

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Campus Araraquara  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Panorama químico e biológico do coral-sol  
*Tubastraea tagusensis***

Virginia Carrara

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

**Araraquara-SP  
2022**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Campus Araraquara  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Panorama químico e biológico do coral-sol  
*Tubastraea tagusensis***

Virginia Carrara

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

**Araraquara-SP  
2022**

---

**C857p** Carrara, Virginia.  
Panorama químico e biológico do coral-sol *Tubastraea tagusensis* /  
Virginia Carrara. – Araraquara: [S.n.], 2022.  
44 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Wagner Vilegas.

1. *Tubastraea tagusensis*. 2. Aplisinopsinas. 3. Espécie invasora.  
4. Bioma marinho. I. Vilegas, Wagner, orient. II. Título.

---

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP - Campus de Araraquara

**CAPES: 33004030078P6**  
**Esta ficha não pode ser modificada**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Panorama químico e biológico do coral-sol *Tubastraea tagusensis*

**AUTORA: VIRGINIA CARRARA**

**ORIENTADOR: WAGNER VILEGAS**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. WAGNER VILEGAS (Participação Virtual)  
Departamento de Ciências Biológicas e Ambientais / Instituto de Biociências UNESP São Vicente

Profa. Dra. PAULA CHRISTINE JIMENEZ (Participação Virtual)  
Departamento de Ciências do Mar / UNIFESP Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. DANIEL RINALDO (Participação Virtual)  
Departamento de Química / Faculdade de Ciências de Bauru - Unesp

Araraquara, 14 de outubro de 2022

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP.

À CAPES, pela bolsa concedida 88887.495578/2020-00.

Ao meu Orientador Prof. Dr, Wagner Vilegas por todos os ensinamentos e por me ensinar a gostar de química.

Ao meu colega de Laboratório e amigo M.Sc Renan Canute Kamikawachi e sua dedicação a este trabalho.

Ao Laboratório de Ecologia e Comportamento Animal (LABECOM) pela contribuição para a avaliação das atividades biológicas.

Ao Prof. Dr. Francisco Seikiguchi de Carvalho e Buchmann pela contribuição à etapa de mergulho.

Aos pesquisadores Prof. Dr. Marcelo Visentini Kitahara e Dra. Kátia Cristina Cruz Capel pela contribuição à coleta de material e logística de transporte.

Ao Prof. Dr. Marcelo Veronesi Fukuda e ao Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) pelo registro do material.

Aos meus pais Isabel C.P. S. Carrara e Wagner Luis Carrara por sempre incentivarem meus estudos.

## RESUMO

Organismos marinhos são utilizados com fins terapêuticos desde a Grécia Antiga. Devido à necessidade de produção de metabólitos secundários para defesa química, organismos sésseis são fonte de moléculas com potencial farmacológico. O gênero de corais invasores *Tubastraea* (Dendrophylliidae) vem, ao longo dos anos, ameaçando o bioma marinho brasileiro, sobretudo espécies nativas, devido à alta capacidade de reprodução e ao seu provável arsenal químico alelopático. A única forma de contenção dessa espécie é a retirada manual das colônias. O presente estudo teve como objetivo investigar o panorama químico e biológico desse material de descarte do coral-sol, *Tubastraea tagusensis*. Foram preparados extratos metanólicos, os quais foram analisados por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acopladas à Espectrometria de Massas (MS). Além disso, foram avaliadas também as atividades antioxidante (DPPH) e a toxicidade aguda em Zebrafish (*Danio rerio*). Como resultados, no extrato metanólico foram encontradas substâncias formadas por adutos derivados da classe de alcaloides aplisinopsinas, conhecidas por apresentarem atividades antimicrobianas, anticâncer e modelador de neurotransmissores. O extrato apresentou promissora atividade antioxidante ( $EC_{50} = 101,00 \text{ ug/mL}$ ) e não apresentou toxicidade aguda em Zebrafish. Essas características sugerem que essa espécie deve ser melhor investigada a fim de se obter novas moléculas potencialmente interessantes para estudos farmacológicos.

**Palavras-chave:** *Tubastraea tagusensis*; aplisinopsinas; espécie invasora; bioma marinho.

## ABSTRACT

Marine organisms have been used for therapeutic purposes since Ancient Greece. Due to the need to produce secondary metabolites for chemical defense, sessile organisms are a source of molecules with pharmacological potential. The genus of invasive corals *Tubastraea* (Dendrophylliidae) has been threatening the Brazilian marine biome over the years, especially native species, due to its high reproductive capacity and its probable allelopathic chemical arsenal. The only way to contain this species is the manual removal of colonies. The present study aimed to investigate the chemical and biological panorama of this waste material from the cup coral, *Tubastraea tagusensis*. Methanolic extracts were prepared and analyzed by means of high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to Mass Spectrometry (MS). In addition, antioxidant activities (DPPH) and acute toxicity in Zebrafish (*Danio rerio*) were also evaluated. As a result, substances formed by adducts derived from the aplysinopsin class of alkaloids were found in the methanolic extract, known to have antimicrobial, anticancer and neurotransmitter modulating activities. The extract showed promising antioxidant activity ( $EC_{50}=101,00$  ug/mL) and did not show acute toxicity in Zebrafish. These characteristics suggest that this species should be further investigated in order to obtain potentially interesting new molecules for pharmacological studies

**Keywords:** *Tubastraea tagusensis*; aplysinopsin invasive alien species; marine biome.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrila

CCD - Cromatografia em camada delgada

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPPH - 2,2-difenil-picrilhidrazila

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

*HPLC-ESI-IT-MS* - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

MeOH - Metanol

MeOH-TtM - Extrato metanólico de *Tubastraea tagusensis* obtido por maceração

MeOH-TtS - Extrato metanólico de *Tubastraea tagusensis* obtido por Soxhlet

MeOH-TtU - Extrato metanólico de *Tubastraea tagusensis* obtido por maceração assistida por ultrassom

MS – Espectrometria de Massas

NI - Modo negativo

P.A - Para Análise

PI - Modo positivo

PNM - Produtos Naturais Marinhos

PTFE - Politetrafluoretileno

RT - Tempo de Retenção

*UPLC-ESI-IT-MS* - Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

UV - Ultravioleta

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Substâncias presentes em corais com potentes atividades biológicas.

**Figura 2:** *Tubastraea tagusensis*. Marcelo Visentini Kitahara. Coral-sol. Banco de imagens Cifonauta. Disponível em: <http://cifonauta.cebimar.usp.br/media/9664/> Acesso em: 2020-04-19.

**Figura 3:** Análise por CCD dos extratos de *Tubastraea tagusensis*. A) Revelação com mistura de anisaldeído/ácido sulfúrico: MeOH-TtS (à esquerda) e MeOH-TtM (direita); B) revelação sob luz Ultravioleta 365 nm: MeOH-TtS (à esquerda) e MeOH-TtM (direita).

**Figura 4:** Análise por *HPLC-ESI-IT-MS* do extrato MeOH-TtS de *Tubastraea tagusensis* nos modos positivo (abaixo) e negativo (acima).

**Figura 5:** Espectro de massas da substância detectada no pico **I** (PI).

**Figura 6:** Espectro de massas da substância detectada no pico **II** (PI).

**Figura 7:** Espectro de massas da substância detectada no pico **III** (PI).

**Figura 8:** Espectro de massas da substância detectada no pico **IV** (PI).

**Figura 9:** Espectro de massas da substância detectada no pico **V** (PI).

**Figura 10:** Espectro de massas da substância detectada no pico **VI** (NI).

**Figura 11:** Espectro de massas da substância detectada no pico **VII** (NI).

**Figura 12:** Espectro de massas da substância detectada no pico **VIII** (NI).

**Figura 13:** Espectro de massas da substância detectada no pico **IX** (NI).

**Figura 14:** Espectro de massas da substância detectada no pico **X** (NI).

**Figura 15:** Cromatogramas de íons extraídos dos íons referentes às substâncias **II** ( $m/z$  239), **III** ( $m/z$  253), **V** ( $m/z$  317) e **VI** ( $m/z$  331) obtidas após análise por *HPLC-ESI-IT-MS* do extrato MeOH-TtS de *Tubastraea tagusensis* no modo negativo (NI).

**Figura 16:** Cromatogramas de íons extraídos dos íons referentes às substâncias **II** ( $m/z$  241), **III** ( $m/z$  255), **V** ( $m/z$  319) e **VI** ( $m/z$  333) obtidos após análise por *HPLC-ESI-IT-MS* do extrato MeOH-Tt de *Tubastraea tagusensis* em modo positivo (PI).

**Figura 17:** Esquematização das reações pericíclicas dos adutos.

**Figura 18:** Cromatogramas obtidos pelas análises por *UPLC-ESI-IT-MS* dos extratos de *Tubastraea tagusensis* obtidos por maceração (acima), soxhlet (no meio) e ultrassom (embaixo). Acima de cada pico foram anotados os íons  $[M-H]^-$ .

**Figura 19:** Curva de inibição do potencial oxidativo de MeOH-TtS e do padrão Trolox.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Moléculas derivadas de Aplisinopsinas identificadas nos extratos de *Tubastraea tagusensis* e *Tubastraea coccinea* (Carpes et al., 2019) - Adaptado

**Tabela 2:** Substâncias identificadas por meio de *HPLC-ESI-IT-MS* no extrato MeOH-TtS, com base nas moléculas descritas por Carpes *et.al* (2019, Tabela 1).

**Tabela 3:** Avaliação da atividade antioxidante do extrato MeOH-TtS *Tubastraea tagusensis* e de Trolox (padrão). Experimento realizado em triplicata  $\pm$  desvio padrão.

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>16</b>
3.1	COLETA	16
3.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	16
3.2.1	<i>Extração por Soxhlet</i>	16
3.2.2	<i>Extração por Maceração</i>	16
3.2.3	<i>Extração por Maceração assistida por ultrassom</i>	17
3.3	CLEAN-UP	17
3.4	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	17
3.4.1	<i>Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</i>	17
3.4.2	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado à Espectrometria de Massas (HPLC-ESI-IT-MS)</i>	18
3.4.3	<i>Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-ESI-IT-MS)</i>	18
3.5	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	18
3.5.1	<i>Avaliação da atividade antioxidante</i>	18
3.5.2	<i>Avaliação de Toxicidade aguda em zebrafish</i>	19
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>19</b>
4.1	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	19
4.2	IDENTIFICAÇÃO DAS MOLÉCULAS PRESENTES NO EXTRATO MEOH-TTS DE <i>TUBASTRAEA TAGUSENSIS</i>	20
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	34
4.4	TOXICIDADE AGUDA EM ZEBRAFISH	36
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos são de suma importância para a indústria farmacêutica, sendo a base para a competitividade entre as empresas desse ramo. Apesar do desenvolvimento de novas técnicas de elaboração de fármacos e de abordagem que envolve a síntese, os produtos naturais e seus derivados representam a maioria dos medicamentos utilizados atualmente (BERLINCK *et al.*, 2017).

Constantemente, pesquisas relatam a descoberta de novas classes de substâncias de origem vegetal e animal, evidenciando a importância dos produtos naturais como fonte abundante de estruturas químicas diversas e promissoras para a indústria farmacêutica. Assim, faz-se necessária a pesquisa multidisciplinar em química de produtos naturais, a fim de explorar novas fontes de biomoléculas (BERLINCK *et al.*, 2017).

Os oceanos são uma importante fonte de produtos naturais devido à sua vasta biodiversidade que, em alguns locais, estima-se que seja maior até mesmo que a de florestas tropicais (HAEFNER, 2003). Desde o século V a.C., organismos marinhos são usados com propósito medicinal. Relatos da medicina tradicional grega evidenciam o uso desses organismos como fonte terapêutica para o tratamento de enfermidades ginecológicas a partir de esponjas associadas a algas, enzimas do estômago e gordura de pinípedes. A medicina tradicional chinesa também relata a produção de medicamentos a partir de algas como fonte de iodo para controle de disfunções da tireoide (VOULTSIADOU, 2007).

