009), foi possível identificar a substância CS.PE.02 isolada como o peróxido de esteroide (22E,24S)-5 α ,8 α -epidioxi-24-metil-colesta-6,22-dien-3 β -ol (Figura 44), de fórmula molecular $C_{28}H_{44}O_3$ e massa molecular de 428,65 g/mol. A comparação dos dados espectrais pode ser observada na Tabela 10.

Figura 44. Estrutura química do peróxido de esteroides isolado do coral *T. coccinea* e identificado como (22E,24S)-5 α ,8 α -epidioxi-24-metil-colesta-6,22-dien-3 β -ol.



Na Tabela 10 é possível observar a grande semelhança entre os sinais encontrados nos espectros da substância CS.PE.02 e os relatados por Ioannou e colaboradores (2009), com destaque para os sinais dos átomos 20 a 28, correspondentes a cadeia lateral, assim como a presença de dupletos em δ_H 6,25 e δ_H 6,51, no espectro de RMN 1H , e dos sinais em δ_C 130,7 e δ_C 135,4, no espectro de RMN ^{13}C .

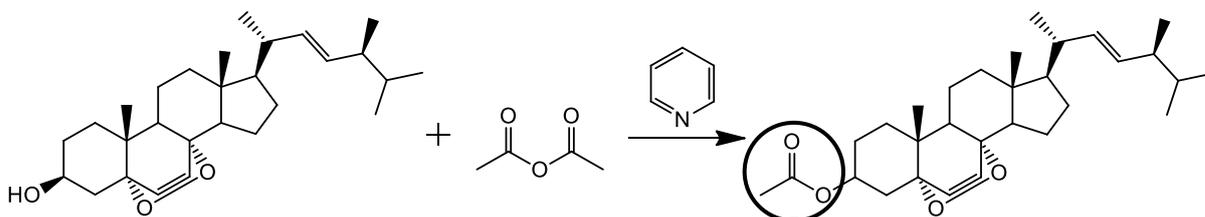
Tabela 10. Dados espectrais de RMN ^1H e RMN ^{13}C da substância CS.PE.02 em comparação com dados da literatura de Ioannou e colaboradores (2009), para (22E,24S)-5 α ,8 α -epidioxi-24-metil-colesta-6,22-dien-3 β -ol.

Átomo		CS.PE.02		Ioannou e colaboradores (2009)	
		RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3)	RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)	RMN ^1H (400 ou 600 MHz, CDCl_3)	RMN ^{13}C (50,3 ou 75 MHz, CDCl_3)
1	α	1,90 m	34,7	1,93 m	34,7
	β	1,68 m	-	1,67 m	-
2	α	1,85 m	30,1	1,82 m	30,1
	β	1,54 m	-	1,52 m	-
3		3,97 m	66,4	3,95 tt (11,3, 5,0)	66,4
4	α	2,17 m	36,9	2,10 m	36,9
	β	2,10 m	-	1,89 m	-
5		-	82,1	-	82,1
6		6,25 d (8,4)	135,4	6,22 d (8,5)	135,4
7		6,51 d (8,4)	130,7	6,48 d (8,5)	130,7
8		-	79,4	-	79,4
9		1,52 m	51,1	1,48 m	51,1
10		-	36,8	-	36,9
11	α	1,51 m	23,4	1,50 m	23,4
	β	1,19 m	-	1,20 m	-
12	α	1,98 m	39,3	1,94 m	39,3
	β	1,22 m	-	1,22 m	-
13		-	44,5	-	44,5
14		1,56 m	51,7	1,54 m	51,7
15	α	1,60 m	20,6	1,58 m	20,7
	β	1,39 m	-	1,38 m	-
16	α	1,77 m	28,9	1,75 m	28,9
	β	1,40 m	-	1,34 m	-
17		1,22 m	56,1	1,19 m	56,1
18		0,81 s	12,6	0,79 s	12,8
19		0,89 s	18,0	0,86 s	18,2
20		2,01 m	39,8	1,99 m	39,8
21		0,98 d (6,7)	20,9	0,97 d (6,6)	20,9
22		5,12 dd (14,7, 7,3)	135,4	5,10 dd (15,2, 8,2)	135,4
23		5,17 dd (14,7, 7,3)	132,4	5,17 dd (15,2, 8,0)	132,4
24		1,85 m	43,0	1,81 m	43,0
25		1,48 m	33,2	1,44 m	33,2
26		0,85 m	19,7	0,79 d (6,7)	19,6
27		0,91 m	20,1	0,81 d (6,8)	20,1
28		0,88 s	18,0	0,89 d (6,8)	18,0

4.3.3 Acetilação da substância CS.PE.02

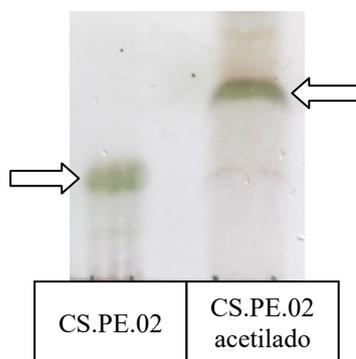
Com o objetivo de avaliar mudanças na atividade citotóxica e anti-herpética, a substância CS.PE.02, isolada em maior quantidade, foi selecionada para a realização de uma alteração em sua estrutura química, mediante uma reação de acetilação, representada na Figura a seguir (Figura 45).

Figura 45. Acetilação da substância CS.PE.02.



Comparando-se o perfil cromatográfico da substância CS.PE.02 com a substância CS.PE.02 acetilada, é possível verificar uma diminuição na sua polaridade, conforme o esperado, uma vez que a hidroxila presente no carbono C3 foi substituída por um grupamento acetila (Figura 46).

Figura 46. Perfil cromatográfico comparativo da substância CS.PE.02 com a substância CS.PE.02 acetilada. Fase móvel: hexano:acetato de etila (6:4). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.



Fonte: Autoria própria.

Para a substância CS.PE.02 acetilada foi obtido o espectro de RMN ^1H mostrado a seguir (Figuras 47 e 48).

Figura 47. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância CS.PE.02 acetilada.

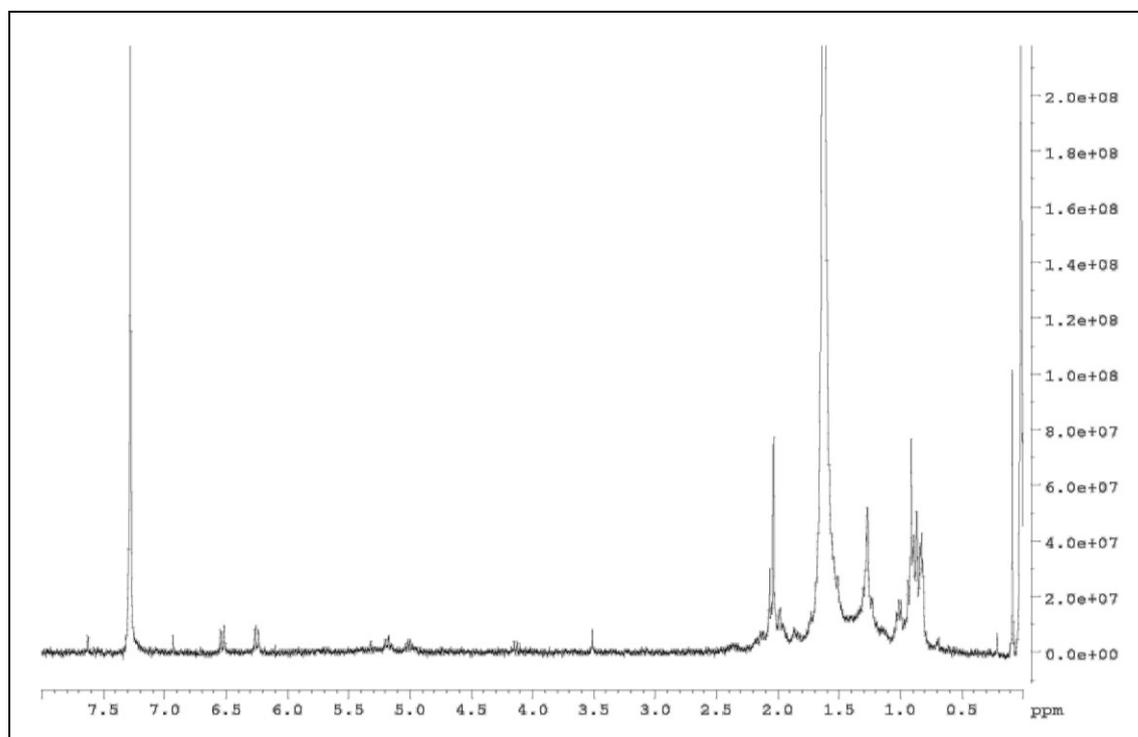
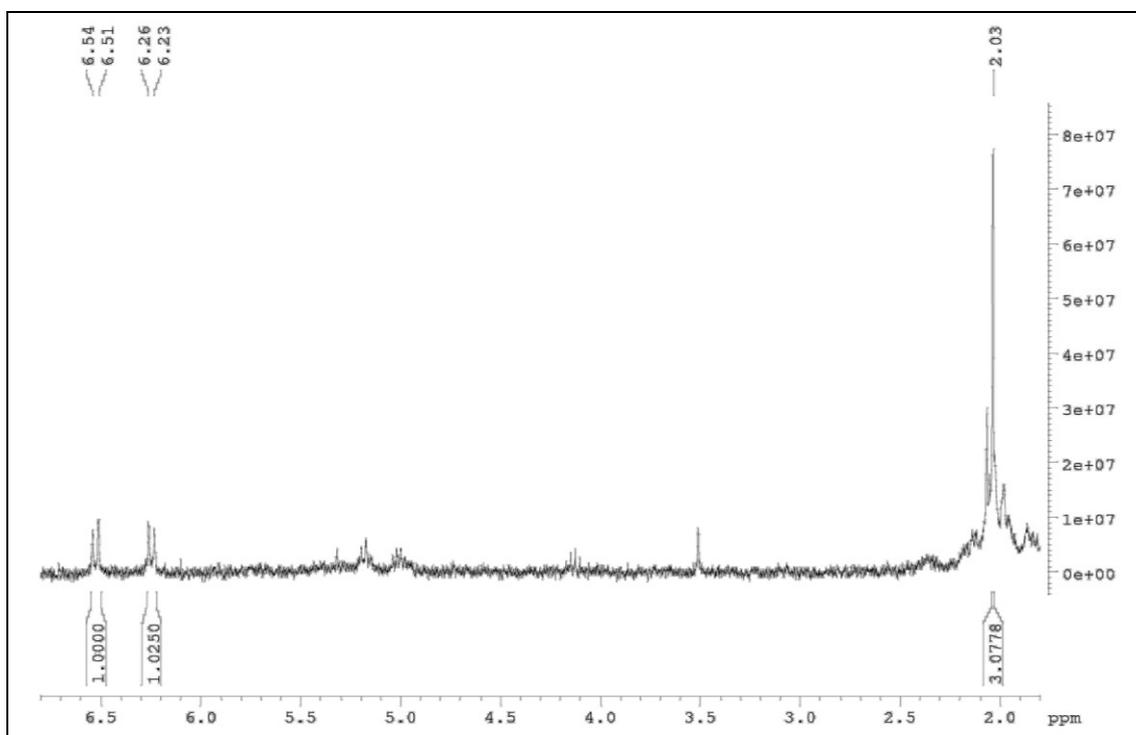


Figura 48. Ampliação do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância CS.PE.02 acetilada.



Na ampliação do espectro de RMN ^1H da Figura 48 pode-se observar, além dos sinais em δ_{H} 6,24 (d, $J = 8,4$ Hz) e δ_{H} 6,52 (d, $J = 8,4$ Hz), com a multiplicidade de dupletos, característicos dos peróxidos de esteroides, o sinal em δ_{H} 2,03 (integrando para 3H) com multiplicidade de simpleto, característico da presença de uma metila pertencente ao grupamento acetila.

Além da mudança observada no perfil cromatográfico e de RMN, a substância CS.PE.02 acetilada também apresentou resultados distintos para a sua atividade citotóxica e anti-herpética, conforme mostrado adiante (item 4.5.2 *Atividade biológica das substâncias isoladas*).

4.3.4 Substância CS.PE.03

A substância CS.PE.03 foi isolada do extrato bruto acetônico da coleta de maio de 2017, com 5,7 mg. Após revelação com solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento, a

análise por CCD revela a presença de uma substância detectada como uma mancha esverdeada em Rf 0,43, ao utilizar-se hexano:acetato de etila (6:4) como fase móvel. Não apresentou extinção de fluorescência ao ser observada em luz ultravioleta a 254 nm.

Com a análise dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C , verificou-se a presença dos mesmos sinais característicos dos peróxidos de esteroides, em δ_{H} 6,18 (d, $J = 8,4$ Hz) e δ_{H} 6,44 (d, $J = 8,4$ Hz), com a multiplicidade de dupletos, bem como dos sinais em δ_{C} 130,7 e δ_{C} 135,4, e o elevado número de grupos metileno e metilas (Figuras 49 a 51). Além disso, no espectro de RMN ^1H é possível observar um sinal diferenciado em δ_{H} 4,18, com a multiplicidade de um tripleto, integrando para 1H. No espectro de RMN ^{13}C (Figura 51) observa-se um sinal adicional em δ_{C} 70,6 correspondente a um grupo CH ligado a um átomo de oxigênio, indicando uma hidroxila adicional nessa estrutura. No entanto, essa informação não é coerente com a menor polaridade observada para essa substância na análise por CCD. Dado que esta substância foi isolada em baixa quantidade e apenas do extrato acetônico da coleta de maio de 2017, sua estrutura não pôde ser elucidada.

Figura 49. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância CS.PE.03.

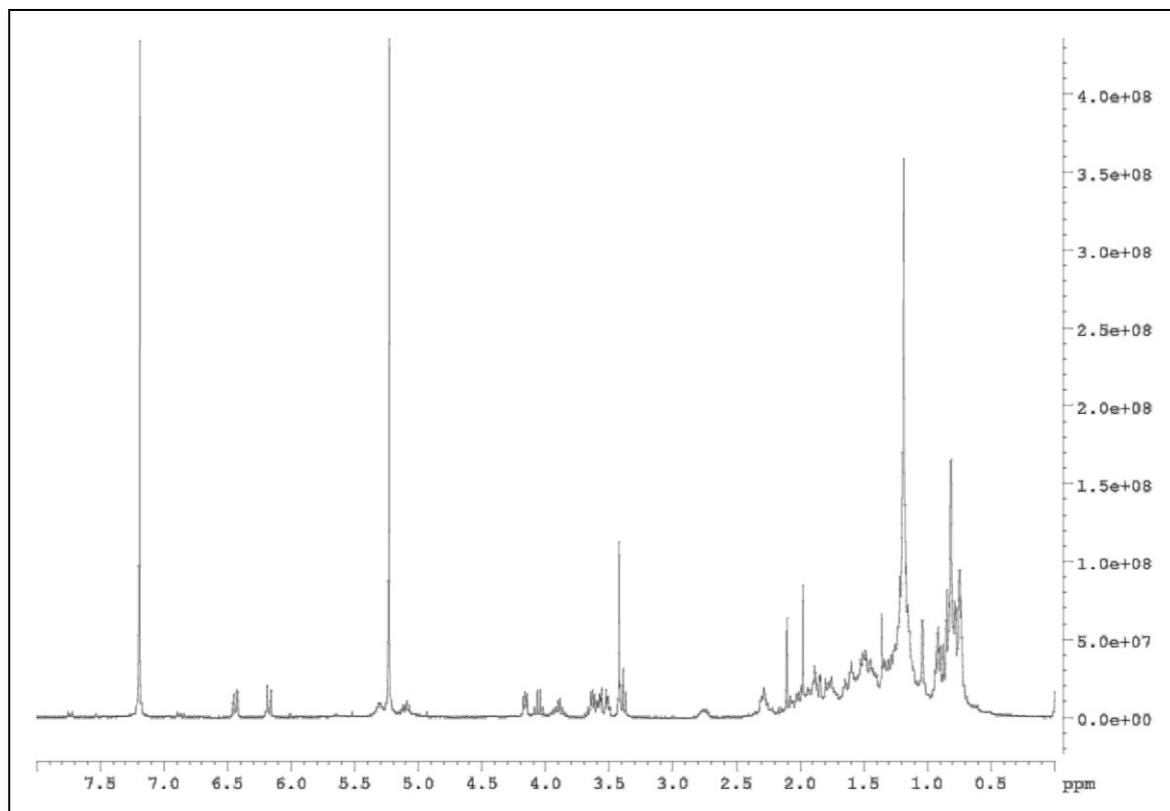


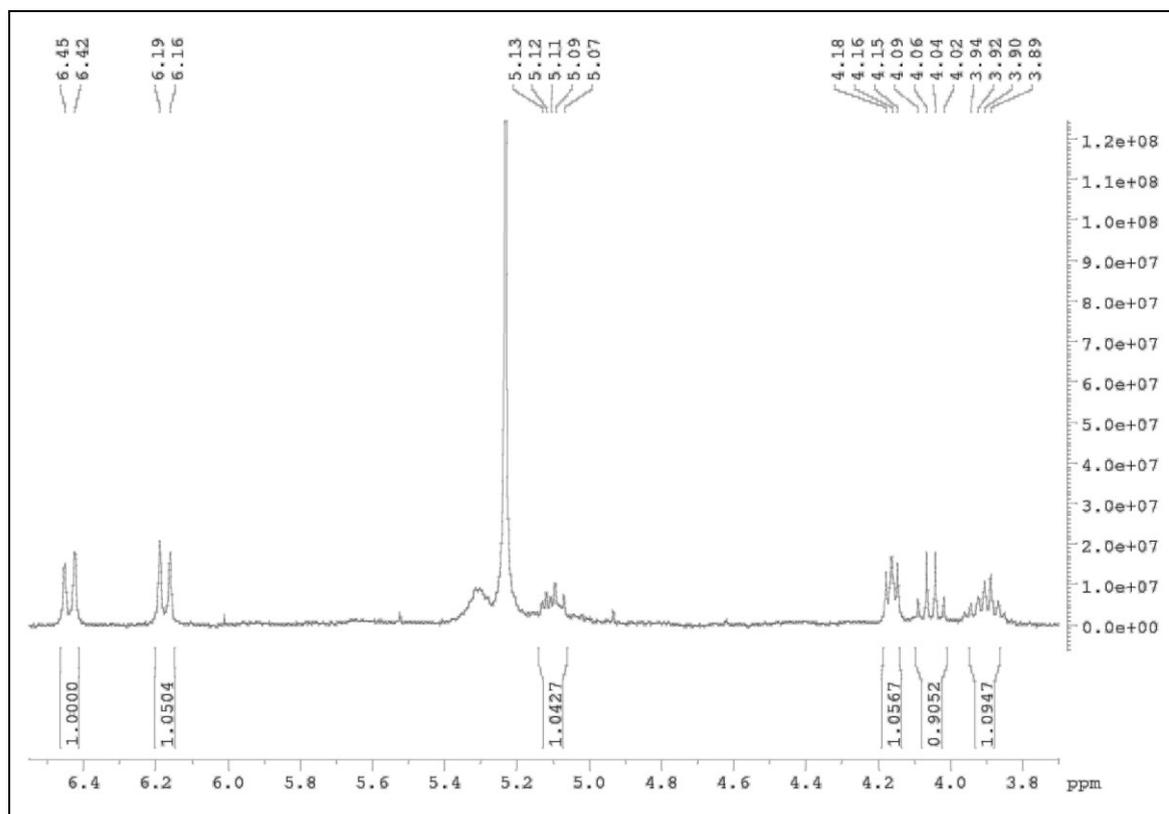
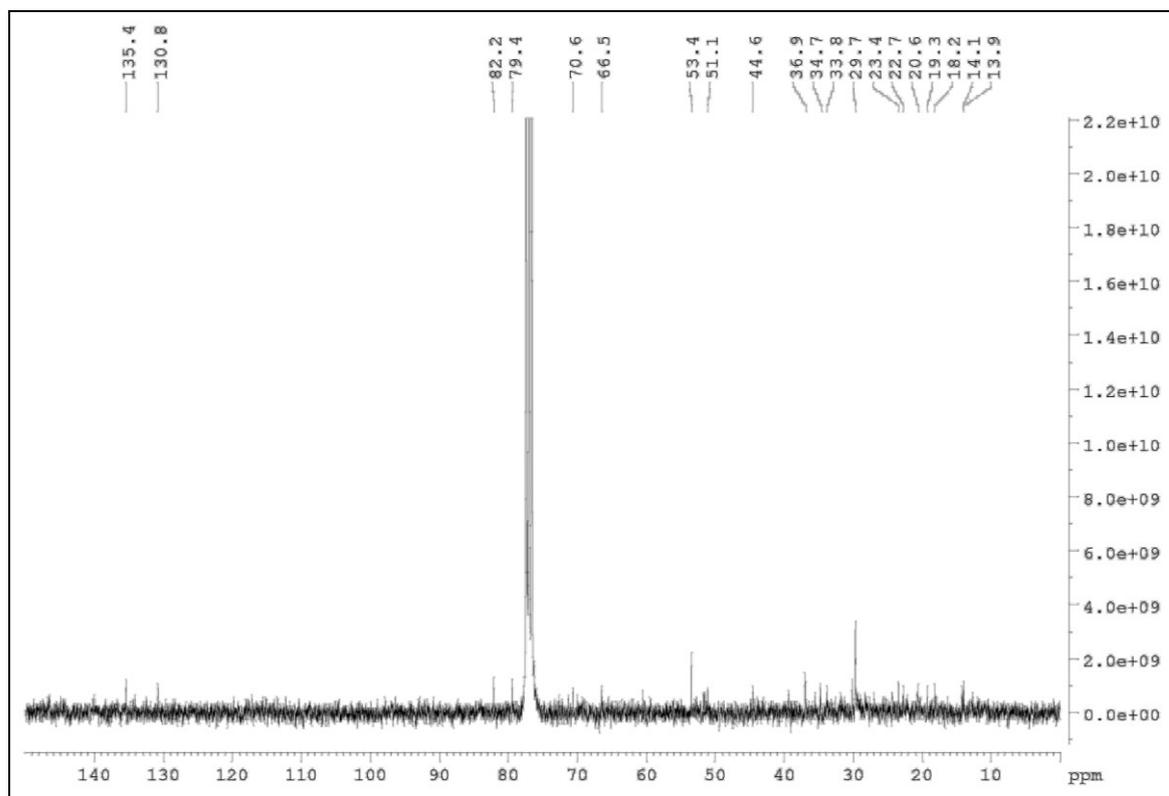
Figura 50. Ampliação do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância CS.PE.03.

Figura 51. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância CS.PE.03.



Até o momento não há relatos da presença de peróxidos de esteroides para corais do gênero *Tubastraea*. A origem dessa classe química nos organismos marinhos ainda é controversa. Alguns autores mencionam a possibilidade de que os peróxidos de esteroides possam ser artefatos da conversão de dienos esteroidais, especificamente $\Delta^{5,7}$ -esterol no seu respectivo peróxido, já que esse sistema dieno é instável e passível de oxidação durante o armazenamento ou a realização dos experimentos em laboratório. Essa conversão foi observada por Elenkov e colaboradores (1994), após isolamento de uma substância da esponja *Dysidea fragilis* coletada no Mar Negro. Nesse estudo, detectou-se a conversão do $\Delta^{5,7}$ -esterol em $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi-esteroide após um mês de armazenamento da substância isolada.

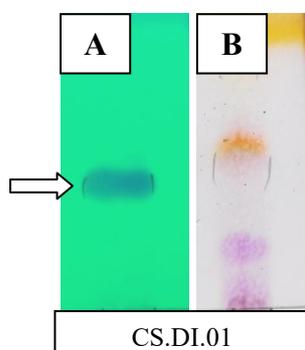
Gauvin e colaboradores (2000) isolaram 10 peróxidos de esteroides da esponja *Luffariella* cf. *variabilis*, coletada no Oceano Índico. Esses autores, todavia, descartaram a possibilidade das substâncias isoladas serem artefatos, visto que o extrato foi prontamente analisado por CCD, mostrando a presença dos peróxidos de esteroides.

Serebryakov e colaboradores (1970), por sua vez, isolaram um peróxido de esteroide a partir do micélio do fungo *Fusarium moniliforme* na ausência de oxigênio, indicando que este é um metabólito formado pelo fungo e que não foi formado a partir da oxidação de um $\Delta^{5,7}$ -esterol.

