

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

TATIANA DA ROSA GUIMARÃES MACIEL

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE PRODUTOS
NATURAIS MARINHOS: ESTUDO BIOGUIADO DE *Petromica
citrina***

DOUTORADO

Florianópolis
2015

Tatiana da Rosa Guimarães Maciel

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE PRODUTOS
NATURAIS MARINHOS: ESTUDO BIOGUIADO DE *Petromica
citrina***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto

Coorientador: Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel

Florianópolis
2015

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

Maciel, Tatiana da Rosa Guimarães

Investigação Química e Biológica de Produtos Naturais
Marinhos : Estudo bioguiado de Petromica citrina /
Tatiana da Rosa Guimarães Maciel ; orientador, Flávio
Henrique Reginatto ; coorientador, Eloir Paulo Schenkel. -
Florianópolis, SC, 2015.
176 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Atividade
antiviral. 4. Petromica citrina. 5. Sulfato de halistanol.
I. Henrique Reginatto, Flávio . II. Paulo Schenkel, Eloir.
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

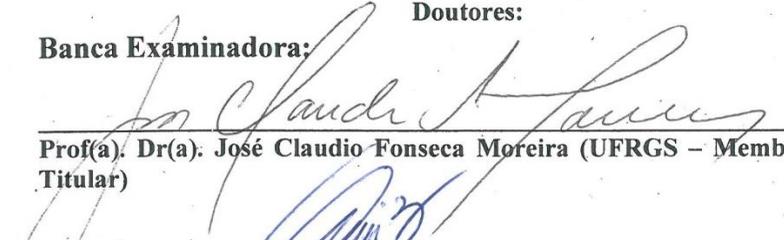
**“INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE
PRODUTOS NATURAIS MARINHOS: ESTUDO
BIOGUIADO DE Petromica citrina”**

POR

Tatiana da Rosa Guimarães Maciel

Tese julgada e aprovada em sua
forma final pelo(a) Orientador(a) e
membros da Banca Examinadora,
composta pelos Professores
Doutores:

Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). José Claudio Fonseca Moreira (UFRGS – Membro
Titular)



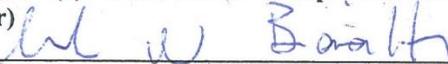
Prof(a). Dr(a). Luiz Carlos Kreutz (UPF – Membro Titular)



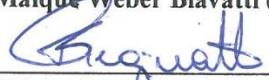
Prof(a). Dr(a). Carlos Roberto Zanetti (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Lilian Sibelle Campos Bernardes (UFSC – Membro
Titular)



Prof(a). Dr(a). Maique Weber Biavatti (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Flávio Henrique Reginatto (UFSC – Orientador)



Prof(a). Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 07 de agosto de 2015.

Dedico esse trabalho especialmente ao meu esposo, pais e irmãos que vivenciaram essa importante etapa da minha formação profissional com muita compreensão, confiança e incentivo. Vocês sempre me impulsionam em direção às vitórias.

AGRADECIMENTOS

“A beleza não está na partida nem na chegada, mas na travessia”.
(Guimarães Rosa)

Meu profundo agradecimento a todos aqueles que participaram desta etapa tão importante da minha vida e que contribuíram para que essa “travessia” fosse concretizada.

Em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto, que confiou na minha capacidade para desenvolver e conduzir o tema, sempre escutando e respeitando as minhas decisões. Dividimos nestes quatro anos muitos acertos e muitos erros inerentes às investigações, que foram vitais para minha formação, sobretudo pela forma franca como foi mantida essa parceria. Obrigado pela paciência, orientação, dedicação e principalmente pela amizade. Foi uma grande honra fazer parte do seu grupo de pesquisa.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel que participou de algumas fases deste trabalho me auxiliando quando era necessário. Tenho muita gratidão e admiração pela sua pessoa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC que contribuíram imensamente no meu aprendizado no decorrer desses anos: Prof^a. Dra. Cláudia Simões, Prof^a. Dra. Maique Biavatti, Prof^a. Dra. Miriam Falkenberg e Prof^a. Dra. Lilian Bernardes. Também agradeço ao Prof. Dr. Marcos Segatto e a Prof^a. Dra. Simone Cardoso que além de compartilharem seus ensinamentos nas disciplinas da pós-graduação, disponibilizaram gentilmente o espaço físico, assim como alguns equipamentos do Laboratório do Controle de Qualidade para que eu pudesse realizar os ensaios da avaliação antimicrobiana.

Ainda em relação a esses ensaios, agradeço a Andrea Koroishi e Cassandra Aresi por terem me repassado seus conhecimentos nessa área, os quais foram substanciais tanto para a conclusão da minha pesquisa, como na minha formação profissional. Foi uma experiência muito enriquecedora!

Ao Prof. Dr. Jorge Palermo e a Prof^a. Dra. Gabriela Cabrera, da Universidade de Buenos Aires, pela realização dos espectros de ressonância magnética nuclear e de massas. E ao Prof. Dr. Mario Steindel do Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina pelos ensaios de avaliação da atividade antiprotozoária durante os estudos de triagem.

Ao Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol pela colaboração nos ensaios dos modelos de sepse e pelas cepas de isolados clínicos. Obrigado por toda a sua atenção, dedicação e entusiasmo. E especialmente, à Larissa (“Lari”) que nestes últimos seis meses foi uma super parceira de trabalho e amiga, compartilhando todos os seus conhecimentos nos modelos de sepse. Obrigada por tudo.

Aqueles amigos que dividiram comigo o fascínio e os desafios do trabalho com Produtos Naturais Marinhos: Éverson, Simone, Maria Tereza, Cintia, Maria Isabel e João Carraro. Aprendi muito com cada um de vocês que

possuem um lugar muito especial no meu coração. Em especial a você “Si” que além de toda troca de experiência no laboratório, sempre me auxiliou nos momentos mais difíceis. Obrigada pela amizade e pela “proteção”, você é uma das pessoas mais humanas que conheço.

As minhas queridas e comprometidas alunas de iniciação científica, Francine e Luiza, que participaram de todas as etapas do trabalho com muita disposição e otimismo. Essa conquista também é de vocês, que mesmo naqueles dias cheios de provas e trabalhos e nas tão esperadas férias de verão não me “abandonaram”. Serei eternamente grata a vocês duas!

Às técnicas dos laboratórios Claudinha e Solange, que durante todo esse percurso foram muito carinhosas comigo. Obrigada por tudo.

Aos colegas Caroline Rigotto, Carlos Quiroz e Maiko Tonini pela realização das avaliações biológicas *in vitro* com as frações e substâncias isoladas de *Petromica*. Aos amigos e colegas que já passaram pelo laboratório e que hoje são exemplos em que me inspiro: Silvana, Claiton, Virginia, Andressa, Karen e Geison.

Aquelas pessoas que cruzaram o meu caminho no decorrer da pós-graduação e que direta ou indiretamente somaram na minha formação profissional: Solomon, Layzon, Vanessa, Tauana, Thalita, Alyne, Ana Luísa, Ana Philipus, Dani, Fabiana, Luiz, Lara, Jadel, Izabella, Fernanda Luiza, Fernanda Madoglio, Fernanda Martins, Lara, Gabi, Luise, Narjara, Rafael, Rafaela e Larissa. Será que faltou alguém? A todos!

Em especial agradeço aqueles que compartilharam comigo o cotidiano no Laboratório Farmacognosia e que mesmos nos dias mais “nublosos” conseguiram tornar tudo mais agradável: Carol, Águisson, Pâmela, Carlos e Vitor. Sentirei muita saudade de todos, principalmente de você minha amiga Carol, que juntamente com as minhas amigas Tamires e Ana Vieira, participaram de forma muito intensa desta caminhada profissional e pessoal. São tantos momentos em que brindamos os bons resultados das nossas pesquisas e das nossas conquistas particulares, que foram ditas palavras de força e encorajamento para superar as dificuldades, do ombro amigo em que enxugamos nossas lágrimas. Esses laços de amizade foram fundamentais para tornar essa trajetória tão especial.

Aos meus amados pais, Luiz Henrique e Tânia e aos meus irmãos, Vânia e Luizinho, que são as minhas bases. Só posso agradecer por ter nascido nessa família em que impera o amor, o respeito e admiração mútua. Essa conquista é também de vocês que vivenciaram todas as fases deste trabalho com palavras de estímulo e confiança! Também deixo registrado meu agradecimento ao meu cunhado Maurício por todo apoio.

Meu agradecimento mais profundo é dedicado à pessoa com que divido a minha vida: meu marido Thobias. Durante toda essa trajetória esteve o tempo todo torcendo pelo êxito deste trabalho, e principalmente nesses últimos três meses foi bastante compreensivo e companheiro. Amo muito você!

A Capes pelo apoio financeiro.

E a Deus que me fortalece todos os dias pela fé.

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que estamos sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar. Fazer da interrupção um novo caminho, fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro”.
(Fernando Sabino)

RESUMO

A esponja marinha *Petromica citrina* é considerada uma espécie nativa do Brasil encontrada na região sul e sudeste. Entre os compostos isolados neste gênero estão os sulfatos de halistanol (esteroides sulfatados) que se destacam por suas atividades antiviral e antimicrobiana. O presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial *in vitro* (atividade antiviral e antimicrobiana) e *in vivo* (modelos de indução da sepse) da fração *n*-butanólica (BF), da fração rica em halistanóis (TSH) e dos compostos isolados [sulfato de halistanol (HS) e sulfato de halistanol C (HS-C)]. O fracionamento bioguiado da fração BF foi realizado utilizando gel de permeação molecular (Sephadex LH-20) que, em um primeiro momento, proporcionou a obtenção da amostra bioativa TSH. Esta subfração foi submetida a novo processo cromatográfico com sílica de fase reversa, permitindo o isolamento do sulfato de halistanol (HS) e sulfato de halistanol C (HS-C), compostos estes identificados por ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (ESI). Os resultados gerados com os ensaios de avaliação da atividade antiherpética (HSV-1) da amostra TSH, apresentaram índice de seletividade (IS) igual a 15,33, valor este superior quando comparado às amostras HS (IS=2,46) e HS-C (IS=1,45). O potencial antimicrobiano das amostras TSH, HS e HS-C foram estabelecidos por meio das técnicas de difusão em disco, bioautografia e microdiluição, sendo constatada atividade frente a três cepas ATCC *S. aureus*, *E. faecalis* e *C. albicans*, além de três cepas de isolados clínicos bacterianos multirresistentes (*S. aureus*, MRSA e VRE), sobretudo para amostra TSH foram evidenciados valores de concentrações inibitórias mínimas promissoras frente as cepas MRSA (CIM=31,25 µg/mL) e VRE (CIM=62,5 µg/mL). Com base nos resultados de atividade antimicrobiana da amostra TSH, a mesma foi submetida a ensaios em modelos experimentais de indução de sepse (*in vivo*). A administração via intraperitoneal dessa amostra na dose de 12 mg/kg no modelo de pneumosepse foi capaz de retardar a morte dos animais. Contudo, no modelo de ligação e perfuração cecal (CLP) a amostra TSH não exerceu efeito na taxa de sobrevivência dos animais quando administrada na dose 33 mg/Kg.

Palavras-chaves: Atividade antimicrobiana. Atividade antiviral. *Petromica citrina*. Sepse. Sulfato de halistanol.