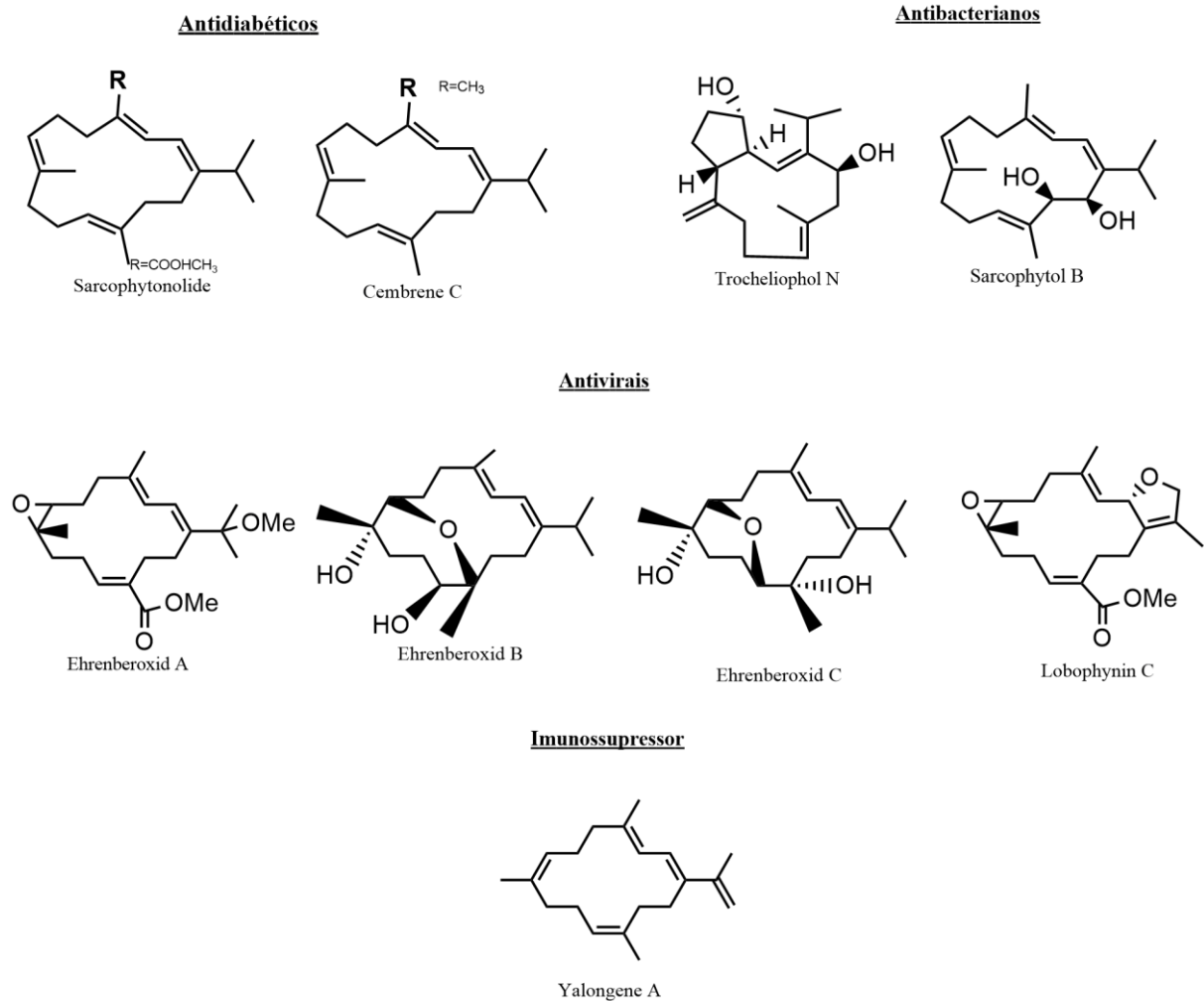
Produtos naturais marinhos (PNM) são derivados, em sua maioria, de organismos sésseis, como corais, algas e esponjas, os quais não possuem defesa física, necessitando, assim, de meios químicos de defesa antipredatória e como mecanismos auxiliares para a competição. Essas defesas químicas geralmente estão na forma de metabólitos secundários de alta complexidade, com grande diversidade estrutural e

altamente potentes, apresentando características únicas, diferentes dos produtos naturais de origem terrestre (ALTMANN, 2017; MATULJA *et al.*, 2022). Esses PNM são fonte valiosa de novas estruturas químicas com atividades biológicas promissoras, com grande potencial para a determinação de novos mecanismos de ação (KHALIFA *et al.*, 2019; SHINDE *et al.*, 2019).

Moléculas derivadas de organismos marinhos apresentam diversos efeitos biológicos, sendo que mais de 50% deles referem-se às atividades citotóxica e antiproliferativa. Invertebrados marinhos apresentam atividades antiviral, antioxidante, antibacteriana, entre outras, sendo as esponjas e os cnidários os maiores produtores desses metabólitos (ALTMANN, 2017; KHALIFA *et al.*, 2019; CARROLL *et al.*, 2021).

Os corais apresentam moléculas com potente atividade citotóxica, como o acetato de asperidiol (encontrado em *Pseudoplexaura flagellosa*) e os michaelídeos (*Lobophytum michaelae*) (WANG & DUH, 2012; BAUER *et al.*, 2018). Moléculas presentes em corais também apresentam atividades imunossupressora (Yalogene A), antidiabética (Sarcophytonolide e Cembrene C), antiviral (Lobophynin C e Ehrenberoxide A, B e C) e antibacteriana (Sarcophytol B), ativos contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus albus* e *Vibrio parahaemolyticus* (Figura 1) (ELKHAWAS *et al.*, 2020).

É interessante observar que muitas das atividades biológicas observadas nos PNM estão envolvidas nos testes iniciais necessários na pesquisa de novas drogas, e que o isolamento dessas substâncias aumenta significativamente a cada ano (ALTMANN, 2017). Atualmente, a Citarabina (Cytosar-U®), o Fosfato de Fludarabina (Fludara®) e outros dez medicamentos sintetizados a partir PNM já foram aprovados para o tratamento de câncer, e esse número tende a aumentar nos próximos anos (MATULJA *et al.*, 2022). Medicamentos com outras propriedades também já foram aprovados: Vidarabina (Vidarabine®), antiviral derivado da esponja *Tectitethya crypta*, e Ziconotida (Prialt®), analgésico derivado do molusco *Conus magus* (KIJJOA *et al.*, 2004; MALVE, 2016; FDA, 2022).



**Figura 1.** Substâncias presentes em corais, com potentes atividades biológicas.

Com o desenvolvimento de novas técnicas de coleta, triagem de metabólitos e testes biológicos, o estudo de PNM torna-se mais acessível. Apesar disso, poucos organismos marinhos, em especial corais, foram estudados na busca de novas substâncias bioativas. Isso ocorre devido às suas próprias peculiaridades, como o alto custo de coleta, quantidade de material disponível para exploração, divergências nas classificações taxonômicas, visto que muitas espécies apresentam pequenas alterações morfológicas, e complexidade das moléculas, desperdiçando o alto potencial desses organismos (MARTINS *et al.*, 2018; ALTMANN, 2017; SHINDE *et al.*, 2019).

Os PNM muitas vezes são oriundos de espécies de grande importância ecológica ou ameaçadas, o que não ocorre com organismos invasores, que ameaçam a biodiversidade nativa. Como essas espécies também podem produzir substâncias

com relevantes atividades biológicas (antiviral, antibacteriana, antioxidante, citotóxica etc.), elas podem surgir como alternativa sustentável para o desenvolvimento de fármacos (MOLLO, 2022).

Ecologicamente, os corais do gênero *Tubastraea* (Dendrophylliidae) representam um dos principais problemas ambientais marinhos brasileiros (SILVA *et al.*, 2011). Isso é particularmente grave no caso do coral-sol (*Tubastraea tagusensis*) (Figura 2), um coral azooxantelado (não apresenta associação com algas) que ocupa superfícies marinhas verticais de diferentes profundidades (PAULA & CREED, 2005). Ele é natural da região do Pacífico e foi introduzido em águas nacionais no final dos anos 80, incrustado em navios e plataformas de petróleo da Bacia de Campos - RJ e atualmente infesta grande parte do litoral brasileiro (SANTOS *et al.*, 2019; WORMS, 2020). Por ser uma espécie invasora e, conseqüentemente, sem predadores, modifica ambientes recifais e ameaça espécies endêmicas e bentônicas, como o coral endêmico *Mussismilia hispida*, crustáceos, poliquetas, entre outros, além de peixes associados que se alimentam desses invertebrados, causando assim grande impacto à biodiversidade nativa, principalmente em áreas marinhas protegidas (SILVA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2019; DOS SANTOS *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Imagem de *Tubastraea tagusensis*. Fonte: Marcelo Visentini Kitahara. Coral-sol. Banco de imagens Cifonauta. Disponível em: <http://cifonauta.cebimar.usp.br/media/9664/>. Acesso em 2020-04-19.

Sua vantagem sobre as espécies nativas é resultado de uma estratégia reprodutiva de sucesso, rápido crescimento e possível arsenal químico. Estudos apontam que esses animais produzem e liberam metabólitos secundários que agem como inibidores alelopáticos contra competidores, seja impedindo o assentamento larval ou por atividade citotóxica, resultando, junto a outras características, em uma enorme disseminação da espécie invasora (LAGES *et al.*, 2010; 2012; MIRANDA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2019).

A atual forma de contenção dessa espécie baseia-se na remoção manual das colônias por mergulhadores. Por ser um trabalho árduo, concentra-se em locais de maior importância ecológica como o Refúgio de Vida Silvestre do Arquipélago dos Alcatrazes-Litoral Norte - SP e o Parque Marinho da Laje de Santos, na Baixada Santista. Após a remoção, as colônias são levadas a terra para serem eliminadas (ICMBIO, 2019).

Sob uma perspectiva mais positiva, metabólitos secundários com essas características podem ter importantes atividades biológicas e farmacológicas. Metabólitos secundários da classe aplisinopsinas foram encontrados em corais gênero *Tubastraea*, com atividades anticâncer, antimicrobiana e moduladora da regulação de serotonina (BIALONSKA & ZJAWIONY, 2009).

Diante do problema multidisciplinar apresentado pela espécie *Tubastraea tagusensis*, o presente trabalho investigou o panorama químico do coral e seu eventual potencial biológico, analisando os organismos descartados originados de uma contenção manual realizada para controle ambiental na Ilha de Búzios, São Sebastião, SP.

## **2 OBJETIVO**

Investigar o panorama químico dos metabólitos secundários de *Tubastraea tagusensis*, a partir do material de descarte proveniente da contenção manual realizada para controle da espécie, através de técnicas cromatográficas e espectrométricas, em busca de substâncias com potencial uso farmacológico.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta

O coral da espécie *Tubastraea tagusensis* foi coletado na Ilha de Búzios - São Sebastião - São Paulo (23°48'44" S 45°09'03" W) por meio de mergulho autônomo a 8 metros de profundidade. Os animais coletados foram provenientes da contenção manual da espécie realizada na ilha, sendo assim material de descarte. Após a coleta, os animais foram mantidos em galões com água do mar no Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (Cebimar-USP). Posteriormente foram congelados em freezer e transportados em coolers até o Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais (LBPN) – Instituto de Biociências - Câmpus do Litoral Paulista - UNESP. Ali, o material foi higienizado com água destilada para a retirada de resíduos, algas e outros organismos associados (bivalves, siris, etc.) e congelado em ultrafreezer -80°C. Uma amostra da espécie coletada foi depositada nas coleções do Museu de Zoologia da USP (MZUSP) sob o código MZUSP8689.

#### 3.2 Obtenção dos Extratos

##### 3.2.1 Extração por Soxhlet.

Uma alíquota (100 g) de *T. tagusensis* foi colocada em Soxhlet junto a 250 mL de metanol P.A e aquecido até a ebulição. A extração exaustiva levou em média 6 horas, quando o coral perdeu todo o pigmento, sobrando apenas o esqueleto calcário. Posteriormente, o extrato foi filtrado em papel filtro 80 g/m<sup>3</sup> (porosidade 3 µ) e rotaevaporado à 40°C e pressão reduzida, fornecendo 1,7 g de extrato metanólico (MeOH-TtS) (rendimento de 1,7%).

##### 3.2.2 Extração por Maceração.

Outra alíquota do coral-sol foi submersa em 350 mL de metanol P.A em frasco âmbar, durante 5 dias, em temperatura ambiente e ao abrigo de luz, impossibilitando assim a pesagem da amostra. Posteriormente, o extrato foi filtrado em papel filtro 80 g/m<sup>2</sup> (porosidade 3 µ) e rotaevaporado à 40°C e pressão reduzida, fornecendo 0,50 g de extrato metanólico (MeOH-TtM). Esse extrato foi utilizado apenas para

comparação do perfil cromatográfico na etapa de verificação da formação ou não de artefatos durante a extração.

### 3.2.3 Extração por Maceração assistida por ultrassom

Uma terceira alíquota do coral-sol (27,6 g) foi extraída com 275 mL de metanol P.A com auxílio de ultrassom (NOVA Instruments) por 15 minutos. O procedimento foi realizado três vezes, até que o coral fosse totalmente extraído. Posteriormente, o extrato foi filtrado em papel filtro 80 g/m<sup>2</sup> (porosidade 3 µ) e rotaevaporado a 40°C e pressão reduzida, fornecendo 0,18 g de extrato metanólico (MeOH-TtU) (rendimento de 0,68%). Esse extrato foi utilizado apenas para comparação do perfil cromatográfico na etapa de verificação da formação ou não de artefatos durante a extração.

### 3.3 *Clean-up*

Alíquotas do extrato MeOH-TtS (5 mg) e MeOH-TtM foram pesadas e submetidas a *clean-up* utilizando-se cartuchos Sep-Pak de fase reversa C18 (500 mg, tamanho da partícula 45 µm e diâmetro e poro 60 Å). O cartucho foi ativado com 450 uL de metanol grau MS, 450 uL de H<sub>2</sub>O ultrapura (Milli-Q®) e equilibrado com 450 uL de MeOH grau MS. As soluções obtidas foram secas à temperatura ambiente, dissolvidas em MeOH grau MS, obtendo-se a soluções estoque de concentração de 1,0 mg/mL, posteriormente filtradas em filtro PTFE 0,22 µm.