4.3.5 Substância CS.DI.01

A substância CS.DI.01 foi observada em diversos extratos, sendo isolada a partir dos extratos acetônicos das coletas de maio de 2017, de maio de 2018 A, de abril de 2019 e de junho de 2019, em uma quantidade total de 43,4 mg. Em CCD, apresenta-se como uma mancha com forte extinção de fluorescência em UV a 254 nm e Rf de 0,34 quando utilizado hexano:acetato de etila (1:1) como fase móvel (Figura 52).

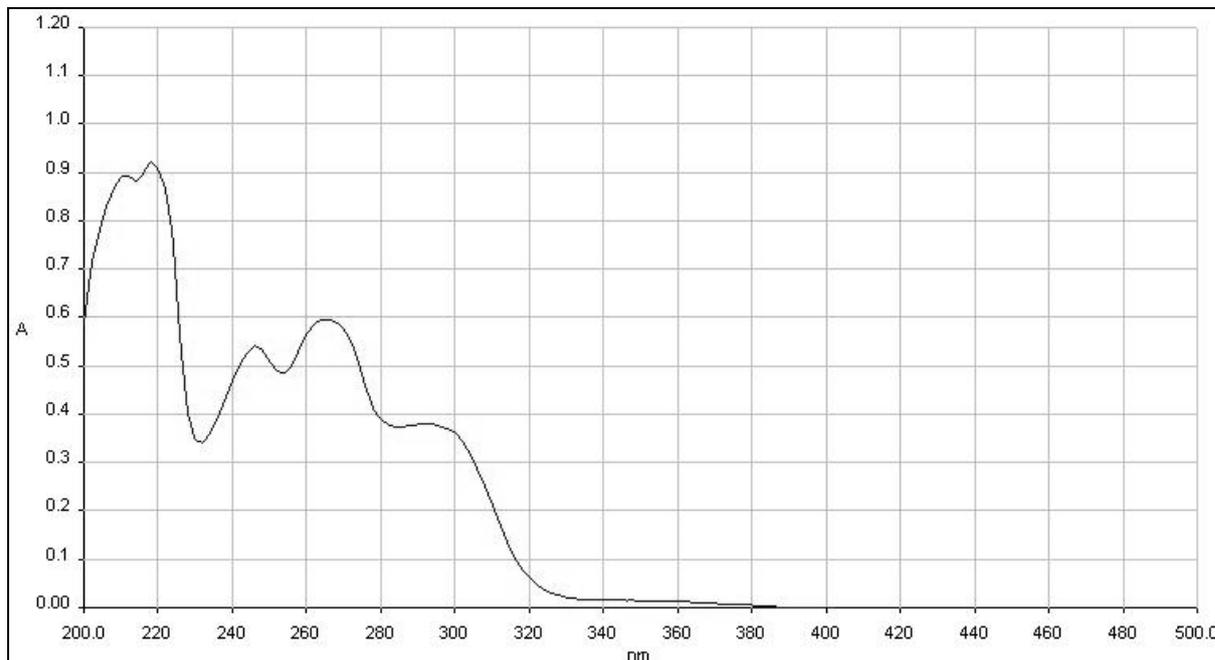
Figura 52. Cromatograma da substância CS.DI.01. Fase móvel: hexano:acetato de etila (1:1). A) Visualização da cromatoplaça em luz UV a 254 nm. B) Cromatoplaça revelada com solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.



Fonte: Autoria própria.

Tendo-se observado uma forte extinção de fluorescência ao analisar a cromatoplaça em luz UV a 254 nm, a substância também foi analisada por espectrofotometria UV-Vis (varredura entre 200 e 500 nm), obtendo-se o espectro abaixo (Figura 53) com máximos de absorção em 220 nm, 245 nm, 265 nm e 300 nm.

Figura 53. Espectro de UV-Vis da substância CS.DI.01.



A análise do espectro de RMN ^1H da substância CS.DI.01 mostrou a presença de seis sinais, todos integrando para 1H: em δ_{H} 7,45 ($J = 8,7; 1,8$ Hz) com a multiplicidade de duplo duplete, δ_{H} 7,63 ($J = 1,8$ Hz) e δ_{H} 8,22 ($J = 8,7$ Hz) com a multiplicidade de dupletos, δ_{H} 7,85 e δ_{H} 10,09 com a multiplicidade de simpletos, além de um simpleto largo em δ_{H} 8,82 (Figuras 54 e 55). O espectro de RMN ^{13}C mostrou a presença de oito sinais entre δ_{C} 114,6 e δ_{C} 185,0, sem sinais na região de metilas e metilenos (Figura 56). O sinal alargado em δ_{H} 8,22 sem correlação com carbonos, conforme foi visualizado no mapa de correlação HSQC (Figura 57), indica a presença de um hidrogênio ligado a um átomo de nitrogênio, sugerindo a presença de um anel indólicos; o que seria coerente com o espectro de UV-Vis observado para essa substância (RASMUSSEN et al., 1993).

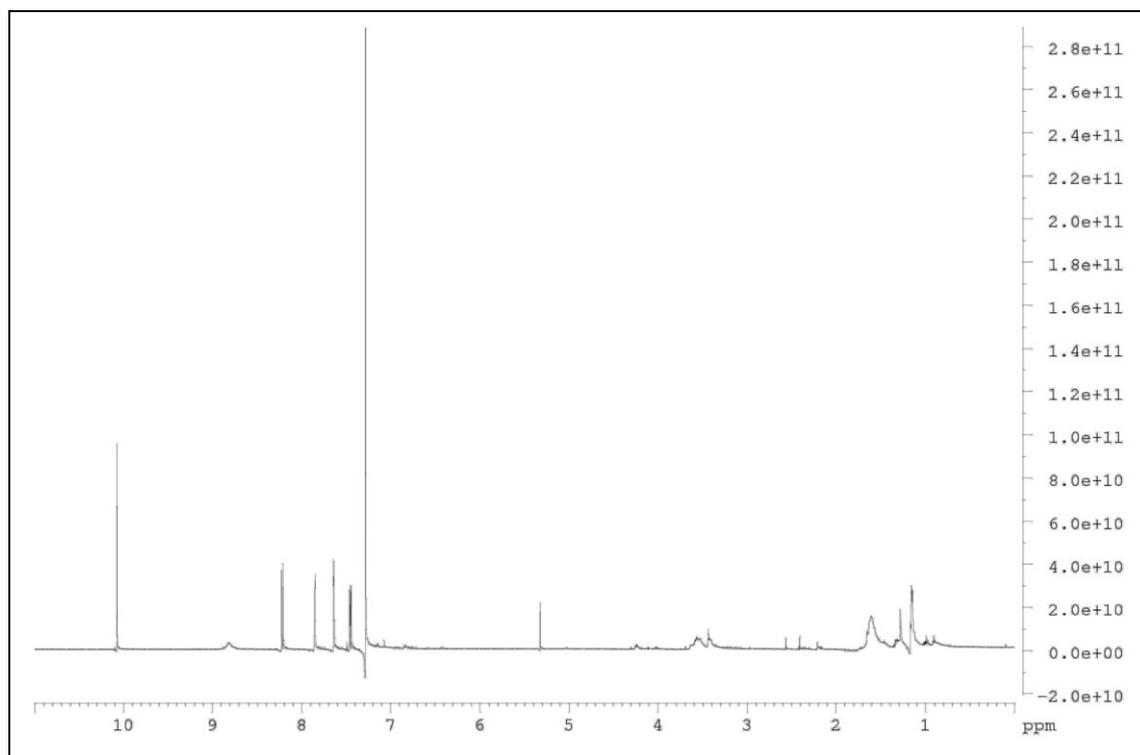
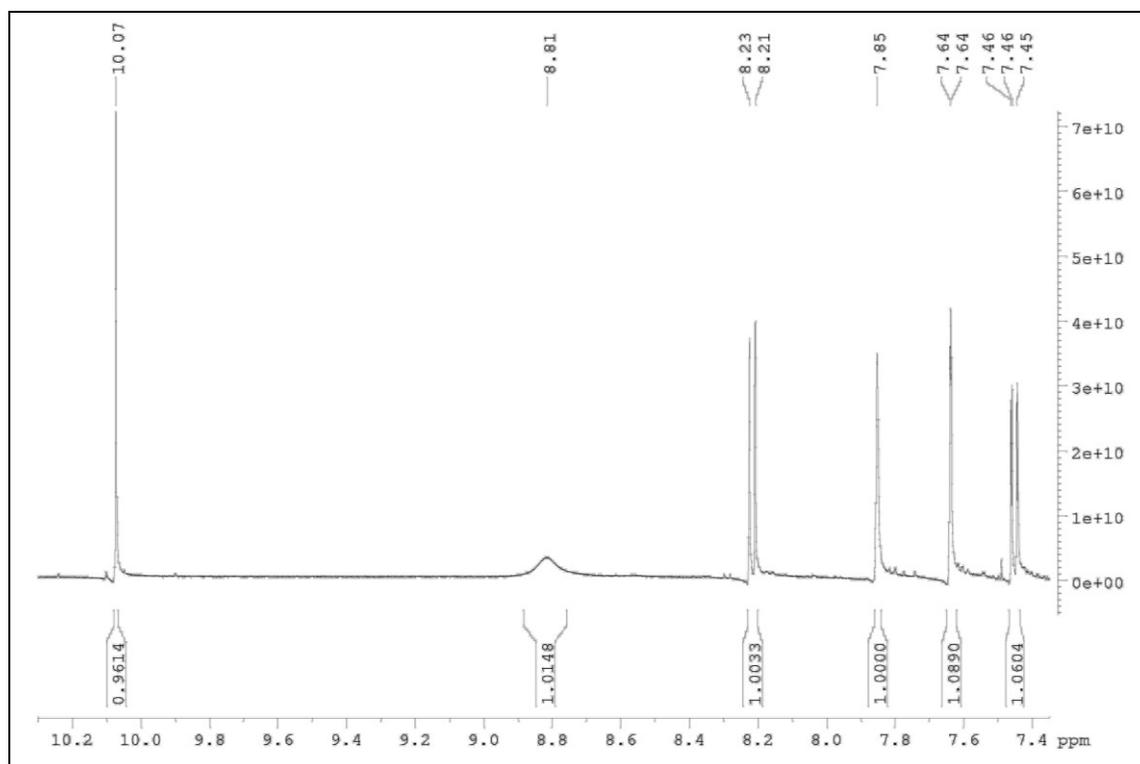
Figura 54. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância CS.DI.01.Figura 55. Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância CS.DI.01.

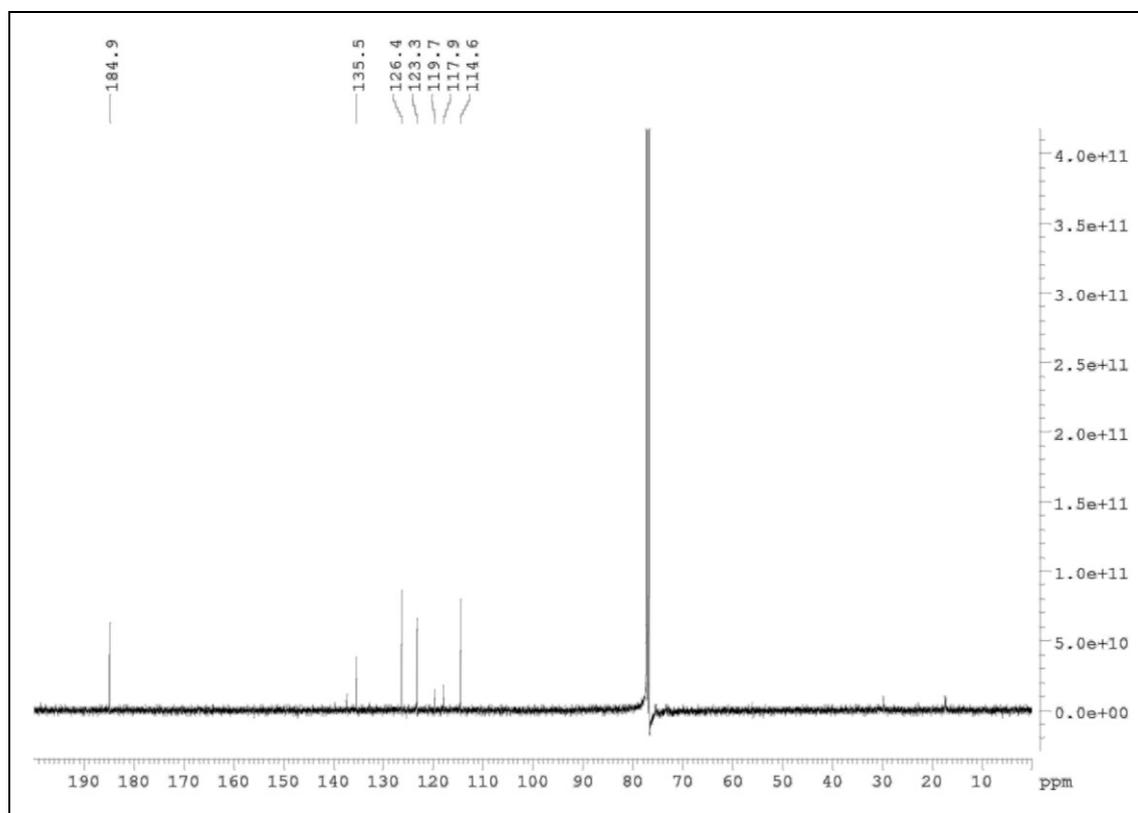
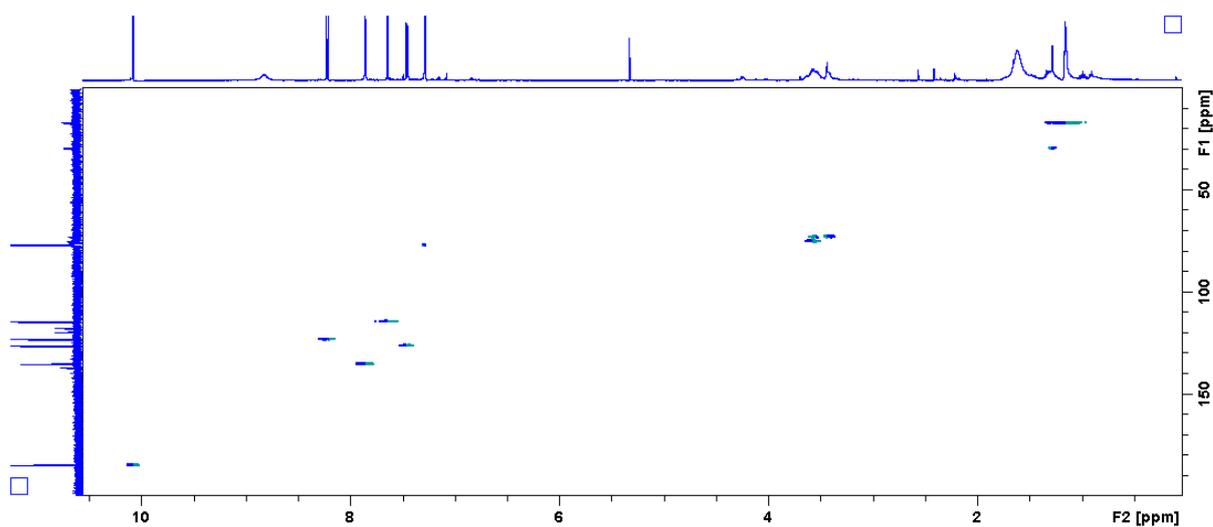
Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância CS.DI.01.

Figura 57. Mapa de correlação HSQC da substância CS.DI.01.



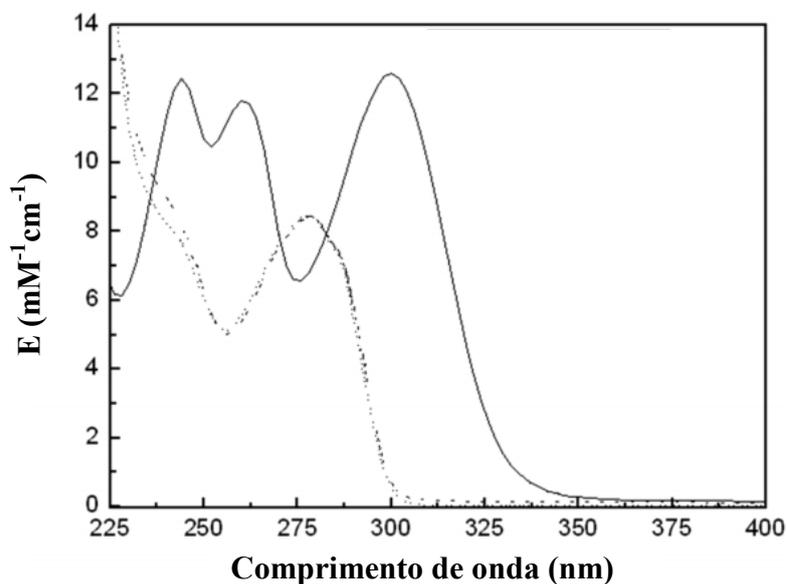
Com base nestas informações, iniciou-se uma busca na literatura por compostos aromáticos nitrogenados, contendo um núcleo indólico. Rasmussen e colaboradores (1993) isolaram cinco compostos 6-bromoindóis da esponja *Pseudosuberites hyalinus*, coletada nas Ilhas Faroé, na Dinamarca. Ao comparar os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C obtidos para a substância CS.DI.01 com os descritos na literatura para o composto 6-bromoindol-3-carbaldeído, observou-se uma grande semelhança entre os sinais. Graças a essa comparação também foi possível perceber que o sinal em δ_{C} 123,3 no espectro de RMN ^{13}C (Figura 56) encontrava-se duplicado, totalizando nove carbonos. Essa comparação é mostrada na Tabela 11.

Tabela 11. Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C da substância CS.DI.01 em comparação com dados da literatura de Rasmussen e colaboradores (1993), para 6-bromoindol-3-carbaldeído.

Átomo	CS.DI.01		Rasmussen e colaboradores (1993)	
	RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3)	RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)	RMN ^1H (CDCl_3)	RMN ^{13}C (CDCl_3)
-	10,09 s	185,0	10,05 CHO	184,5
1	8,82 sl	-	8,67 b	-
2	7,85 s	135,4	7,81 d ($J = 3,0$)	135,1
3	-	119,7	-	119,8
3 ^a	-	123,3	-	126,1
4	8,22 d ($J = 8,7$)	123,3	8,19 d ($J = 9,0$)	123,3
5	7,45 dd ($J = 8,7; J = 1,8$)	126,4	7,43 dd ($J = 2,0$)	126,4
6	-	117,0	-	118,0
7	7,63 d ($J = 1,8$)	114,6	7,61 d	114,4
7 ^a	-	137,3	-	137,0

Além da grande semelhança entre os dados de RMN, o espectro de UV-Vis observado para a substância CS.DI.01 apresentou os mesmos máximos de absorção (245 nm, 265 nm e 300 nm) da substância indol-3-acetaldeído (Figura 58), derivado indólico analisado por Cao e colaboradores (2014), confirmando se tratar de uma substância dessa classe química.

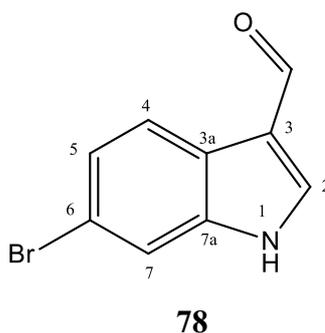
Figura 58. Espectro de UV-Vis (varredura entre 225 e 400 nm) da substância indol-3-acetaldeído (linha contínua).



Fonte: CAO, H. et al., 2014, modificado pela autora.

Com a análise descrita acima foi possível confirmar a identidade da substância CS.DI.01 isolada como 6-bromoindol-3-carbaldeído (Figura 59), com fórmula molecular C_9H_6BrNO .

Figura 59. Estrutura química do derivado indólico isolado do coral *T. coccinea* e identificado como 6-bromoindol-3-carbaldeído.



Wratten e colaboradores (1977) já haviam isolado a substância 6-bromoindol-3-carbaldeído, ao investigar uma amostra de água coletada diretamente do mar da Califórnia,

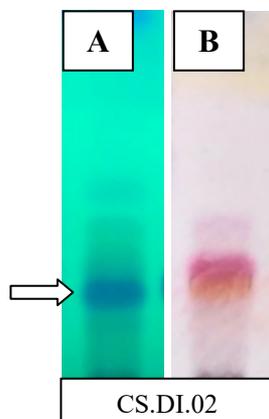
nos Estados Unidos. Nesse estudo foram isolados cinco metabólitos (2-n-pentil-4-quinolinol; 2-n-heptil-4-quinolinol; indol-3-carbaldeído, 6-bromoindol-3-carbaldeído e p-hidroxibenzaldeído) da bactéria marinha *Pseudomonas* spp. Os autores constataram que os metabólitos 2-n-pentil-4-quinolinol; 2-n-heptil-4-quinolinol e p-hidroxibenzaldeído apresentaram atividade antimicrobiana. Tal atividade, contudo, não foi observada para as substâncias indol-3-carbaldeído e 6-bromoindol-3-carbaldeído.

Posteriormente, Olguin-Urbe e colaboradores (1997) isolaram as substâncias 6-bromoindol-3-carbaldeído e indol-3-carbaldeído da ascídia *Stomazoa murrayi*, coletada no México, e das bactérias que viviam em associação com essa espécie de organismo marinho. Nesse estudo os autores mostraram que a substância 6-bromoindol-3-carbaldeído apresentou moderada atividade antimicrobiana para *Abdillus marinus* e *Vibrio campbellii* (halo de inibição de 5 a 10 mm no ensaio de difusão em disco, com aplicação de 60 µg da substância), além de inibir 80% do crescimento da larva *Balanus amphitrite* ao ser testado em uma concentração de 10 µg/ml.

4.3.6 Substância CS.DI.02

A substância CS.DI.02 foi isolada a partir dos extratos acetônicos das coletas de maio de 2018 A e de junho de 2019, em uma quantidade total de 30,8 mg. Ao ser analisada por CCD, essa substância apresenta uma mancha com forte extinção de fluorescência quando visualizada em UV a 254 nm e com coloração rosada após revelação com solução de anisaldeído sulfúrico (Figura 60). O R_f para este composto, fazendo-se uso de hexano:acetato de etila (6:4) como fase móvel, é de 0,34.

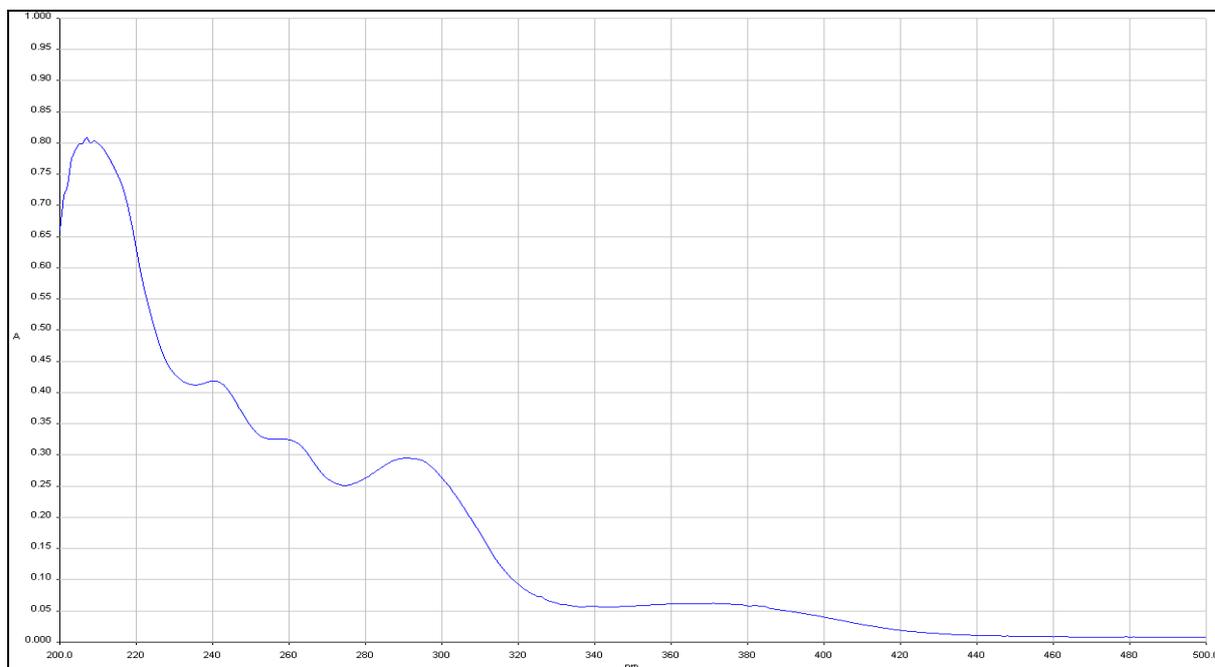
Figura 60. Cromatograma da substância CS.DI.02. Fase móvel: hexano:acetato de etila (6:4). A) Visualização da cromatoplaça em luz UV a 254 nm. B) Cromatoplaça revelada com solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.