ABSTRACT

The marine sponge *Petromica citrina* is considered a native species found in south and southeast of Brazil. Among the compounds isolated at this genus are the halistanol sulfates (sulfated steroids), that showed antiviral and antimicrobial activities. The aim of this study was to evaluate the potential *in vitro* (antiviral and antimicrobial activity) and *in vivo* (sepsis model) of the *n*-butanol fraction (BF), halistanol enriched-fraction (TSH) and compounds isolated [halistanol sulfate (HS) and halistanol sulfate C (HS-C)]. Herein it was performed a chemical bioguided fractionation of BF fraction using gel permeation (Sephadex LH-20), as a first step to obtain bioactive TSH sample. This TSH fraction was then submitted to a new purification process by reversed phase chromatography yielding the halistanol sulfate (HS) and halistanol sulfate C (HS-C), that were identified by nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (ESI). The results of anti-herpetic activity (HSV-1) were significantly more attractive to TSH sample, that showed selectivity index $SI = 15.33$, while HS ($SI = 2.46$) and HS-C ($SI = 1.45$) showed weak activities. The antimicrobial potential of TSH, HS and HS-C were established by the disk diffusion, bioautography and microdilution techniques. The results showed antimicrobial activity against three ATCC strains (*S. aureus*, *E. faecalis* and *C. albicans*), as well as against three clinical multiresistant strains (*S. aureus*, MRSA and VRE). The TSH sample, presented the most promising results with minimum inhibitory concentrations values against MRSA strains ($MIC = 31.25 \mu\text{g/mL}$) and VRE ($MIC = 62.5 \mu\text{g/mL}$). Finally, the TSH was assayed in two experimental models of sepsis (*in vivo*). The intraperitoneal administration of this sample at 12 mg/kg in Pneumosepse model was able to delay the death of animals. On the other hand, in the cecal ligation and puncture model (CLP), TSH sample at 33 mg/kg did not shown effect on the animal survival.

Keywords: Antimicrobial activity. Antiviral activity. *Petromica citrina*. Sepsis. Halistanol sulfate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Número de novos compostos isolados de organismos marinhos entre as décadas de 1970-2010	33
Figura 2- Número total de novos compostos isolados de diferentes organismos marinhos entre os anos de 2001-2010	33
Figura 3- Estatísticas de bioatividade dos novos produtos naturais marinhos por ano	37
Figura 4- Distribuição entre diferentes classes químicas dos novos compostos isolados de esponjas marinhas	44
Figura 5- Distribuição mundial de todas as espécies validadas para o gênero <i>Petromica</i>	50
Figura 6- Foto <i>in situ</i> da esponja <i>P. citrina</i>	50
Figura 7- Ilustração com as datas das descobertas ou das patentes das diferentes classes de antibióticos.....	82
Figura 8- Cronograma de desenvolvimento de agentes antimicrobianos e surgimento de bactérias resistentes aos medicamentos.....	88
Figura 9- Estimativa anual do uso de antibióticos nos Estados Unidos	90
Figura 10- Avaliação da atividade <i>in vivo</i> da amostra TSH em modelo de Pneumosepse.....	120
Figura 11- Avaliação da atividade <i>in vivo</i> da amostra TSH no modelo de sepse por CLP	122
Figura 12- Dados microbiológicos de hemoculturas dos três grupos do modelo CLP.....	123
Figura 13- Perfil cromatográfico (CCD) da amostra HS hidrolisada em coluna IR120 (A) e dos produtos hidrolisados após purificação (B)...	129
Figura 14- Resultado do ensaio de bioautografia dos produtos da hidrólise (HS) frente a MRSA	130

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Produtos naturais marinhos disponíveis comercialmente e alguns compostos em estudos clínicos	35
Quadro 2- Exemplos de compostos com atividade antibacteriana e antifúngica isolados de esponjas marinhas	45
Quadro 3- Exemplos de compostos com atividade frente a diferentes vírus isolados de esponjas marinhas	47
Quadro 4- Atividades biológicas descritas para o gênero <i>Petromica</i>	52
Quadro 5- Fármacos antimicrobianos lançados desde o ano 2000 no mercado farmacêutico.....	84
Quadro 6- Principais estudos de incidência, prevalência e mortalidade de sepse.....	112
Quadro 7- Guia de antibioticoterapia empírica para sepse elaborado pelo Instituto Latino Americano da Sepse.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados gerais de mortalidade	114
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATTC- *American type culture collection*
AZT- Azidotimidina
BVDV- *Bovine viral diarrhea virus*
CBM- Concentração bactericida mínima
CCD- Cromatografia em camada delgada
CD₃OD- Metanol deuterado
CIM- Concentração inibitória mínima
CLP- *Cecal ligation and puncture*
CLSI- *Clinical and laboratory standards institute*
COSY- *Correlated spectroscopy*
¹³C RMN- Ressonância magnética nuclear de carbono
DMSO- Dimetilsufóxido
ESI- *Eletrospray ionization*
FDA- *Food and drug administration*
HMBC- *Heteronuclear multiple bond correlation*
¹H RMN- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
HSQC- *Heteronuclear single quantum coherence*
HSV-1- Herpes simplex virus tipo 1
MRSA- *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*
Rf- Fator de retenção
UFC- Unidade formadora de colônias
UV- Ultravioleta
VRE- *Vancomycin-resistant Enterococcus*
VRSA- *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
2	OBJETIVOS	39
2.1	OBJETIVO GERAL	39
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
	CAPÍTULO I- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: FILO PORÍFERO E GÊNERO <i>PETROMICA</i>	41
1.1	FILO PORÍFERO	43
1.1.1	Diversidade química e biológica do filo porífero.....	43
1.1.2	Esponjas no litoral de Santa Catarina	48
1.1.2.1	O gênero <i>Petromica</i>	49
1.1.2.2	Atividades biológicas relatadas para o gênero <i>Petromica</i>	51
	CAPÍTULO II- ESTUDO QUÍMICO BIOGUIADO PELA ATIVIDADE ANTIVIRAL COM A FRAÇÃO <i>n</i>-BUTANOL DE <i>P. citrina</i>.....	57
2.1	APRESENTAÇÃO.....	59
2.2	OBJETIVOS	60
2.2.1	Objetivos específicos	60
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
2.3.1	Publicação.....	61
	CAPÍTULO III- AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DA ESPÉCIE <i>P. citrina</i>.....	79
3.1	INTRODUÇÃO	81
3.1.1	Resistência bacteriana e fúngica.....	86
3.2	OBJETIVOS	91
3.2.1	Objetivos específicos.....	91
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
3.3.1	Manuscrito a ser submetido para avaliação ao periódico Marine Drugs	92
	CAPÍTULO IV- AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO POTENCIAL DE AÇÃO DE <i>P. citrina</i> EM MODELO DE SEPSE.....	107
4.1	INTRODUÇÃO	109
4.1.1	Dados epidemiológicos.....	110
4.1.2	Tratamento da sepse.....	114
4.2	OBJETIVOS	116
4.2.1	Objetivos específicos.....	116
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS	117
4.3.1	Obtenção da amostra TSH.....	117
4.3.2	Animais	117

4.3.3	Grupos experimentais.....	117
4.3.3.1	Modelo experimental de sepse por Pneumonia.....	117
4.3.3.2	Modelo experimental de sepse por ligação e perfuração cecal	118
4.3.4	Procedimentos experimentais	118
4.3.4.1	Modelo experimental de sepse por Pneumonia.....	118
4.3.4.2	Modelo experimental de sepse por ligação e perfuração cecal	119
4.3.5	Análise estatística	119
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
4.5	CONCLUSÕES	123
3	DISCUSSÃO GERAL.....	125
4	CONCLUSÕES	133
	REFERÊNCIAS.....	135
	APÊNDICE 1.....	151
	APÊNDICE 2.....	169
	APÊNDICE 3.....	170
	APÊNDICE 4.....	170
	APÊNDICE 5.....	171
	APÊNDICE 6.....	171
	APÊNDICE 7.....	172
	APÊNDICE 8.....	172
	APÊNDICE 9.....	173
	APÊNDICE 10.....	174
	APÊNDICE 11.....	175
	APÊNDICE 12.....	175
	APÊNDICE 13.....	176

1 INTRODUÇÃO

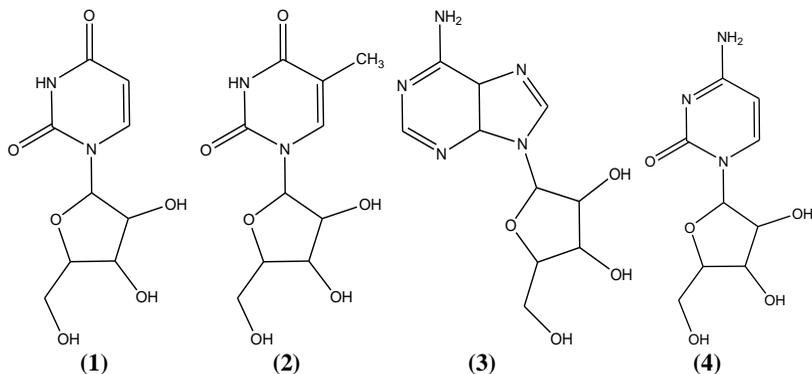
Ao longo da história, a natureza tem contribuído na manutenção das necessidades básicas do homem, sobretudo, disponibilizando recursos naturais que podem ser aproveitados por diversos ramos, incluindo o seguimento farmacêutico (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; LAHLOU, 2013).

Dados publicados recentemente apontam importantes fármacos provenientes de fontes naturais que revolucionaram o tratamento de doenças graves, como também a magnitude que os produtos naturais apresentam na descoberta de novas substâncias. Entre os anos de 1981-2010 foram introduzidos no mercado 195 novas moléculas com atividade anti-infecciosa, e destas 69% foram inspiradas em produtos naturais. Esse percentual torna-se ainda maior, quando se trata de substâncias que podem ser empregadas no tratamento do câncer. No mesmo período foram inseridas no mercado 173 novas moléculas para tal finalidade, sendo que 75% eram derivadas de produtos de ocorrência natural (CRAGG; NEWMAN, 2013; NEWMAN; CRAGG, 2012).

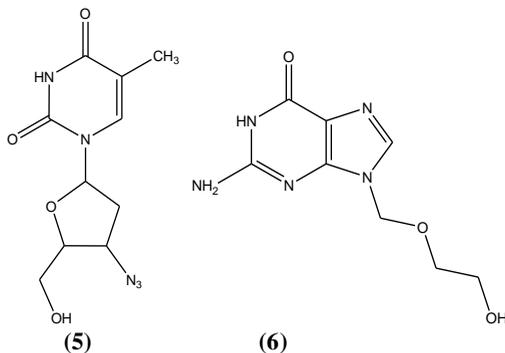
Nesse contexto, um campo que vem se destacando é a investigação com produtos naturais de origem marinha. Os oceanos e mares, devido a área que ocupam na superfície da terra e pela diversidade taxonômica que abrigam, representam uma importante fonte para a descoberta de novos agentes bioativos. Contudo, efetivamente somente nos últimos 40 anos foi possível uma exploração da riqueza do ambiente marinho e de seus organismos que frequentemente produzem uma gama de metabólitos secundários com estruturas químicas diferenciadas e complexas (LEAL et al., 2012; MONTASER; LUESCH, 2011).

O primeiro relato de moléculas bioativas provenientes de fontes marinhas ocorreu em 1951 pelos autores Bergmann e Feeney. A partir de uma esponja coletada no Caribe, *Tethya crypta*, foram isolados dois nucleosídeos denominados espongouridina (**1**) e espongotimidina (**2**).