### 3.4 Análises cromatográficas

#### 3.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

A fim de determinar o número e a polaridade das substâncias presentes, os extratos obtidos foram triados em placas cromatográficas de camada delgada (CCD) UV 254, com espessura de 0,20 mm. Foram utilizadas fase móvel quaternária (clorofórmio/n-propanol/metanol/água 31:38:6:25 v:v) e como revelador Anisaldeído/ácido sulfúrico (WAGNER *et al.*, 1984).

### 3.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado à Espectrometria de Massas (*HPLC-ESI-IT-MS*).

Em seguida, para obter informações estruturais, as soluções estoques obtidas por *clean-up* foram diluídas em metanol grau MS para obter a concentração de 0,5 mg/mL. Essas soluções foram analisadas por um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado com um sistema de espectrometria de massas com fonte de ionização *Electrospray* e analisador *Ion-trap* (*HPLC-ESI-IT-MS*, Thermo LTQ-XL), sob as seguintes especificações: coluna Luna C18 Phenomenex® (250 x 4,6 mm 5 µm) e sistema gradiente: 0-60 min (5-100% ACN) sob fluxo de 350 µL/min. A temperatura do capilar foi de 280°C, os gases de nebulização e colisão utilizados foram nitrogênio 40 unidades arbitrárias e hélio 10 unidades arbitrárias, respectivamente. Os solventes utilizados foram água acidificada (0,1% ácido fórmico) e acetonitrila acidificada (0,1% ácido fórmico). Foram realizados experimentos nos modos positivo (PI) e negativo (NI).

### 3.4.3 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (*UPLC-ESI-IT-MS*).

Para comparação dos extratos, as soluções estoque foram diluídas em metanol grau MS para obter a concentração de 0,5 mg/mL. Essas soluções foram analisadas usando o mesmo sistema mencionado em 3.4.2, alterando-se apenas as seguintes condições: coluna Acquity UPLC® BEH C18 (2,1 x 50 mm 1.7 µm) e sistema gradiente: 0-11 min (5-100% ACN) sob fluxo de 0,200 mL/min, modo negativo (NI).

## 3.5 Avaliação das atividades biológicas

### 3.5.1 Avaliação da atividade antioxidante.

Para avaliação antioxidante do extrato, foi empregado o ensaio colorimétrico com 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH), para detecção do potencial sequestrador de radicais livres (NURCHOLIS *et al.*, 2021). Em placas Elisa 96 poços foram aplicados 100 µL de extrato nas concentrações de 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL. Em seguida, foram adicionados 100 µL de solução a 0,06 mM de DPPH em

cada poço. Após 45 minutos de reação, foi realizada a leitura da absorvidade molar destas soluções a 517 nm. O decréscimo na absorvidade molar expressa o potencial antioxidante da amostra. Esta é representada por uma curva de concentração/porcentagem de variação da absorvidade molar (A). Como padrão positivo foi utilizado Trolox.

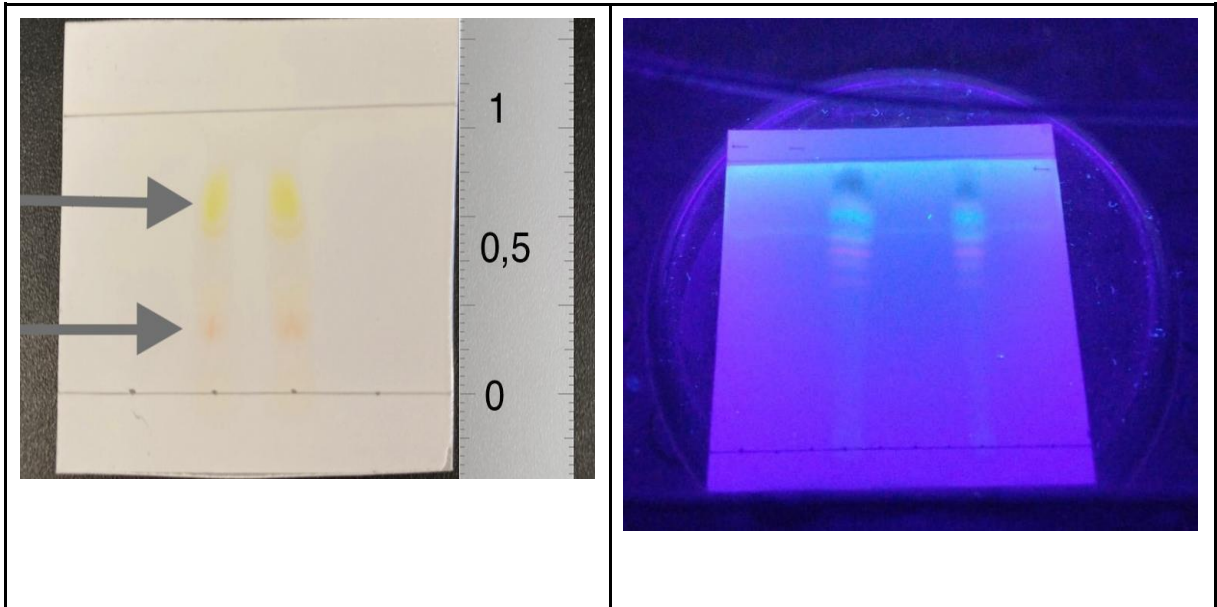
### 3.5.2 Avaliação de Toxicidade aguda em Zebrafish.

A avaliação de toxicidade aguda em Zebrafish (*Danio rerio*) foi realizada de acordo com o protocolo Test Guideline No. 203, Fish, Acute Toxicity Testing, OECD (2019). Os animais foram mantidos em tanques com filtro, aeração e temperatura constante, e alimentados com ração Premium Tropicais Dia a Dia - Poytara®, ad libitum. Para o ensaio, os animais foram transferidos para aquários de 22 L e a alimentação foi suspensa 24h antes. Os grupos (n= 10/concentração) foram tratados via oral, com auxílio de micropipeta, com 20 µL de solução (extrato/veículo) nas seguintes concentrações: 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL, sendo o veículo DMSO 5%. A contagem de indivíduos mortos foi realizada em 24h, 48h, 72h e 96 horas.

## 4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).

Análise por CCD dos extratos MeOH-TtS e MeOH-TtM (Figura 3) evidenciou bandas de coloração alaranjadas na região de RF 0,25 e bandas amareladas, na região de RF 0,6. Sob luz UV 365 nm, ambos os extratos apresentaram bandas de fluorescência azuladas e rosadas. A partir disso, sugerimos que ambos os métodos extraem as mesmas substâncias.



**Figura 3.** Análise por CCD dos extratos de *Tubastraea tagusensis*. A) Revelação com mistura de anisalaldeído/ácido sulfúrico: MeOH-TtS (à esquerda) e MeOH-TtM (direita); B) revelação sob luz Ultravioleta 365 nm: MeOH-TtS (à esquerda) e MeOH-TtM (direita).

A análise por CCD fornece apenas uma visão geral das substâncias. Para obter informações estruturais, o extrato MeOH-TtS foi submetido à análise por *HPLC-ESI-IT-MS*.

#### 4.2 Identificação das moléculas presentes no extrato MeOH-TtS de *Tubastraea tagusensis*.

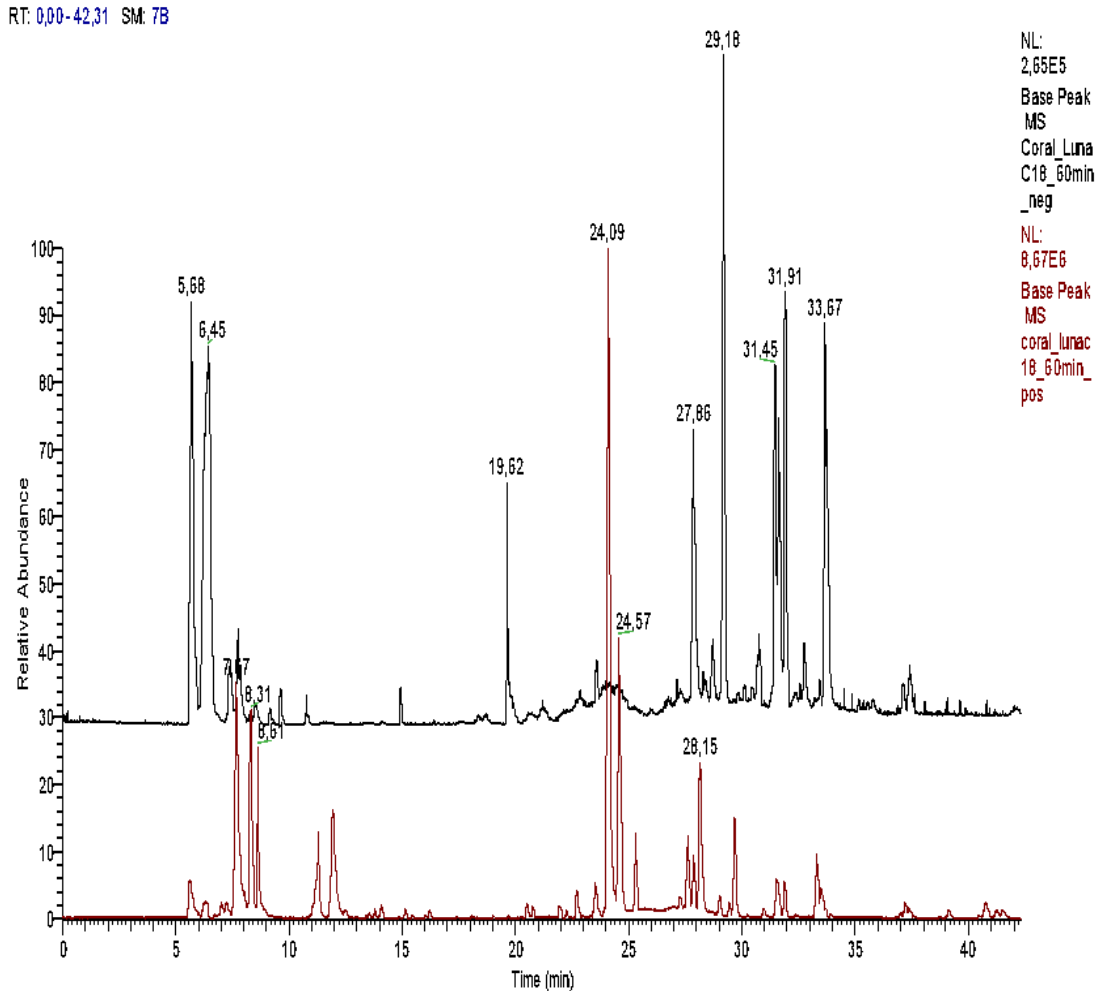
Segundo Carpes *et al.*, (2019), o extrato metanólico de *Tubastraea tagusensis* apresenta moléculas derivadas da classe de aplisinopsinas, as quais, naquele trabalho, foram identificadas por espectrometria de massas de alta resolução no modo positivo (Tabela 1). São alcalóides indólicos que podem estar bromados no anel benzênico (**5** e **6**), ou não (**1**, **2**, **3** e **4**). Outra diferença entre essas moléculas é a presença de um (**2**, **5**), dois (**3**, **6**) ou três (**4**) grupos metílicos na molécula, em

diferentes posições. Isso também pode gerar vários isômeros de posição, alguns dos quais presentes nas substâncias **3**, **4** e **5**, o que aumenta a complexidade da análise. Essas moléculas foram utilizadas como principal referência para a identificação das moléculas presentes no extrato MeOH-TtS.

**Tabela 1.** Moléculas derivadas de Aplisinopsinas identificadas nos extratos de *Tubastraea tagusensis* e *Tubastraea coccinea* (Carpes et al., 2019) - Adaptado.

	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Molécula	Estrutura
<b>1</b>	228.0768	3'-deimino-2',4-bis(demethyl-3'-oxo-aplysinopsin	 C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
<b>2</b>	241.1084	2'-de-N-methyl-aplysinopsin	 C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O
<b>3</b>	255.1240	Aplysinopsin ou Isoplysin A	 C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O
<b>4</b>	269.1397	Methylaplysinopsin (a) ou N-methylaplysinopsin (b)	 C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O
<b>5</b>	319.0189	6-bromo-2'-de-N-methylaplysinopsin (a) ou 6-bromo-4'-de-N-methylaplysinopsin (b)	 C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> BrN <sub>4</sub> O
<b>6</b>	333.0351 ou 335.0331	6-bromo-aplysinopsin	 C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> BrN <sub>4</sub> O

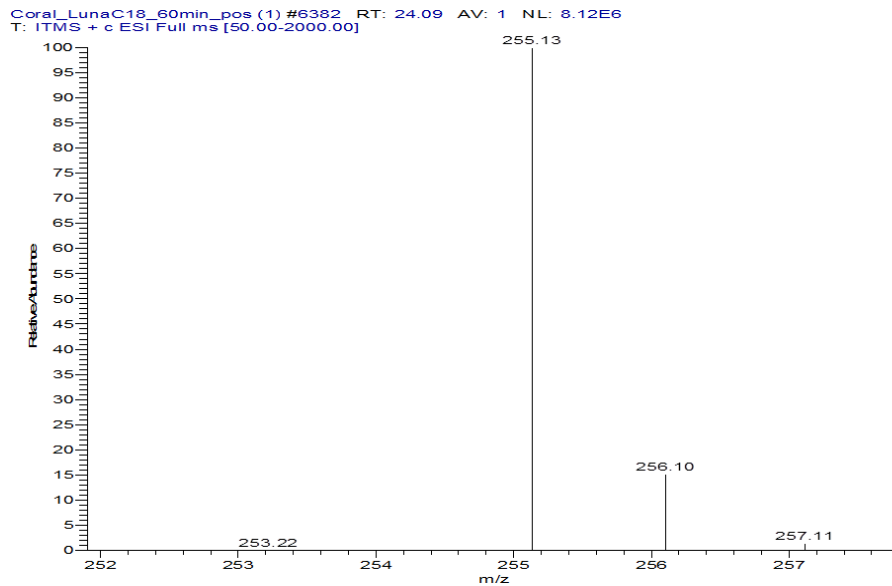
A Figura 4 mostra o cromatograma originado a partir da análise por *HPLC-ESI-IT-MS* do extrato MeOH-TtS nos modos positivo e negativo.