Fonte: Autoria própria.

Observando-se uma forte extinção de fluorescência ao analisar a cromatoplaça em luz UV a 254 nm, a substância também foi analisada por espectrofotometria no UV-Vis, com varredura entre 200 e 500 nm (Figura 61).

Figura 61. Espectro de UV-Vis da substância CS.DI.02.



O espectro de UV-Vis da substância CS.DI.02 apresenta os mesmos máximos de absorção observados para a substância CS.DI.01 previamente isolada. Pode-se perceber, no espectro da Figura 62, um padrão muito semelhante ao observado por Cao e colaboradores (2014) para a substância indol-3-acetaldeído (Figura 58), com máximos de absorção nas regiões aproximadas de 245 nm, 265 nm e 300 nm, característicos dos derivados indólicos.

A análise do espectro de RMN ^1H revelou a presença de sete sinais, todos integrando para 1H, sendo: dois multipletos em $\delta_{\text{H}} = 7,34$ e $\delta_{\text{H}} = 7,31$, um duplo duplete em $\delta_{\text{H}} 8,33$ ($J = 2,0; 3,4$ Hz), dois dupletos em $\delta_{\text{H}} 7,43$ ($J = 1,8$ Hz) e $\delta_{\text{H}} 7,85$ ($J = 2,3$ Hz), um simpleto em $\delta_{\text{H}} 10,06$ e um simpleto largo em $\delta_{\text{H}} 8,87$ (Figuras 62 a 64). O espectro de RMN ^{13}C mostrou a presença de nove sinais entre $\delta_{\text{C}} 112,3$ e $\delta_{\text{C}} 184,9$, sem sinais na região de metilas e metilenos (Figura 65). O sinal alargado em $\delta_{\text{H}} 8,87$ no espectro de RMN ^1H sem correlação com carbonos, conforme visualizado no mapa de correlação HSQC (Figura 66), indica tratar-se de um hidrogênio ligado a um átomo de nitrogênio. Esses dados, novamente, confirmam a presença de um núcleo aromático, conforme já havia sido observado em CCD e no espectro de UV-Vis.

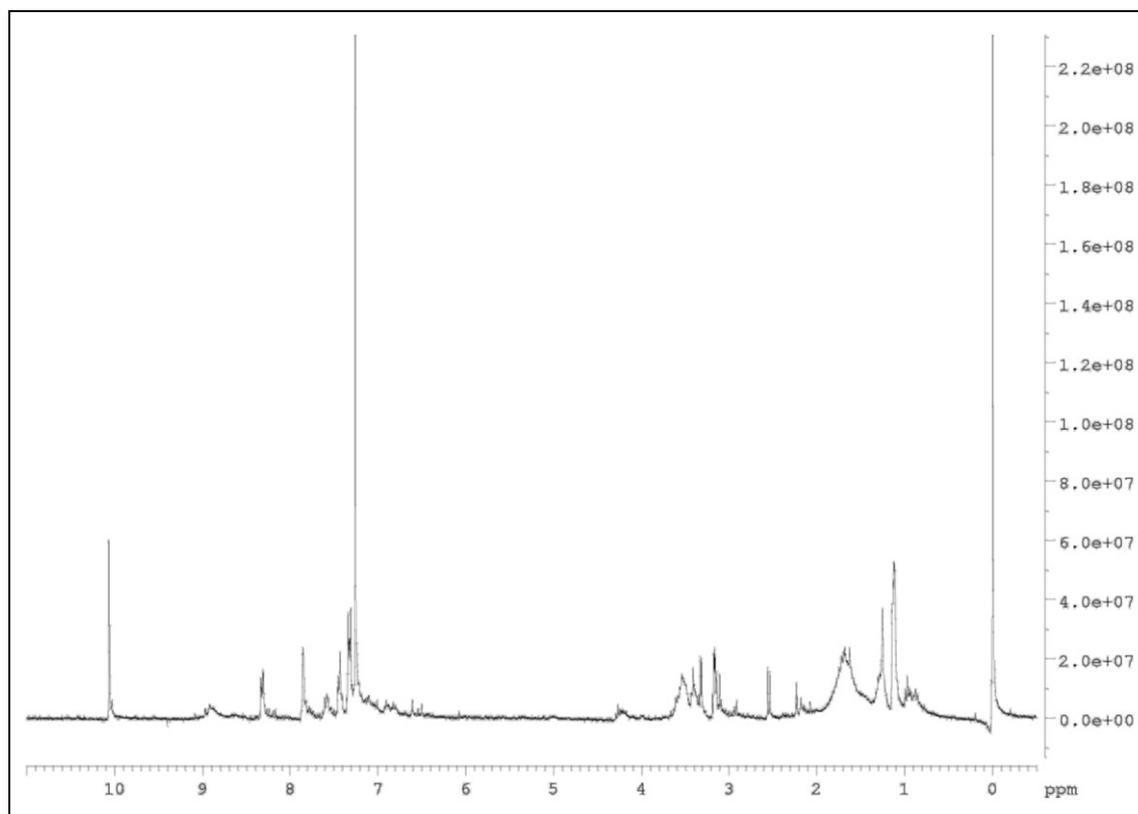
Figura 62. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância CS.DI.02.

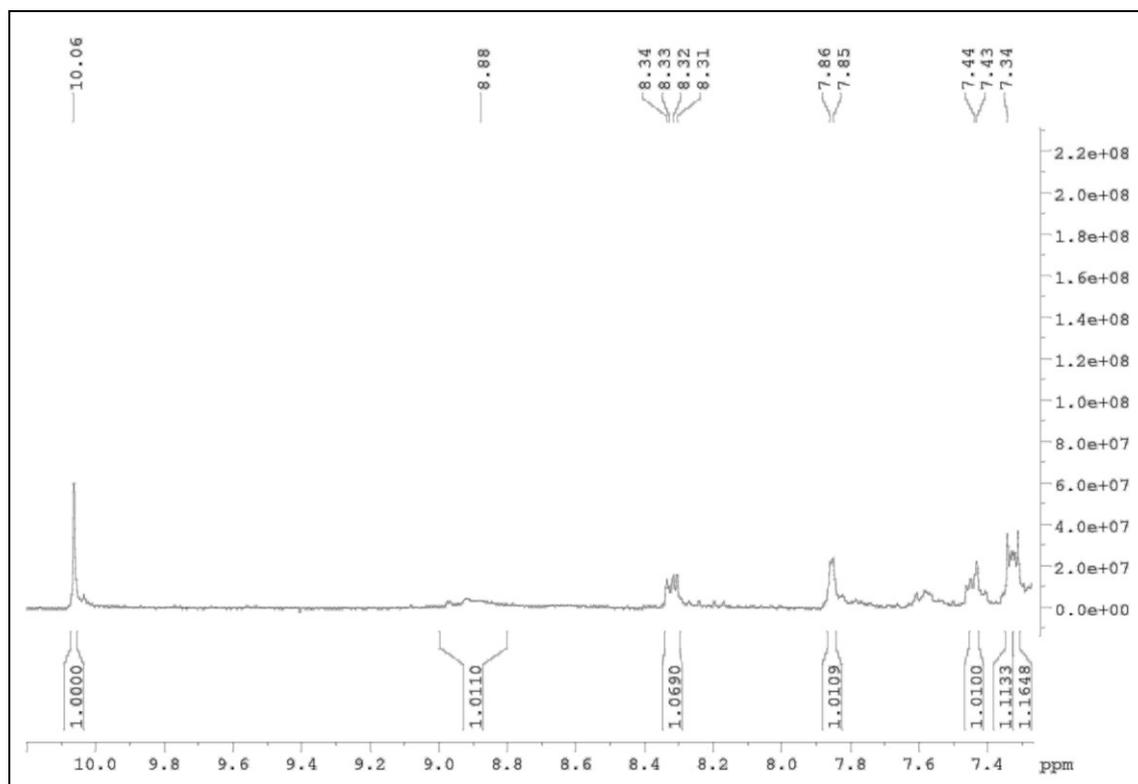
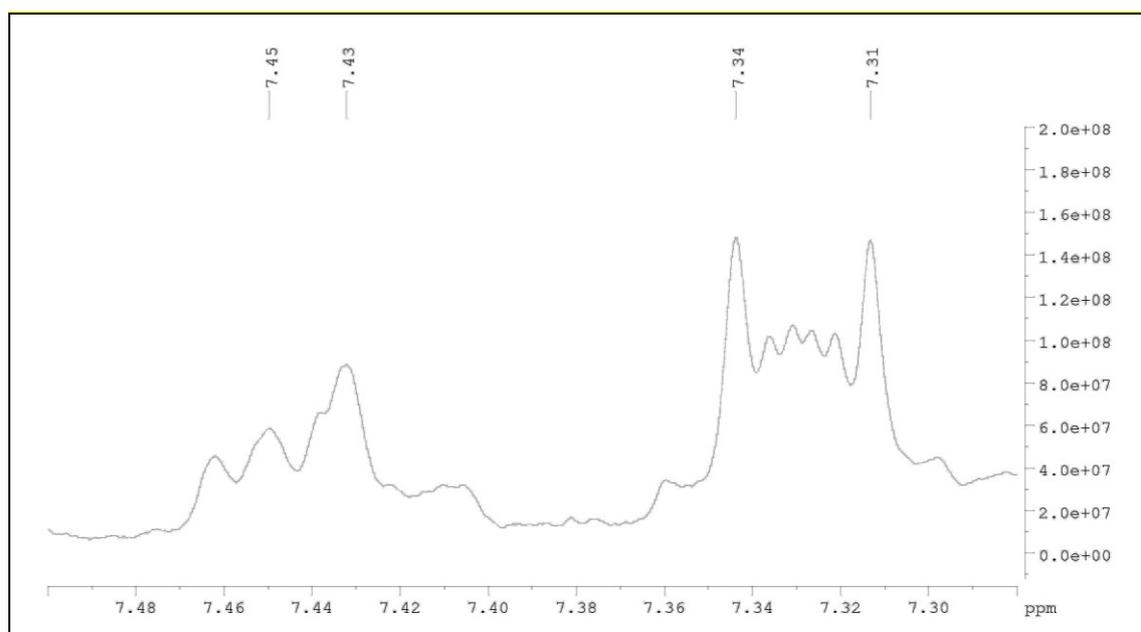
Figura 63. Ampliação do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância CS.DI.02.Figura 64. Ampliação da região entre δ_{H} 7,30 e δ_{H} 7,48 do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da substância CS.DI.02.

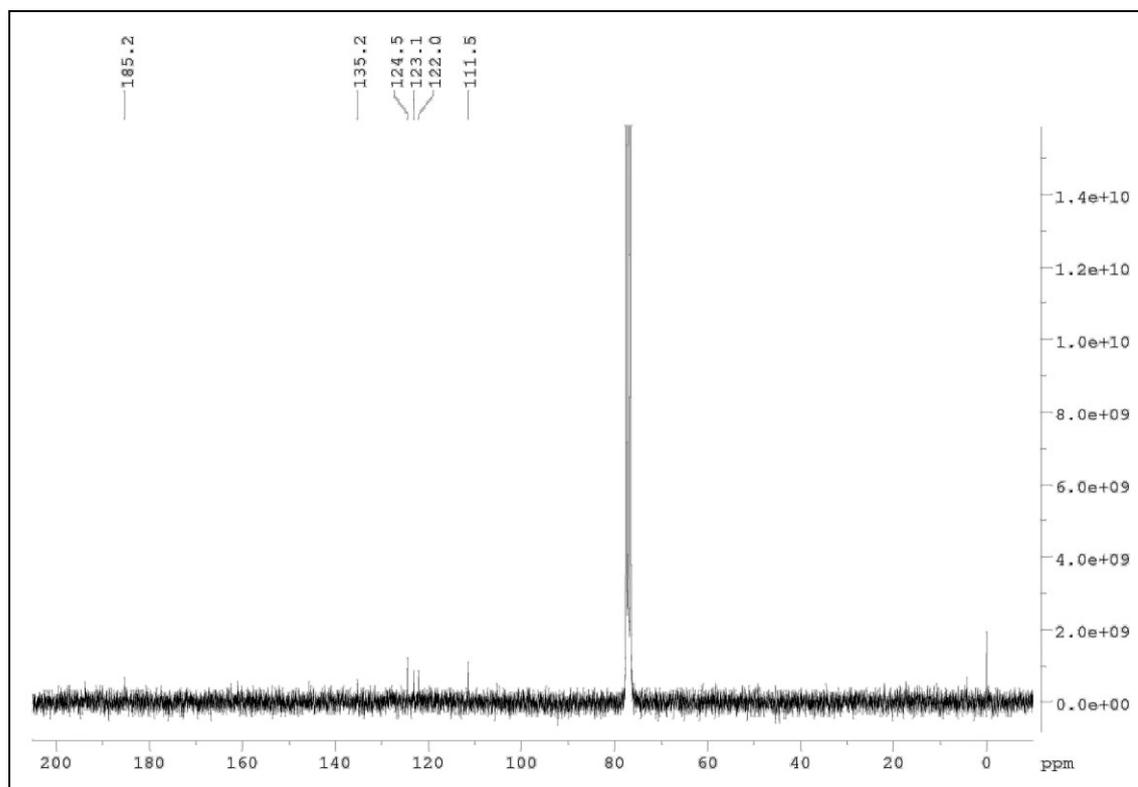
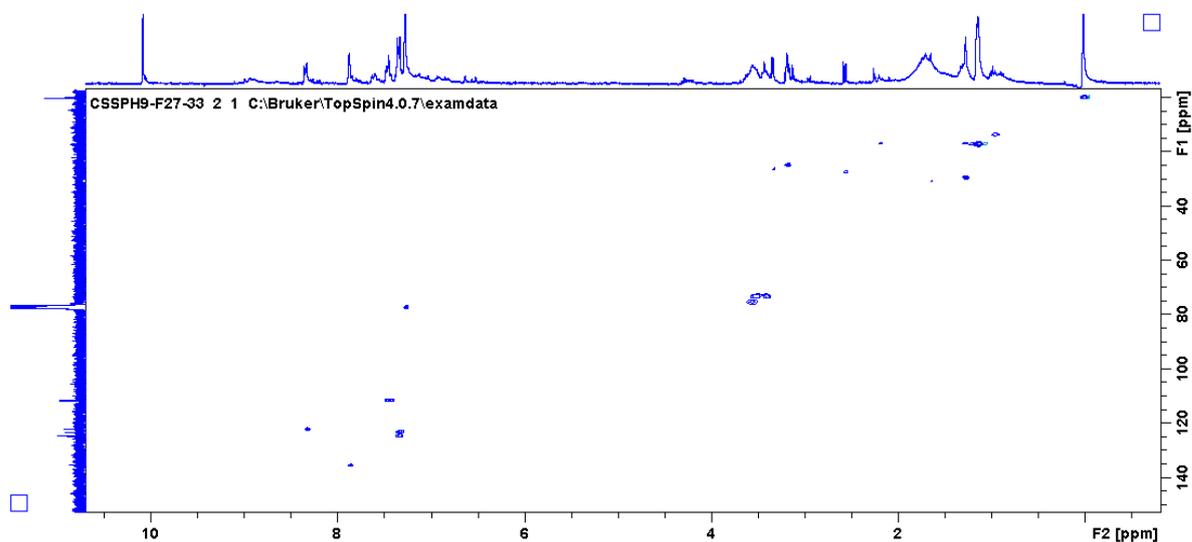
Figura 65. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da substância CS.DI.02.

Figura 66. Mapa de correlação HSQC da substância CS.DI.02.



A partir dos dados encontrados nos espectros de RMN, iniciou-se uma busca na literatura por compostos aromáticos nitrogenados contendo um núcleo indólico, semelhante à

substância CS.DI.01 já isolada. Li e colaboradores (1994) isolaram três derivados indólicos (triptofol; 6-bromoindol-3-carbaldeído e indol-3-carbaldeído) e dois outros metabólitos (p-hidroxibenzaldeído e penilacetamida) da esponja *Halichondria* sp. coletada em Tóquio, no Japão. Ao comparar os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C obtidos para a substância CS.DI.02 com os descritos para o composto indol-3-carbaldeído, observou-se uma grande semelhança entre os sinais, conforme apresentado na Tabela abaixo (Tabela 12).

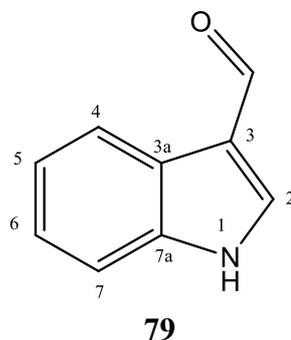
Tabela 12. Dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C da substância CS.DI.02 em comparação com dados da literatura de Li e colaboradores (1994), para indol-3-carbaldeído.

Átomo	CS.DI.02		Li e colaboradores (1994)	
	RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3)	RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)	RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3)	RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)
-	10,06 s	185,2	10,04 s	185,1
1	8,87 sl	-	8,73 sl	-
2	7,85 d ($J = 2,3$)	135,0	7,81 d ($J = 3,3$)	135,1
3	-	n.a.	-	n.a.
3 ^a	-	n.a.	-	n.a.
4	8,33 dd ($J = 2,0; 3,4$)	122,0	8,29 d ($J = 7,7$)	122,1
5	7,31 m	123,4	7,23 m	123,1
6	7,34 m	124,1	7,24 m	124,5
7	7,43 d ($J = 1,8$)	111,0	7,43 d ($J = 7,3$)	111,4
7 ^a	-	n.a.	-	n.a.

n.a.: Sinais não atribuídos.

Após comparação com a literatura, foi possível confirmar a identidade da substância CS.DI.01 isolada como indol-3-carbaldeído (Figura 67), com fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}$ e massa molecular de 145,16 g/mol.

Figura 67. Estrutura química do derivado indólico isolado do coral *T. coccinea* e identificado como indol-3-carbaldeído.



A estrutura química da substância CS.DI.02 pôde ser confirmada como indol-3-carbaldeído mediante análise por CG/MS. O cromatograma, o espectro de massas e a comparação com a biblioteca (*NIST Mass Spectral Library*) podem ser observados a seguir (Figuras 68 a 70).

Figura 68. Cromatograma da substância CS.DI.02 obtido por CG/MS.

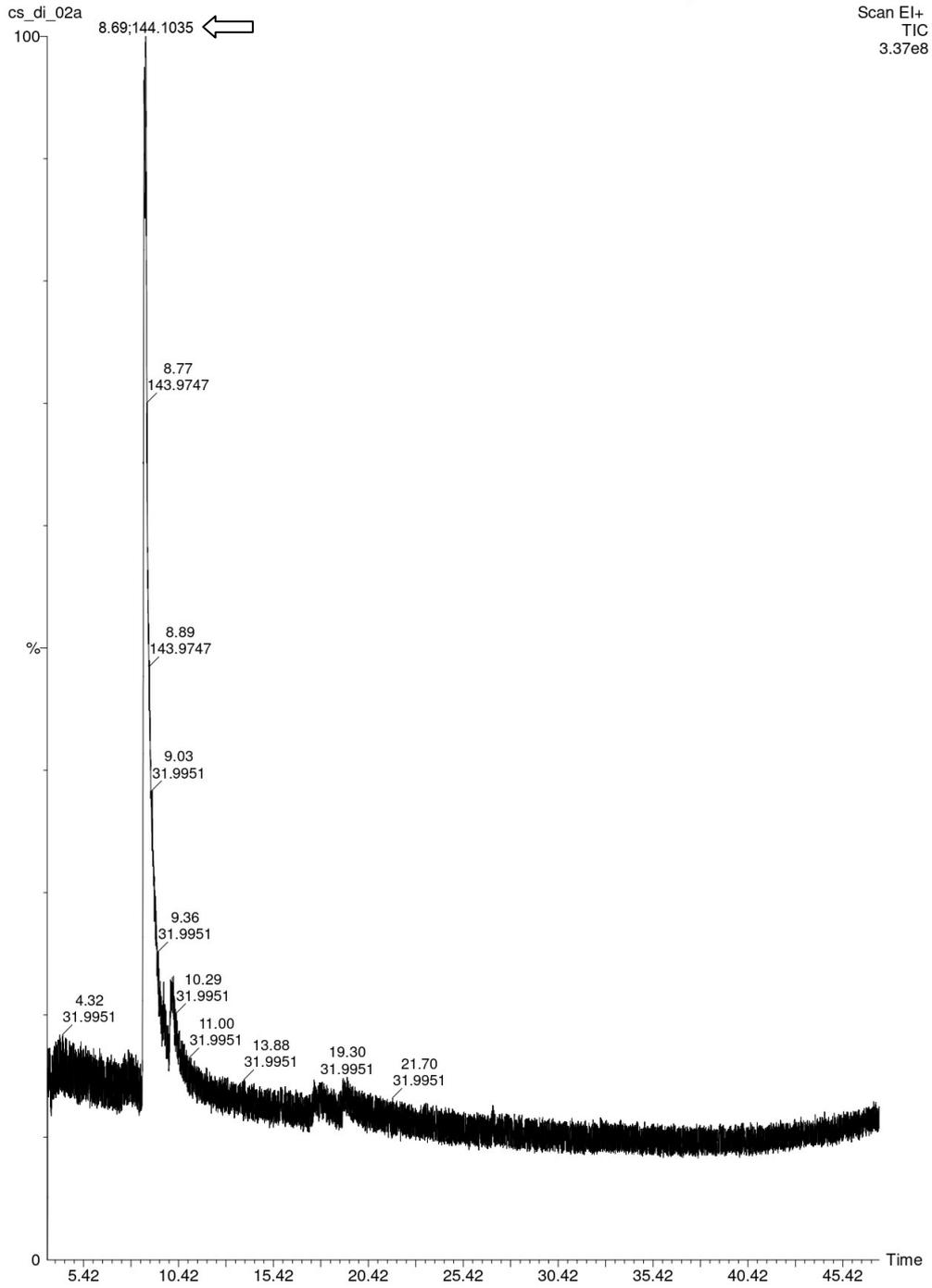


Figura 69. Espectro de massas do pico no tempo de retenção 8,59 (substância CS.DI.02) obtido por CG/MS.