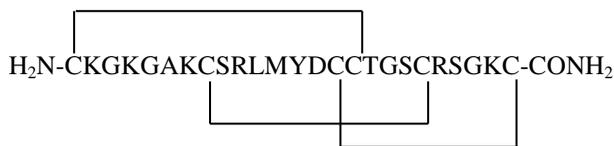
Transcorridos cerca de 15 anos, essas substâncias serviram como protótipos para obtenção dos análogos sintéticos, como a Vidarabina (ara-A) (**3**) e Citarabina (ara-C) (**4**), indicados desde então, como agente antiviral (Vira-A[®]) e anticâncer (Cytosar-U[®]), respectivamente (COSTA-LOTUFO; WILKE; JIMENEZ, 2009).



A partir dessa iniciativa, teve origem toda uma geração de nucleosídeos terapeuticamente potentes e relevantes para a prática clínica, como azidotimidina (AZT) (5) e aciclovir (6) (COSTA-LOTUFO WILKE; JIMENEZ, 2009; FELÍCIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012; MOLINSKI et al., 2009).

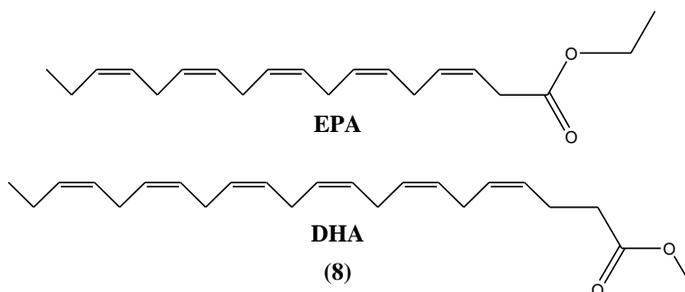


Outra contribuição dos produtos naturais marinhos ocorreu em 2004 com aprovação do Ziconotídeo (7) (Prialt[®]), sendo este o primeiro composto ativo a ser utilizado como fármaco sem a necessidade de modificações estruturais. Este fármaco (ω -conotoxina), cuja estrutura é caracterizada como um peptídeo de 25 aminoácidos foi isolado do molusco *Conus magus* sendo recomendado para utilização no tratamento da dor crônica, por possuir uma ação analgésica 1000 vezes mais potente que a morfina (COSTA-LOTUFO WILKE; JIMENEZ, 2009; MAYER et al., 2010; MISHRA; TIWARI, 2011).

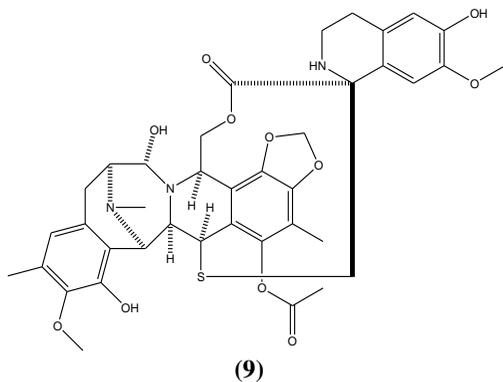


(7)

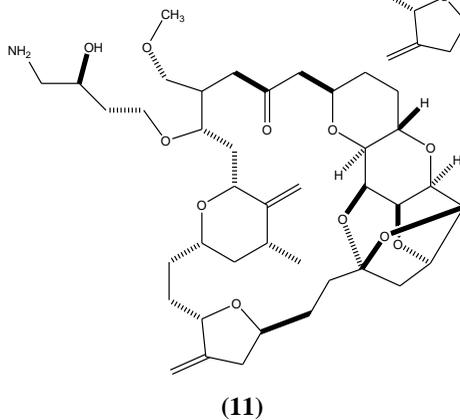
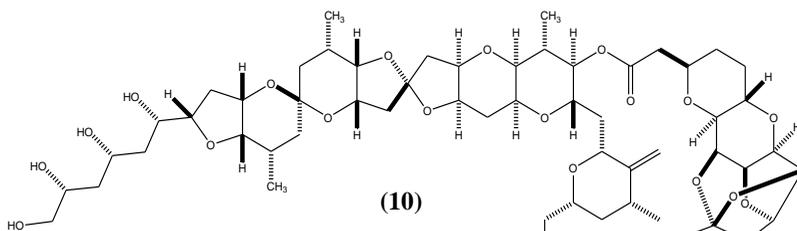
Ainda nesse mesmo ano, foi descoberto um adjuvante para auxiliar na dieta de adultos com elevados níveis de triglicerídeos (≥ 500 mg/dL), constituído por uma mistura de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (**8**), ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), obtidos a partir de óleos de peixe e comercializados como Lovaza[®]. Essa preparação também é recomendada em casos de arteriosclerose coronária e na prevenção secundária pós-infarto do miocárdio (DAYSPRING, 2011; KOSKI, 2008).



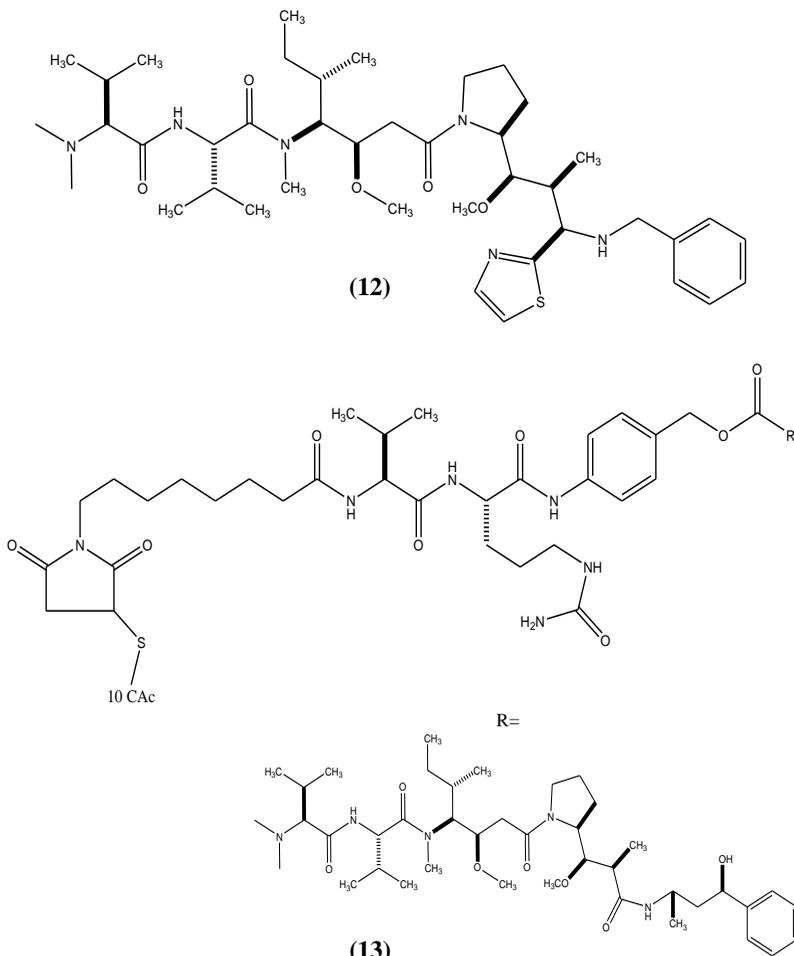
Em 2007 a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) autorizou o uso clínico da Trabectedina (**9**) (Yondelis[®]). Encontrado em um tunicado *Ecteinascidia turbinata* coletado no Caribe, tal substância mostrou-se eficaz no tratamento de sarcoma de tecidos moles. Esse mesmo fármaco, também está sendo avaliado para os tratamentos de câncer de ovário (ensaios clínicos de fase III), próstata, mama, osteossarcoma e tumores sólidos pediátricos (ensaios clínicos de fase II) (COSTA-LOTUFO WILKE; JIMENEZ, 2009; MAYER et al., 2010).



Com base na estrutura da substância Halicondrina B (**10**), isolada da esponja *Halichondria okadai*, foi obtido o análogo sintético Mesilato de eribulina (**11**) (Halaven[®]), aprovado recentemente pelo (FDA) para terapia do câncer de mama metastático (JAIN; VAHDAT, 2011).

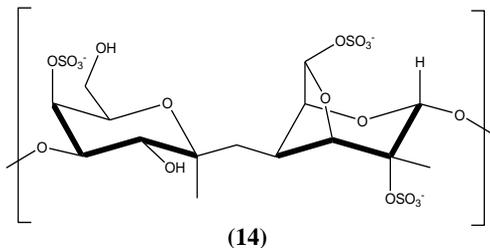


Baseado na molécula dolastatina originalmente isolada do molusco *Dolabella auricularia* (12), foi obtido o anticorpo-fármaco Brentuximabe vedotina (Adcetris®) (13) recomendado para o tratamento de linfoma anaplásico de grandes células e linfoma de Hodgkin (SEENTER; SIEVERS, 2012).



Recentemente, a empresa austríaca de biotecnologia Marinomed constatou uma inovadora aplicação para as carragenanas (polissacarídeos lineares sulfatados). Tais substâncias extraídas das

algas vermelhas são amplamente utilizadas e bastante conhecidas na indústria alimentícia por suas propriedades espessantes e estabilizantes, e há pouco, passaram a ser comercializadas como componentes antivirais (carragenanas do tipo iota) de sprays nasais (Carragelose[®], **14**) (MARTINS et al., 2014).



De forma resumida, é possível constatar que o número de fármacos aprovados para uso clínico originários do ambiente marinho é ainda limitado, embora exista um expressivo número de compostos em estudos pré-clínicos e clínicos conforme mostrados no quadro 1. Cabe enfatizar, que os dados apresentados foram embasados nas publicações dos autores Gerwick e Moore (2012) e Martins e colaboradores (2014), apesar do número de substâncias em diferentes etapas dos ensaios clínicos possa ser superior ao apontado por eles (COSTA-LOTUFO WILKE; JIMENEZ, 2009; HUSSAIN et al., 2012; LIU et al., 2012; MAYER et al., 2010; MOLINSKI et al., 2009).

Blunt e colaboradores (2015) destacaram que apenas no ano de 2013 foram isolados 1163 novos compostos de organismos marinhos, resultando em 379 publicações científicas. Esses números, quando comparados aos do ano anterior revelaram um aumento de 6% (BLUNT et al., 2015; BLUNT et al., 2014).

De fato, principalmente nessas últimas três décadas, as investigações químicas e farmacológicas com organismos marinhos, contribuíram significativamente na descoberta de novas substâncias, com aproximadamente 15.000 compostos reportados até o ano de 2010 (Figuras 1 e 2) (MEHBUB et al., 2014).

Figura 1- Número de novos compostos isolados de organismos marinhos entre as décadas de 1970-2010. Adaptado: Mehbub e colaboradores (2014).

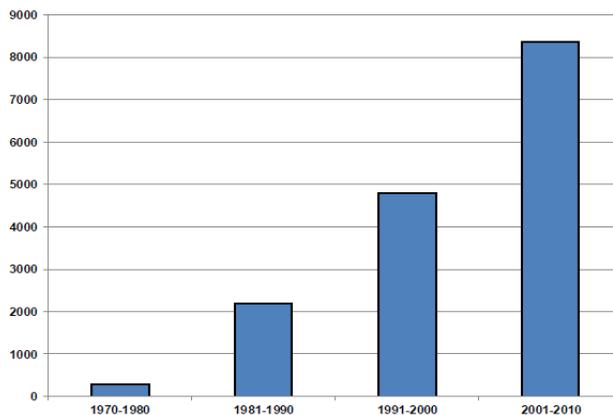
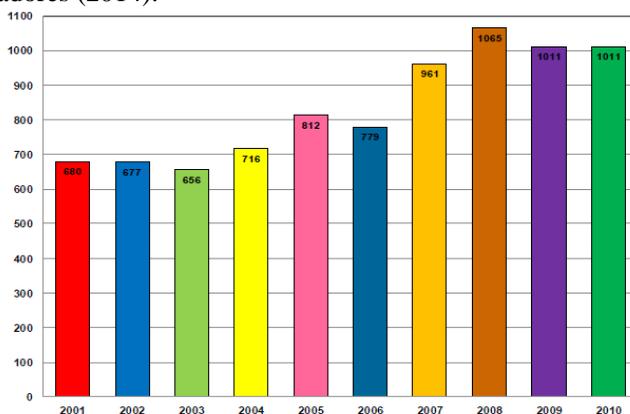


Figura 2- Número total de novos compostos isolados de diferentes organismos marinhos entre os anos de 2001-2010. Adaptado: Mehbub e colaboradores (2014).