**Figura 4.** Análise por *HPLC-ESI-IT-MS* do extrato MeOH-TtS de *Tubastraea tagusensis* nos modos positivo (abaixo) e negativo (acima).

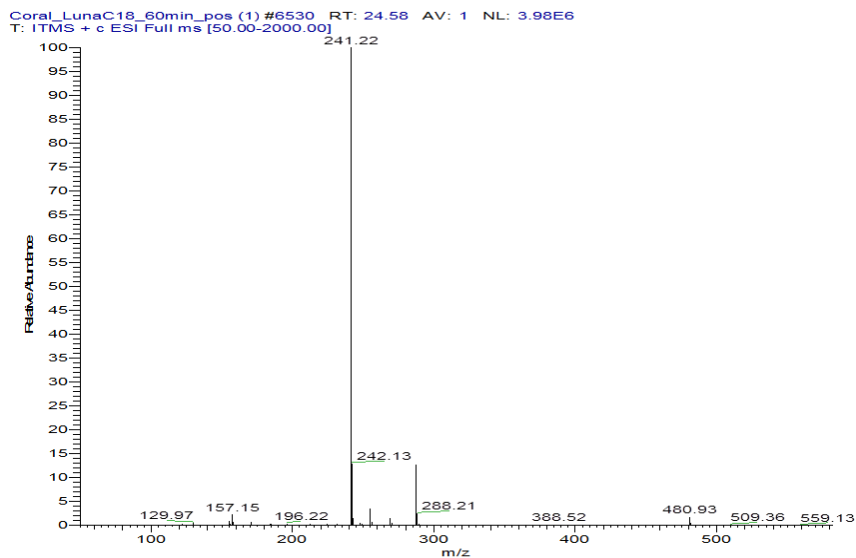
O cromatograma da Figura 4 apresentou boa resolução, exibindo grande quantidade de picos de diferentes intensidades, principalmente entre os tempos de retenção de 24 até 34 minutos. As substâncias que eluíram entre 5 e 20 minutos não puderam ser identificadas e não pertencem à classe das aplisinopsinas. Discutiremos os picos de maior intensidade, pois a maioria deles se refere à formação de uma série de adutos formados a partir das unidades monoméricas, inclusive isoméricas. Pode-se observar que picos de tempos de retenção mais baixos (24-25 min) aparecem apenas no modo positivo, enquanto outros se distribuem entre NI e PI.

O pico (I) (RT 24,09 min) (PI) apresentou o sinal da molécula protonada de  $m/z$  255  $[M+H]^+$ , que equivale à molécula **3** (Figura 5).



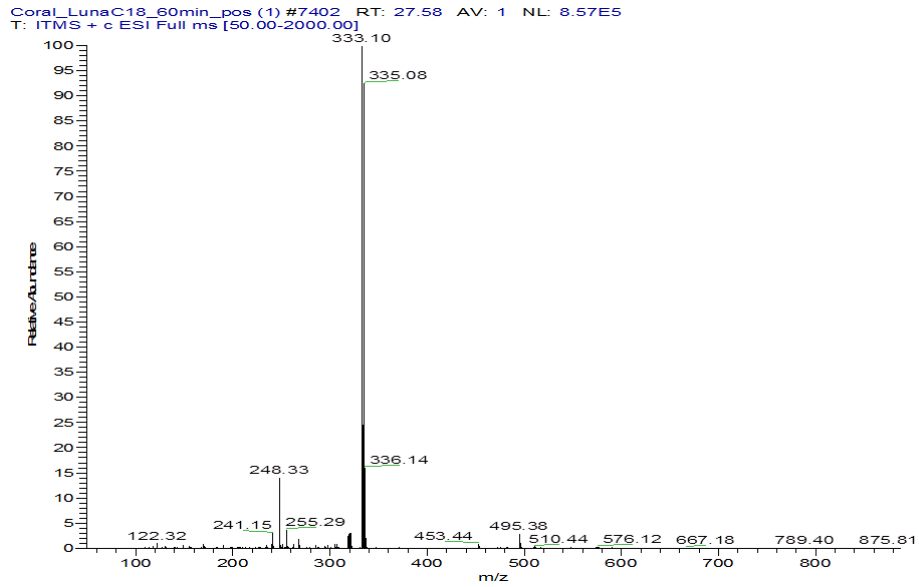
**Figura 5.** Espectro de massas da substância detectada no pico I (PI).

O pico (II) (RT 24.57 min) (PI) apresentou o sinal de molécula protonada de  $m/z$  241  $[M+H]^+$ , equivalente à molécula **2** (Figura 6).



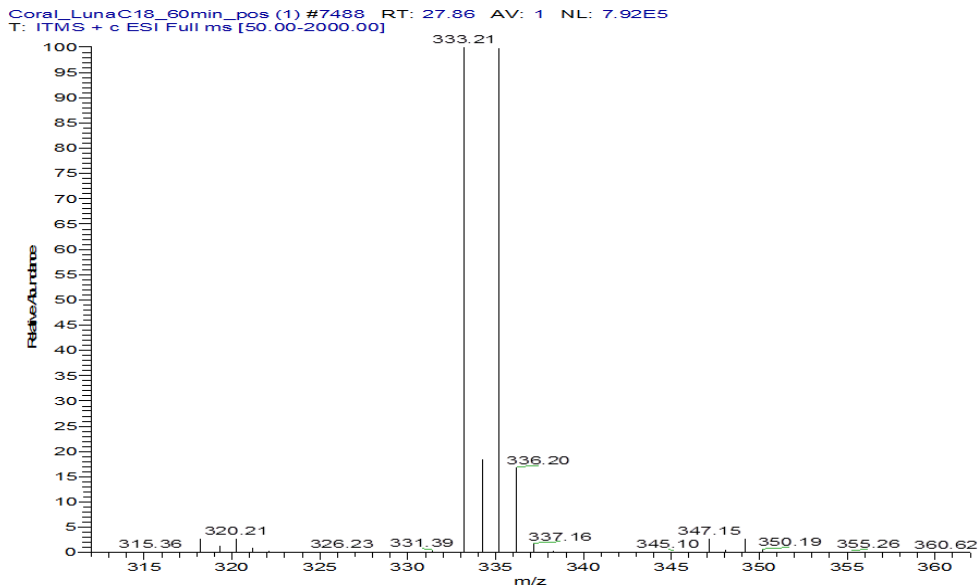
**Figura 6.** Espectro de massas da substância detectada no pico II (PI).

O pico (III) (RT 27,60 min) (PI) apresentou sinais em  $m/z$  333  $[M+H]^+$  e  $m/z$  335  $[M+2H]^+$ , apontando para a presença da molécula bromada protonada **6** (Figura 7).



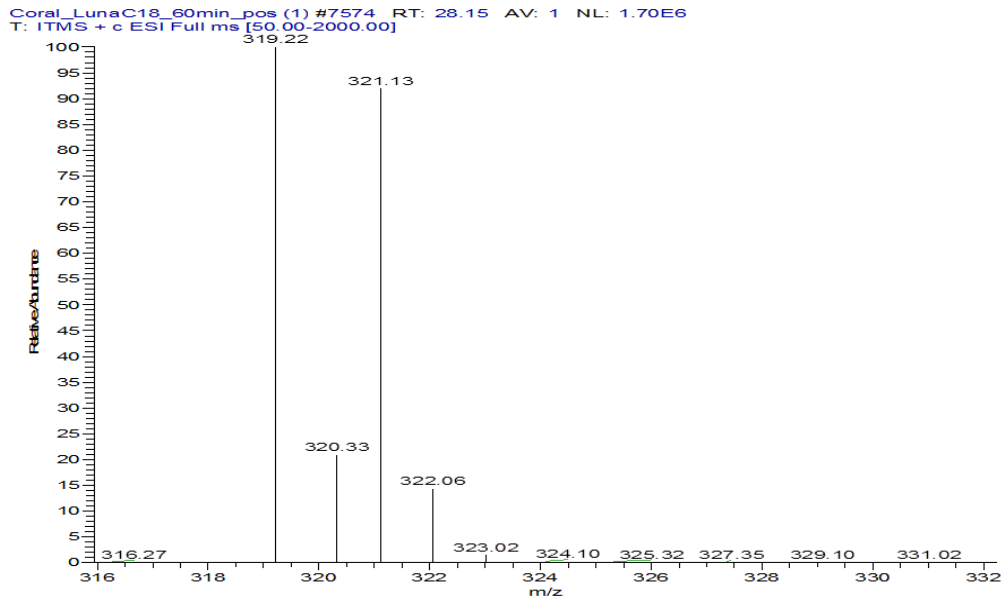
**Figura 7.** Espectro de massas da substância detectada no pico III (PI).

O pico (IV) (RT 27,86 min) (PI) apresentou também dois picos de intensidades similares de  $m/z$  333  $[M+H]^+$  e de  $m/z$  335  $[M+2+H]^+$ , sugerindo a presença de um isômero da substância bromada **6** (Figura 8).



**Figura 8.** Espectro de massas da substância detectada no pico IV (PI).

O pico (V) (RT 28,15 min) (PI) apresentou dois picos de intensidade similares, um de  $m/z$  319  $[M+H]^+$  e outro de  $m/z$  321  $[M+2+H]^+$ , revelando a presença da substância bromada **5** (Figura 9).



**Figura 9.** Espectro de massas da substância detectada no pico V (PI).

A molécula (VI) (RT 29,18 min), que foi detectada no modo negativo (NI), apresentou a molécula desprotonada de  $m/z$  493  $[M-H]^-$ , assim como íon de  $m/z$  254  $[M-240-H]^-$ , correspondente à aplisinopsina **3** e perda da molécula **2**. Outro íon observado, de  $m/z$  239  $[M-254-H]^-$ , evidencia a presença da molécula **2** e a perda da molécula **3**. Esse resultado sugere a presença de uma substância (VI), formada por um aduto composto pelas moléculas **2** + **3** (Figura 10).

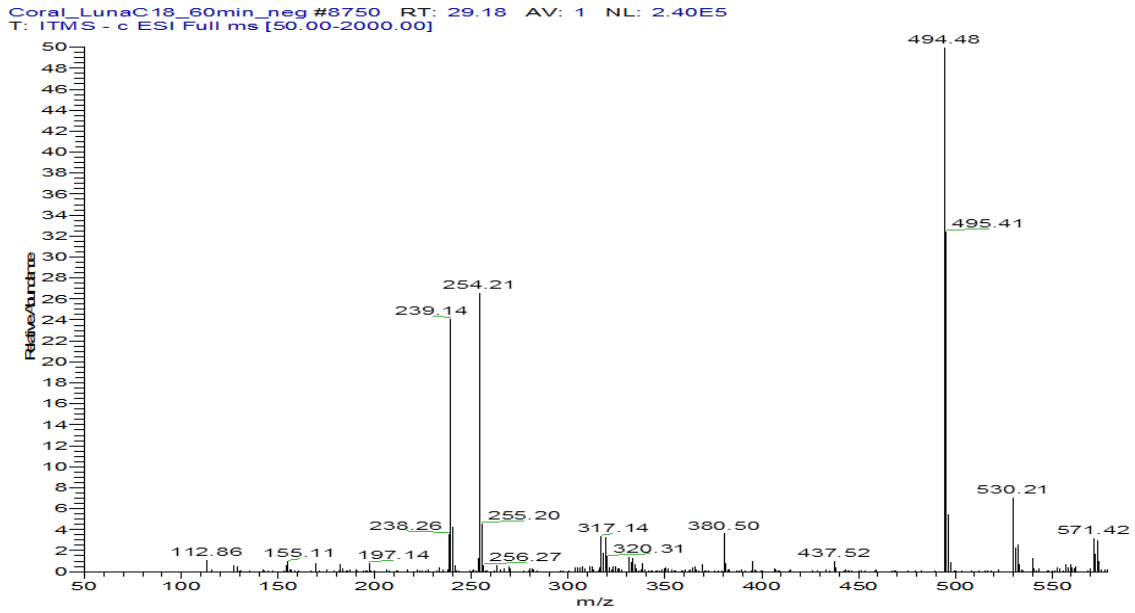


Figura 10. Espectro de massas da substância detectada no pico VI (NI).

O pico (VII) (RT 31,45 min) (NI) mostrou sinais em  $m/z$  572/574  $[M]^-/[M+2]^-$ , em  $m/z$  254 (3) e em  $m/z$  317/319 (5), sugerindo a presença de um aduto formado pelas moléculas 3 e 5 (Figura 11).