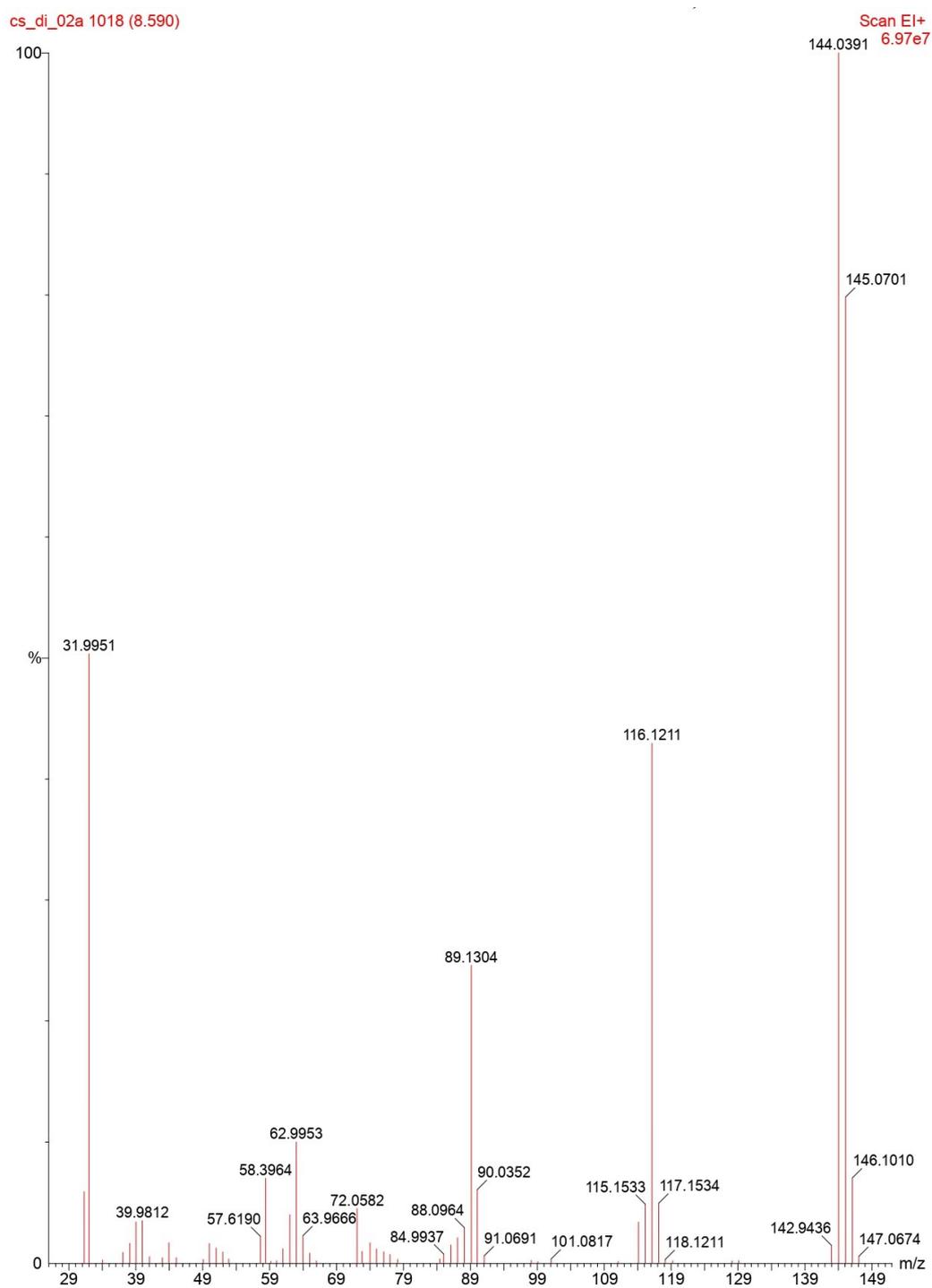
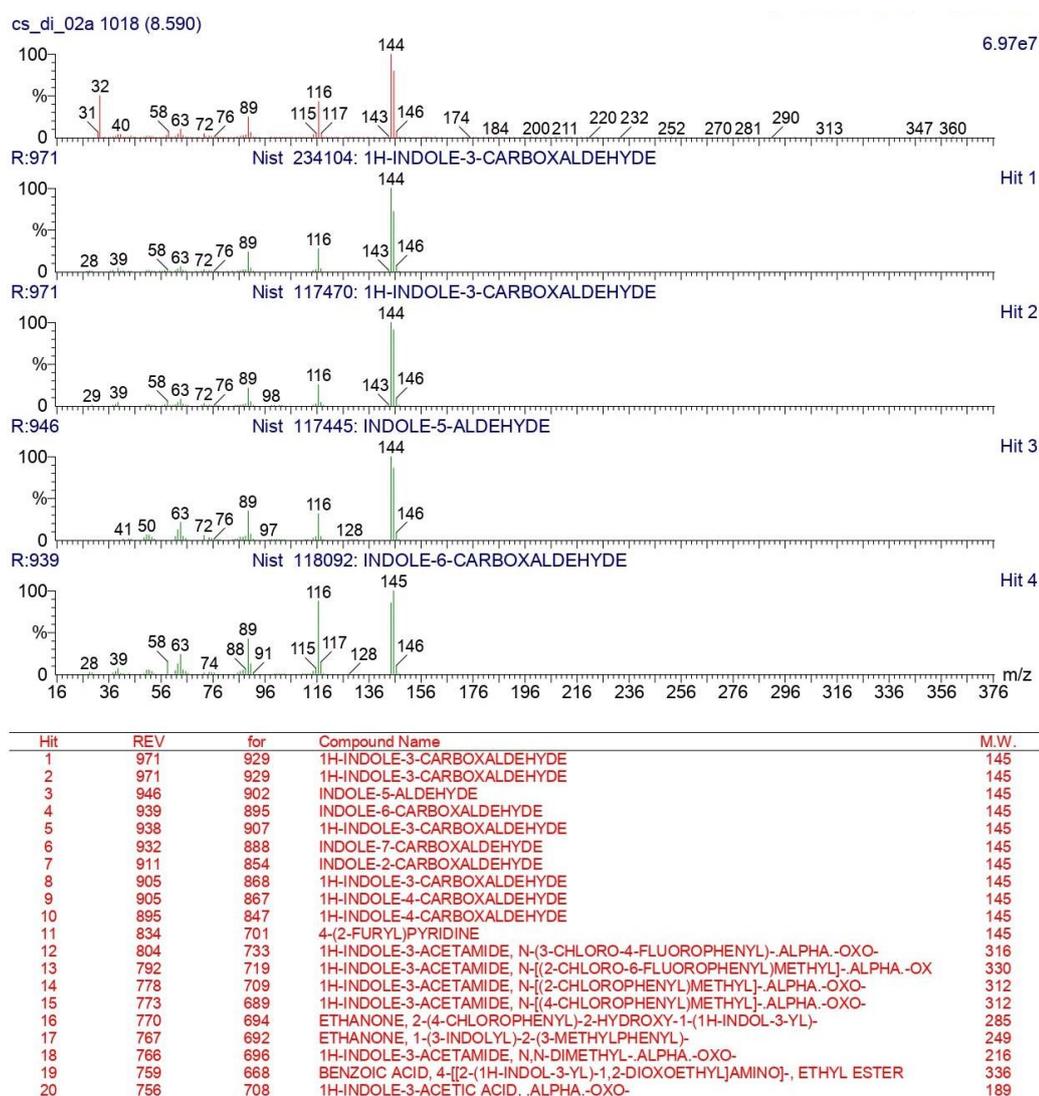


Figura 70. Comparação entre os dados de fragmentação de compostos disponíveis na biblioteca *NIST* e a substância CS.DI.02 (pico no tempo de retenção 8,590) por CG/MS.



Na Figura 70 pode-se observar que os dados de fragmentação da substância CS.DI.02 obtidos por CG/MS (pico no tempo de retenção 8,590) equivalem aos da substância indol-3-carbaldeído, conforme comparação interna com a biblioteca *NIST*.

Nas mesmas condições de análise por CG/MS (descritas no item 3.1.3 *Equipamentos*), não foram obtidos cromatograma e espectros adequados para a substância CS.DI.01 (6-bromoindol-3-carbaldeído).

Além da investigação química, Li e colaboradores (1994) também avaliaram biologicamente os metabólitos secundários isolados, os quais mostraram atividade antifúngica

sobre *Mortiereila ramannianus*. A substância indol-3-carbaldeído já havia sido isolada da bactéria *Pseudomonas* spp. por Wratten e colaboradores (1977), conforme mencionado anteriormente.

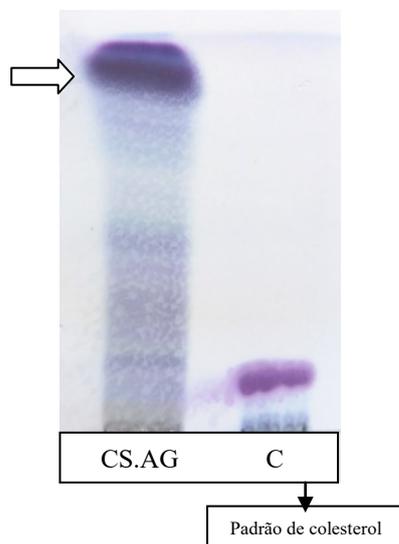
Além das aplisinopsinas mostradas na Figura 13 (item 1.2.2.1.1.1.1 *Alcaloides indólicos tipo aplisinopsina*), Okuda e colaboradores (1982) também relataram o isolamento de dois derivados indólicos (6-bromoindol-3-carbaldeído – CS.DI.01 e indol-3-carbaldeído – CS.DI.02) para o coral *T. coccinea* coletado em uma região da Pupukea, no Oahu, EUA.

4.3.7 Fração CS.AG

Na análise preliminar dos extratos do coral-sol por CCD, verificou-se a presença de uma mancha intensa, uma das principais nos extratos analisados, conforme Figura 32 (item 4.3 *Fracionamento cromatográfico, purificação e isolamento*). Buscou-se o isolamento dessa substância a partir do extrato acetônico da coleta de junho de 2019, do qual ela pôde ser obtida em uma quantidade total de 24,8 mg, sendo denominada CS.AG. Ao ser analisada por CCD, essa substância apresenta uma mancha com coloração arroxeadada após revelação com solução de anisaldeído sulfúrico (Figura 71), em Rf 0,91⁶, ao utilizar-se hexano:acetato de etila (96:4) como fase móvel.

⁶ Rf inadequado para análise da fração CS.AG, embora essa fase móvel tenha sido utilizada com o objetivo de comparar a fração com o padrão de colesterol.

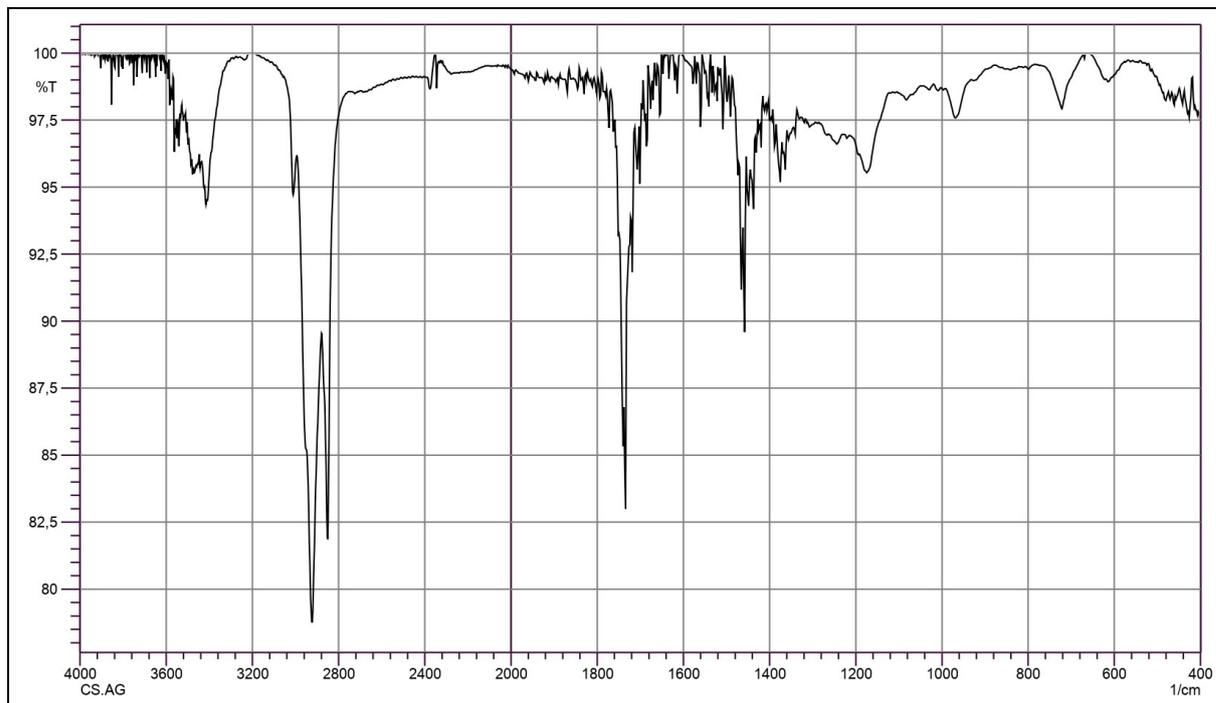
Figura 71. Cromatograma da fração CS.AG. Fase móvel: hexano:acetato de etila (96:4). Cromatoplaça revelada com solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento. C: padrão de colesterol.



Fonte: Autoria própria.

O espectro de infravermelho da fração CS.AG, por sua vez, indicou claramente a presença de uma carbonila de éster, dada a absorção de cerca de 1740 cm^{-1} (Figura 72). Entretanto, a presença de duas bandas nessa região sugere tratar-se de uma mistura. Mesmo assim, a amostra foi analisada por RMN ^1H .

Figura 72. Espectro de infravermelho da fração CS.AG.



O espectro de RMN ^1H confirmou o tipo de estrutura de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, haja vista a proporção de metilas e metilenos de 1:16, conforme integração mostrada na Figura 74. O espectro RMN ^1H indica ainda a presença de insaturação, dada a presença do sinal em δ_{H} 5,39; todavia, essa região pode coincidir com o sinal do solvente diclorometano. No mapa de correlação HSQC (Figura 75) é possível, no entanto, observar que o sinal em δ_{H} 5,39 correlaciona com o carbono δ_{C} 128,2, indicando a presença de uma ligação dupla.

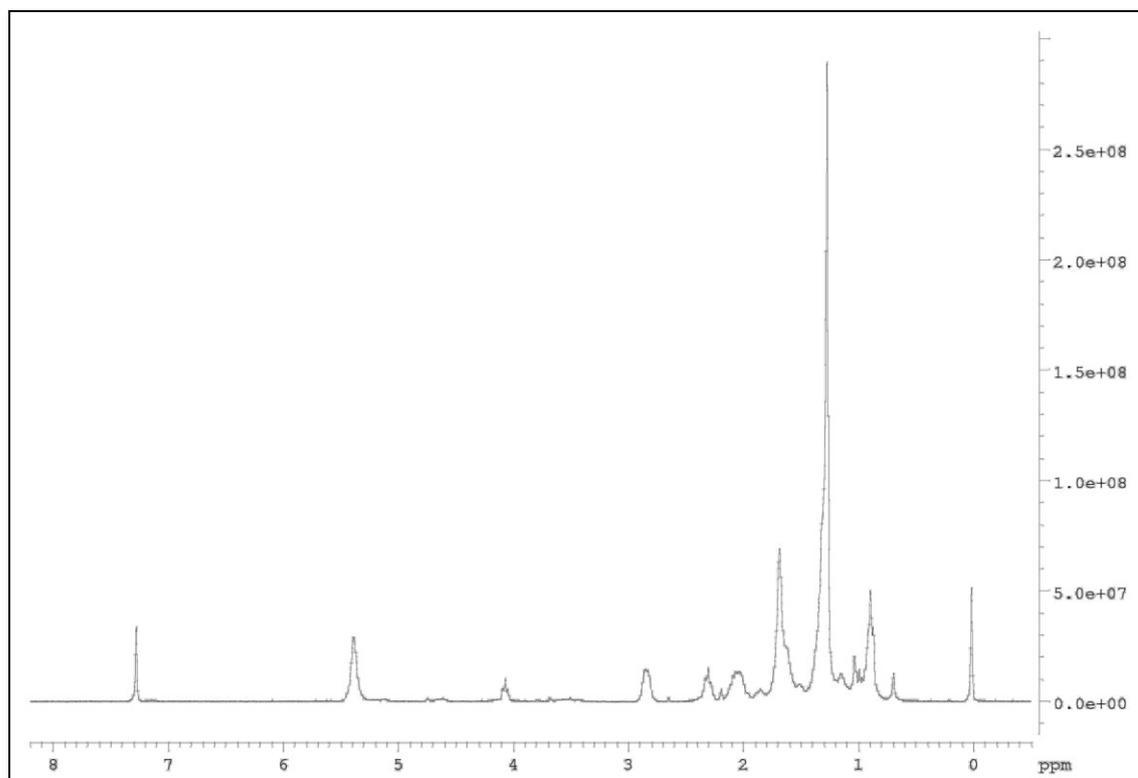
Figura 73. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fração CS.AG.

Figura 74. Ampliação do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fração CS.AG.

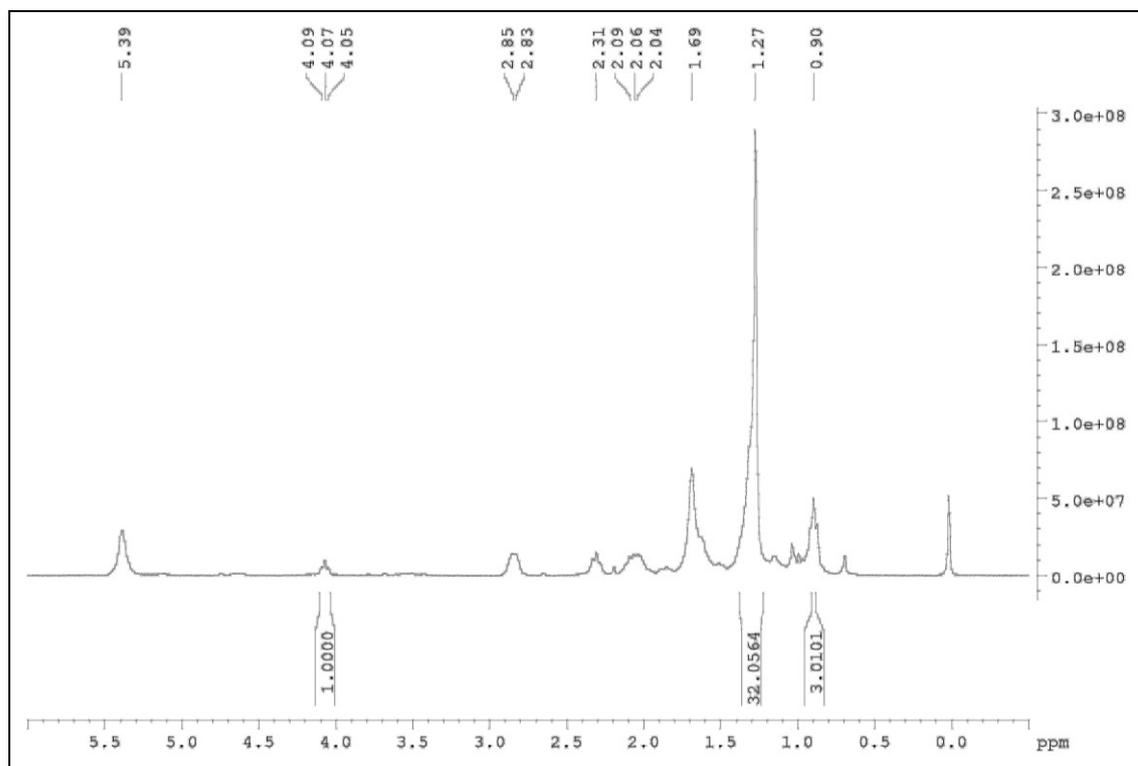
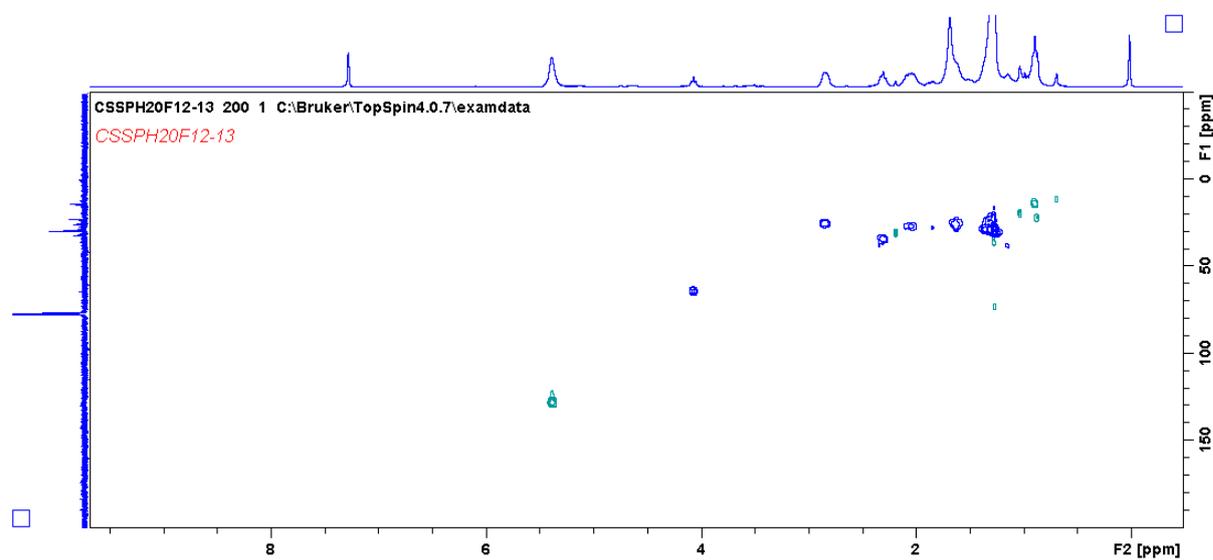


Figura 75. Mapa de correlação HSQC da fração CS.AG.



A fração CS.AG também foi analisada por CG/MS. O cromatograma da Figura 76 indica a presença de uma mistura complexa, com predominância de aproximadamente dez

compostos e destaque para a substância no tempo de retenção em 13,81. O espectro de massas dessa substância é apresentado na Figura 77.

Figura 76. Cromatograma da fração CS.AG obtido por CG/MS.

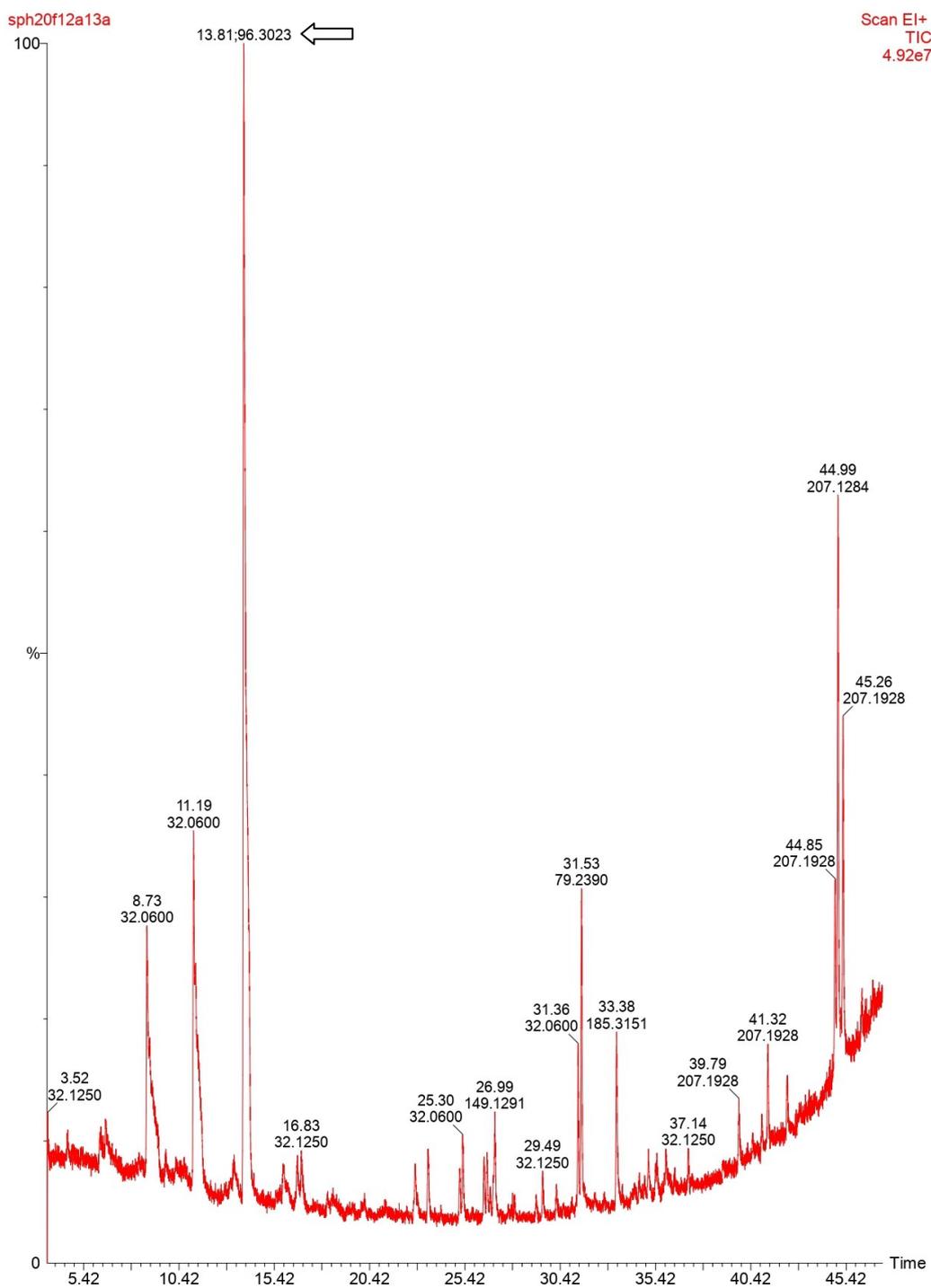
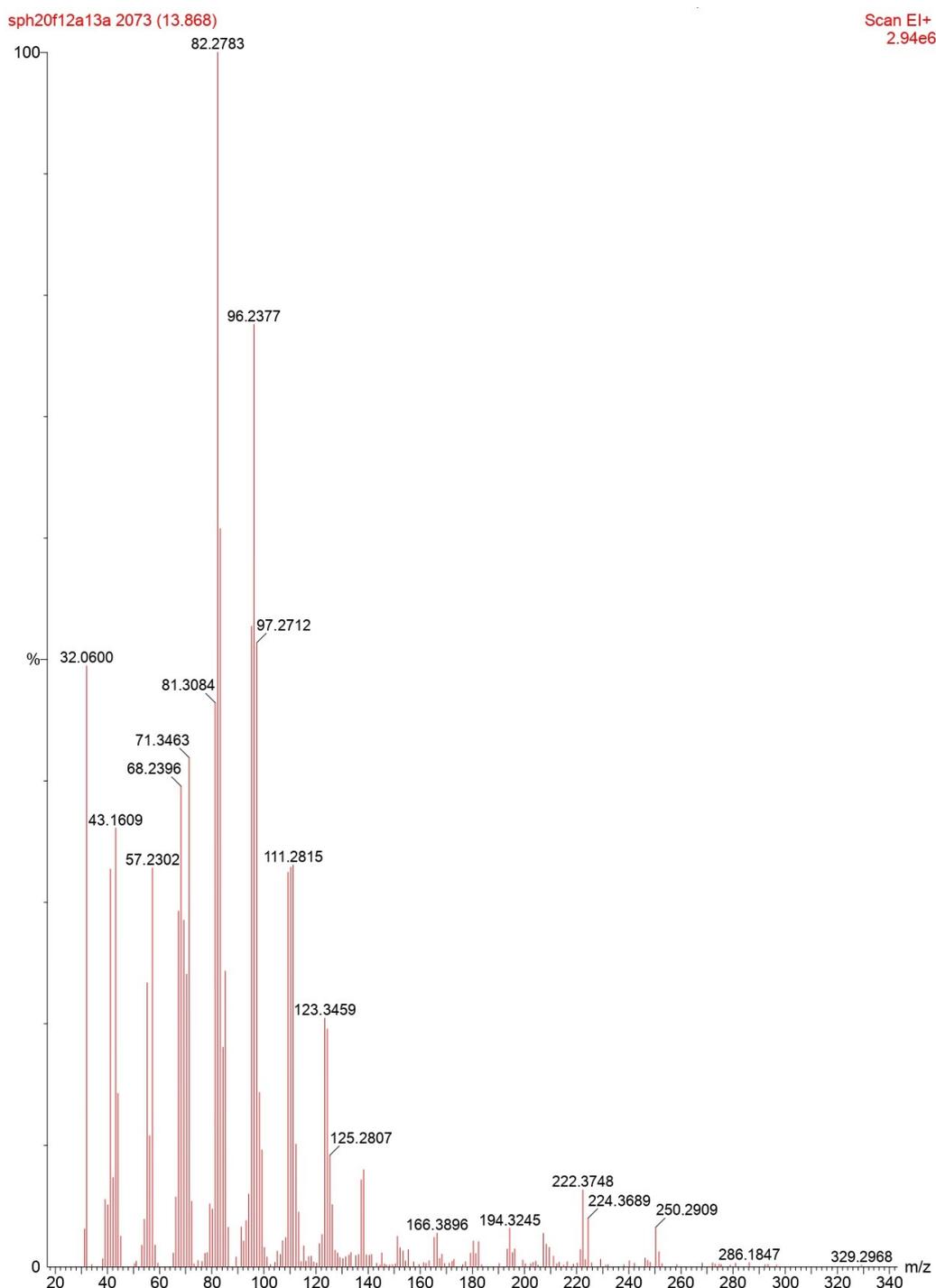


Figura 77. Espectro de massas do pico no tempo de retenção 13,81 (fração CS.AG) obtido por CG/MS.