Possivelmente o aumento no interesse por esta classe de produtos naturais está vinculado tanto à possibilidade do isolamento de estruturas químicas inéditas como também as promissoras e variadas atividades farmacológicas que estão sendo constatadas para esses compostos, tais como anticâncer, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiprotzoária,

antiviral entre outras (BLUNT et al., 2015, BLUNT et al., 2014; MAYER et al., 2013; SAWADOGO et al., 2013; SENTHILKUMAR; KIM, 2013; VO et al., 2011).

Essa afirmação é corroborada através da revisão elaborada por Mayer e colaboradores (2013). De acordo com os autores, nos ensaios farmacológicos pré-clínicos realizados com produtos naturais marinhos, entre os anos de 2009-2011, foram reportadas as atividades antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária, antituberculose e antiviral para 102 substâncias. Ainda nesse estudo, foram identificados outros 60 compostos isolados de organismos marinhos que além de atuarem no sistema nervoso e imune, também exercem atividade contra a diabetes e a inflamação.

Quadro 1- Produtos naturais marinhos disponíveis comercialmente e alguns compostos em estudos clínicos. Adaptado: Gerwick; Moore, 2012; Martins e colaboradores (2014).

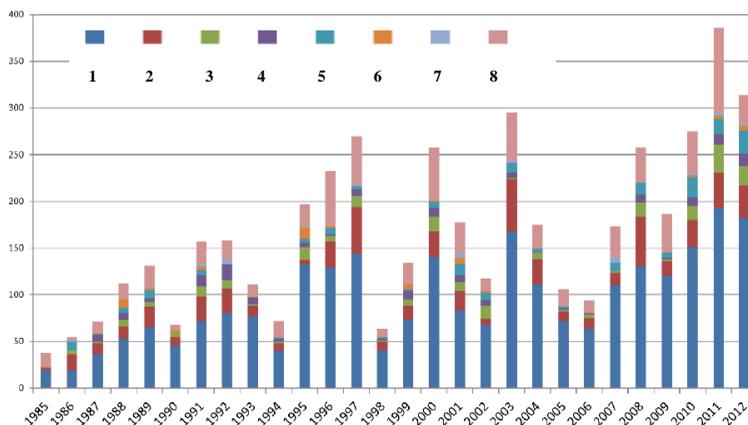
Status clínico	Nome do Composto	Natural ou Derivado	Fonte de obtenção	Área da doença
Aprovado FDA	Citarabina (Ara-C)	Derivado	<i>Cryptotethya crypta</i>	Câncer
Aprovado FDA	Vidarabina (Ara-A)	Derivado	<i>Cryptotethya crypta</i>	Antiviral
Aprovado FDA	Ziconotídeo	Natural	<i>Conus magnus</i>	Dor
Aprovado FDA	Mesilato eribulina (E7389)	Derivado	<i>Halichodria okadai</i>	Hipertrigliceridemia
Aprovado FDA	Ácido ômega 3-etil-éster	Derivado	Peixes	Câncer
Aprovado FDA	Trabectedina (ET-743)	Natural	<i>Ecteinascidia turbinata</i>	Câncer
Aprovado FDA	Brentuximabe vedotina	Derivado	<i>Dolabella auricularia</i>	Câncer
Aprovado FDA	Iota-carragenana	Natural	<i>Eucheuma/Cnondus</i>	Antiviral
Fase clínica III	Plitidepsina (Aplidina)	Natural	<i>Aplidium albicans</i>	Câncer
Fase clínica II	DMXBA (GTS-21)	Derivado	<i>Paranemertes peregrina</i>	Cognição, Esquizofrenia
Fase clínica II	Plinabulina (NPI 2358)	Derivado	<i>Aspergillus</i> sp.	Câncer
Fase clínica II	Elisidepsina	Derivado	<i>Elysia rufescens</i>	Câncer
Fase clínica II	Zalipsis (PM00104)	Derivado	<i>Joruna funebris</i>	Câncer
Fase clínica II	Glembatumumabe vedotina	Derivado	<i>Dolabella auricularia</i>	Câncer
Fase clínica II	Lurbinctedina (PM01183)	Derivado	<i>Ecteinascidia turbinata</i>	Câncer
Fase clínica II	CDX-011 (Derivado Dolastatina-10)	Derivado	<i>Dolabella auricularia</i>	Câncer
Fase clínica I	Salinosporamida A	Natural	<i>Salinospora tropica</i>	Câncer

Continuação

Status clínico	Nome do Composto	Natural ou Derivado	Fonte de obtenção	Área da doença
Fase clínica I	Análogo da Trabectedina (PM01183)	Derivado	<i>Ecteinascidia turbinata</i>	Câncer
Fase clínica I	SGN-75	Derivado	<i>Dolabella auricularia</i>	Câncer
Fase clínica I	ASG-5ME	Derivado	<i>Dolabella auricularia</i>	Câncer
Fase clínica I	Derivado Hemiasterlina (E7974)	Derivado	<i>Hemiasrella minor</i>	Câncer
Fase clínica I	Briostatina	Natural	<i>Bugula neritina</i>	Câncer e Alzheimer
Fase clínica I	PM060184	Natural	<i>Lithoplocamia lithistoides</i>	Câncer
Fase clínica I	Soblidotina	Derivado	<i>Dolabella auricularia</i>	Câncer

O estudo proposto por Hu e colaboradores (2015) apresenta um panorama ainda mais amplo, contemplando informações sobre a distribuição dos compostos bioativos durante os anos de 1985-2012, sendo os mesmos inseridos em oito grupos de atividades farmacológicas conforme mostrado na figura 3.

Figura 3- Estatísticas de bioatividade dos novos produtos naturais marinhos por ano. Adaptado: Hu e colaboradores (2015).



(1)= Anticâncer; (2)= Antibacteriano; (3)= Antifúngico; (4)= Antiviral; (5)= Ação inseticida; (6)= Prevenção de doenças cardíacas; (7)= Proteção neurônios e (8)= Outras atividades.

Outro ponto importante de ser ressaltado é quanto à localização geográfica em que a maior parte desses novos compostos foram reportados. Segundo Leal e colaboradores (2012), nas últimas duas décadas, o Japão, Austrália, Coreia, Taiwan e China foram os países que mais investiram na investigação com organismos marinhos. Tais regiões são responsáveis por mais de 40% dos novos produtos naturais de invertebrados marinhos descobertos. Ainda em relação a esse levantamento foram listados um total de 25 países, porém nenhum dos países situados na América do Sul mostrou uma contribuição expressiva.

Com um litoral contínuo que ultrapassa 8.500 km de extensão, o Brasil é um dos países com maior potencial para a descoberta de novas substâncias bioativas. Entretanto as pesquisas em bioprospecção e biotecnologia marinha ainda são incipientes em nosso país quando comparadas a outros países como, por exemplo, a Espanha, Estados

Unidos e Japão, que contém companhias que investem na pesquisa de fármacos de origem marinha como PharmaMar, Nereus Pharmaceuticals e Eisai, respectivamente (BERLINCK et al., 2004; COSTA-LOTUFO; WILKE; JIMENEZ, 2009; JOLY et al., 2011; MARTINS et al., 2014).

A fim de contribuir para o conhecimento científico de espécies marinhas bioativas brasileiras e direcionar essa proposta de trabalho, no ano 2011 teve início em nosso grupo de investigação um estudo com 27 algas e 13 invertebrados marinhos. Os extratos destes organismos apresentaram potencial antimicrobiano, antiviral e antiprotozoário *in vitro* (Apêndice 1).

Dentre as espécies ativas detectadas nesse trabalho, a esponja *Petromica citrina*, mais especificamente a fração *n*-butanol dessa espécie, apresentou resultados promissores frente às atividades antiviral e antimicrobiana (BIANCO et al., 2013). Estes resultados com a fração *n*-butanólica, associados à disponibilidade de material para coleta no litoral de Santa Catarina e ao número limitado de publicações com o gênero (BASTOS et al., 2013; CRISTANCHO et al., 2007; KOSSUGA et al., 2007; LIMA et al., 2014; MARINHO et al., 2010; MARINHO et al., 2012; MONKS et al., 2002; RIBEIRO et al., 2013; SILVA et al., 2006), foram os motivos que conduziram a escolha desta espécie como objeto de estudo da presente tese.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Aprofundar a investigação de metabólitos bioativos da espécie *P. citrina* por meio de um ensaio bioguiado visando caracterizar os compostos responsáveis pelas atividades antiviral e antimicrobiana (*in vitro* e *in vivo*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Ampliar os ensaios de triagem antibacteriana e antifúngica da fração *n*-butanol frente a um maior número de cepas padrões ATCC (“*American Type Culture Collection*”) e de cepas de isolados clínicos bacterianos através do ensaio de difusão em disco.
- ✓ Detectar as substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana através da técnica de bioautografia.
- ✓ Determinar através da técnica de microdiluição a concentração inibitória mínima (CIM), de frações e substâncias isoladas de *P. citrina*, como também a concentração bactericida mínima (CBM).
- ✓ Avaliar o efeito terapêutico da(s) amostra(s) ativa(s) em dois modelos experimentais *in vivo* de sepse.

Considerando os objetivos apresentados, o presente trabalho está organizado em quatro capítulos.

- ✓ O **capítulo I** apresenta uma breve revisão da literatura sobre o Filo Porífero e o gênero *Petromica* englobando tópicos sobre taxonomia, aspectos químicos e atividades biológicas.
- ✓ O **capítulo II** discute os dados referentes à atividade anti HSV-1 de frações e substâncias isoladas da fração *n*-butanol de *P. citrina*, bem como a elucidação estrutural dos compostos ativos presentes em tal fração.
- ✓ O **capítulo III** apresenta os dados referentes à atividade antimicrobiana de frações e substâncias isoladas da fração *n*-butanol de *P. citrina*.
- ✓ O **capítulo IV** apresenta o potencial *in vivo* da amostra TSH nos modelos Pneumosepse e de Ligação e Perfuração Cecal (CLP).

Ao final, será apresentada a discussão geral dos resultados obtidos e as conclusões.

**CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:
FILO PORÍFERO E GÊNERO *Petromica***

1.1 FILO PORÍFERO

Dentre todas as classes de organismos marinhos, as esponjas, também conhecidas como poríferos, são as representantes desse habitat quimicamente mais prolíficas. Durante os anos de 2001-2010 ofereceram cerca de 30% dos novos produtos naturais marinhos, o que representou mais de 2400 novos compostos, os quais foram obtidos a partir de 542 gêneros e 671 espécies de esponjas. Em termos totais, estima-se que até a presente data, tenham sido isolados 4.851 novos compostos desse filo (MEHBUB et al., 2014).

As esponjas estão entre os mais antigos animais multicelulares, surgiram possivelmente há mais de 700 milhões de anos. Estes organismos são encontrados fixados sobre substratos sólidos (sésseis) e chamam atenção por sua grande variedade de cores, formas, tamanhos e consistências (TAYLOR et al., 2007).