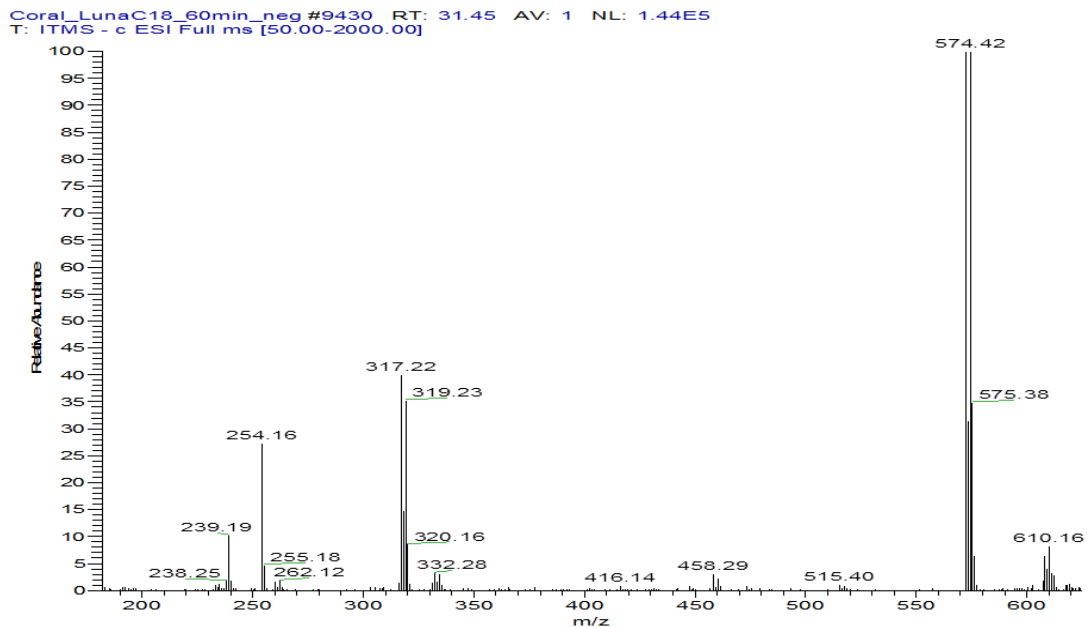
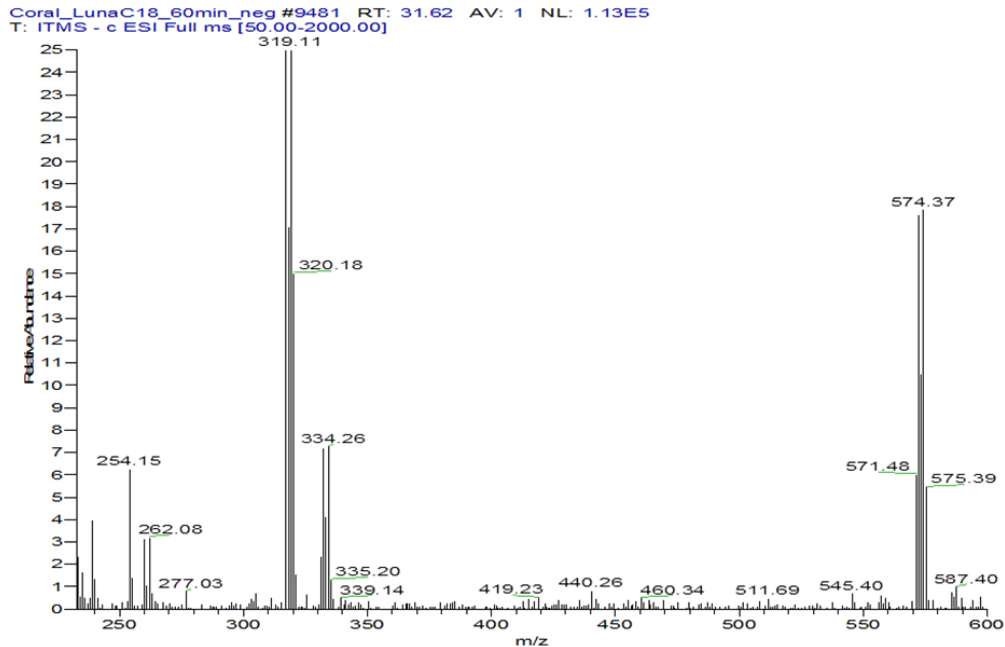


Figura 11. Espectro de massas da substância detectada no pico VII (NI).

O pico (VIII) (RT 31,62 min) (NI) também exibiu sinais em  $m/z$  572/574 [M]<sup>-</sup>/[M+2]<sup>-</sup>, e sinais em  $m/z$  254 (3) e em  $m/z$  317/319 (5), sugerindo a presença de outro aduto isomérico formado pelas moléculas 3 e 5 (Figura 12).



**Figura 12.** Espectro de massas da substância detectada no pico VIII (NI).

O pico (IX) (RT 31,91 min) (NI) também exibiu sinais em  $m/z$  572/574 [M]<sup>-</sup>/[M+2]<sup>-</sup>, mas agora com sinais em  $m/z$  239 (2) e em  $m/z$  332/334 (6), sugerindo a presença de um aduto formado pelas moléculas 2 e 6 (Figura 13).

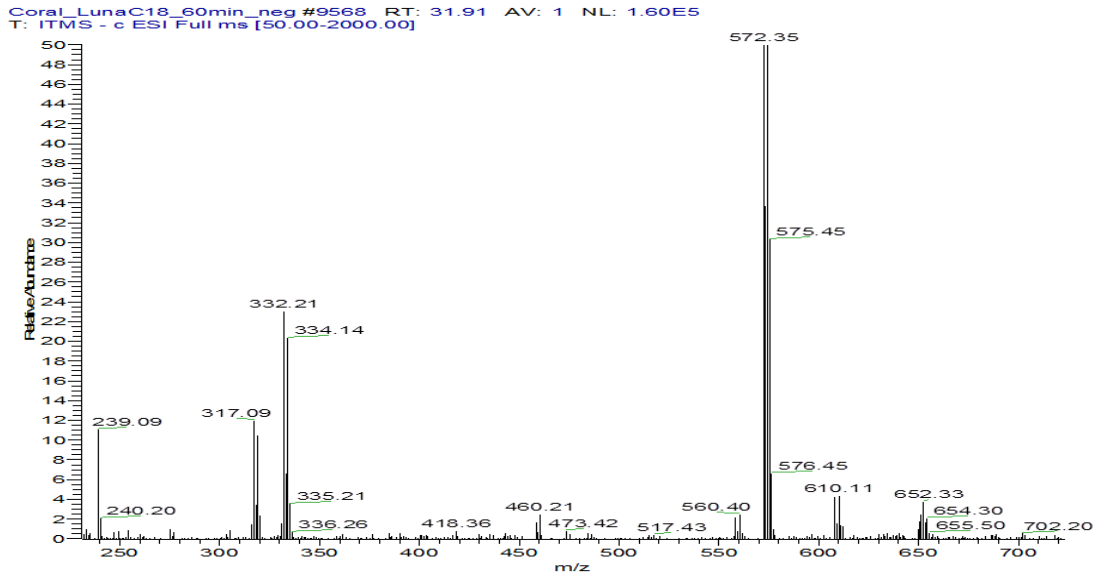


Figura 13. Espectro de massas da substância detectada no pico IX (NI).

O pico (X) (RT 33,67 min) (NI) exibiu sinais em  $m/z$  650/652/654  $[M]^+/[M+2]^+/[M+4]^+$  e sinais em  $m/z$  317/319 (5) e em  $m/z$  332/334 (6), sugerindo a presença de outro aduto isomérico formado pelas moléculas 5 e 6 (Figura 14).

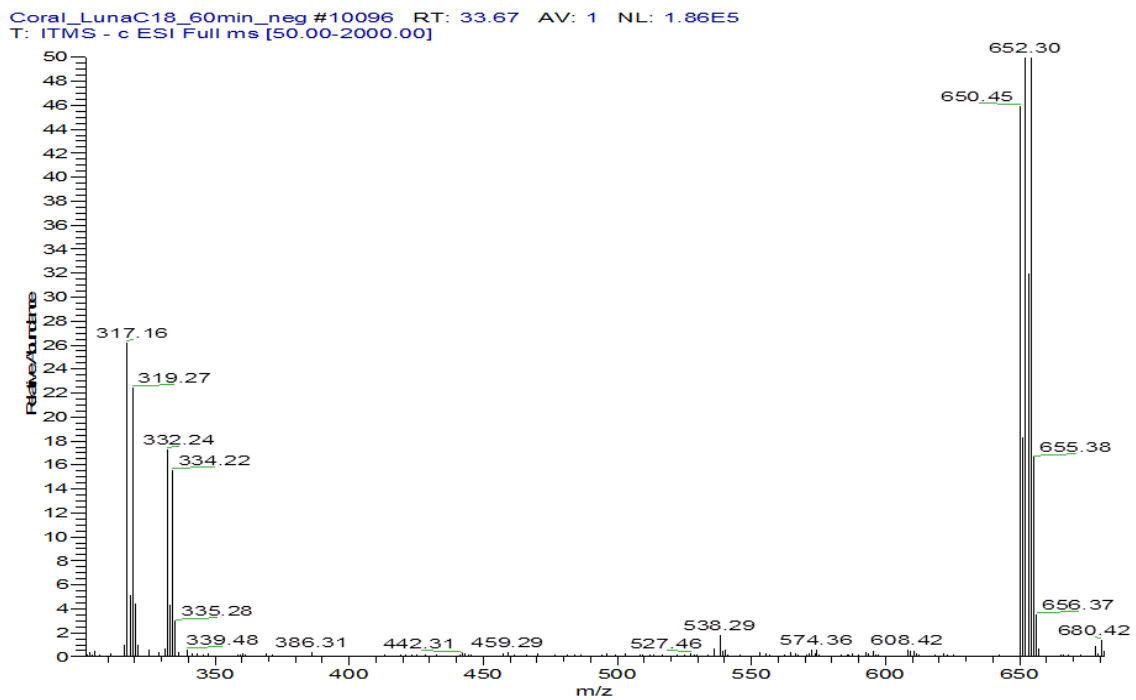


Figura 14. Espectro de massas da substância detectada no pico X (NI).

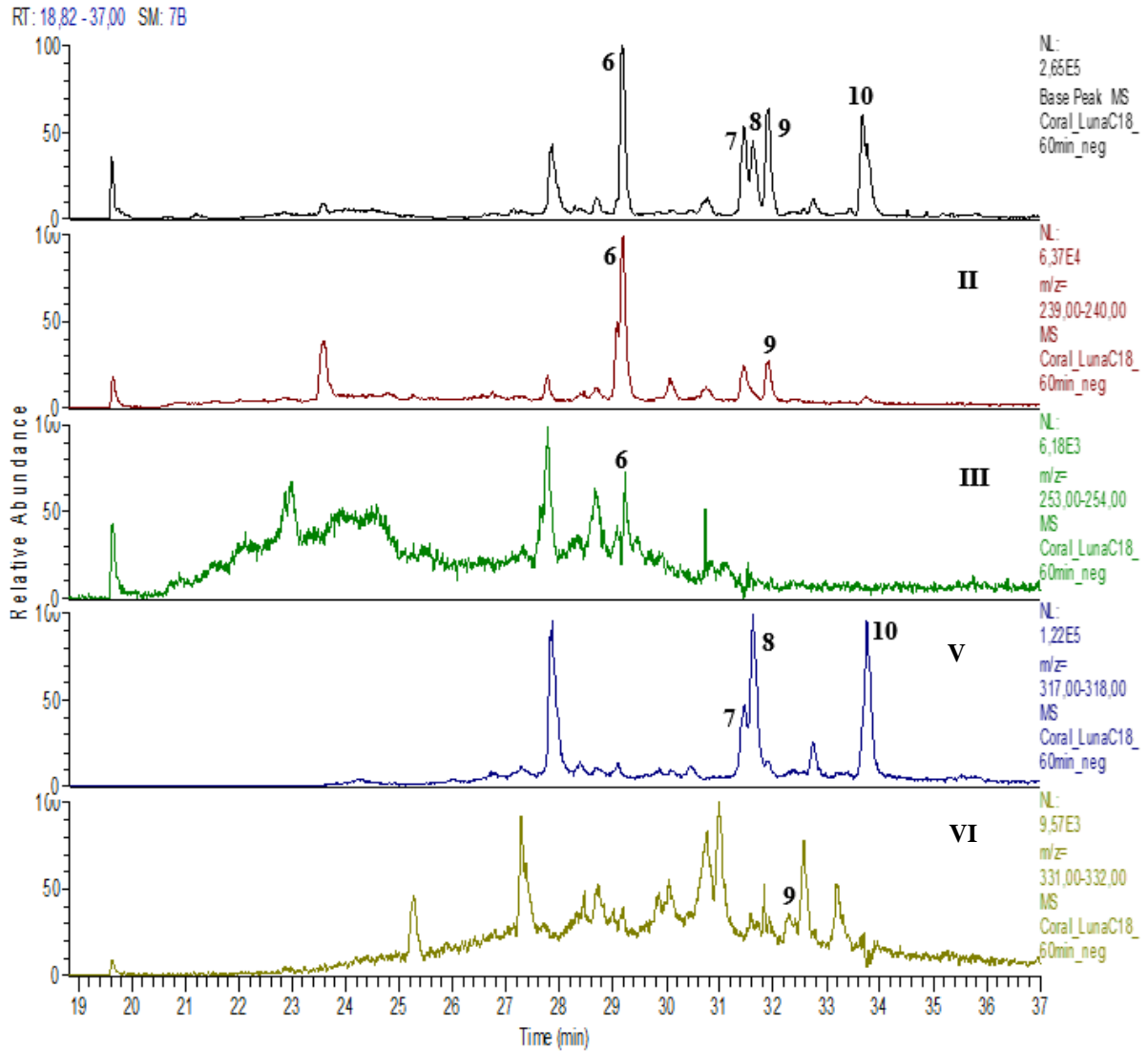
Os demais picos apresentam padrões de fragmentação similares àqueles descritos, sugerindo que a maioria dos componentes presentes no extrato MeOH-TtS de *Tubastraea tagusensis* é formada principalmente por adutos entre as substâncias **2, 3, 5 e 6** (Tabela 1). Devido à possibilidade de várias interações entre as moléculas **1-6** é possível a formação de diversas combinações, incluindo a formação de isômeros (Tabela 2). Não foi possível identificar adutos formados pelas moléculas **1** ou **4**.