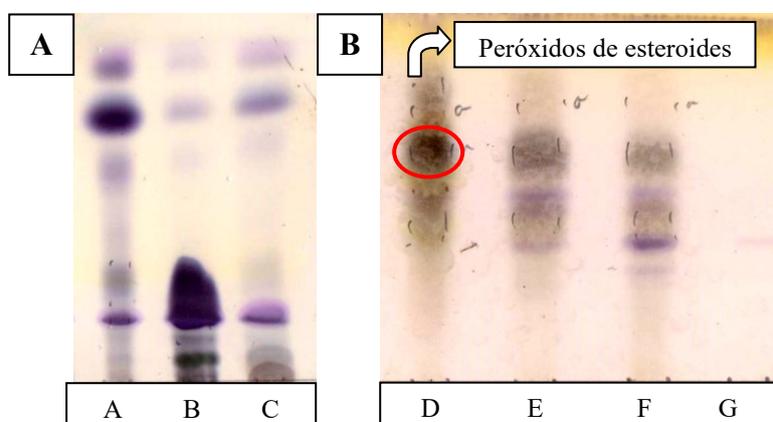
No espectro de massas da Figura 77 é possível observar um padrão de fragmentação com série típica de hidrocarbonetos de cadeia longa ($m/z = 83/ 97/ 111/ 125$ e 139), não sendo

possível detectar claramente o íon molecular nas condições utilizadas na análise. Dessa forma, o conjunto de análises realizado indica tratar-se de uma mistura complexa de ésteres de ácido graxo de cadeia longa. A purificação dessa fração não foi realizada, devido à priorização do isolamento de substâncias das classes dos peróxidos de esteroides e derivados indólicos.

4.4 COMPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA E QUÍMICA ENTRE AS COLETAS

Ao comparar o perfil cromatográfico das CLVs realizadas com cada extrato bruto, pode-se perceber certo padrão de coloração, polaridade e complexidade entre as frações obtidas, principalmente entre os extratos brutos acetônicos das últimas coletas, que seguiram o mesmo procedimento de separação cromatográfica. As CCDs de cada CLV (CLVs 1 a 8) encontram-se mostradas nas Figuras 78 a 83.

Figura 78. Cromatograma das frações da CLV2 da coleta de abril de 2016 (extrato etanólico). A) Fase móvel: hexano:acetato de etila (9:1). B) Fase móvel: B.A.W. (6:1:2). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.



Fonte: Autoria própria.

Figura 79. Cromatograma das frações da CLV4 (extrato acetônico) da coleta de maio de 2017. Fase móvel: hexano:acetato de etila (7:3). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.

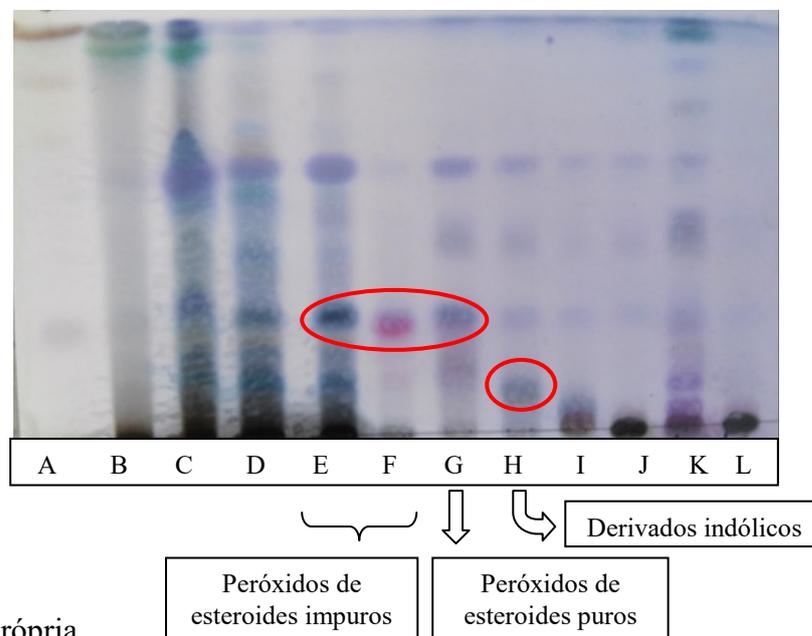


Figura 80. Cromatograma das frações da CLV5 (extrato etanólico) da coleta de maio de 2017. A) Fase móvel: hexano:acetato de etila (7:3). B) Fase móvel: B.A.W. (6:1:2). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.

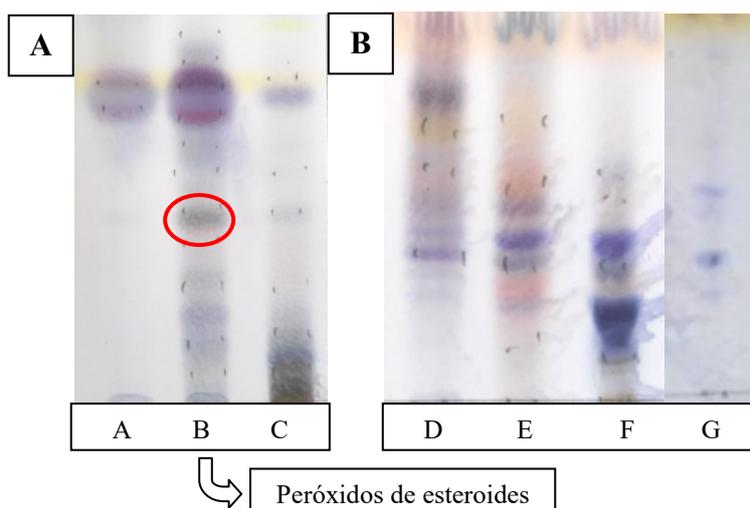
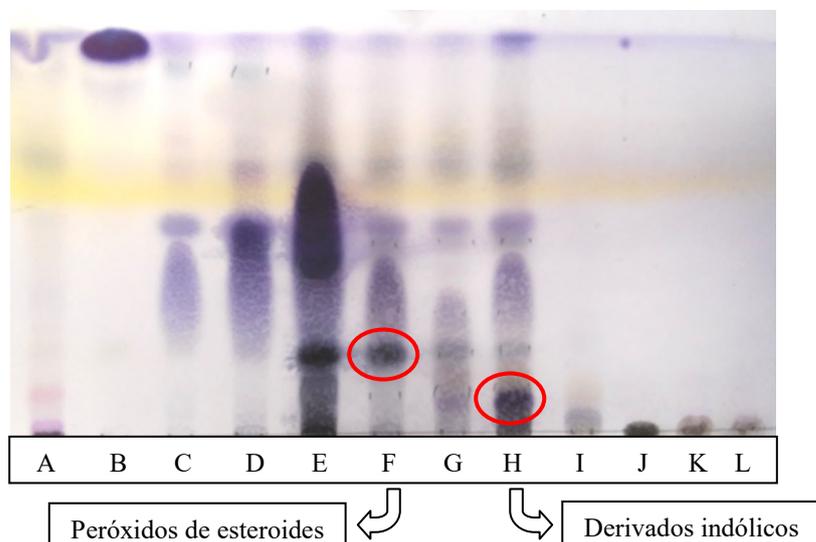
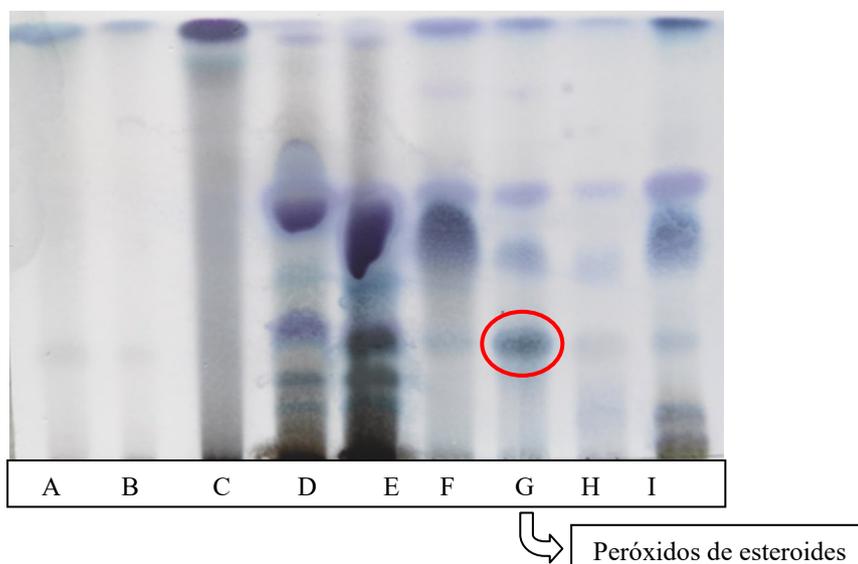


Figura 81. Cromatograma das frações da CLV6 (extrato acetônico) da coleta de maio de 2018. A. Fase móvel: hexano:acetato de etila (7:3). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.



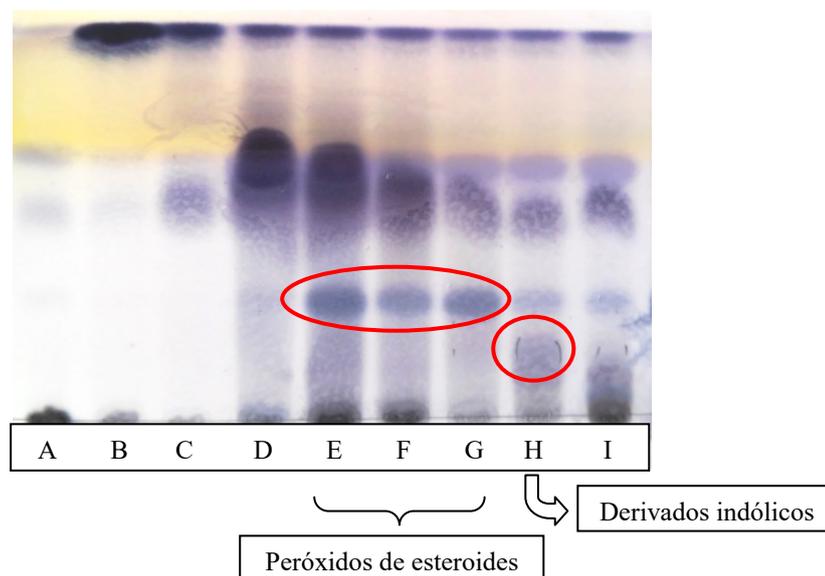
Fonte: Autoria própria.

Figura 82. Cromatograma das frações da CLV7 (extrato acetônico) da coleta de abril de 2019. Fase móvel: hexano:acetato de etila (7:3). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.



Fonte: Autoria própria.

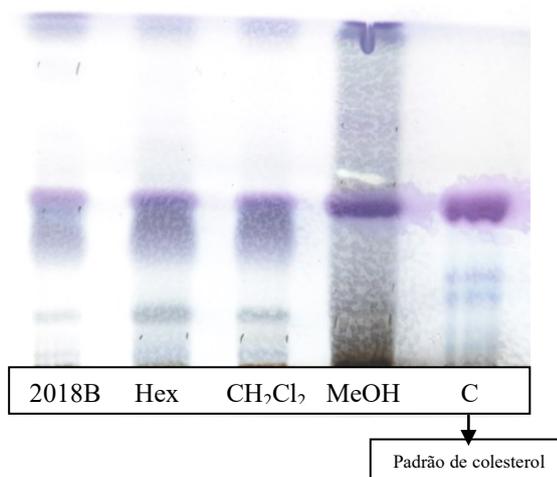
Figura 83. Cromatograma das frações da CLV8 (extrato acetônico) da coleta de junho de 2019. Fase móvel: hexano:acetato de etila (7:3). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento.



Fonte: Autoria própria.

As frações da partição líquido-líquido realizada com o extrato bruto acetônico de 2018 B também foram analisadas por CCD, conforme cromatoplaça representada a seguir (Figura 84).

Figura 84. Cromatograma das frações da partição líquido-líquido (extrato acetônico) da coleta de maio de 2018 B. Fase móvel: hexano:acetato de etila (8:2). Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico sob aquecimento. C: padrão de colesterol.



Fonte: Autoria própria.

Na Figura 84 pode-se perceber que, ao modificar a metodologia de fracionamento do extrato bruto acetônico da coleta de 2018 B, as frações da partição líquido-líquido mostraram um mesmo padrão cromatográfico, revelando que essa não é uma maneira tão eficiente para um primeiro fracionamento do coral-sol, se comparado às CLVs.

Com relação às frações das CLVs em que as substâncias foram isoladas, ao longo do fracionamento cromatográfico percebeu-se que os peróxidos de esteroides geralmente se encontravam nas frações E (hexano:acetato de etila 8:2), F (hexano:acetato de etila 7:3) e/ou G (hexano:acetato de etila 6:4). Já a fração H (hexano:acetato de etila 1:1) era a que continha os derivados indólicos. Após algumas coletas, foi possível perceber que esse padrão se mantinha ao se repetir a metodologia de separação cromatográfica, facilitando o reisolamento de tais substâncias, conforme destacado nas cromatoplasmas das Figuras acima. Nas frações da partição líquido-líquido do extrato bruto acetônico de 2018 B, por sua vez, a substância CS.PE.02 isolada proveio da fração hexânica, não sendo encontradas outras substâncias nas frações em metanol e em diclorometano.

Com o objetivo de comparar os extratos das diferentes coletas, foi realizada análise por CG/MS. Os cromatogramas obtidos são mostrados na Figura 85. Em todos eles observa-se a predominância da substância em tempo de retenção 39,80, cujo espectro de massas (Figura 86 – Referente à coleta de junho de 2019) mostra claramente tratar-se do colesterol, conforme comparação com dados da literatura (Figura 88).

Figura 85. Cromatogramas dos extratos brutos das coletas de maio de 2017, maio de 2018 A, maio de 2018 B, abril de 2019 e junho de 2019.

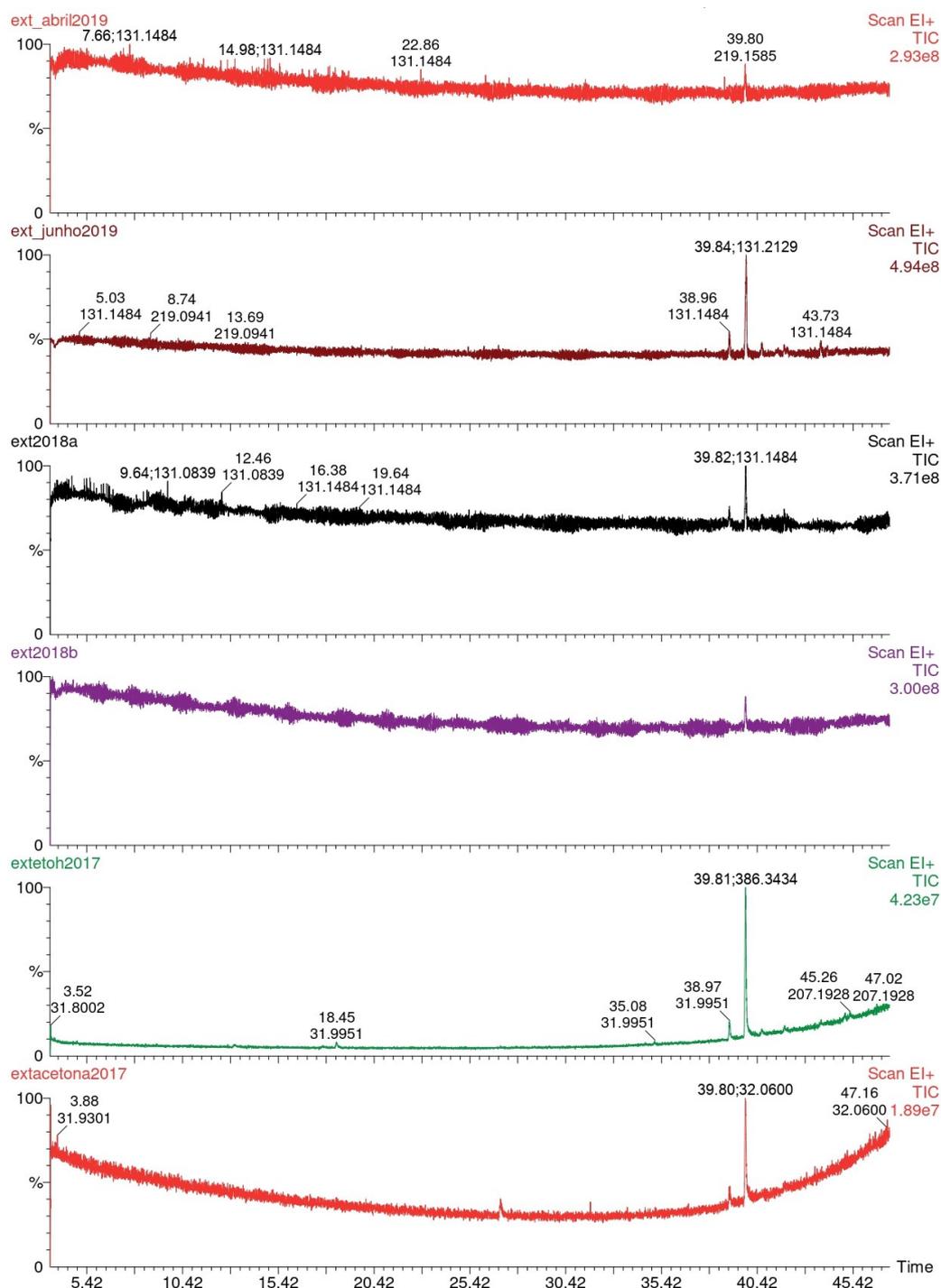


Figura 86. Espectro de massas do pico no tempo de retenção 39,80 (extrato bruto acetônico da coleta de junho de 2019) obtido por CG/MS.

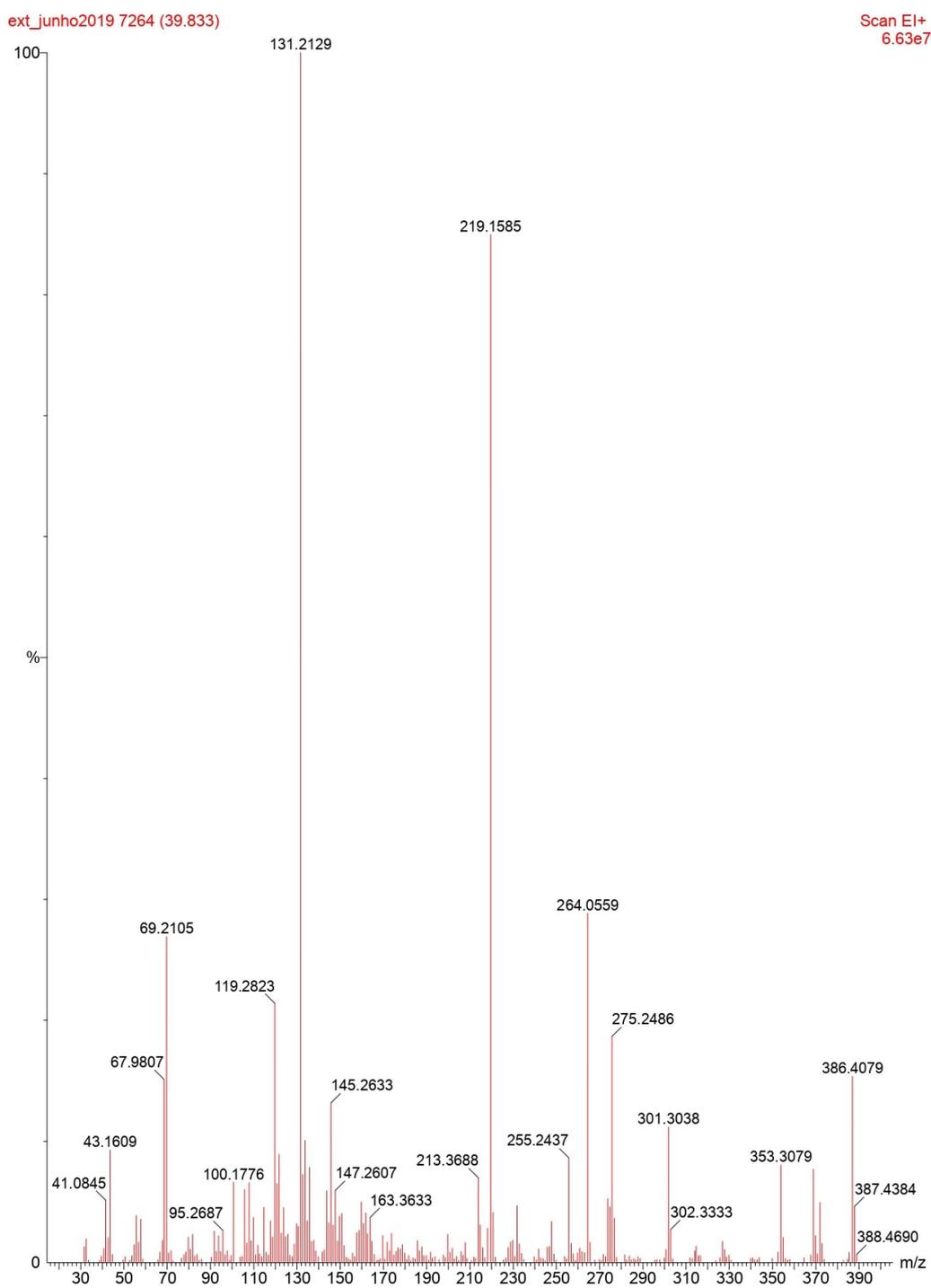
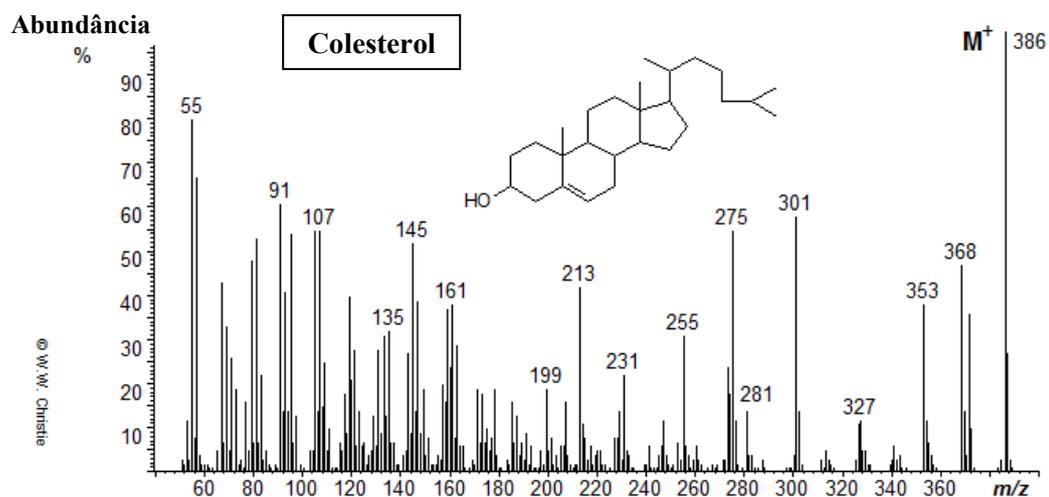


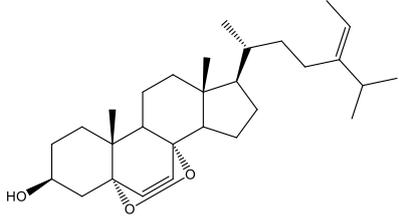
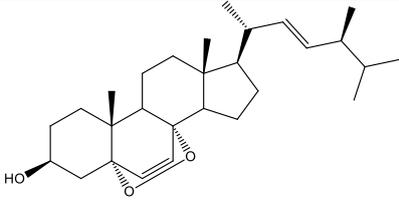
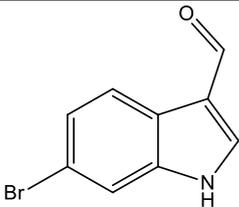
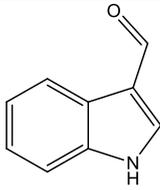
Figura 87. Espectro de massas do colesterol.