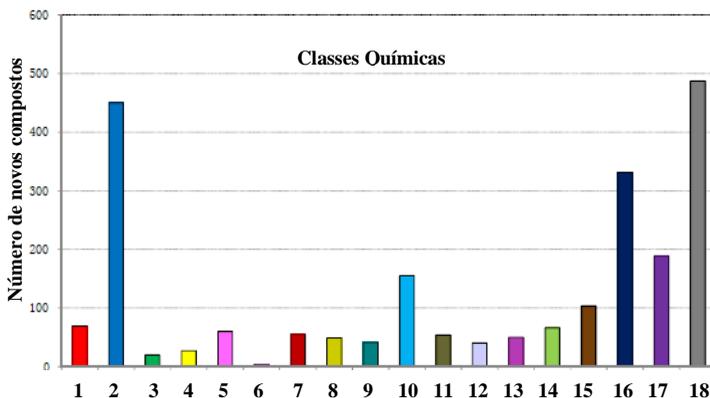
Com cerca de 15.000 espécies descritas e provavelmente muitas ainda para serem identificadas, as esponjas encontram-se distribuídas por regiões tropicais, temperadas e polares (ABBAS et al., 2011; MOURA et al., 2011; SEPCIC et al., 2010; TURK et al., 2013). Um percentual ínfimo de esponjas (1%) habitam águas doces.

1.1.1 Diversidade química e biológica do filo porífero

Uma das características mais marcantes desses organismos sésseis são os mecanismos de defesa contra predadores e assentamento larval de outros organismos. Além de possuírem estruturas que possibilitam suas defesas físicas, muitas esponjas desenvolveram mecanismos de proteção de natureza química através da produção de metabólitos secundários para superar sua inerente vulnerabilidade no meio, garantindo vantagens na sobrevivência e na competição por espaço (HILL; LOPES; YOUNG, 2005; PAWLICK et al., 1995).

Em função desta peculiaridade, esses organismos possuem habilidade de sintetizar uma gama de compostos de diferentes classes químicas como ácidos graxos, alcaloides, esteroides, lipídeos, policetídeos, terpenos entre tantas outras mostradas na Figura 4 (MEHBUB et al., 2014).

Figura 4- Distribuição entre diferentes classes químicas dos novos compostos isolados de esponjas marinhas. Adaptado: Mehbub e colaboradores (2014).



(1) Ácidos; (2) Alcaloides; (3) Éster; (4) Ácidos graxos; (5) Glicosídeos; (6) Cetonas; (7) Lipídeos; (8) Macrolídeos; (9) Álcool; (10) Peptídeos; (11) Peróxidos; (12) Policetídeos; (13) Quinolonas; (14) Esteroides; (15) Esterol; (16) Terpenos; (17) Terpenoides e (18) Outros.

Consequentemente, essa diversidade de metabólitos secundários com estruturas incomparáveis propicia um amplo painel de bioatividades como antitumoral/citotóxicos, antimicrobiano, antiviral, antimalárico, anti-inflamatória, anti-alzheimer e antituberculose, compostos excepcionalmente interessantes para aplicações futuras na indústria farmacêutica (MEHBUB et al., 2014).

Muitas publicações de revisões expressam toda potencialidade desse grupo de organismos que poderão representar opções terapêuticas como antimicrobianos (Quadro 2) e antivirais (Quadro 3).

Quadro 2- Exemplos de compostos com atividade antibacteriana e antifúngica isolados de esponjas marinhas. Adaptado: Laport, Santos e Muricy (2009).

Compostos	Classes	Espécies	Espectro de ação
(S)-(+)-Curcufenol	Sesquiterpeno	<i>Myrmekeioderma styx</i>	<i>M. tuberculosis</i>
6-Hidróxi-manzamina E	Alcaloide	<i>Acanthostrongylophora</i> sp.	<i>M. tuberculosis</i>
Agelasina D	Derivado purina	<i>Agelas</i> sp.	Bactérias Gram positivas e negativas, <i>M. tuberculosis</i>
Arenosclerinas A-C	Alcaloides	<i>Arenosclera brasiliensis</i>	<i>S. aureus</i> (MRSA) <i>P. aeruginosa</i> (cepa multirresistente)
Axinelaminas B-D	Alcaloides	<i>Axinella</i> sp.	<i>H. pylori</i>
Ácido acetilênico C14	Ácido graxo	<i>Oceanapia</i> sp.	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>B. subtilis</i>
Caminosídeos A-D	Glicolípideos	<i>Caminus sphaeroconia</i>	<i>E. coli</i>
Coralidictiais A-D	Hidroquinonas	<i>Aka coralliphaga</i>	<i>S. aureus</i>
Cribrostatina 3	Alcaloide	<i>Cribrochalina</i> sp.	<i>N. gonorrhoeae</i> (cepa multirresistente)
Cribrostatina 6	Alcaloide	<i>Cribrochalina</i> sp.	<i>S. pneumoniae</i> (cepa multirresistente)
CvL	Lecitina	<i>Cliona varians</i>	<i>B. subtilis</i> e <i>S. aureus</i>
Ácido isoaspíco, Cacospongina D e Jaspaquinol	Diterpenos	<i>Cacospongia</i> sp.	<i>S. epidermidis</i>
Latrunculins	Macrolídeo	<i>Negombata magnifica</i>	<i>S. aureus</i> e <i>B. cereus</i>
Meloplin C	Heterocíclico nitrogenado	<i>Melophlus sarassinorum</i>	<i>B. subtilis</i> e <i>S. aureus</i>
Petrosamina B	Alcaloide	<i>Oceanapia</i> sp.	<i>H. pylori</i>

Continuação

Compostos	Classes	Espécies	Espectro de ação
Polidiscamida A	Peptídeo	<i>Discodermia</i> sp.	<i>B. subtilis</i>
Agelasinas /agelasiminas	Alcaloides	<i>Agelas</i> sp.	<i>C. krusei</i>
Psamaplina A	Derivado Bromo-tirosina	<i>Psammaphysilla</i>	<i>S. aureus</i> (MRSA)
Discobahamina A-B	Peptídeos	<i>Discodermia</i> sp.	<i>C. albicans</i>
Euristerols A-B	Esteróis	<i>Eurysspongia</i> sp.	<i>C. albicans</i>
Manzamina A	Alcaloide	<i>Acanthostrongylophora</i> sp.	<i>C. neoformans</i>
Naamina D	Alcaloide	<i>Leucetta chagosensis</i>	<i>C. neoformans</i>
Secomanoalideo	Sesteterpeno	<i>Luffariella variabilis</i>	<i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. albicans</i>
Arenosclerinas A- C/Haliclonaciclamina E	Alcaloides	<i>Arenosclera brasiliensis</i>	<i>C. albicans</i>
Jasplakinolideo/Jaspamida	Despeptídeos macrocíclicos	<i>Jaspis</i> sp.	<i>C. albicans</i>

Quadro 3- Exemplos de compostos com atividade frente a diferentes vírus isolados de esponjas marinhas. Adaptado: Sagar, Kaur e Minneman (2010).

Compostos	Classes	Espécies	Espectro ação
Micalamida A-B	Nucleosídeos	<i>Mycale</i> sp.	Anti-HSV-1
Avarol	Hidroquinona	<i>Disidea avara</i>	Anti-HIV
Papuamida A, B, C e D	Peptídeos	<i>Theonella mirabilis</i> e <i>Theonella swinhoei</i>	Anti-HIV
Microspinosamida	Peptídeo	<i>Sidonops microspinoso</i>	Anti-HIV
4-Metilaptamina	Alcaloide	<i>Aaptos aaptos</i>	Anti-HSV-1
Dragmacidina F	Alcaloide	<i>Halicortex</i> sp.	Anti-HSV-1 e Anti-HIV
Manzamina A	Alcaloide	<i>Haliclona</i> sp. e <i>Pachypellina</i> sp.	Anti-HIV e Anti-HSV-2
Hamigerana B	Macrolídeo	<i>Hamigera tarangaensis</i>	Anti-HSV-1 e HSV-2

Outro aspecto importante são associações das esponjas com uma ampla variedade de microorganismos, como archaeas, bactérias, fungos e microalgas. A estrutura morfológica, assim como a alta capacidade de filtração desses organismos (24000 litros de água por kg de tecido) favorece a formação de um ambiente microbiano, que dependendo da espécie pode constituir 40% da biomassa da esponja (TAYLOR et al., 2007).

Atualmente vários estudos sustentam a hipótese da origem simbiótica, em que muitas das substâncias farmacologicamente ativas relatadas como isoladas de esponjas, sejam provavelmente produzidas por microorganismos marinhos (TAYLOR et al., 2007; THOMAS; KAVLEKAR; LOKABHARATHI, 2010; TURQUE et al., 2010). A manzamina A, utilizada em ensaios clínicos contra a malária, é um dos exemplos de compostos que reitera essa afirmação. Originalmente, sua obtenção foi relatada para esponjas marinhas do gênero *Haliclona* coletadas no Japão, contudo esclareceu-se recentemente que tal substância é produzida por actinomicetos do gênero *Micromonospora* (VOGEL et al., 2008).

Muitos outros exemplos nesse sentido são descritos no trabalho de revisão elaborado por Thomas, Kavlekar e Lokabharathi (2010), sendo mostrados mais de 100 compostos bioativos derivados dessa associação entre esponjas e microorganismos.

1.1.2 Esponjas no litoral de Santa Catarina

Os costões rochosos e as muitas ilhas em Santa Catarina oferecem substratos diversificados para a fixação da fauna de poríferos na região sul da costa brasileira. A primeira espécie de esponja identificada em nosso litoral foi a *Geodia glariosa*, encontrada em Imbituba (VOLKMER-RIBEIRO; MOTHE-DE-MORAES, 1975).

As investigações realizadas por alguns pesquisadores (BOUZON et al., 2012; CARVALHO et al., 2003; LERNER; HADJU, 2002; LERNER, 1996; MOTHE et al., 2006) permitiram ampliar o conhecimento quanto a presença de poríferos (mais de 38 espécies de esponjas distribuídas em diferentes ordens) na costa catarinense, já que até a metade dos anos de 1990, apenas 17 espécies de esponjas haviam sido relatadas para a região (MOTHE-DE-MORAES, 1987; MOTHE; LERNER, 1994). Segundo Carraro (2012), dezessete localidades apresentam registros de esponjas no estado de Santa Catarina,

distribuídas basicamente em seis municípios: Bombinhas, Governador Celso Ramos, Florianópolis, Palhoça, Garopaba e Imbituba.

O número de esponjas registradas foi de 75 espécies sendo que, três gêneros se destacaram: *Haliclona*, *Clathria* e *Mycale*, representando 30% de todas as espécies registradas para Santa Catarina.

Entre os anos 2010 a 2012 foram realizadas por parte do nosso grupo coletas através de mergulho autônomo pela costa de Santa Catarina (Ilha das Aranhas, Ilha do Campeche, Ilha do Xavier, Praia Canasvieiras, Praia da Lagoa da Conceição e na Praia do Sambaqui) e pelo litoral do nordeste do nosso país (Praia Arraial d' Ajuda, Atol das Rocas, Praia Cabo Branco, Praia Enseada dos Corais, Praia Farol da Barra, Praia do Farol Itapuã e Praia Taíba) que permitiram a preparação de extratos de diferentes invertebrados marinhos e algas, os quais foram submetidos a estudos preliminares frente às atividades antimicrobiana, antiparasitária e antiviral (BIANCO et al., 2013).