**Tabela 2.** Substâncias identificadas através de HPLC-ESI-IT-MS no extrato MeOH-TtS, com base nas moléculas descritas por Carpes *et.al* (2019, Tabela 1).

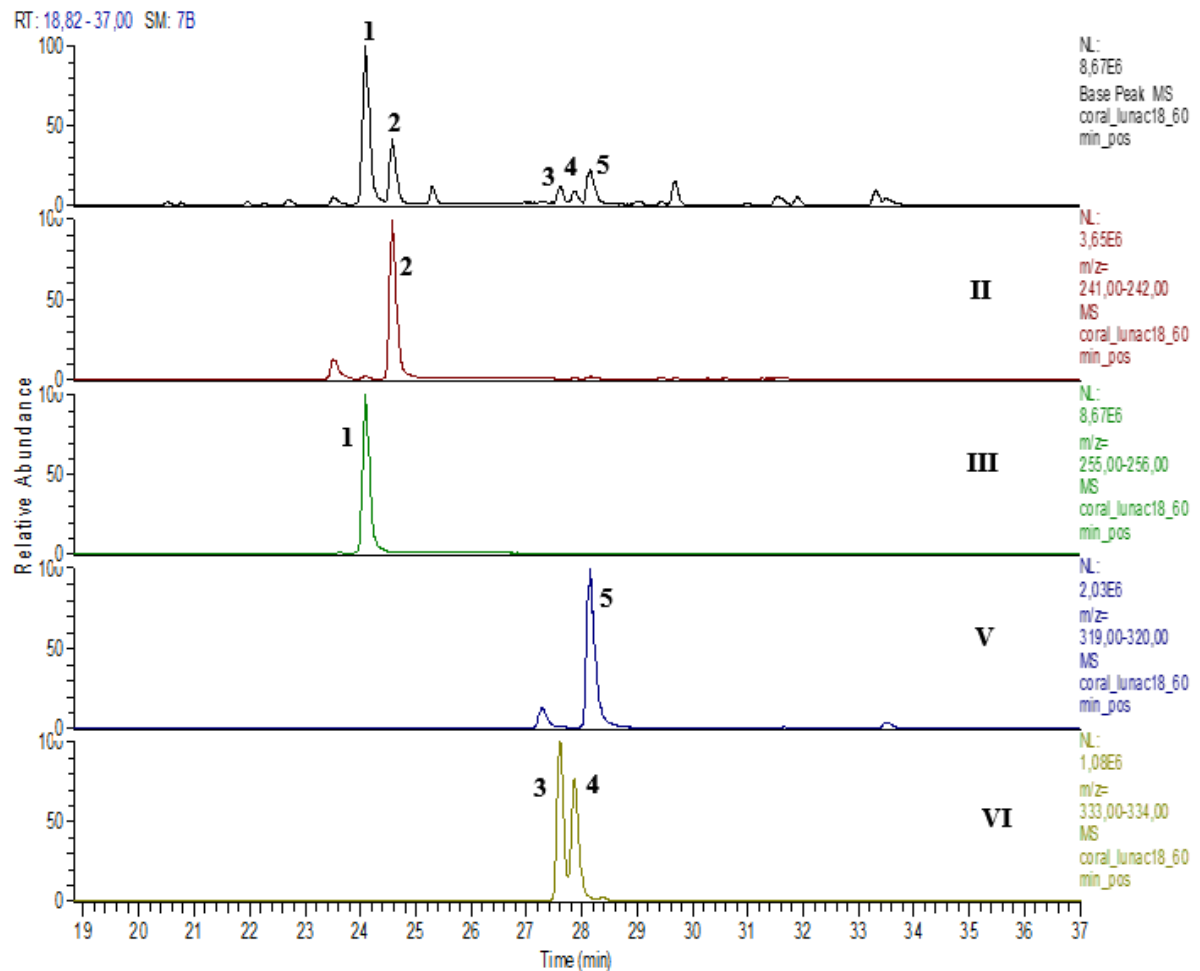
Substância	RT (min)	Modo Positivo [M+H] <sup>+</sup>	Modo Negativo [M-H] <sup>-</sup>	Outros íons observados	Molécula correspondente
I	24.09	255			3
II	24.57	241			2
III	27.60	333/335			6
IV	27.86	333/335			6
V	28.15	319/321			5
VI	29.18		493	254, 239	2+3
VII	31.45		572/574	317/319, 254	3+5
VIII	31.62		572/574	317/319	3+5
IX	31.91		572/574	332/334, 239	2+6
X	33.67		650/652/654	332/334, 317/319	5+6

O cromatograma dos íons extraídos (Figuras 15 e 16) também complementa os dados gerados pelas análises por *HPLC-ESI-IT-MS*. Assim, além dos adutos já mencionados, observa-se a formação de outros similares. Esta é uma análise que precisa ser feita com cuidado, tendo em vista que 1) o equipamento faz suas próprias marcações dos tempos de retenção e que podem sofrer pequenas variações; 2) há variação na intensidade dos cromatogramas de íons extraídos; 3) há sobreposição de vários picos que não puderam ser resolvidos cromatograficamente. No entanto, essa análise deixa claro que em *T. tagusensis* foram formados vários adutos provenientes

das unidades **2**, **3**, **5** ou **6**, resultado este diferente daquele reportado por Carpes *et al.*, 2019 (Tabela 1) que detectaram apenas a presença das unidades monoméricas.



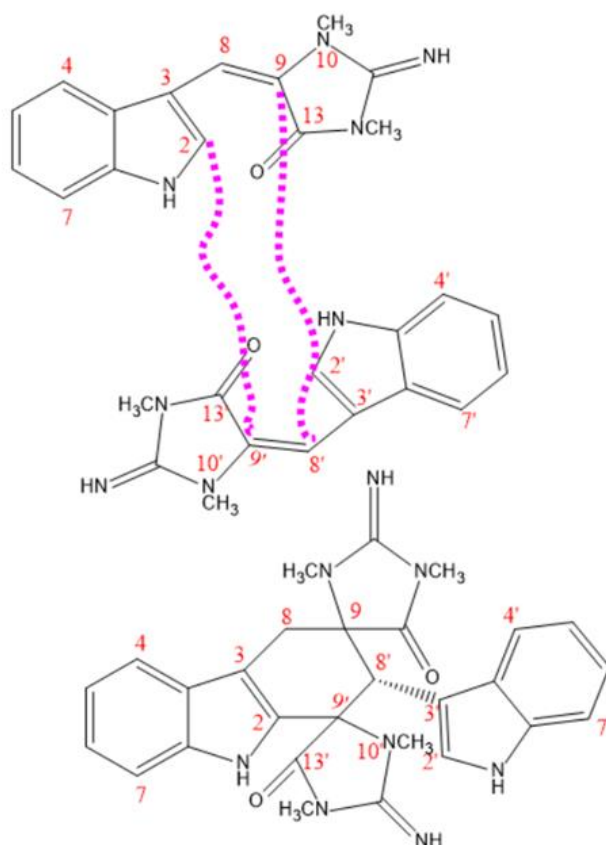
**Figura 15.** Cromatogramas de íons extraídos dos íons referentes às substâncias **II** ( $m/z$  239), **III** ( $m/z$  253), **V** ( $m/z$  317) e **VI** ( $m/z$  331) obtidas após análise por HPLC-ESI-IT-MS do extrato MeOH-TtS de *Tubastraea tagusensis* no modo negativo (NI).



**Figura 16.** Cromatogramas de íons extraídos dos íons referentes às substâncias **II** ( $m/z$  241), **III** ( $m/z$  255), **V** ( $m/z$  319) e **VI** ( $m/z$  333) obtidos após análise por *HPLC-ESI-IT-MS* do extrato MeOH-TtS de *Tubastraea tagusensis* em modo positivo (PI).

Neste parágrafo, daremos apenas um breve panorama de como tais adutos poderiam ser formados, mas não é o escopo deste trabalho nos aprofundarmos nesse tipo de análise. Esses adutos podem ser gerados por reações pericíclicas (SMITH & MARCH, 2007), conforme esquematizado na figura 17. Ela representa a formação de um aduto entre duas unidades de **3**. É relevante observar que, teoricamente, existem diversas possibilidades de configuração das ligações duplas *Z* e *E* dos monômeros, conforme apresentado por Bialonska & Zjawiony (2009), bem como da aproximação entre as duas unidades (FACES *Re* e *Si*), de forma que não é surpreendente a detecção de vários adutos em *T. tagusensis*. Ademais, apesar de que a Teoria dos Orbitais Moleculares prevê que tais adutos podem ser formados apenas por via térmica - e não

fotoquímica (SMITH & MARCH, 2007), a ligação dupla dos monômeros **1-6** pode ser afetada pela radiação ultravioleta (BIALONSKA & ZJAWIONY, 2009), provocando isomerização e aumentando a possibilidade de formação de vários tipos de adutos.



**Figura 17.** Esquemática das reações pericíclicas dos adutos.

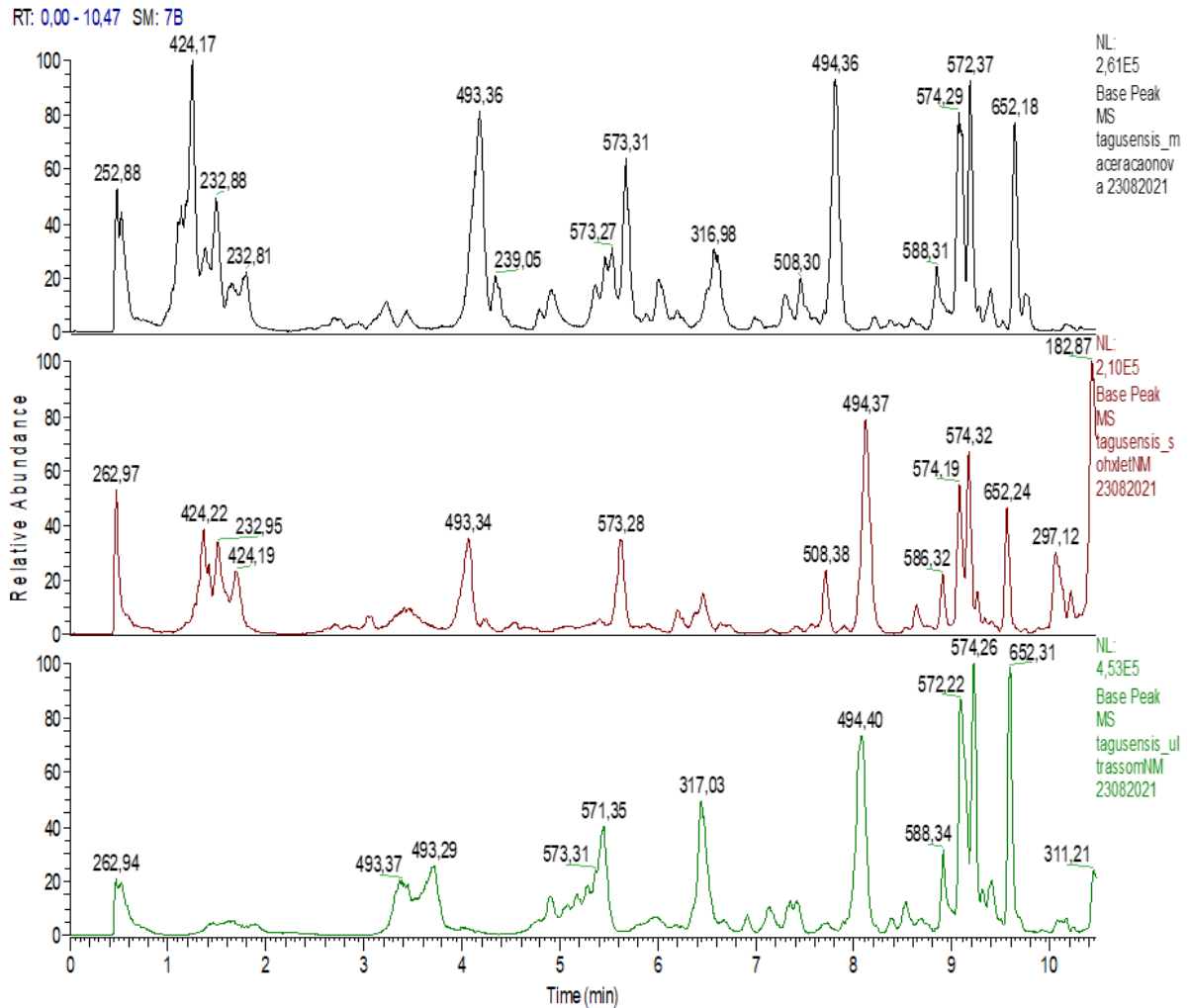
O aprofundamento das análises estruturais é importante, pois a literatura reporta que o isômero *trans* da metilaplisinopsina possui atividade neurotransmissora muito maior do que o isômero *cis* (BAKER & WELLS, 1981). Essa fotoisomerização também é reportada como um possível mecanismo de defesa desses corais contra a excessiva incidência de radiação ultravioleta, que poderia afetar as populações que vivem em águas pouco profundas (BIALONSKA & ZJAWIONY, 2009). Substâncias desse tipo foram isoladas por Koh *et al.* (2000) de *T. faulknerii* (um dímero formado entre duas unidades de **5**) e por Iwagawa *et al.* (2003), de *Tubastraea sp.* (adutos entre **3** e **5**, um dímero de **3** e um aduto entre **3** e uma aplesinona).