Fonte: CHRISTIE, 2018, modificado pela autora.

Um resumo das substâncias isoladas, suas classes químicas, nomenclaturas oficiais e estruturas químicas encontra-se na Tabela 13.

Tabela 13. Substâncias isoladas dos extratos do coral *T. coccinea*.

Código	Classe química	Nome químico	Estrutura química
CS.PE.01	Peróxido de esteroide	(24E)-5 α ,8 α -epidioxi-24-etil-colesta-6,24(28)-dien-3 β -ol	
CS.PE.02	Peróxido de esteroide	(22E,24S)-5 α ,8 α -epidioxi-24-metil-colesta-6,22-dien-3 β -ol	
CS.PE.03	Peróxido de esteroide	Não identificada	Não identificada
CS.DI.01	Derivado indólicos	6-bromoindol-3-carbaldeído	
CS.DI.02	Derivado indólicos	Indol-3-carbaldeído	
CS.AG		Fração rica em ésteres de ácidos graxos de cadeia longa	

Na Tabela 14, a seguir, encontra-se descrita a relação entre os extratos do coral-sol e as substâncias isoladas. Pode-se perceber que grande parte das substâncias isoladas foi encontrada no solvente extrator acetona, variando conforme data de coleta. A acetona é um solvente de fácil evaporação e, em virtude da sua polaridade, extrai uma menor quantidade de sal do material marinho, comparada ao etanol.

Tabela 14. Substâncias isoladas dos extratos do coral *T. coccinea*, conforme cada coleta realizada.

Data da coleta	Extrato	Substância isolada	Massa (mg)
Abril de 2016	Extrato etanólico	CS.PE.01	25,1
Maior de 2017	Extrato acetônico	CS.PE.03	5,7
		CS.DI.01	15,1*
	Extrato etanólico	CS.PE.02	8,3
Maior de 2018 A	Extrato etanólico	CS.DI.01	15,1*
		CS.PE.02	130,2
		CS.DI.01	14,7
Maior de 2018 B	Extrato acetônico	CS.DI.02	5,5
		CS.PE.02	4,5
Abril de 2019	Extrato acetônico	CS.PE.02	33,5
		CS.DI.01	13,6
Junho de 2019	Extrato acetônico	CS.PE.01	20,7
		CS.DI.01	6,9
		CS.DI.02	25,3
		CS.AG	24,8

* Após coluna Sephadex® LH-20 realizada com frações obtidas dos extratos brutos acetônico e etanólico.

Na tabela acima também é possível observar que a substância isolada em maior quantidade do coral *T. coccinea* é o peróxido de esteroide CS.PE.02, encontrada no extrato etanólico da coleta de maio de 2017 e nos extratos acetônicos das coletas de 2018 A, 2018 B e abril de 2019, em uma quantidade total de 176,5 mg.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

A seguir serão abordados os resultados obtidos na avaliação das atividades citotóxica, anti-herpética e antiprotozoária dos extratos brutos e das substâncias isoladas.

4.5.1 Atividade biológica dos extratos

Os extratos brutos das coletas de abril de 2016, maio de 2017, maio de 2018 A e maio de 2018 B tiveram suas atividades citotóxica e anti-herpética avaliadas. Com relação à atividade antiprotozoária, somente o extrato de abril de 2016 foi testado. Os extratos de abril de 2019 e de junho de 2019 não foram incluídos nos ensaios.

4.5.1.1 Atividades citotóxica e anti-herpética

a) Atividade citotóxica

Os resultados de atividade citotóxica dos extratos brutos das coletas de abril de 2016, maio de 2017, maio de 2018 A e maio de 2018 B são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Efeitos antiproliferativos em linhagens celulares tumorais (A549, HCT-8 e H460) e não-tumoral (Vero) após 48 h de experimento pelo método da Sulforrodamina B.

Amostras	CI ₅₀ (µg/mL)			
	A549	HCT-8	H460	Vero
EB etanólico 2016	>250	>500	>250	>250
EB etanólico 2017	>250	>250	>250	>250
EB acetônico 2017	>250	115,3 (96,0-138,5)	>250	>250
EB acetônico 2018 A	214,4 (153,6-299,1)	113,2 (79,9-160,1)	>250	>250
EB acetônico 2018 B	>250	>250	>250	>250
Fração 2018 B – Diclorometano	68,7 (49,9-86,5)	29,4 (24,1-35,9)	140,0 (69,2-193,3)	117,7 (62,7-220,8)
Fração 2018 B – Hexano	131,8 (111,9-155,4)	131,5 (95,8-180,5)	>250	208,7 (133,9-295,4)
Fração 2018 B – Metanol	>250	>250	>250	>250

A549 e H460: células não-pequenas de tumor de pulmão humano; HCT-8: células de adenocarcinoma ileocecal humano; Vero: fibroblastos de rim de macaco verde da África; CI₅₀: concentração que inibe 50% da proliferação celular. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (Intervalo de Confiança 95%).

EB: extrato bruto.

Pelos dados mostrados acima (Tabela 15), pode-se perceber que a fração em diclorometano obtida a partir da partição líquido-líquido realizada com o extrato bruto de 2018 B foi a mais promissora, com uma CI_{50} de 68,7 $\mu\text{g/mL}$ para A549, 29,4 $\mu\text{g/mL}$ para HCT-8 e 140,0 $\mu\text{g/mL}$ para H460. Durante o fracionamento cromatográfico dessa fração, não foi detectada nenhuma das substâncias já isoladas. Essa fração também mostrou uma baixa citotoxicidade para a linhagem de células não tumorais Vero (117,7 $\mu\text{g/mL}$). O extrato bruto acetônico da coleta 2018 B, que deu origem a tal fração, não se mostrou ativo afinal de contas.

b) Atividade anti-herpética

Os resultados da avaliação da atividade anti-herpética dos extratos brutos das coletas de abril de 2016, maio de 2017, maio de 2018 A e maio de 2018 B encontram-se na Tabela 16. As concentrações utilizadas no experimento foram definidas pelo grupo colaborador, conforme protocolos pré-estabelecidos.

Tabela 16. Atividade anti-herpética sobre o vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R) após 48 h de experimento por meio do ensaio de redução do número de placas de lises virais.

Amostras	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)*	Porcentagem de inibição (%)	
		Cepa KOS	Cepa 29R
EB etanólico 2016	200	50,9 \pm 0,8	49,9 \pm 9,5
EB etanólico 2017	100	8,8 \pm 2,4	11,4 \pm 5,7
EB acetônico 2017	100	46,5 \pm 10,5	55,7 \pm 11,0
EB acetônico 2018 A	100	25,3 \pm 12,3	25,8 \pm 4,8
EB acetônico 2018 B	100	30,2 \pm 9,7	27,0 \pm 5,1
2018 B – Diclorometano	50	60,9 \pm 18,3	52,2 \pm 10,4
2018 B – Hexano	100	21,7 \pm 8,8	30,0 \pm 11,4
2018 B – Metanol	100	39,1 \pm 10,2	32,5 \pm 8,1

Os dados estão expressos como porcentagens de inibição da replicação viral em relação ao controle viral e são representativos de dois experimentais independentes \pm desvio padrão da média. * Maior concentração testada, que não foi citotóxica para as células Vero.

EB: extrato bruto.

Com os resultados apresentados na Tabela 16 é possível perceber que, novamente, a fração 2018 B – Diclorometano, obtida a partir da partição líquido-líquido realizada com o extrato bruto acetônico da coleta de 2018 B, foi a mais promissora, apresentando uma porcentagem de inibição de 60,9% sobre a cepa KOS e de 52,2% sobre a cepa 29R. Os extratos brutos das coletas de abril de 2016 (50,9% para cepa KOS e 49,9% para cepa 29R) e de maio de 2017 (46,5% para cepa KOS e 55,7% para cepa 29R) também apresentaram resultados significativos, porém não tiveram seu índice de seletividade determinado em ensaio posterior, uma vez que os resultados de porcentagem de inibição foram inferiores ao valor de corte de 50%.

Com a fração 2018 B – Diclorometano foi realizado um novo ensaio, utilizando-se a mesma metodologia anterior, com o objetivo de determinar o seu índice de seletividade. Os resultados encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17. Atividade anti-herpética da fração 2018 B – Diclorometano sobre o vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R), em 48h de experimento, mediante ensaio de redução do número de placas de lises virais.

Amostra	CC ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL) ± DP		IS	
	Células Vero	HSV-1 Cepa KOS	HSV-1 Cepa 29R	KOS	29R
Fração 2018 B – Diclorometano	117,7	36,1±9,3	40,3±8,5	3,2	2,9

Vero: Fibroblastos de rim de macaco verde da África; CC₅₀: concentração que inibe 50% da proliferação celular; CI₅₀: concentração que inibe 50% da replicação viral; IS: Índice de Seletividade (CC₅₀ / CI₅₀); os resultados são representativos de dois experimentos independentes ± desvio padrão da média.

Conforme mostrado na Tabela acima (Tabela 17), a fração 2018 B – Diclorometano apresentou um índice de seletividade de 3,2 para a cepa KOS e 2,9 para a cepa 29R.

4.5.1.2 Atividade antiprotozoária

Com relação à avaliação da atividade antiprotozoária, somente o extrato bruto etanólico de 2016 foi testado, utilizando amastigotas de *T. cruzi*, *L. amazonensis* e *L. infantum*. Os resultados encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18. Triagem antiprotozoária utilizando amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, *L. amazonensis* e *L. infantum* expressando β -galactosidase.

Amostra	Porcentagem de inibição (%)
<i>T. cruzi</i>	
EB etanólico 2016	Inativo
Benznidazol 20 μ M	90,9 \pm 0,6
<i>L. amazonensis</i>	
EB etanólico 2016	9,4 \pm 2,4
Anfotericina 2 μ M	96,6 \pm 1,8
<i>L. infantum</i>	
EB etanólico 2016	24,6 \pm 2,9
Anfotericina 8 μ M	78,9 \pm 7,3

EB: extrato bruto.

O extrato bruto etanólico da coleta de abril de 2016 foi testado em uma concentração de 50 μ g/mL, definida conforme protocolos internos do grupo parceiro. De acordo com os dados mostrados na Tabela 18, o extrato bruto etanólico da coleta de abril de 2016 mostrou-se inativo para *T. cruzi*. Ao ser testado sobre amastigotas de *L. amazonensis* e de *L. infantum*, o extrato apresentou uma porcentagem de inibição de 9,4% e de 24,6%, respectivamente, resultados abaixo do valor de corte de 50,0% de inibição.

4.5.2 Atividade biológica das substâncias isoladas

4.5.2.1 Atividades citotóxica e anti-herpética

Das cinco substâncias isoladas do coral *T. coccinea*, dois peróxidos de esteroides (CS.PE.01 e CS.PE.02) tiveram sua atividade citotóxica e anti-herpética avaliada. A

substância CS.PE.02 acetilada também foi testada, assim como uma fração contendo uma mistura dos dois derivados indólicos (CS.DI.01 e CS.DI.02).

a) Atividade citotóxica

Os resultados obtidos na avaliação da atividade citotóxica encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19. Efeitos antiproliferativos em linhagens celulares tumorais (A549, HCT-8 e H460) e não-tumoral (Vero) após 48 h de experimento pelo método da Sulforrodamina B.

Amostras	CI ₅₀ (µg/mL)			
	A549	HCT-8	H460	Vero
CS.PE.01	47,8 (38,1-60,0)	19,3 (16,5-22,4)	48,4 (26,1-89,7)	37,5 (30,6-45,9)
CS.PE.02	45,1 (31,2-65,1)	17,3 (12,2-24,4)	82,6 (39,6-172,4)	61,2 (26,2-143,0)
CS.PE.02 acetilado	93,7 (75,4-116,4)	102,1 (85,2-122,3)	>250	244,1 (147,4-304,1)
Fração contendo CS.DI.01 + CS.DI.02	81,3 (62,3-106,2)	48,9 (42,9-55,7)	189,5 (98,8-222,1)	106,5 (88,2-155,7)

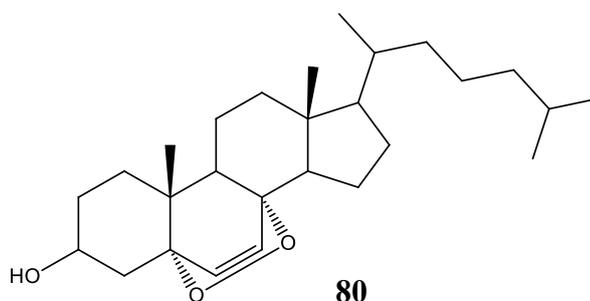
A549 e H460: células não-pequenas de tumor de pulmão humano; HCT-8: células de adenocarcinoma ileocecal humano; Vero: fibroblastos de rim de macaco verde da África; CI₅₀: concentração que inibe 50% da proliferação celular. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes (Intervalo de Confiança 95%).

Conforme dados apresentados na Tabela 19, os peróxidos de esteroides CS.PE.01 e CS.PE.02 foram mais promissores à linhagem células tumorais HCT-8, com uma CI₅₀ de 19,3 µg/mL e 17,3 µg/mL, respectivamente, além de uma baixa citotoxicidade sobre a linhagem não tumoral Vero (CI₅₀ de 37,5 µg/mL para CS.PE.01 e 61,2 µg/mL para CS.PE.02). A substância CS.PE.02 acetilada, no entanto, apresentou resultados mais elevados de CI₅₀ quando comparada aos dois peróxidos de esteroides (CS.PE.01 e CS.PE.02).

Os derivados indólicos CS.DI.01 e CS.DI.02 isolados não tiveram sua citotoxicidade determinada individualmente, embora uma fração contendo uma mistura das duas substâncias tenha sido analisada, conforme resultados apresentados na Tabela 19, os quais indicam uma moderada citotoxicidade sobre as linhagens testadas (CI₅₀ para linhagens tumorais de 81,3 µg/mL sobre A549, 48,9 µg/mL sobre HCT-8 e 189,5 µg/mL sobre H460 e CI₅₀ de 106,5 µg/mL sobre a linhagem não tumoral Vero).

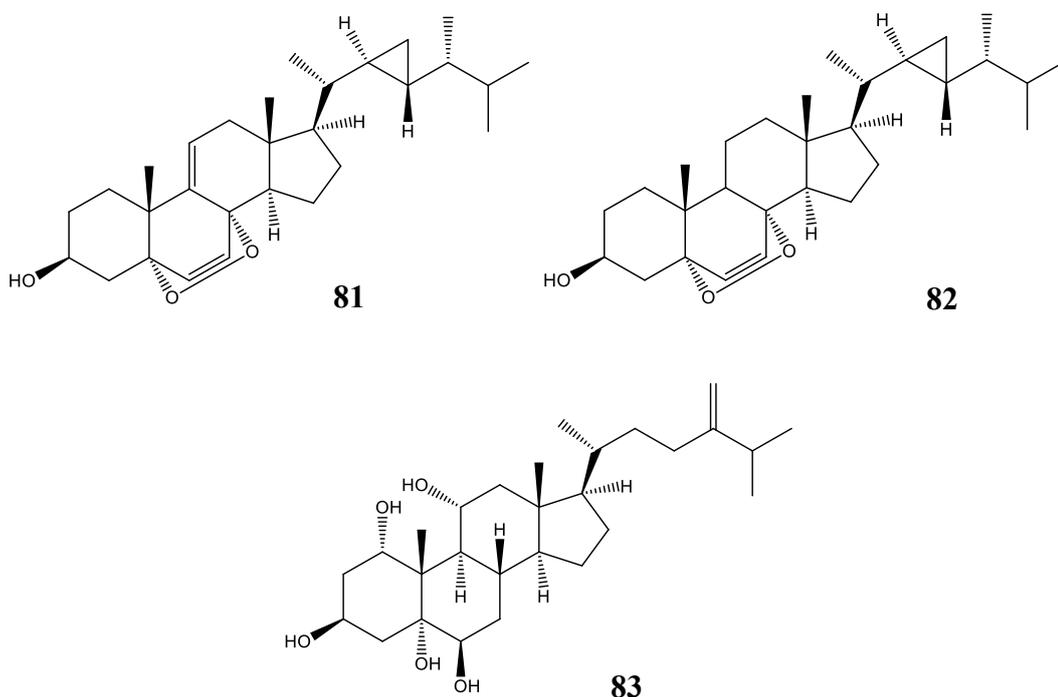
Comparando com dados da literatura, Abourriche e colaboradores (2000) isolaram pela primeira vez um peróxido de esteroide (Figura 89) do tunicado *Cynthia savignyi*, coletado em Marrocos. O peróxido de esteroide também apresentou atividade antifúngica sobre fungos patogênicos de tomates: *Botrytis cinérea* (halo de inibição de 9 mm), *Fusarium oxysporum* (halo de inibição de 15 mm) e *Verticillium albo atrum* (halo de inibição de 7 mm), além de atividade antibacteriana sobre *Agrobacterium tumefaciens* (halo de inibição de 18 mm), *Escherichia coli* (halo de inibição de 5 mm), *Staphylococcus faecalis* (halo de inibição de 6 mm), *Staphylococcus aureus* (halo de inibição de 12 mm) e *Pseudomonas aeruginosa* (halo de inibição de 13 mm).

Figura 88. Peróxido de esteroide isolado do tunicado *Cynthia savignyi*.



Fonte: ABOURRICHE et al., 2000.

Yen e colaboradores (2013), ao investigarem o coral *Sinularia gaweli* coletado em Taiwan, isolaram dois peróxidos de esteroides e um esteroide. A citotoxicidade das três substâncias foi avaliada sobre linhagens tumorais humanas (K562: leucemia eritromieloblastoide; MOLT-4: leucemia linfoblástica aguda; HL-60: leucemia promielocítica), usando o ensaio colorimétrico do MTT (sal tetrazólico) modificado. Dentre os resultados obtidos, o esteroide (estrutura 83 da Figura 90) foi o mais promissor, apresentando uma CI_{50} de 3,39 $\mu\text{g/mL}$ sobre a linhagem de células tumorais HL-60. Os peróxidos de esteroides (estruturas 81 e 82 da Figura 90) não foram ativos quando testados na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, durante 72 horas de experimento.

Figura 89. Esteroides isolados do coral *Simularia gaweli*.

Fonte: YEN et al., 2013.

b) Atividade anti-herpética

Na Tabela 20 encontram-se os resultados obtidos na avaliação da atividade anti-herpética.

Tabela 20. Atividade anti-herpética sobre o vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R) após 48 h de experimento por meio do ensaio de redução do número de placas de lises virais.

Amostras	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)*	Porcentagem de inibição (%)	
		Cepa KOS	Cepa 29R
CS.PE.01	25	0,0	0,0
CS.PE.02	50	15,2 \pm 5,9	10,6 \pm 2,9
CS.PE.02 acetilado	100	65,2 \pm 12,5	60,3 \pm 14,1
Fração contendo CS.DI.01 + CS.DI.02	50	54,3 \pm 12,3	42,6 \pm 17,9

Os dados estão expressos como porcentagens de inibição da replicação viral em relação ao controle viral e são representativos de dois experimentais independentes \pm desvio padrão da média. * Maior concentração testada, que não foi citotóxica para as células Vero.

Com relação à atividade anti-herpética, a fração contendo a mistura dos derivados indólicos CS.DI.01 e CS.DI.02 apresentou uma porcentagem de inibição de 54,3% sobre a cepa KOS e de 42,6% sobre a cepa 29R, conforme resultados apresentados na Tabela 20.

Ao contrário da atividade citotóxica, a substância CS.PE.02 acetilada foi a mais promissora dos peróxidos de esteroides para atividade anti-herpética (Tabela 20), apresentando uma porcentagem de inibição de 65,2% sobre a cepa KOS e de 60,3% sobre a cepa 29R, resultados bastante superiores se comparados aos peróxidos de esteroides CS.PE.01 e CS.PE.02. Por esse motivo foi determinado o índice de seletividade da substância CS.PE.02 acetilada, mediante um novo ensaio. Os resultados encontram-se na Tabela 21.

Tabela 21. Atividade anti-herpética da substância CS.PE.02 acetilada sobre o vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R), em 48h de experimento, mediante ensaio de redução do número de placas de lises virais.

Amostra	CC ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL) ± DP		IS	
	Células Vero	HSV-1 Cepa KOS	HSV-1 Cepa 29R	KOS	29R
CS.PE.02 acetilado	244,1	68,5±8,3	57,4±4,9	3,6	4,2

Vero: Fibroblastos de rim de macaco verde da África; CC₅₀: concentração que inibe 50% da proliferação celular; CI₅₀: concentração que inibe 50% da replicação viral; IS: Índice de Seletividade (CC₅₀ / CI₅₀); os resultados são representativos de dois experimentos independentes ± desvio padrão da média.

A substância CS.PE.02 acetilada, conforme mostrado na Tabela acima (Tabela 21), apresentou um índice de seletividade de 3,6 para a cepa KOS e 4,2 para a cepa 29R.

4.5.2.2 Atividades antiprotozoária

Das substâncias isoladas, somente o peróxido de esteroide CS.PE.01 teve sua atividade antiprotozoária avaliada. Os resultados encontram-se mostrados na Tabela 22.

Tabela 22. Triagem antiprotozoária utilizando amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, *L. amazonensis* e *L. infantum* expressando β -galactosidase.