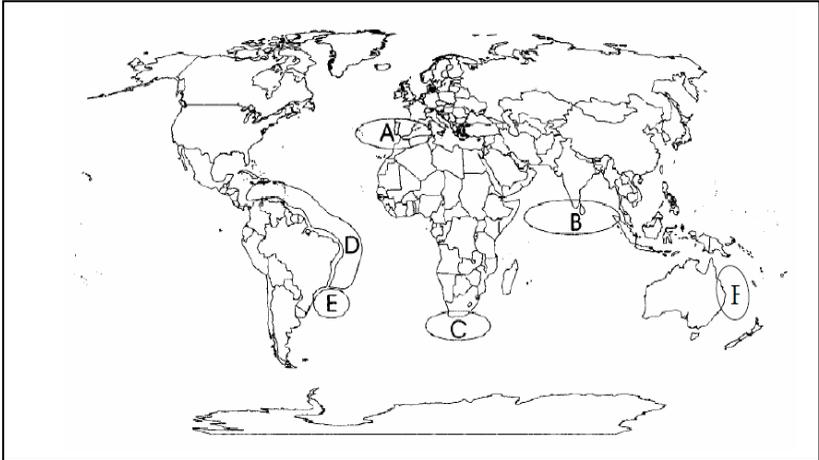
1.1.2.1 O Gênero *Petromica*

O gênero *Petromica* compreende oito espécies (*P. digitata*, *P. grimaldii*, *P. massalis*, *P. plumosa*, *P. tubulata*, *P. pacifica*, *P. ciocalyptoides* e *P. citrina*) que podem ser encontradas em diversas partes do mundo, ainda que no Brasil, até o momento, tenha sido descrita a ocorrência apenas de *P. ciocalyptoides* e *P. citrina* (Figura 5). Em relação à distribuição dessas duas espécies, *P. ciocalyptoides* pode ser encontrada em Búzios (Rio de Janeiro), Fernando de Noronha (Pernambuco) e Salvador (Bahia), enquanto que *P. citrina* está presente nos litorais dos estados de Santa Catarina, São Paulo e Rio de Janeiro (LERNER, 1996; MURICY et al., 2001).

P. citrina, ordem Halichondrida, família Halichondriidae, apresenta coloração que pode variar entre tons de laranja e amarelo. Possui forma incrustante, maça e com superfície irregular, podendo ser encontrada em costões rochosos em profundidades que variam de 3 a 25 m (MURICY et al., 2001).

Especificamente para esse estudo, amostras dessa espécie (Figura 6) foram coletadas em dois períodos (Janeiro-Julho/2010 e Janeiro/2015) por mergulho autônomo na Ilha de Xavier, localizada na costa do estado de Santa Catarina, distribuídas entre as profundidades de 13 a 17 m. Tanto as coletas como as identificações dos materiais foram realizadas pelo Dr. João Luís Carraro do laboratório de Porifera do Museu Nacional (Universidade Federal do Rio de Janeiro).

Figura 5- Distribuição mundial de todas as espécies validadas do gênero *Petromica*. Adaptado: Muricy et al., 2001.



(A) *P. grimaldii*, (B) *P. massalis*, (C) *P. plumosa*, *P. tubulata* e *P. digitata*, (D) *P. ciocalyptoides*, (E) *P. citrina* e (F) *P. pacifica*.

Figura 6- Foto *in situ* da esponja *P. citrina*.



Fonte: João Luís Carraro.

1.1.2.2 Atividades biológicas relatadas para o gênero *Petromica*

As publicações envolvendo o gênero *Petromica* são ainda limitadas, e em sua maior parte estão focadas em estudos de triagens farmacológicas com extratos de diferentes organismos marinhos. Uma tabela em ordem cronológica de publicação é apresentada para que se possa ter uma melhor dimensão do que foi mencionado (Quadro 4), e na sequência os mesmos são apresentados com maiores detalhes.

Quadro 4- Atividades biológicas descritas para o gênero *Petromica*.

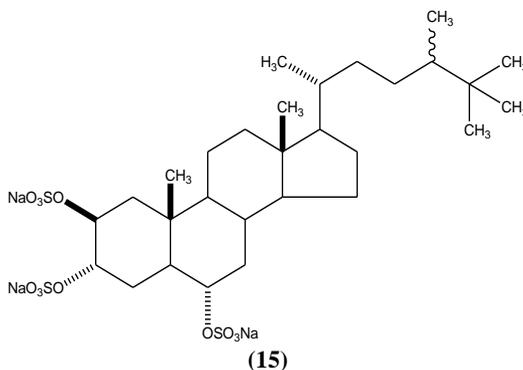
Espécie	Local de coleta	Extrato	Atividade	Referências
<i>P. citrina</i>	Santa Catarina	Metanol:tolueno (3:1)	Triagem antimicrobiana e antiviral	Monks et al., 2002
<i>P. citrina</i>	Santa Catarina	Aquoso	Triagem antiviral	Silva et al., 2006
<i>P. ciocalyptoides</i>	Colômbia	Metanol	Triagem antimutagênica	Cristancho et al., 2007
<i>P. ciocalyptoides</i>	Bahia	Metanol	Atividade inibitória da enzima adenosina fosforribosil transferase e isolamento do sulfato de halistanol	Kossuga et al., 2007
<i>P. ciocalyptoides</i>	Colômbia	Clorofórmio: metanol (3:1)	Triagem constituição química	Rodriguez et al., 2010
<i>P. citrina</i>	Rio de Janeiro	Aquoso	Triagem antimicrobiana	Marinho et al., 2010
<i>P. citrina</i>	Rio de Janeiro	Aquoso	Avaliação antimicrobiana de sulfato halistanol	Marinho et al., 2012
<i>P. citrina</i>	Rio de Janeiro	Diclorometano	Triagem <i>antifouling</i>	Ribeiro et al., 2013
<i>P. citrina</i>	São Paulo	Derivado metabolismo bactéria	Efeito protetor contra o modelo Diarreia Viral Bovina (BVDV)	Bastos et al., 2013
<i>P. citrina</i>	Santa Catarina	Fração <i>n</i> -butanol	Triagem antimicrobiana, antiviral e antiprotozoária	Bianco et al., 2013
<i>P. citrina</i>	Santa Catarina	Fração <i>n</i> -butanol	Atividade antiviral	Guimarães et al., 2013
<i>P. ciocalyptoides</i>	Bahia	Metanol	Atividade do sulfato de halistanol frente <i>S. mutans</i>	Lima et al., 2014

Em 2002 Monks e colaboradores realizaram triagem *in vitro* com 10 esponjas marinhas coletadas no litoral de Santa Catarina frente às atividades antitumoral e antimicrobiana. Contudo, *P. citrina* não se mostrou ativa em nenhum dos bioensaios avaliados.

Da mesma forma não foram observados resultados promissores para essa espécie nos ensaios de avaliação da atividade antiviral frente à Herpes simplex virus 1 (HSV-1; cepa KOS), Adenovírus humano sorotipo 5 (HAdv-5) e Rotavírus (RV-SA11) (SILVA et al., 2006).

A atividade antimitótica *in vitro* de 15 esponjas marinhas coletadas na Colômbia foi avaliada em larvas do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*. Os autores constataram que 80% das espécies, incluindo *P. ciocalyptoides* foram capazes de inibir a divisão mitótica dos ovos fertilizados dos ouriços desde o início do estágio celular (CRISTANCHO et al., 2007).

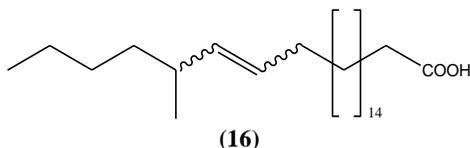
A primeira descrição relativa à constituição química do gênero *Petromica* foi realizado por Kossuga e colaboradores (2007) em um estudo envolvendo 04 esponjas marinhas, 01 ascídia e 01 octocoral. Particularmente em relação ao extrato metanólico *P. ciocalyptoides* coletada na Bahia, foi possível verificar sua potente capacidade de inibir a ação da enzima adenosina fosforribosil transferase (98%) isolada de *Leishmania tarantolae* na concentração de 50 µg/mL, o qual posteriormente foi fracionado levando ao isolamento de um esteroide sulfatado, denominado sulfato de halistanol (**15**), substância originalmente isolada da esponja *Halichondria* cf. *moorei* (FUSETANI et al., 1981).



Com o objetivo de avaliar a atividade antifúngica desse composto, os mesmos autores avaliaram a atividade do sulfato de halistanol frente cepas de *C. parapsilosis* (sensível) e *C. krusei*

(resistente) a antibióticos pertencentes à classe dos azóis utilizando o ensaio de microdiluição. O sulfato de halistanol foi mais efetivo frente *C. krusei* (25,8 µg/mL) do que o fármaco anfotericina B (49,5 µg/mL). A linhagem sensível *C. parapsilosis* apresentou-se menos suscetível à atividade antifúngica do sulfato de halistanol com concentração inibitória mínima de 59,0 µg/mL. Cabe ainda destacar, que esse foi o primeiro relato de isolamento de um esteroide sulfatado a partir de uma esponja coletada na costa brasileira (KOSSUGA et al., 2007).

Rodriguez e colaboradores (2010) relataram a composição de ácidos graxos de fosfolipídios de seis esponjas marinhas (*Halichondria magniconulosa*, *Halichondria lutea*, *Petromica ciocalyptoides*, *Axinyssa ambrosia*, *Didiscus oxeata* e *Dragmaxia undata*) coletadas no mar do caribe colombiano pertencentes à ordem Halichondrida através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). As técnicas cromatográficas permitiram a identificação de 79 ácidos graxos. Particularmente em relação à *P. ciocalyptoides*, os autores caracterizaram 34 substâncias, e dentre essas foi destacado um novo ácido caracterizado como 20-metil-18-tetracosanóico (**16**).



Marinho e colaboradores (2010) realizaram triagem antibacteriana *in vitro* de doze espécies de esponjas coletadas no Rio de Janeiro, visando à identificação de novas substâncias bioativas. Para avaliação antibacteriana foram utilizados nos ensaios 18 cepas padrão de referência da “American Type Culture Collection” (ATCC) e 26 cepas de isolados clínicos. O extrato aquoso de *P. citrina* foi ativo frente 28 das 44 cepas avaliadas, incluindo cepas resistentes.

Ainda nesse estudo, os autores realizaram fracionamento químico bioguiado do extrato aquoso com solventes em ordem de polaridade crescente (*n*-hexano, clorofórmio e acetato etila), e a fração residual foi definida como a responsável por tal atividade constatada previamente (MARINHO et al., 2010).

Baseado nesses primeiros resultados, os mesmos autores realizaram novos estudos químicos e farmacológicos com a fração residual aquosa de *P. citrina*, que por sua vez, mostrou atividade frente a *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228, *M. fortuitum*

ATCC 6841, *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, como também frente às cepas *Enterococcus* sp. (resistente à vancomicina), *S. aureus* (resistente à meticilina), *S. epidermidis* (resistente à meticilina), *M. fortuitum* (resistentes à ciprofloxacina), *N. gonorrhoeae* (resistente à penicilina e tetraciclina). Com isso, a fração residual aquosa foi então submetida a novos processos cromatográficos que conduziram a obtenção do sulfato de halistanol (**15**) (MARINHO et al., 2012).

A diferença entre os resultados constatados pelos autores Monks (2002) e Marinho (2010) pode ser decorrente da utilização de processos de extrações, épocas e locais de coletas distintos entre as duas amostras, o que pode ter alterado a concentração e a composição das substâncias nos extratos avaliados. Essa justificativa também pode ser empregada na comparação dos resultados obtidos por Silva e colaboradores (2006) com o que constatamos em nossos estudos que serão mostrados na sequência desse capítulo.