Além disso, existe também a possibilidade de isômeros ópticos de derivados semelhantes a **1-6** (Ex.: hidroxilados na posição 3), como os diversos enantiômeros isolados de *Fascaplysinopsis reticulata* (WANG *et al.*, 2019).

Outro aspecto interessante da química dos derivados das aplisinopsinas é que a cicloadição [2+2], ou seja, das duplas *Z* e *E* também é possível. Ela não ocorre espontaneamente induzida por luz, mas ocorre quando catalisada por DNA, formando derivados com anéis ciclobutânicos (DUCHEMIN *et al.*, 2018).

No extrato metanólico de *Tubastraea tagusensis* coletado na Ilha dos Macacos, Ilha Grande - Rio de Janeiro (S 23°04,578' - W 44°14,129') foram descritas apenas substâncias monoméricas, e não adutos ou dímeros (CARPES *et al.*, 2019). No presente estudo, no qual as colônias de *T. tagusensis* foram originárias da Ilha de Búzios - São Sebastião - São Paulo (23°48'44" S 45°09'03" W), encontramos substâncias com adutos formados a partir de duas unidades de derivados das aplisinopsinas. É possível que essa diferença possa ser explicada pela alteração fisiológica que ocorre em organismos marinhos, em resposta às condições biológicas e geográficas de um ambiente específico, o que conseqüentemente leva à alteração de sua composição metabólica de forma quali e quantitativa (CARROLL *et al.*, 2022; CABRITA *et al.*, 2010; GARSON, 1989).

Contudo, para descartar a hipótese de que tais adutos fossem formados pelo método de extração (Soxhlet) utilizado, devido à fonte de calor necessária para aquecer o solvente de extração, dois outros extratos foram obtidos: um a partir de maceração (MeOH-TtM) e outro usando banho ultrassônico (MeOH-TtU). Esses extratos foram preparados em temperatura ambiente e ao abrigo de luz e, ao serem analisados por *UPLC-ESI-IT-MS*, apresentaram perfis cromatográficos e fragmentações semelhantes às do extrato MeOH-TtS, obtido por Soxhlet (Figura 18). Embora tenham sido observadas pequenas diferenças nos perfis cromatográficos obtidos para os três tipos de extração, a maioria dos picos possui íons  $[M-H]^-$  compatíveis com a formação de adutos semelhantes aos descritos anteriormente para o extrato MeOH-TtS. Conseqüentemente, infere-se que os adutos detectados não são artefatos provenientes do processo de extração.



**Figura 18.** Cromatogramas obtidos pelas análises por UPLC-ESI-IT-MS dos extratos de *Tubastraea tagusensis* obtidos por maceração (acima), soxhlet (no meio) e ultrassom (embaixo). Acima de cada pico foram anotados os íons [M-H].

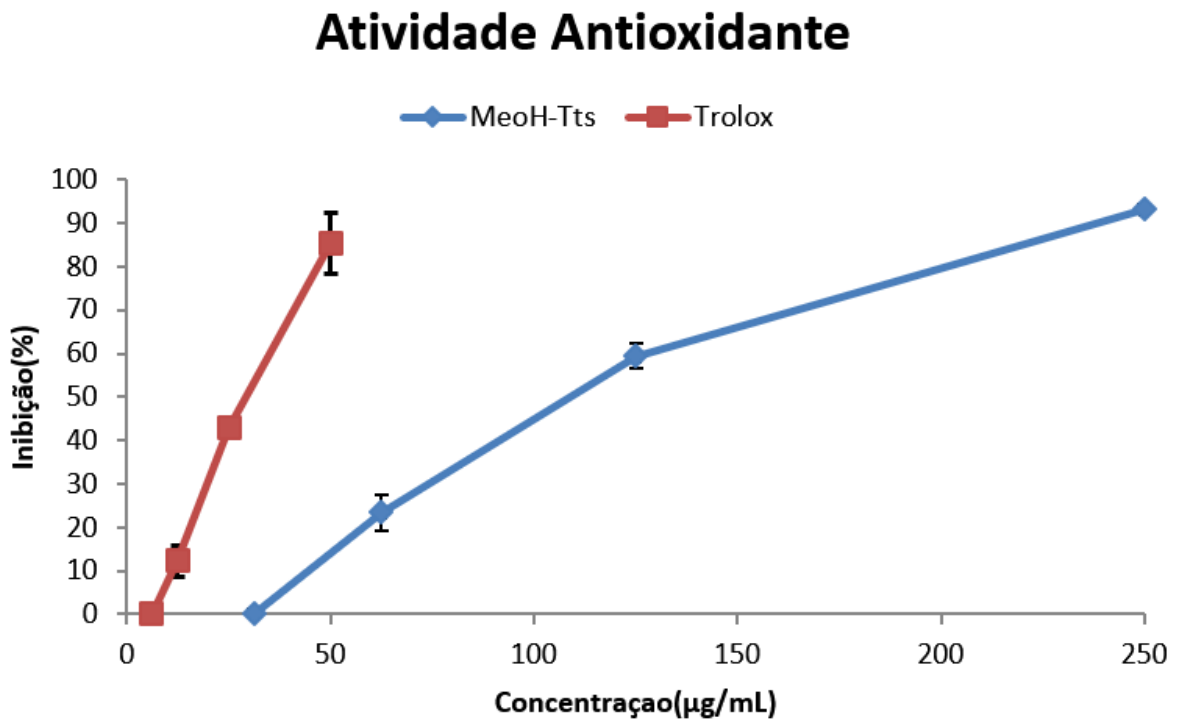
### 4.3 Avaliação da Atividade Antioxidante.

Dentre as atividades biológicas já estudadas em PNM, corais apresentam também relevante potencial antioxidante (MATULJA *et al.*, 2021; VLADKOVA *et al.*, 2022).

O ensaio colorimétrico com DPPH do extrato MeOH-TtS de *T. tagusensis* apresentou  $Ec_{50}$  de 101  $\mu\text{g/mL}$ , atingindo a inibição máxima do potencial oxidativo de DPPH na concentração 250  $\mu\text{g/mL}$ , com inibição de 93% (Tabela 3).

**Tabela 3.** Avaliação da atividade antioxidante do extrato MeOH-TtS *Tubastraea tagusensis* e de Trolox (padrão). Experimento realizado em triplicata  $\pm$  desvio padrão.

<i>T. tagusensis</i>		Trolox	
Concentração (ug/mL)	Inibição (%)	Concentração (ug/mL)	Inibição (%)
31,25	0 $\pm$ 0,99	6,125	0 $\pm$ 1,46
62,5	23,37 $\pm$ 2,78	12,5	12,32 $\pm$ 3,61
125	59,44 $\pm$ 4,02	25	42,85 $\pm$ 1,24
250	93,19 $\pm$ 1,12	50	85,32 $\pm$ 7,0
EC <sub>50</sub>	101,00 ug/mL	EC <sub>50</sub>	24,79 ug/mL



**Figura 19.** Curva de inibição do potencial oxidativo de MeOH-TtS e do padrão Trolox.

O ensaio com DPPH com duas substâncias encontradas no extrato metanólico do coral *Montipora digitata* apresentou inibição de 25% e 35% na concentração 1 mg/mL (KODANI *et al.*, 2013), enquanto que o extrato DCM/MeOH 3:1 de *Eunicella cavolini* apresentou EC<sub>50</sub> de 963,67 ug/mL (MATULJA *et al.*, 2021). Quanto às algas, reconhecidas por sua atividade antioxidante, o extrato em diclorometano de *Bifurcaria*

*bifurcata* mostrou  $EC_{50}$  de 43,34  $\mu\text{g/mL}$  (SILVA *et al.*, 2019), e o extrato metanólico *Undaria pinnatifida* apresentou  $EC_{50}$  de 18,08  $\text{mg/mL}$  (LEE *et al.*, 2022). Por sua vez, o extrato metanólico do pepino do mar *Holothuria scabra* apresentou  $EC_{50}$  de 33,77  $\mu\text{g/mL}$  (NOBSATHIAN *et al.*, 2017).

A literatura reporta que a molécula 6-bromo-2'-de-N-metilaplisinopsina (5), detectada no extrato MeOH-TtS (RT 28,15 min), possui  $EC_{50}$  18  $\mu\text{M}$  (UTKINA, 2009), o que é um resultado muito bom para atividade antioxidante e auxilia a compreender os resultados da atividade antioxidante de MeOH-TtS.

Espécies marinhas podem apresentar variação na composição e capacidade antioxidante quando desenvolvidas em condições ambientais diferentes. Isso pode ocorrer devido às influências bióticas como, por exemplo, diferentes condições de temperatura e presença de predadores, ou ainda por influências bióticas, como relata o estudo de Liao *et al.* (2021), que, na presença de contaminantes (microplástico), corais da espécie *Tubastraea aurea* sofreram impactos fisiológicos significativos, consequentemente afetando seu potencial antioxidante (VLADKOVA *et al.*, 2022; LIAO *et al.*, 2021). Assim, no caso de *Tubastraea tagusensis*, a presença majoritária dos adutos das apolisinopsinas pode alterar substancialmente a atividade antioxidante do extrato, quando comparado com aqueles que possuem apenas as unidades monoméricas.

#### 4.4 Toxicidade aguda em Zebrafish.

Para avaliar a toxicidade do extrato MeOH-TtS, utilizamos testes com Zebrafish de acordo com o protocolo Test Guideline, 203, OECD (2019). Devido ao baixo custo e às características fenotípicas do animal, *Danio rerio* é atualmente considerado um modelo promissor para pesquisas farmacológicas (LIRA *et al.*, 2020). As três concentrações de extrato MeOH-TtS de *Tubastraea tagusensis* (0,1  $\text{mg/mL}$ , 0,5  $\text{mg/mL}$  e 1  $\text{mg/mL}$ ) testadas não apresentaram toxicidade aguda em indivíduos adultos de Zebrafish, pois não houve nenhuma mortalidade ( $n=10/\text{concentração}$ ) durante o período de 96 horas após o tratamento. Assim, este ensaio indica, de maneira preliminar, que o uso do extrato MeOH-TtS pode ser potencialmente seguro como fonte de novas moléculas para o desenvolvimento de fármacos.

As aplisinopsinas apresentam grande potencial para uso em fármacos por possuírem atividades antimicrobianas, antiplasmódicas e alta citotoxicidade, e se destacam principalmente como moduladores de neurotransmissores. A inibição da captação de serotonina e da noradrenalina por neurotransmissores é responsável pelo efeito antidepressivo. Estudos *in vivo* e *in vitro* com aplisinopsinas mostraram resultados interessantes relacionados à inibição da captação de serotonina, assim como a amplificação de liberação desse hormônio (BIALONSKA & ZJAWIONY, 2009).

Estudos com extrato metanólico do coral *Tubastraea faulkneri*, composto por derivados de aplisinopsinas, apresentaram atividade antimicrobiana contra *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *Photobacterium damsela*, *Alteromonas rubra* e *Synechococcus* sp. Além disso, aplisinopsinas apresentaram atividade antimalárica contra clones D6 de *Plasmodium falciparum*, e ação antitumoral em ensaios bioguiados contra leucemia linfocítica P388 e citotoxicidade contra P338 em camundongos, além da inibição de crescimento celular de LH-12220 (BIALONSKA & ZJAWIONY, 2009).

O estudo de Koh & Sweatman (2000) mostra que um dímero de aplisinopsinas, semelhante aos adutos encontrados no extrato MeOH-TtS, apresentou atividade antimicrobiana contra *Synechococcus* sp, criando um halo de inibição de 4,5 mm na concentração de 96 µg. Esse resultado demonstra a importância do estudo de atividades biológicas acerca dos adutos encontrados.