Amostra	Porcentagem de inibição (%)	CI ₅₀ (μ g/mL)	CC ₅₀ (μ g/mL)	IS
<i>T. cruzi</i>				
CS.PE.01	96,5 \pm 0,1	15,0 \pm 0,9	56,3 \pm 9,2	3,7
Benznidazol 20 μ M	90,9 \pm 0,6	-	-	-
<i>L. amazonensis</i>				
CS.PE.01	39,2 \pm 3,6	-	-	-
Anfotericina 2 μ M	96,6 \pm 1,8	-	-	-
<i>L. infantum</i>				
CS.PE.01	52,1 \pm 7,5	32,1 \pm 5,7	-	-
Anfotericina 8 μ M	78,9 \pm 7,3	27,8 \pm 0,9	1,7 \pm 0,03	6,4

Ao contrário do extrato bruto etanólico da coleta de abril de 2016, a substância CS.PE.01 demonstrou uma promissora atividade antiprotozoária, com uma porcentagem de inibição de 96,5% para *T. cruzi* e 52,1% para *L. infantum*. Somente para o protozoário *T. cruzi* é que a porcentagem de inibição da substância testada (96,5%) foi superior à porcentagem de inibição do controle (90,9% – benznidazol), tendo, assim, seu índice de seletividade determinado (IS = 3,7).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foram investigados extratos brutos obtidos a partir de seis coletas do coral *T. coccinea*, realizadas na Ilha do Arvoredo, em Santa Catarina, em épocas variadas: abril de 2016, maio de 2017, maio de 2018 A, maio de 2018 B, abril de 2019 e junho de 2019.

Ao todo, foram isoladas cinco substâncias dessa espécie, pertencentes a duas classes químicas distintas: peróxidos de esteroides (CS.PE.01, CS.PE.02 e CS.PE.03) e derivados indólicos (CS.DI.01 e CS.DI.02). Dessas, apenas a substância CS.PE.03 não teve sua estrutura química identificada, por ter sido pouco isolada e, também, em razão da maior complexidade de sinais observados nos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C .

Embora haja registros na literatura para as cinco substâncias isoladas, somente os derivados indólicos já foram descritos para a espécie *T. coccinea*, conforme trabalho realizado por Okuda e colaboradores (1982), com o isolamento dos metabólitos indol-3-carbaldeído e 6-bromoindol-3-carbaldeído. Esses derivados indólicos também já foram isolados da esponja *Pseudosuberites hyalinus*, por Rasmussem e colaboradores (1993), e da esponja *Halichondria* sp., por Li e colaboradores (1994) – publicações essas que foram úteis para a comparação dos dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C .

Ao contrário dos derivados indólicos, este é o primeiro registro para os peróxidos de esteroides no coral *T. coccinea*. Anteriormente, essa classe química já havia sido isolada dos organismos marinhos *Ascidia nigra*, *Dendrogyra cylindrus*, *Thalysias juniperina* e *Aplysia dactylomela*, segundo relatos de Gunatilaka e colaboradores (1981), dos tunicados *Phalhisia mamillata* e *Ciona intestinalis*, conforme publicação de Guyot e Durgeat (1981) e da esponja *Monanchora* sp., por Mun e colaboradores (2014). Ioannou e colaboradores (2009), por sua vez, isolaram peróxidos de esteroides da gorgônia *Eunicella cavolini* e da ascídia *Trididemnum inarmatum*, trabalho esse que permitiu a comparação entre os dados dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C .

A espécie *T. coccinea* é nativa do Oceano Pacífico, embora já tenha sido encontrada em diversas outras localidades, como Golfo do México, Caribe, Curaçao, Equador e Brasil. Esse processo de invasão possivelmente está relacionado à abertura do canal do Panamá e consequente intensificação da navegação (CREED et al., 2016). Sabe-se que sua vinda ao

Brasil ocorreu no final do século XX, provavelmente através de sua incrustação em navios e plataformas de petróleo, conforme relatos de Paula e Creed (2005), Lages e colaboradores (2010), Silva e colaboradores (2011 e 2014) e Mantelatto e colaboradores (2011).

Quando se encontra fora do seu ambiente de origem (oceano Pacífico), o coral-sol é considerado uma espécie invasora, capaz de alterar o ecossistema local e de causar prejuízos à pesca e ao turismo (OIGMAN-PSZCZOL et al., 2017). Na presença de espécies invasoras, uma forma de manter o equilíbrio ecológico do ambiente marinho é fazendo-se uso de planos de manejo, como os realizados pelo ICMBio na Rebio Marinha do Arvoredo. Embora haja um planejamento para a realização de planos de manejo periódicos, o coral *T. coccinea* é uma espécie de rápida reprodução, já que produz larvas de forma sexuada e assexuada (PRECHT et al., 2014). Na Ilha do Arvoredo é observada uma grande dominância desse coral comparativamente às espécies nativas.

Apesar da baixa variedade química, os dois peróxidos de esteroides isolados e identificados (CS.PE.01 e CS.PE.02), ao terem sua atividade citotóxica testada, mostraram-se bastante interessantes. Sobre a linhagem de células tumorais HCT-8, as substâncias CS.PE.01 e CS.PE.02 foram as mais promissoras, com uma CI_{50} de 19,3 $\mu\text{g/mL}$ e 17,3 $\mu\text{g/mL}$, além de uma baixa citotoxicidade sobre a linhagem não tumoral Vero (CI_{50} de 37,5 $\mu\text{g/mL}$ para CS.PE.01 e 61,2 $\mu\text{g/mL}$ para CS.PE.02). Ainda que essas substâncias tenham sido testadas sobre células tumorais humanas, os resultados de citotoxicidade podem sugerir que os peróxidos de esteroides sejam os responsáveis pela capacidade invasora de *T. coccinea*. É possível que, no ambiente marinho, essa espécie libere tais substâncias como forma de defesa e de agressão contra espécies nativas. Para confirmar essa suposição, no entanto, seriam necessários experimentos ecológicos de simulação ou *in situ*.

No que tange à avaliação da atividade antiprotozoária, o peróxido de esteroide CS.PE.01 demonstrou-se promissor, com uma porcentagem de inibição de 96,5% para *T. cruzi* e 52,1% para *L. infantum*. Para o protozoário *T. cruzi*, a porcentagem de inibição da substância testada (96,5%) foi superior à porcentagem de inibição do benznidazol (90,9% – controle), fármaco utilizado no tratamento da doença de Chagas.

Bianco e colaboradores (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos e frações do coral-sol coletado na Ilha do Arvoredo pelo método de difusão em disco e bioautografia. Ao todo foram testadas 21 cepas/isolados, sendo 14 cepas ATCC (dentre as

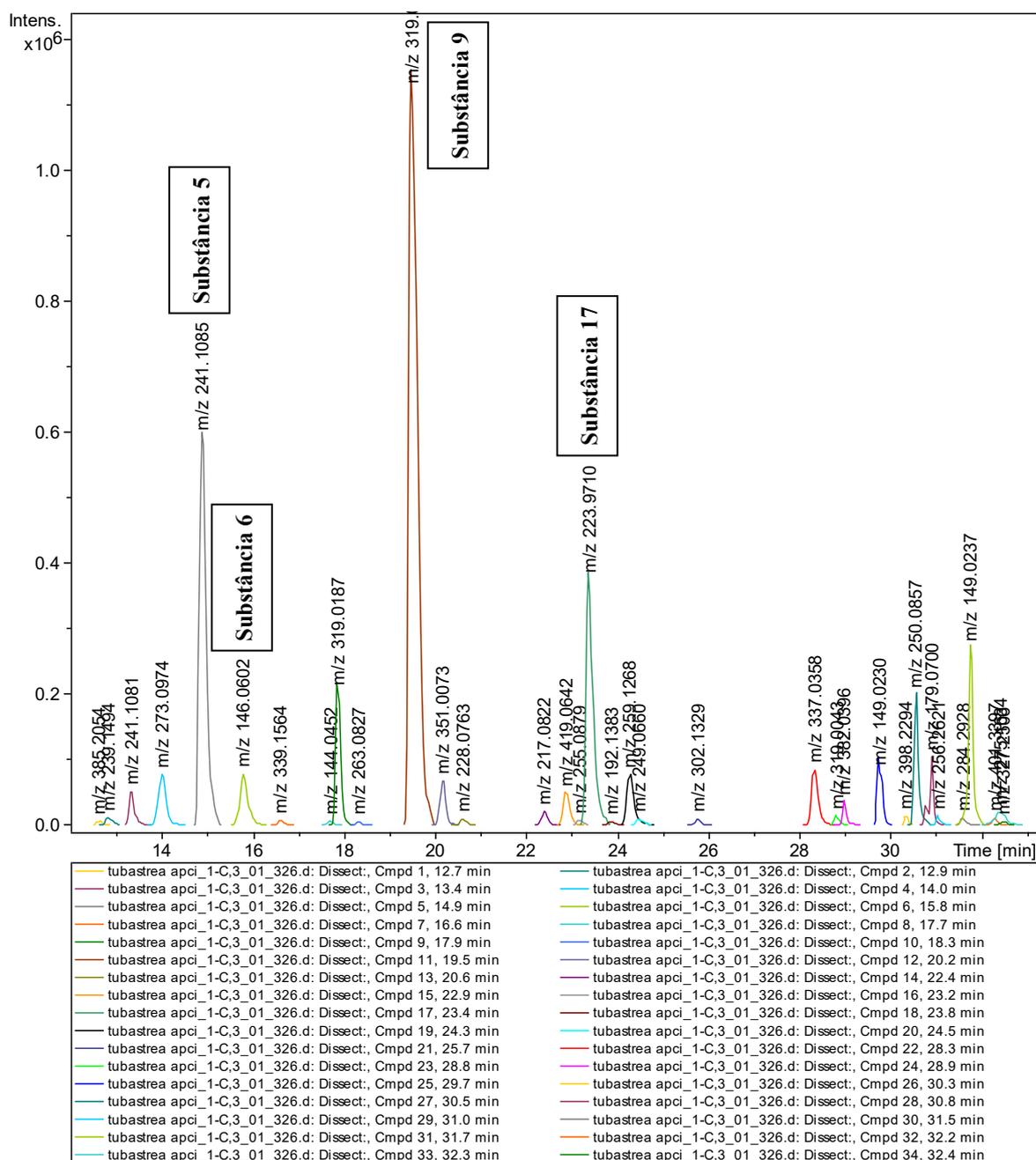
quais: *Candida tropicalis*, *Clostridium sporogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri*) e sete isolados de pacientes de um hospital de Santa Catarina (*Acinetobacter baumannii*, *E. faecium*, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae* Carbapenemase, *S. aureus*, *S. aureus* resistente à meticilina e *E. faecalis* resistente à vancomicina). As frações n-butanol e aquosa demonstraram atividade sobre as cepas ATCC de *S. aureus* (MIC 31,25 e 250 µg/mL), *S. typhimurium* (MIC 125 e 500 µg/mL), *E. coli* (MIC 62,5 e 500 µg/mL) e *P. aeruginosa* (MIC 62,5 e 500 µg/mL). A fração n-butanol também mostrou atividade sobre as cepas clínicas de *S. aureus* (MIC 62,5 µg/mL), *K. pneumoniae* Carbapenemase (MIC 125 µg/mL), *S. aureus* resistente à meticilina (MIC 125 µg/mL) e *E. faecalis* resistente à vancomicina (MIC 62,5 µg/mL).

Essa pesquisa teve início em 2012 e foi desenvolvida na UFSC, pelos alunos de pós-doutorado Everson Miguel Bianco e Simone Quintana de Oliveira e pela doutoranda Maria Izabel Goularte Moritz, vinculados ao PGFar/UFSC, com o estudo do coral *T. coccinea* coletado na Ilha do Arvoredo. À época, fazendo-se uso do material marinho coletado, foi realizado o processo de extração de seus compostos, utilizando-se etanol como solvente extrator. Com a fração n-butanol, obtida a partir de uma partição líquido-líquido, foram realizadas análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas (HPLC/MS) na Universidade de Buenos Aires, na Argentina⁷. Essa fração foi escolhida para as análises em função dos resultados de atividade antimicrobiana mencionados anteriormente no trabalho de Bianco e colaboradores (2016).

Em tais análises, os cromatogramas foram obtidos por intermédio do detector ultravioleta, utilizando-se o comprimento de onda de 280 nm, apropriado para detecção de derivados indólicos, enquanto os espectros de massas das substâncias detectadas foram obtidos por Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI). Nos cromatogramas e espectros de massas representados nas Figuras a seguir (Figuras 90, 94, 96 e 98), destaca-se a presença de substâncias pertencentes à classe química dos derivados indólicos.

⁷ Agradecemos à professora Dra. Gabriela Cabrera e ao professor Dr. Jorge Alejandro Palermo a realização das análises.

Figura 90. Cromatograma da fração n-butanol do coral *T. coccinea*, com destaque para as substâncias 5, 6, 9 e 17.



No cromatograma da Figura 90 acima é possível observar que a substância de número 9 é a majoritária da fração n-butanol do coral *T. coccinea*. A seguir será dada ênfase para as substâncias 5, 6, 9 e 17 destacadas na Figura 90.

– **Substância número 5:** O espectro de massas (Figura 91) aponta um pico base m/z 241,1085 que, através de comparação com a biblioteca disponível no equipamento, apresenta a fórmula molecular $C_{13}H_{13}N_4O$, possivelmente uma aplisinopsina, conforme representado na Figura 92.

Figura 91. Espectro de massas da substância 5 (pico m/z 241,1085).

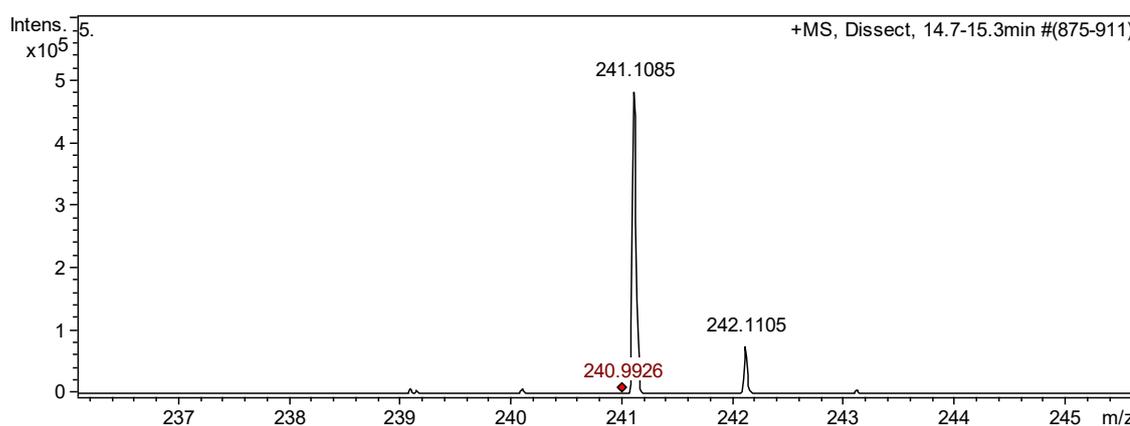
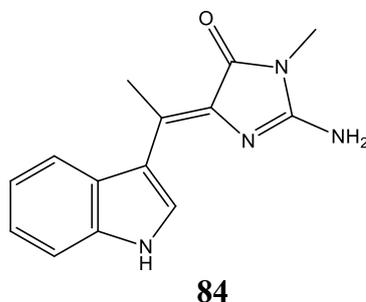


Figura 92. Possível estrutura química para a substância 5 (2'-dimetilaplisinopsina).



– **Substância número 6:** O espectro de massas (Figura 93) aponta um pico base m/z 146,0602, apresentando a fórmula molecular C_9H_8NO , indicando a presença do derivado indólico indol-3-carbaldeído (Figura 94). Essa substância equivale a isolada no presente trabalho e denominada CS.DI.02.

Figura 93. Espectro de massas da substância 6 (pico m/z 146,0602).

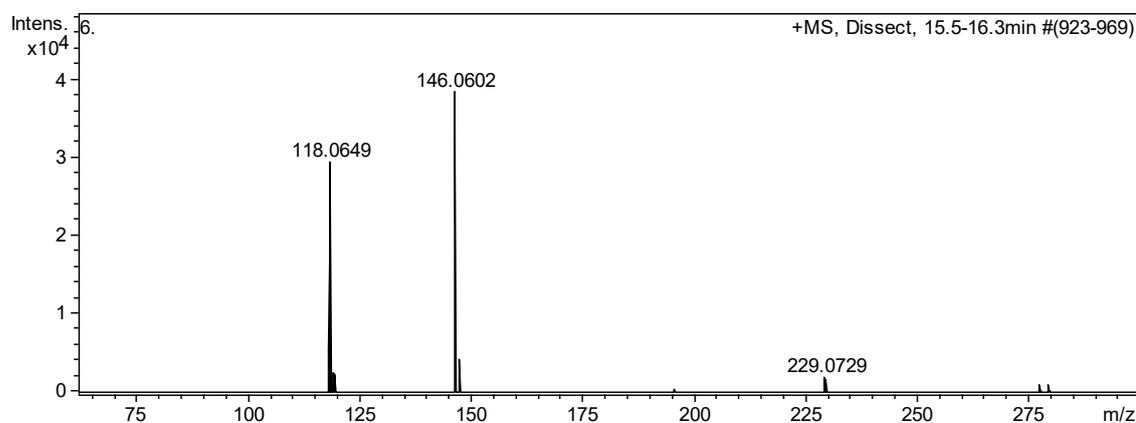
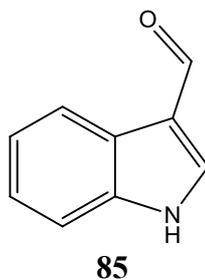


Figura 94. Estrutura química para a substância 6 (indol-3-carbaldeído).



– **Substância número 9:** Substância majoritária da fração n-butanol do coral *T. coccinea* coletado em 2012, na Ilha do Arvoredo. O espectro de massas (Figura 95) aponta um pico base m/z 319,0187, apresentando a fórmula molecular C₁₃H₁₂BrN₄O, possivelmente uma aplisinopsina (Figura 96).

Figura 95. Espectro de massas da substância 9 (pico m/z 319,0187).

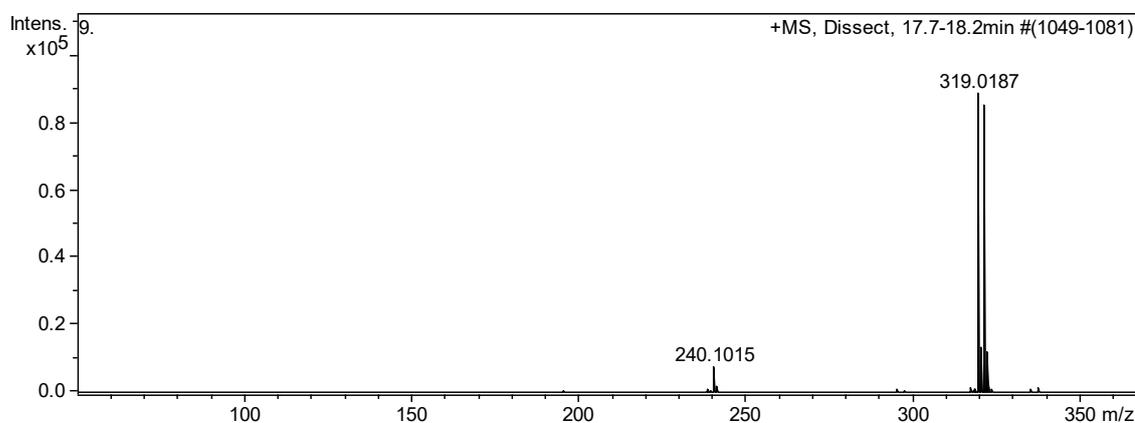
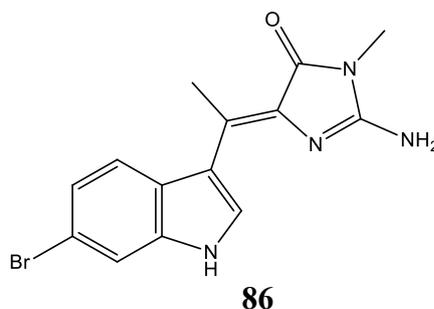


Figura 96. Possível estrutura química para a substância 9 (6-bromo-2'-dimetilaplisinopsina).



– **Substância número 17:** É a segunda substância presente em maior quantidade na fração n-butanol do coral *T. coccinea* coletado em 2012. O espectro de massas (Figura 97) aponta um pico base m/z 223,9710, apresentando a fórmula molecular C₉H₇BrNO, indicando a presença do derivado indólico 6-bromoindol-3-carbaldeído (Figura 98). Essa substância equivale à isolada no presente trabalho e denominada CS.DI.01.

Figura 97. Espectro de massas da substância 17 (pico m/z 223,9710).

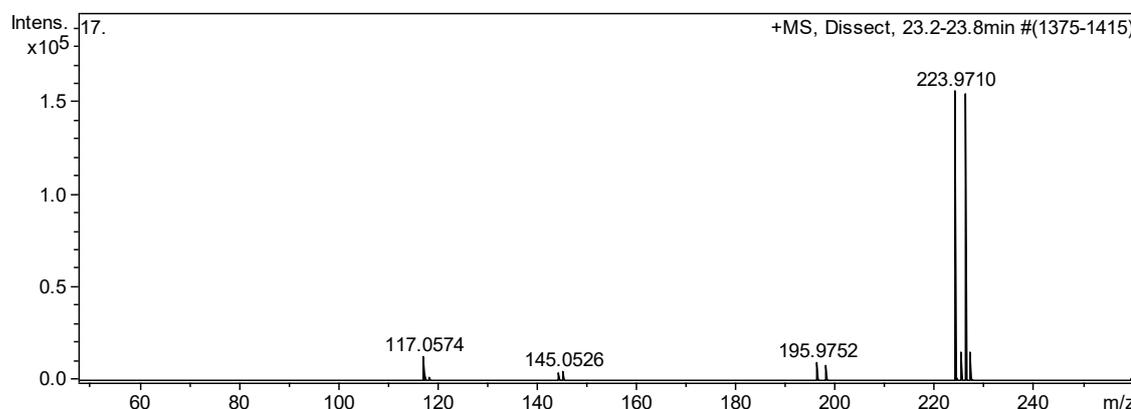
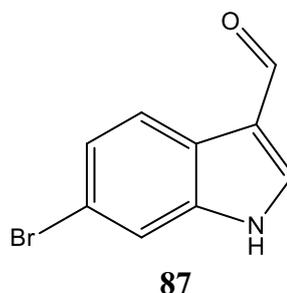


Figura 98. Estrutura química para a substância 17 (6-bromoindol-3-carbaldeído).



Conforme o cromatograma e os espectros de massas obtidos por HPLC/MS apresentados anteriormente, a fração n-butanol do coral *T. coccinea* coletado na Ilha do Arvoredo, em 2012, já apontava para a presença das substâncias indol-3-carbaldeído e 6-bromoindol-3-carbaldeído. Esses mesmos metabólitos puderam ser isolados no presente trabalho; todavia, outros derivados de alcaloides da classe das aplisinopsinas não foram detectados nos extratos analisados. Em todos os seis extratos investigados, as substâncias com forte extinção de fluorescência (254 nm) em CCD tratavam-se dos derivados indólicos indol-3-carbaldeído e 6-bromoindol-3-carbaldeído.

No que concerne à investigação biológica do coral *T. coccinea*, somente o estudo de Bianco e colaboradores (2016) foi encontrado. Daí que os resultados de atividade biológica, apresentados nesse trabalho, se tornem ainda mais relevantes, pois esse é um campo de estudo pouco explorado dessa espécie.

6 CONCLUSÕES

- O fracionamento cromatográfico dos extratos brutos obtidos a partir das seis coletas (abril de 2016, maio de 2017, maio de 2018 A, maio de 2018 B, abril de 2019 e junho de 2019) levou ao isolamento de cinco substâncias, pertencentes a duas classes químicas distintas: peróxidos de esteroides (CS.PE.01, CS.PE.02 e CS.PE.03) e derivados indólicos (CS.DI.01 e CS.DI.02);

- Peróxidos de esteroides:

- CS.PE.01 → Foi identificado como (24E)-5 α ,8 α -epidioxi-24-etil-colesta-6,24(28)-dien-3 β -ol, com base nos espectros de RMN (^1H , ^{13}C e mapa de correlação HSQC) e comparação com dados da literatura de Ioannou e colaboradores (2009).
- CS.PE.02 → Foi identificado como (22E,24S)-5 α ,8 α -epidioxi-24-metil-colesta-6,22-dien-3 β -ol, com base nos espectros de RMN (^1H , ^{13}C e mapa de correlação HSQC) e conforme comparação com dados da literatura de Ioannou e colaboradores (2009).
- CS.PE.03 → Peróxido de esteroide não identificado em razão de sua baixa quantidade e de sua maior complexidade.