P. citrina, assim como outras onze espécies de esponjas coletadas no litoral do Rio de Janeiro e na Bahia tiveram seus extratos avaliados frente à capacidade anti-incrustante do molusco *Perna perna*. O modelo empregado leva em consideração o comportamento exploratório ativo do mexilhão ao substrato (extratos). Dentre as espécies testadas, *P. citrina*, assim como *T. rubra*, *T. maza* e *H. heliophila* mostraram que seus extratos são capazes de reduzir significativamente a bioincrustação (RIBEIRO et al., 2013).

Em 2013, Bastos e colaboradores verificaram que extratos produzidos pelas bactérias *Bacillus* sp. isoladas *P. citrina* mostraram um percentual de 98% de proteção contra Diarreia Viral Bovina (BVDV). Utilizado como um modelo substituto, BVDV é empregado para identificação de agentes antivirais para hepatite C.

Recentemente, o sulfato de halistanol (**15**) previamente isolado por Kossuga e colaboradores (2007), inibiu a formação de biofilmes das cepas *Streptococcus mutans*, principais agentes etiológicos causadores das cáries dentárias humanas. Este resultado foi bastante interessante, visto que esse composto foi capaz de inibir as bactérias patogênicas sem afetar a microbiota saudável da cavidade bucal, podendo tal composto ser utilizado em tratamentos preventivos (LIMA et al., 2014).

Por ser uma espécie endêmica do Brasil e amplamente encontrada no litoral catarinense, a continuidade dos estudos químicos e farmacológicos com a esponja *P. citrina* são relevantes, visto que promissoras atividades biológicas já foram detectadas. Além disso, até o presente momento, uma pequena quantidade de substâncias foi identificada tanto para o gênero como para a espécie.

**CAPÍTULO II- ESTUDO QUÍMICO BIOGUIADO PELA
ATIVIDADE ANTIVIRAL COM A FRAÇÃO *n*-BUTANOL DE
*P. citrina***

2.1 APRESENTAÇÃO

O uso de vacinas e a disponibilidade de medicamentos antirretrovirais potentes propiciou um grande avanço na luta do homem contra infecções virais possibilitando a erradicação de algumas patologias como a varíola e uma melhor abordagem terapêutica contra os vírus da imunodeficiência humana (HIV), herpesvirus, ortomixovirus, hepatites B e C (KITAZATO; WANG; KOBAYASHI, 2007).

Apesar de toda essa evolução, nos últimos anos esse tipo de microorganismo é responsável por 25% de todas as patologias infecciosas emergentes no mundo, apontando a alta prevalência de infecções virais para as quais não existem tratamentos específicos e o constante aparecimento de novas cepas virais resistentes aos fármacos empregados na prática clínica (STRASFELD; CHOU, 2010; KIMBERLIN; WHITLEY, 1996).

Além disso, deve-se levar em conta que os vírus necessitam da célula hospedeira e dos fatores celulares para a sua propagação, característica que acaba muitas vezes acarretando em uma série de efeitos adversos sobre as células infectadas, em virtude da dificuldade da concepção de um tratamento capaz de atacar apenas o vírus (JAIME et al., 2013).

Atualmente cerca de 50 fármacos encontram-se disponíveis para o tratamento de infecções virais (DE CLERQ, 2013). Dentre eles, podemos destacar os análogos dos nucleosídeos, aciclovir e azidotimidina (AZT), descobertos por meio do embasamento dos estudos de Bergmann e Feeney (1951). Desde então, o ambiente marinho passou a ser investigado com maior profundidade e está servindo como fonte de novas moléculas capazes de atuar contra diferentes tipos de vírus (SAGAR; KAUR; MINNEMAN, 2010; UZAIR; MAHMOOD; TABASSUM, 2011).

Com intuito de contribuir para o desenvolvimento de agentes terapêuticos capazes de inibir ação do HSV-1 (cepa KOS), Bianco e colaboradores (2013) avaliaram a potencial ação antiherpética *in vitro* de 95 extratos provenientes de macroalgas e invertebrados marinhos coletados na costa brasileira, destacando-se naquela época o potencial antiviral da fração *n*-butanólica (BF) de *P. citrina*.

Baseado nestes primeiros resultados, este capítulo está focado no fracionamento biomonitorado com a fração BF de *P. citrina* visando o tratamento das infecções provocadas pelos vírus do Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1), um vírus de DNA, que é associado à alta incidência de

infecções virais caracterizado pelo surgimento de cepas resistentes aos medicamentos tradicionalmente empregados na terapêutica, especialmente em pacientes imunocomprometidos (PIRET; BOVIN, 2011). Cabe destacar que até o presente momento, não existiam relatos na literatura científica de compostos isolados de *P. citrina* com atividade antiviral.

2.2 OBJETIVOS

Realizar estudo químico com a fração *n*-butanol (BF) de *P. citrina* visando identificar os compostos responsáveis pela atividade antiviral.

2.2.1 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a citotoxicidade de amostras purificadas e compostos isolados a partir de *P. citrina*, através do ensaio colorimétrico do MTT, em células Vero.
- ✓ Avaliar a potencial atividade antiherpética (anti-HSV-1, cepa KOS) de amostras purificadas e dos compostos isolados, por meio do ensaio de redução do número de placas de lise.
- ✓ Analisar o mecanismo de ação antiherpético dos compostos isolados.
- ✓ Verificar o possível sinergismo entre os compostos.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo será apresentado na forma de artigo, o qual descreve o isolamento de uma amostra ativa enriquecida em esteroides sulfatados (TSH) e de dois compostos isolados (HS e HS-C) a partir de *P. citrina*, guiado por meio de bioensaios com o vírus HSV-1, como também a avaliação dos prováveis mecanismos de ação antiherpética e a potencial ação sinérgica entre os compostos isolados e o fármaco de referência aciclovir. Os dados espectrais que permitiram a caracterização do núcleo fundamental da amostra TSH e a elucidação estrutural dos compostos isolados HS e HS-C são apresentados nos apêndices (2-12).

2.3.1 Publicação

Anti HSV-1 activity of halistanol sulfate and halistanol sulfate C isolated from brazilian marine sponge *Petromica citrina* (Demospongiae).

Tatiana da Rosa Guimarães; Carlos Guillermo Quiroz; Caroline Rigotto Borges; Simone Quintana de Oliveira; Maria Tereza Rojo de Almeida; Éverson Miguel Bianco; Maria Izabel Goulart Moritz; João Luís Carraro; Jorge Alejandro Palermo; Gabriela Cabrera; Eloir Paulo Schenkel; Flávio Henrique Reginatto e Cláudia Maria Oliveira Simões.

Marine Drugs, v.11, p. 4176-4192, 2013.

(ISSN 1660-3397)

DOI: 10.3390/md11114176

Article

Anti HSV-1 Activity of Halistanol Sulfate and Halistanol Sulfate C Isolated from Brazilian Marine Sponge *Petromica citrina* (Demospongiae)

Tatiana da Rosa Guimarães^{1,†}, Carlos Guillermo Quiroz^{2,†}, Caroline Rigotto^{1,2}, Simone Quintana de Oliveira¹, Maria Tereza Rojo de Almeida¹, Éverson Miguel Bianco¹, Maria Izabel Goulart Moritz¹, João Luis Carraro³, Jorge Alejandro Palermo⁴, Gabriela Cabrera⁴, Eloir Paulo Schenkel¹, Flávio Henrique Reginato¹ and Cláudia Maria Oliveira Simões^{1,2,*}

¹ Laboratory of Natural Products, Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil; E-Mails: tatyguimaraes@gmail.com (T.R.G.); simonequintana@hotmail.com (S.Q.O.); terezarojo@gmail.com (M.T.R.A.); ebianco@chemist.com (E.M.B.); mizabelgm@gmail.com (M.I.G.M.); eloirschinkel@gmail.com (E.P.S.); freginato@hotmail.com (F.H.R.)

² Laboratory of Applied Virology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil; E-Mails: carlosguillermo.quiroz@gmail.com (C.G.Q.); rigottocarol@gmail.com (C.R.B.)

³ Laboratory of Porifera, National Museum, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 20940-040, RJ, Brazil; E-Mail: joao.porifera@gmail.com

⁴ UMYMFOR—Department of Organic Chemistry, FCEN—University of Buenos Aires, Buenos Aires C1428EGA, Argentina; E-Mails: palermo@qo.fcen.uba.ar (J.A.P.); gabyc@qo.fcen.uba.ar (G.C.)

[†] These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: claudiasimoes13@gmail.com; Tel.: +55-48-3721-5207; Fax: +55-48-3721-9350.

Received: 2 September 2013; in revised form: 18 September 2013 / Accepted: 30 September 2013 / Published: 29 October 2013

Abstract: The *n*-butanol fraction (BF) obtained from the crude extract of the marine sponge *Petromica citrina*, the halistanol-enriched fraction (TSH fraction), and the isolated compounds halistanol sulfate (**1**) and halistanol sulfate C (**2**), were evaluated for their inhibitory effects on the replication of the Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1, KOS

strain) by the viral plaque number reduction assay. The TSH fraction was the most effective against HSV-1 replication (SI = 1.5.33), whereas compounds **1** (SI = 2.46) and **2** (SI = 1.95) were less active. The most active fraction and these compounds were also assayed to determine the viral multiplication step(s) upon which they act as well as their potential synergistic effects. The anti-HSV-1 activity detected was mediated by the inhibition of virus attachment and by the penetration into Vero cells, the virucidal effect on virus particles, and by the impairment in levels of ICP27 and gD proteins of HSV-1. In summary, these results suggest that the anti-HSV-1 activity of TSH fraction detected is possibly related to the synergic effects of compounds **1** and **2**.

Keywords: antiviral activity; HSV-1; marine sponge; *Petromica citrina*; sulfate sterols

Abbreviations

CMC, Carboxymethylcellulose; COSY, Correlation Spectroscopy; ESI, Electrospray ionization; HMBC, Heteronuclear Multiple Bond Correlation; HSQC, Heteronuclear Single Quantum Correlation; HSV, Herpes Simplex Virus; MEM, Minimal Essential Medium; NMR, Nuclear Magnetic Resonance; PFU, Plaque Forming Units; TSH, Halistanol-Enriched Fraction.

1. Introduction

The drug of choice for the prophylaxis and treatment of Herpes Simplex Virus (HSV) infections is acyclovir (ACV), which selectively inhibits HSV DNA replication with low host-cell toxicity. However, the intensive use of antiviral drugs has led to the emergence of resistant viruses [1–3]. Recently, De Clercq [4] described the evolution of antiviral agents against some viral infections, including HSV, confirming that the search for new antiviral agents is still relevant.

Pharmaceutical interest in marine organisms has provided thousands of new and novel compounds that have shown important biological properties, such as anticancer, antiviral, antiprotzoal, and antibacterial activities [2,5–8]. In this context, marine sponges have been a prolific source of diverse secondary metabolites with complex and unique structures [2,9–13]. Some of them were used as lead compounds to obtain new drugs that are currently used in clinics, such as acyclovir, vidarabine, cytarabine, eribulin mesylate, and others, that are now in clinical stages of evaluation such hemasterlin [14–16]. In addition, several highly active compounds from marine sponges have been reported as new biologically active structures [17–24].

Petromica citrina (Porifera, Demospongiae) belongs to a marine sponge genus that occurs only on the Brazilian coast [25]. There are few studies with this species, and most of them describe the evaluation of different pharmacological properties such as antibacterial and antiviral activities for its aqueous extracts [26,27] and *n*-butanol fraction [28]. Moreover, a restricted number of chemical investigations and a few bioactive constituents have been reported, in particular, a sulfated steroidal compound, identified as halistanol sulfate [29,30].