Assim, as aplisinopsinas e seus derivados apresentam grande potencial para atividades farmacológicas. Por isso, é de grande importância dar continuidade ao estudo que tem por finalidade aumentar o entendimento da composição química de *Tubastraea tagusensis*, a fim de buscar novas moléculas com potenciais biológicos para o suprimento de necessidades farmacológicas atuais. Isso poderia se dar por meio do isolamento de tais adutos, mas que está fora do escopo desta dissertação.

## 5 CONCLUSÃO

No presente estudo, foram encontrados, no extrato metanólico de *Tubastraea tagusensis*, adutos formados por duas unidades de derivados de aplisinopsinas, resultado diferente daquele encontrado por Carpes e seus colaboradores (2019). Tais adutos apresentam alta complexidade e não são artefatos provenientes do método de extração. Além disso, o extrato metanólico obtido por meio de Soxhlet, apresentou atividade antioxidante significativa, com  $Ec_{50} = 101,00$  ug/mL, no teste realizado com DPPH, e não apresentou toxicidade aguda em Zebrafish (*Danio rerio*). O conjunto desses resultados indica que a capacidade invasiva do coral-sol, *Tubastraea tagusensis*, pode ser racionalmente utilizada para gerar uma nova fonte a prospecção de bioprodutos com atividades biológicas relevantes.

## 6 REFERÊNCIAS

ALTMANN, Karl-Heinz. Drugs from the oceans: Marine natural products as leads for drug discovery. **Chimia**, v.71, n.10, p.646–651, 2017.

BAKER, J.T.; WELLS, R.J. Biological active substances from Australian marine organisms. **Natural Products as Medicinal Agents**, p. 281,1981.

BAUER, K.; PUYANA, M.; CASTELLANOS, L.; TELLO, E. New diterpenes isolated from the colombian caribbean soft coral *Pseudoplexaura flagellosa* and their cytotoxic properties. **Records of Natural Products**, v.13, n.3, p.243–253, 2018.

BERLINCK, R, G, S.; BORGES, W de S.; SCOTTI, M, T.; VIEIRA, P, C. A Química de Produtos Naturais do Brasil no Século XXI. **Química Nova**, v.40, n.6, p.706–710, 2017.

BIALONSKA, D.; ZJAWIONY, J, K. Aplysinopsins-Marine Indole Alkaloids: Chemistry, Bioactivity and Ecological Significance. **Marine Drugs**, v.7, p.166-183, 2009.

CABRITA, M, T.; VALE, C.; RAUTER, A, P. Halogenates Compounds from Marine Algae. **Marine Drugs**, v.8, p. 2301-2317, 2010.

CARPES, R, M.; ALVES, M, A.; CREED, J, C.; SILVA, C, A.; HAMERSKI, L.; GARDEN, S, J.; FLEURY, B, G.; FELZENSZWALB, I. Mutagenic, genotoxic and cytotoxic studies of invasive corals *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*. **Journal of Applied Toxicology**, p.1-15, 2019.

CARPES, R, M.; ALVES, M, A.; CREED, J, C.; SILVA, C, A.; HAMERSKI, L.; GARDEN, S, J.; FLEURY, B, G.; FELZENSZWALB, I. Mutagenic, genotoxic and cytotoxic studies of invasive corals *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*. **Journal of Applied Toxicology** - Material Suplementar, 2019.

CARROL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A.; KEYZERS, R. A.; PRINSEP, M. R.; Marine Natural Products. **Natural Products Report**, v.39, p. 1122-1171, 2022.

DOS SANTOS, L. A. H.; RIBEIRO, F, V.; CREED, J, C. Antagonism between invasive pest corals *Tubastraea* spp. and the native reef-builder *Mussismilia hispida* in the southwest Atlantic. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 449, p.69-76, 2013.

DUCHEMIN, N.; SKIREDJ, A.; MANSOT, J.; LEBLANC, K.; VASSEUR, J, J.; BENIDDIR, M. A.; EVANNO, L.; POUPON, E.; SMIETANA, M.; ARSENIYADIS, S. DNA-Templated [2+2] Photocycloaddition: A Straightforward Entry into the

Aplysinopsin Family of Natural Products. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 57, n. 36, p. 11786-11791, 2018.

ELKHAWAS, Y, A.; ELISSAWY, A, M.; ELNAGGAR M, S. et al. Chemical Diversity in Species Belonging to Soft Coral Genus *Sacrophyton* and Its Impact on Biological Activity: A Review. **Marine Drugs**, v.18, n.41, 2020.

FDA- U.S FOOD & DRUG ADMINISTRATION- Orange Book: Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/index.cfm>. Acesso em Agosto de 2022.

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

KODANI, S.; SATO, K.; HIGUCHI, T.; CASARETO, B,E.; SUZUKI, Y. Motiporic acid D, a new polyacetylene carboxylic acid from scleractinian coral *Montipora digitata*. **Natural Products Research: Formerly Natural Products Letters**, v.27, n. 20, p.1859-1862, 2013.

GARSON, M, J. Biosynthetic studies on marine natural products. **Natural Products Reports**, n.2, 1989.

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

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

IWAGAWA, T.; MIYAZAKI, M.; OKAMURA, H.; NAKATANI, M.; DOE, M.; TAKEMURA, K. Three novel bis(índole) from a stony coral, *Tubastraea* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 2533-2535, 2003.

ICMBIO. “**Expedição retira 123kg de coral-sol em Alcatrazes**”. 2019. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/portal/ultimas-noticias/20-geral/10284-expedicao-retira-123-kg-de-coral-sol-em-alcatrazes>. Acesso em: 14 de abr de 2020.

KHALIFA S, A, M.; ELIAS, N.; FARAG, M, A. et al. Marine Natural Products: A Source of Novel Anticancer Drugs. **Marine Drugs**, v.17, n.9, p.491, 2019.

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

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; PINTO, A. C.; CREED, J. C. Chemical defenses against generalist fish predators and fouling organisms in two invasive ahermatypic corals in the genus *Tubastraea*. **Marine Ecology**, v.31, p.473-482, 2010.

LAGES, B. G.; FLEURY, B. G.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C.; CREED, J. C. Proximity to competitors changes secondary metabolites of non-indigenous cup corals, *Tubastraea* spp., in the southwest Atlantic. **Marine Biology**, v.159, n.7, p.1551–1559, 2012.

LEE, H.; KIM, J.; JEONG, J.; PARK, S. M.; SATHASIVAM, R.; LEE, S. Y.; KIM, C. S. Effect of Different Solvents on the Extraction of Compounds from Different Parts of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. **Journal of Marine Science and Engineering**, v.10, p.1193, 2022.

LIAO, B.; WANG, J.; XIAO, B.; YANG, X.; XIE, Z.; LI, D.; LI, C. Effects of acute microplastic exposure on physiological parameters in *Tubastraea aurea* corals. **Marine Pollution Bulletin**, v. 165, 2021.

LIRA, S. M.; DIONÍSIO, A. P.; HOLANDA, M. O.; MARQUES, C. G.; DA SILVA, G. S.; CORREA, L. C.; ... & ZOCOLO, G. J. Metabolic profile of pitaya (*Hylocereus polyrhizus* (FAC Weber) Britton & Rose) by UPLC-QTOF-MSE and assessment of its toxicity and anxiolytic-like effect in adult zebrafish. **Food Research International**, v.27, p. 108701, 2020.

MAGALHÃES, F. E. A.; SOUSA, C. A. P. B.; SANTOS, S. A. A. R.; MENEZES, R. B.; BATISTA, F. L. A.; ABREU, A. O.; OLIVEIRA, M. V.; MOURA, L. F. W. G.; RAPOSO, R. S.; CAMPOS, A. R. Adult Zebrafish (*Danio rerio*): An Alternative Behavioral Model of Formalin- Induced Nociception. **Zebrafish**, v.14, n. 5, p. 422-429, 2017.

MALVE, Harshad. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. **Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences**, v.8, n.2, p.83-91, 2016.

MARTINS, A.; VIEIRA, H.; GASPAR, H.; SANTOS, S. Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 1066, 2014.

MATULJA, D.; GRBČIĆ, P.; BOJANIĆ, K.; TOPIĆ-POPOVI, N.; ČOŽ-RAKOVAC, R.; LACLEF, S.; ŠMUC, T.; JOVIĆ, O.; MARKOVIĆ, D.; PAVELIĆ, S, K. Chemical Evaluation, Antioxidant, Antiproliferative, Anti-Inflammatory and Antibacterial Activities of Organic Extract and Semi-Purified Fractions of the Adriatic Sea Fan, *Eunicella cavolini*. **Molecules**, v, 26, p.5751, 2021.

MATULJA, D.; VRANJESEVIC, F.; MARKOVIC, M, K.; PAVELIC, S, K.; MARKOVIC, D. Anticancer Activities of Marine-Derived Phenolic Compounds and Their Derivaties. **Molecules**, v. 27, p.1449, 2022.

MIRANDA, R. J.; CRUZ, I. C. S.; BARROS, F. Effects of the alien coral *Tubastraea tagusensis* on native coral assemblages in a southwestern Atlantic coral reef. **Marine Biology**, v.163, n. 45, 2016.

MOLLO, Ernesto. Chansing Chances in a Changing Sea. **Marine drugs**, v. 20, p. 311, 2022.

NOBSATHIAN, S.; TUCHINDA, P.; SOBHON, P.; TINIKUL, Y.; POLJAROEN, J.; TINIKUL, R.; SROYRAYA, M.; POOMTON, T.; CHAICHOTRANUT,S. An antioxidant activity of the whole body of *Holothuria scabra*. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v.4, n.4, 2017.

NURCHOLIS, W.; PUTRI, D. N. S.; HUSNAWATI, H.; AISYAH, S.; PRISOERYANTO, B, P. Total flavonoid content and antioxidant activity of ethanol and ethyl acetate extracts from accessions of *Amomum compactum* fruits. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 66, p.58-62, 2021.

OECD. **Test Guideline No. 203**. Fish, Acute Toxicity Testing, 2019.

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

SANTOS, H. S.; SILVA, F. G. C.; MAIS, B. P.; FLEURY, B. G.; CREED, J. C. Environmental matching used to predict range expansion of two invasive corals (*Tubastraea* spp.). **Marine Pollution Bulletin**, v.145, p.587–594, 2019.

SHINDE, P.; BANERJEE, P.; MANDHARE, A. Marine natural products as source of new drugs: a patent review (2015–2018). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v.29, n.4, 2019.

SILVA, J.; ALVES, C.; FREITAS, R.; MARTINS, A.; PINTEUS, S.; RIBEIRO, J.; GASPAR, H.; ALFONSO, A.; PEDROS, R. Antioxidant and Neuroprotective Potential of the Brown Seaweed *Bifurcaria bifurcata* in na in vitro Parkinson's Disease Model. **Marine Drugs**, v.17, p.85, 2019

SILVA, A. G.; LIMA, R. P.; GOMES, A. N.; FLEURY, B. G.; CREED, J. C. Expansion of the invasive corals *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis* into the Tamoios Ecological Station Marine Protected Area, Brazil. **Aquatic Invasions**, v.6, n.1, p.105-110, 2011.

SILVA, R.; VINAGRE, C.; KITAHARA, M. V.; ACORSI, I. V.; MIZRAHI, D.; FLORES, A. A. V. Sun coral invasion of shallow rocky reefs: effects on mobile invertebrate assemblages in Southeastern Brazil. **Biological Invasions**, v.21, p.1339-1350, 2019.

SIMTH, M. B.; MARCH, J. March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure. 6th. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience, 2007. ISBN: 978-0471720911.

SIMMONS, T. L.; ANDRIANASOLO, E.; MCPHAIL, K.; FLATT, P.; GERWICK, W, H. Marine natural products as anticancer drugs. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.4, n.2, p.333–342, 2005.

UTIKINA, N. K. Antioxidant activity of aromatic alkaloids from the marine sponges *Aptos aptos* and *Hyrtios* SP. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 6, p. 849–853, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10600-010-9490-z>.

VIEIRA, V. M. da M.; OHAYON, P. Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P & D. Revista **Economia & Gestão**, v.6, n.13, p.60–82, 2006.

VLADKOVA, T.; GEORGIEVA, N.; STANEVA, A.; GOSPODINOVA, D. Recent Progress in Antioxidant Active Substances from Marine Biota. **Antioxidants**, v. 11, n. 3, p. 439, 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11030439>.

VOULTSIADOU, Eleni. Sponges: An historical survey of their knowledge in Greek antiquity. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v.87, n.6, p.1757–1763, 2007.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant Drug Analysis**. 1.ed. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, 1984.

WANG, Q.; TANG, X.; LUO, X.; VOOG, N, J.; LI, P.; LI, G. Aplysinsin-type and Bromotyrosine-derived Alkaloids from the South China Sea Sponge *Fascaplysinsinopsis reticulata*. **Scientific Reports**, v.9, p. 2248, 2019.

WANG, S. K.; DUH, C, Y. New cytotoxic cembranolides from the soft coral *Lobophytum michaelae*. **Marine Drugs**, v.10, n.2, p.306–318, 2012.

WORMS. WoRMS táxon details- *Tubastraea tagusensis* Wells, 1982. Disponível em:<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=291256#distributions>. Acesso em:13 de maio de 2020.