- Derivados indólicos:

- CS.DI.01 → Foi identificado como 6-bromoindol-3-carbaldeído, com base nos espectros de UV-Vis e de RMN (^1H , ^{13}C e mapa de correlação HSQC) e comparação com a literatura de Rasmussen e colaboradores (1993).
- CS.DI.02 → Foi identificado como indol-3-carbaldeído, com base nos espectros de UV-Vis e de RMN (^1H , ^{13}C e mapa de correlação HSQC) e comparação com a literatura de Li e colaboradores (1994).

- A partir do extrato bruto acetônico da coleta de junho de 2019, foi obtida uma fração rica em ésteres de ácidos graxos (CS.AG), conforme dados de CG/MS. Esses compostos, conforme análises por CCD, também foram observados nas demais coletas, mostrando-se majoritários em comparação com substâncias isoladas.

- Com relação à avaliação da citotoxicidade, as substâncias CS.PE.01 e CS.PE.02 apresentaram uma CI_{50} de 19,3 $\mu\text{g/mL}$ e de 17,3 $\mu\text{g/mL}$ sobre a linhagem de células tumorais HCT-8, respectivamente, além de uma baixa citotoxicidade sobre a linhagem não tumoral Vero (CI_{50} de 37,5 $\mu\text{g/mL}$ e 61,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).
- Na avaliação da atividade antiprotozoária, por meio de testes sobre amastigotas de *T. cruzi*, de *L. amazonensis* e de *L. infantum*, o peróxido de esteroide CS.PE.01 apresentou uma porcentagem de inibição de 96,5% para *T. cruzi* (superior à porcentagem de inibição do fármaco de referência benznidazol) e 52,1% para *L. infantum*.

REFERÊNCIAS

- ABOURRICHE, A.; CHARROUF, M.; CHAIB, N.; BENNAMARA, A.; BONTEMPS, N.; FRANCISCO, C. Isolation and bioactivities of epidioxysterol from the tunicate *Cynthia savignyi*. **Il Farmaco**, [s.l.], v. 55, p. 492-4, 2000.
- ALAM, M.; SANDUJA, R.; WELLINGTON, G. M. Tubastraine: isolation and structure of a novel alkaloid from the stony coral *Tubastraea micrantha*. **Heterocycles**, [s.l.], v. 27, n. 3, p. 719-23, 1988.
- ALMEIDA, M. T. R.; MORITZ, M. I. G.; CAPEL, K. C. C.; PÉREZ, C. D.; SCHENKEL, E. P. Chemical and biological aspects of octocorals from the Brazilian coast. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 24, n. 4, p. 446-67, 2014.
- ALMEIDA, M. T. R.; PALERMO, J. A. Produtos naturais de origem marinha e o desenvolvimento de fármacos e medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.) **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre, Artmed, 2017. p. 107-28.
- BARREIRO, E. J. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 679-88, 2009.
- BBC NEWS. UCHÔA, V. **Danos do óleo no litoral do nordeste vão durar décadas, dizem oceanógrafos**, 2019. Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/brasil-50131560>>. Acesso em: 14/11/2019.
- BERNARDES, L. S. C.; LANG, K. L.; PETROVICK, P. R.; SCHENKEL, E. P. Produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.) **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre, Artmed, 2017. p. 437-64.
- BIANCO, E. M.; OLIVEIRA, S. Q.; GUIMARÃES, T. R.; PESSOA, L. G. S.; SANTOS, M. E. A.; DAL-PIZZOL, F.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. *Tubastraea coccinea*: A non-indigenous coral (Cnidaria, Scleractinia) collected at Arvoredo Island, south of Brazil with potential MRSA and VRE antimicrobial activity. **Open Journal of Marine Science**, [s.l.], v. 06, n. 02, p. 334-40, 2016.
- BIRKELAND, C. Introduction. In: BIRKELAND, C. (Org.). **Life and death of coral reefs**. New York: Chapman & Hall. 1997. p. 1-10.
- BOFF, L.; MUNKERT, J.; OTTONI, F. M.; SCHNEIDER, N. F. Z.; RAMOS, G. S.; KREIS, W.; ANDRADE, S. F.; FILHO, J. D. S.; BRAGA, F. C.; ALVES, R. J.; PÁDUA, R. M.; SIMÕES, C. M. O. Potential anti-herpes and cytotoxic action of novel semisynthetic digitoxigenin-derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 167, n. 1, p. 546-61, 2019.

BROWN, B. E. Coral bleaching: causes and consequences. **Coral Reefs**, [s.l.], v. 16, p. 129-38, 1997.

BURKE, L.; REYTAR, K.; SPALDING, M.; PERRY, A. **Reefs at risk revisited**. World Resources Institute, 2011. 130 p.

CAIRNS, S. D. **A revision of the ahermatypic scleractinia of the Galapagos and Cocos Islands**. Washington, D. C.: Smithsonian Institution Press, 1991. 56 p.

CAPEL, K. C. C.; MIGOTTO, A. E.; KITAHARA, M. V.; ZILBERBERG, C. Another tool towards invasion? Polyp “bail-out” in *Tubastraea coccinea*. **Coral Reefs**, [s.l.], v. 33, n. 4, p. 1165, 2014.

CAO, H.; HALL, J.; HILLE, R. Substrate orientation and specificity in xanthine oxidase: Crystal structures of the enzyme in complex with indole-3-acetaldehyde and guanine. **Biochemistry**, [s.l.], v. 53, p. 533-41, 2014.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2006. 544 p.

CHENG, S-Y; WEN, Z-H; CHIOU, S-F; HSU, C-H; WANG, S-K; DAI, C-F; CHIANG, M. Y.; DUH, C-Y. Duramolides A-E, anti-inflammatory and antibacterial cembranolides from the soft coral *Lobophytum durum*. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 68, p. 9698-704, 2008.

CHRISTIE, W. W. **The lipid web**, 2018. Mass spectra of some miscellaneous lipids – archive. Disponível em: <<https://lipidhome.co.uk/ms/others/others-arch/index1.htm#sterol>>. Acesso em: 18/12/2019.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C; EPIFANIO, R. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 3, n. 32, p. 703-16, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, [s.l.], v. 77, n. 1, p. 7-24, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s.l.], v. 1830, n. 6, p. 3670-95, 2013.

CREED, J. C.; FENNER, D.; SAMMARCO, P.; CAIRNS, S.; CAPEL, K.; JUNQUEIRA, A. O. R.; CRUZ, I.; MIRANDA, R. J.; CARLOS-JÚNIOR, L.; MANTELATTO, M. C. OIGMAN-PSZCZOL, S. The invasion of the azooxanthellate coral *Tubastraea* (Scleractinia: Dendrophylliidae) throughout the world: history, pathways and vectors. **Biological Invasions**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 283-305, 2016.

DEWICK, P. M. Secondary metabolism: the building blocks and construction mechanisms. *In: Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Reino Unido: Wiley, 2002, 3^a ed., p. 7-38.

DOMINGUEZ, J. M. L. The Coastal Zone of Brazil. *In: DILLENBURG, S. R.; HESP, P. A. (Org.). Geology and Geomorphology of Holocene Coastal Barriers of Brazil*. Berlin: Springer, 2009. p. 17-51.

DREW, S. W.; DEMAIN, A. L. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annual Review of Microbiology*, [s.l.], v. 31, p. 343-56, 1977.

ELENKOV, I.; MILKOVA, T.; ANDREEV, S.; POPOV, S. Sterol composition and biosynthesis in the Black Sea sponge *Dysidea fragilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, [s.l.], v. 107B, n. 4, p. 547-51, 1994.

FUSETANI, N.; YASUMURO, K.; MATSUNAGA, S.; HASHIMOTO, K. Mycalolides A-C, hybrid macrolides of ulapualides and halichondramide, from a sponge of the genus *Mycale*. *Tetrahedron Letters*, [s.l.], v. 30, n. 21, p. 2809-12, 1989.

GAUVIN, A.; SMADJA, J.; AKNIN, M.; FAURE, R.; GAYDOU, E-M. Isolation of bioactive 5 α ,8 α -epidioxy sterols from the marine sponge *Luffariella cf. variabilis*. *Canadian Journal of Chemistry*, [s.l.], v. 78, p. 986-92, 2000.

GBRMPA – GREAT BARRIER REEF MARINE PARK AUTHORITY 2019. **Great Barrier Reef Outlook Report 2019**. Townsville, 2019. 374 p.

GUELLA, G.; MANCHI, I.; ZIBROWIUSB, H.; PIETRA, F. Novel aplysinopsin-type alkaloids from Scleractinian corals the family Dendrophylliidae of the Mediterranean and the Philippines. Configurational-assignment criteria, stereospecific synthesis, and photoisomerization. *Helvetica Chimica Acta*, [s.l.], v. 71, p. 773-82, 1988.

GUNATILAKA, A. A. L.; GOPICHAND, Y.; SCHMITZ, F. J.; DJERASSI, C. Minor and trace sterols in marine invertebrates. 26. Isolation and structure elucidation of nine new 5 α ,8 α -epidioxy sterols from four marine organisms. *Journal of Organic Chemistry*, [s.l.], v. 46, p. 3860-6, 1981.

GUYOT, M.; DURGEAT, M. Occurrence of 9(11)-unsaturated sterol peroxides in tunicates. *Tetrahedron Letters*, [s.l.], v. 22, n. 15m p. 1391-2, 1981.

HEGAZY, M-E F.; MOHAMED, T. A.; ELSHAMY, A. I.; AL-HAMMADY, M. A.; OHTA, S.; PARÉ, P. W. Casbane diterpenes from red sea coral *Sinularia polydactyla*. *Molecules*, [s.l.], v. 21, n. 308, p. 1-8, 2016.

IOANNOU, E.; ABDEL-RAZIK, A. F.; ZERVOU, M.; CHRISTOFIDIS, D.; ALEXI, X.; VAGIAS, C.; ALEXIS, M. N.; ROUSSIS, V. $5\alpha,8\alpha$ -Epidioxysterols from the gorgonian *Eunicella cavolini* and the ascidian *Trididemnum inarmatum*: Isolation and evaluation of their antiproliferative activity. **Steroids**, [s.l.], v. 74, n. 1, p. 73-80, 2009.

IWAGAWA, T.; MIYAZAKI, M.; YOKOGAWA, Y.; OKAMURA, H.; NAKATANI, M.; DOE, M.; MORIMOTO, Y.; TAKEMURA, K. Aplysinopsin dimers from a stony coral *Tubastraea aurea*. **Heterocycles**, [s.l.], v. 75, n. 8, p. 2023-8, 2008.

ICMBio, 20-?. **A Reserva Biológica Marinha do Arvoredo**. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/rebioarvoredo/images/stories/quem_somos/folder_arvoredo.pdf>. Acesso em: 10/11/2019.

IWAGAWA, T.; MIYAZAKI, M.; OKAMURA, H.; NAKATANI, M.; DOE, M.; TAKEMURA, K. Three novel bis(indole) alkaloids from a stony coral, *Tubastraea* sp. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 44, n. 12, p. 2533-5, 2003.

KHAN, R. A. Natural products chemistry: the emerging trends and prospective goals. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s.l.], v. 26, n. 5, p. 739-53, 2018.

KLEIN-JÚNIOR, L. C.; HENRIQUES, A. T. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.) **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre, Artmed, 2017. p. 305-15.

KNOPPERS, B.; EKAU, W.; FIGUEIREDO, A. G. The coast and shelf of east and northeast Brazil and material transport. **Geo-marine Letters**, [s.l.], n. 19, p. 171-8, 1999.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; PINTO, A. C.; CREED, J. C. et al. Chemical defenses against generalist fish predators and fouling organisms in two invasive ahermatypic corals in the genus *Tubastraea*. **Marine Ecology**, [s.l.], p. 473-82, 2010.

LI, H-Y.; MATSUNAGA, S.; FUSETANI, N. Simple antifungal metabolites from a marine sponge, *Halichondria* sp. **Comparative Biochemistry and Physiology**, [s.l.], v. 107B, n. 2, p. 261-4, 1994.

LINDNER, A. **Vida marinha de Santa Catarina**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2014. 132 p.

MAIA, L. F.; FERREIRA, G. R.; COSTA, R. C. C.; LUCAS, N. C.; TEIXEIRA, R. I.; FLEURY, B. G.; EDWARDS, H. G. M.; OLIVEIRA, L. F. C. de. Raman spectroscopic study of antioxidant pigments from cup corals *Tubastraea* spp. **The Journal of Physical Chemistry A**, [s.l.], v. 118, n. 19, p. 3429-37, 2014.

MANCINI, I.; GUELLA, G.; ZIBROWIUS, H.; PIETRA, F. On the origin of quasi-racemic aplysinopsin cycloadducts, (bis)indole alkaloids isolated from scleractinian corals of the family Dendrophylliidae. Involvement of enantioselective Diels–Alderses or asymmetric induction in artifact processes involving adventitious catalysts? **Tetrahedron**, [s.l.], v. 59, p. 8757-62, 2003.

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. 122-30, 2012.

MANTELATTO, M. C.; CREED, J. C.; MOURÃO, G. G.; MIGOTTO, A. E.; LINDNER, A. Range expansion of the invasive corals *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis* in the Southwest Atlantic. **Coral Reefs**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 397, 2011.

MAPLESTONE, R. A.; STONE, M. J.; WILLIAMS, D. H. The evolutionary role of secondary metabolites – a review. **Gene**, [s.l.], v. 115, p. 151-7, 1992.

MARANGONI, L. F. B.; MARQUES, J. A.; BIANCHINI, A. Fisiologia de corais: a simbiose coral-zooxantela, o fenômeno de branqueamento e o processo de calcificação. In: **Conhecendo os Recifes Brasileiros: Rede de Pesquisas Coral Vivo**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2016, p. 55-71.

MARZZOCO, A.; TORRER, B. B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 355 p.

MAYER, A. M. S.; GLASER, K. B.; CUEVAS, C.; JACOBS, R. S.; KEM, W.; LITTLE, R. D.; MCINTOSH, J. M.; NEWMAN, D. J.; POTTS, B. C.; SHUSTER, D. E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 31, p. 255-65, 2010.

MEYER, M.; DELBERGHE, F.; LIRON, F.; GUILLAUME, M.; VALENTIN, A. GUYOT, M. An antiplasmodial new (bis)indole alkaloid from the hard coral *Tubastraea* sp. **Natural Product Research**, [s.l.], v. 23, n. 2, p. 178-82, 2009.

MORITZ, M. I. G.; MAROSTICA, L. L.; BIANCO, E. M.; ALMEIDA, M. T. R.; CARRARO, J. L.; CABRERA, G. M.; PALERMO, J. A.; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. Polyoxygenated steroids from the octocoral *Leptogorgia punicea* and in vitro evaluation of their cytotoxic activity. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 12, p. 5864-80, 2014.

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

MUN, B.; WANG, W.; KIM, H.; HAHN, D.; YANG, I.; WON, D. H.; KIM, E-H; LEE, J.; HAN, C.; KIM, H.; EKINS, M.; NAM, S-J; CHOI, H.; KANG, H. Cytotoxic 5a,8a-epidioxy sterols from the marine sponge *Monanchora* sp. **Archives of Pharmacal Research**, 2013.

NOAA. **What is coral bleaching?**, 20-?. Disponível em: <https://oceanservice.noaa.gov/facts/coral_bleach.html>. Acesso em: 08/11/2019.

OIGMAN-PSZCZOL, S.; CREED, J.; FLEURY, B.; MANTELATTO, M. C.; CAPEL, K. C. C.; MEIRELES, C.; CABRAL, D.; MASI, B.; JUNQUEIRA, A. O controle da invasão do coral-sol no Brasil não é uma causa perdida. **Ciência e Cultura**, [s.l.], v. 69, n. 1, p. 56-9, 2017.

OKUDA, R. K.; KLEIN, D.; KINNEL, R. B.; LI, M.; SCHEUER, P. J. Marine natural products: the past twenty years and beyond. **Pure and Applied Chemistry**, [s.l.], v. 54, n. 10, p. 1907-14, 1982.

OLGUIN-URIBE, G.; ABOU-MANSOUR, E.; BOULANDER, A.; DÉBARD, H.; FRANCISCO, C.; COMBAUT, G. 6-bromoindole-3-carbaldehyde, from an acinetobacter sp. bacterium associated with the ascidian *Stomozoa murrayi*. **Journal of Chemical Ecology**, [s.l.], v. 23, n. 11, p. 2507-21, 1997.

OSBORNE, K.; THOMPSON, A. A.; CHEAL, A. J.; EMSLIE, M. J.; JOHNS, K. A.; JONKER, M. J.; LOGAN, M.; MILLER, I. R. Delayed coral recovery in a warming ocean. **Global Change Biology**, [s.l.], p. 1-13, 2017.

OSPINA, C. A.; RODRÍGUEZ, A. D.; ZHAO, H.; RAPTIS, R. G. Bipinnapterolide B, a bioactive oxapolycyclic diterpene from the Colombian gorgonian coral *Pseudopterogorgia bipinnata*. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 48, p. 7520-3, 2007.

PAULA, A. F.; CREED, J. C. Spatial distribution and abundance of nonindigenous coral genus *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) around Ilha Grande, **Brazilian Journal of Biology**, [s.l.], v. 65, n° 4, p. 661-73, 2005.

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**, [s.l.], v. 74, n. 1, p. 175-83, 2004.

PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 608-15, 1995.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S. S.; BOLZANI, V. da S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PIZZOLATTI, M. G.; KOGA, A. H.; GRISARD, E. C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 10, n. 5, p. 422-6, 2003.

RANGEL, M.; FALKENBERG, M. An overview of the marine natural products in clinical trials and on the market. **Journal of Coastal Life Medicine**, [s.l.], v. 3, n. 6, p. 421-8, 2015.

RASHID, M. A.; GUSTAFSON, K. R.; CARDELLINA II, J. H.; BOYD, M. R. Mycalolides D and E, new cytotoxic macrolides from a collection of the Stony coral *Tubastrea faulkneri*. **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 58, n. 7, p. 1120-5, 1995.

RASMUSSEN, T.; JENSEN, J.; ANTHONI, U.; CHRISTOPHERSEN, C.; NIELSEN, P. H. Structure and synthesis of bromoindoles from the marine sponge *Pseudosuberites hyalinus*. **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 56, n. 9, p. 1553-8, 1993.

SAGAR, S.; KAUR, M.; MINNEMAN, K. P. Antiviral lead compounds from marine sponges. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 8, n. 10, p. 2619-38, 2010.

SEREBRYAKOV, E. P.; SIMOLIN, A. V.; KUCHEROV, V. F. New metabolites of fusarium moniliforme sheld. **Tetrahedrom**, [s.l.], v. 26, p. 5215-23, 1970.

SILVA, A. G.; LIMA, R. P.; GOMES, A. N.; FLEURY, B. G.; CREE, J. C. Expansion of the invasive corals *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis* into the Tamoios Ecological Station Marine Protected Area, Brazil. **Aquatic Invasions**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 105-10, 2011.

SILVA, A. G.; PAULA, A. F.; FLEURY, B. G.; CREED, J. C. Eleven years of range expansion of two invasive corals (*Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*) through the southwest Atlantic (Brazil). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, [s.l.], v. 141, p. 9-16, 2014.

SOCIETAT CATALATA DE QUÍMICA. **Nomenclatura de química orgânica – Seccions A, B, C i H – Regles definitives de 1979**. Barcelona, 2013. 402 p.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.1112-16, 2006.

YAMASHIRO, H.; OKU, H.; HIGA, H.; CHINEN, I.; SAKAI, K. Composition of lipids, fatty acids and sterols in Okinawan corals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, [s.l.], v. 122, p. 397-407, 1999.

YEN, W-H.; CHEN, W-F.; CHENG, C-H.; DAI, C-F.; LU, M-C.; SU, J-H.; SU, Y-D.; CHEN, Y-H.; CHANG, Y-C.; CHEN, Y-H.; SHEU, J-H.; LIN, C-S.; WEN, Z-H.; SUNG, P-Y. A new 5 α ,8 α -epidioxysterol from the soft coral *Sinularia gaweli*. **Molecules**, [s.l.], v. 18, p. 2895-903, 2013.

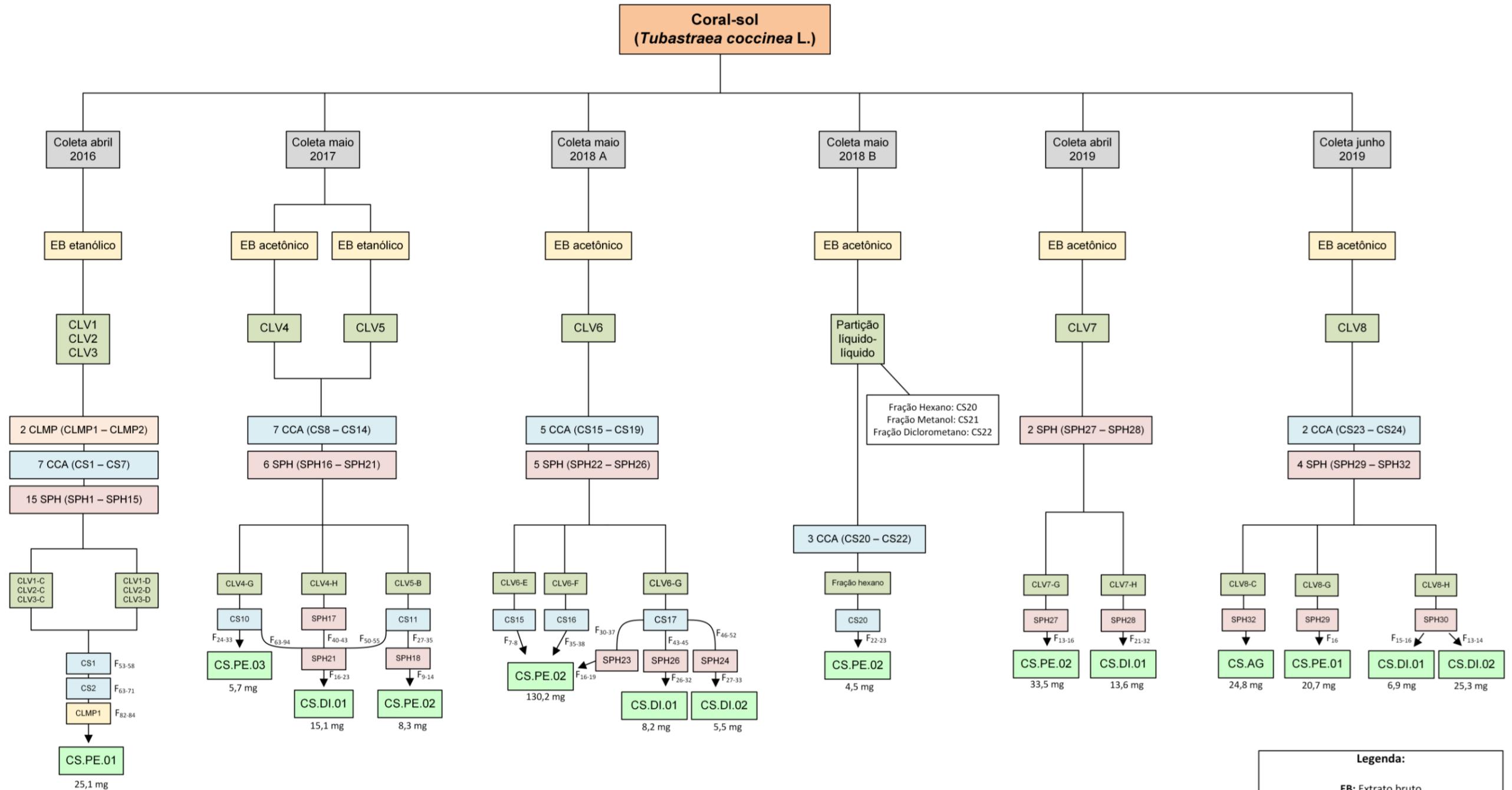
WELLS, J. W. Notes on Indo-Pacific scleractinian corals. Part 9. New corals from the Galapagos Islands. **Pacific Science**, [s.l.], v. 36, n. 2, p. 211-9, 1982.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from na ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 64, p. 3-19, 2003.

WRATTEN, S. J.; WONFE, M. S.; ANDERSEN, R. J.; FAULKNER, D. J. Antibiotic metabolites from a marine pseudomonad. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 411-4, 1977.

APÊNDICE

Fracionamento
cromatográfico



Legenda:

- EB: Extrato bruto
- CCA: Coluna cromatográfica aberta
- CLMP: Coluna líquida de média pressão
- SPH: Sephadex® LH-20
- CS.PE.01: Peróxido de esteroide 1
- CS.PE.02: Peróxido de esteroide 2
- CS.PE.03: Peróxido de esteroide 3
- CS.DI.01: Derivado indólico 1
- CS.DI.02: Derivado indólico 2
- CS.AG: Fração rica em ésteres de ácidos graxos