Recently, our research group described the anti-herpes activity of the *n*-butanol fraction of *P. citrina* [28]. Thus, the aim of this investigation was to determine, through a bioguided study, the active compounds responsible for the anti-HSV-1 activity detected.

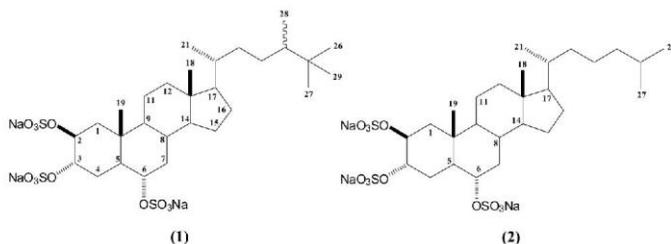
2. Results and Discussion

2.1. Bioguided Fractionation of the *n*-Butanol Fraction of *P. citrina*

In a previous screening of the anti-infective potential of marine invertebrates and seaweeds [28], we observed a promising activity for the *n*-butanol fraction (BF) obtained from the ethanolic crude extract of this sponge that led us to perform this study. Our goal was to isolate, through a bioguided study, the anti-herpes bioactive metabolites present in this fraction.

First, the BF fraction was submitted to several Sephadex LH-20 chromatography procedures yielding five fractions (Sep-1 to Sep-5), which were pooled based on thin-layer chromatography (TLC) similarity. Among these fractions, only fraction Sep-5 showed anti HSV-1 activity and was submitted to NMR analysis. The ^1H NMR spectrum of Sep-5 displayed characteristic signals of the presence of halistanol sulfates as the major compounds. These major compounds were isolated by C18 column chromatography, yielding compounds **1** and **2** (Figure 1).

Figure 1. Structures of halistanol sulfate (**1**) and halistanol sulfate C (**2**).



The complete structure of compound **1** was determined based on HSQC, HMBC, and COSY spectra, as well as by ESI mass spectrometry and by comparison with literature data [29–33]. The presence of three sulfate groups in the structure could be clearly defined by ESI mass spectrometry (m/z 731 $[\text{M} - \text{Na}]^-$, m/z 611 $[\text{M} - \text{NaHSO}_4]$, m/z 491 $[\text{M} - (\text{NaHSO}_4)_2]$ and m/z 354 $[\text{M} - (\text{NaHSO}_4)_3]$). These sulfate groups was also supported by the IR band (1230 cm^{-1}).

In addition, the ^1H NMR spectrum of compound **1** showed carbinol signals at δ_{H} 4.83 (sl), δ_{H} 4.76 (sl, $J = 1.8\text{ Hz}$), and δ_{H} 4.20 (dt, $J = 11.0, 4.4\text{ Hz}$), corresponding in the HSQC spectrum to the signals at δ_{C} 75.6 (CH-2 and CH-3), and δ_{C} 78.8 (CH-6), respectively. These data, together with characteristic signals of two methyl singlets at δ 0.70 (CH₃-18) and δ 1.07 (CH₃-19), suggested a sulfated sterol nucleus. The structure of the side chain of compound **1** was elucidated by analysis of 2D NMR data. The NMR spectra showed the presence of a side chain containing two secondary methyls at δ 0.95

(d, $J = 6.4$ Hz) and δ 0.84 (d, $J = 6.8$ Hz) attributed to positions C₂₁ and C₂₈, also based on HMBC data. The ¹H NMR spectra revealed a singlet at δ 0.86 (9H), which was connected to carbon at δ 27.9, suggesting a *t*-butyl group on the side chain. HMBC correlations of carbons at δ 27.9 (C₂₆, C₂₇ and C₂₉), δ 34.2 (C₂₅), and δ 45.5 (C₂₄) to the proton at δ 0.86 confirmed that C₂₆, C₂₇, and C₂₉ were connected to C₂₅. Therefore, compound **1** was identified as halistanol sulfate, a steroid previously reported for marine sponges such as *Halichondria* cf. [31], *Epipolasis* sp. [32], *Petromica ciocalyptoides* [29], *Haliclona* sp. [33], and *Petromica citrina* [30].

Halistanol sulfate (HS) was first reported in 1981 by Fusetani *et al.* [31] and, in that work, the authors only showed the ¹³C NMR data of HS. New compounds of the halistanol sulfate series (halistanol sulfates A to H) were isolated in the subsequent years [32,34], but the nomenclature and the chemical shift values in the ¹H NMR spectra of the side chain are still not completely defined [29,32]. Therefore, it is important that the details of the structural elucidation of compounds **1** and **2** are also presented.

Compound **2** also showed the same halistanol steroidal nucleus signals, but with a shorter side chain, which was inferred by NMR data together with the information of the ESI mass spectrum. Moreover, the ESI/MS spectrum showed the presence of three sulfate groups (m/z 703 [M - Na]⁻; m/z 583 [M - NaHSO₄]; m/z 463 [M - (NaHSO₄)₂] and m/z 340 [M - (NaHSO₄)₃]) in the structure. As well as for compound **1** the presence of sulfate groups in the structure was also supported by the IR band (1226 cm⁻¹). Although the ¹H-NMR spectra of compound **1** displayed two methyl doublets at δ 0.95 and δ 0.84 on the side chain, corresponding to C₂₁ and C₂₈, respectively, the ¹H NMR of compound **2** only one doublet signal at δ 0.94 (d, $J = 6.6$ Hz), corresponding to the C₂₁ methyl group. In addition, the ¹H NMR data did not show a *t*-butyl group at the end side of the chain. Furthermore, two new methyl signals at δ 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz) and δ 0.89 (d, $J = 6.6$ Hz) were identified. Considering the J values of these protons, we could suggest the presence of an isopropyl on the side chain. Thus, based on the data obtained, compound **2** was identified as halistanol sulfate C, a steroid previously reported for *Pseudoaxinissa digitata* [34] and *Epilopasis* sp. [32]. As far as we are aware, this is the first report of halistanol sulfate C for *Petromica citrina*.

Sulfated sterols have been described from a wide variety of marine organisms, such as sponges and echinoderms. Several of these sterols have a great structural diversity and broad spectrum of biological activities [35–39].

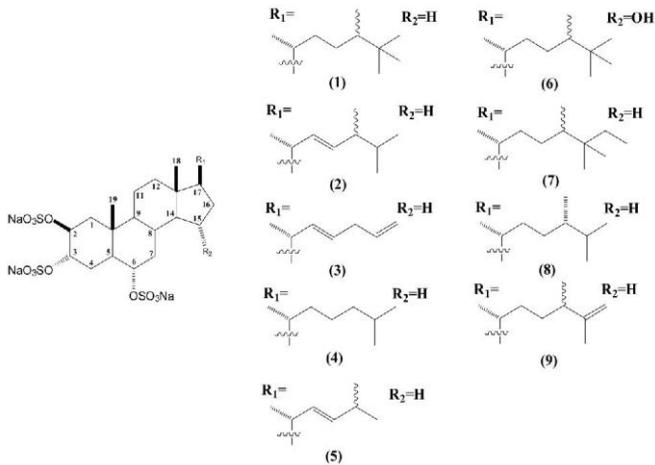
The first reported compound of the halistanol family was halistanol sulfate, isolated from the marine sponge *Halichondria* cf. *moorei* Bergquist [31]. Important biological activities have been reported for this steroid sulfate, such as anti-HIV effects [38], cytotoxic activity against human hepatoma cells (QGY-7701), and chronic myelogenous leukemia cells (K562) [40]. Afterwards, the same compound was isolated from *Petromica ciocalyptoides* and *Topsentia ophiraphidites*, showing inhibitory activity of *Leishmania tarentola* [29] and a wide spectrum of activity against resistant bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium fortuitum*, and *Neisseria gonorrhoeae* [30].

Thus far, eight sulfated sterols have been described with this fundamental nucleus and named as halistanol sulfates A to H (Figure 2). All of them are characterized by the same 2 β , 3 α , 6 α -trisulfoxy functionalities, differing only in their side chains [32,34,35]. The most promising pharmacological

activities described for these compounds were the anti-HIV-1 and anti-HIV-2 effects for halistanol sulfates F and G [32].

In addition, there are many other reports about different members of the halistanol series that have shown important pharmacological properties. One of the first reported members of this series was ibisterol sulfate, isolated from *Topsentia* sp., which showed anti-HIV activity [41]. Other examples of halistanol-type compounds with antiviral activity are weinbersterol disulfates A and B isolated from the sponge *Petrosia weinbergi* which exhibited activity against leukemia virus (FeLV), mouse influenza virus (PR8), and mouse coronavirus (A59) replication [42].

Figure 2. Structures of halistanol sulfate (**1**) and derivatives halistanol sulfates A to H (**2–9**).



As compounds with sulfated groups are described to have antiviral properties [34,38,43–46], and due to the anti-herpetic activity shown by the BF fraction, we decided to verify the anti-HSV-1 activity of compounds **1** and **2** and the TSH fraction and to elucidate their mode of action.

2.2. Antiviral Activity

The evaluation of potential antiviral activity of *P. citrina* fractions [Sep-1, Sep-2, Sep-3, Sep-4, and Sep-5 (TSH fraction)] as well as the isolated compounds (**1** and **2**) was performed against HSV-1 (KOS strain) using the viral plaque number reduction assay.

According to the results obtained (Table 1), the isolated compounds **1** (SI = 2.46) and **2** (SI = 1.45) showed weak activity. On the other hand, the TSH fraction that contains these compounds as the major constituents showed the most promising activity (SI = 1.533).

As it is important to understand the targets and the mode of action of a potential useful new antiviral agent, a set of experiments was carried out to determine the stages at which the most active samples (TSH fraction and compounds **1** and **2**) affect the viral replication cycle.

Pretreatment of Vero cells with TSH fraction and compounds **1** and **2** for three hours before viral infection showed that these samples did not affect viral infectivity suggesting that they did not exert protective effects against the HSV-1 infection process (data not shown).

Table 1. Cytotoxicity and anti-herpetic activity of samples obtained from *Petromica citrina*.

Samples	CC ₅₀ ^a	IC ₅₀ ^b	SI ^c
BF fraction	>500.00	100.99 ± 19.65	>4.95
Sep-1 fraction	388.38 ± 2.54	NI	—
Sep-2 fraction	430.13 ± 10.76	NI	—
Sep-3 fraction	45.37 ± 15.17	NI	—
Sep-4 fraction	23.83 ± 11.80	NI	—
Sep-5 (TSH fraction)	44.05 ± 2.52	2.87 ± 0.78	15.33
Compound 1	13.83 ± 3.75	5.63 ± 1.37	2.46
Compound 2	11.89 ± 4.02	6.09 ± 1.51	1.95
ACV	>2000	3.45 ± 0.42	>580

Values represent the mean ± standard deviations of three independent experiments. NI = no inhibitory activity; ^a 50% cytotoxicity concentration, Vero cells (µg/mL); ^b 50% viral inhibitory concentration, HSV-1 (KOS strain) (µg/mL); ^c Selectivity index (SI = CC₅₀/IC₅₀).

The direct virus inactivating activity of the tested samples, in the absence of cells, was also evaluated. It was also observed that the TSH fraction and compounds **1** and **2** were able to reduce HSV-1 infectivity at concentrations 8×, 12× and 6× lower than their IC values (Table 2). This is in accordance with previous studies that have reported the virucidal activity of halistanol sulfates F and H against HIV replication [34,38].

Table 2. Virucidal, attachment and penetration inhibitory effects of samples obtained from *Petromica citrina* on HSV-1 (KOS strain) replication.

Samples	VC ₅₀ ^a	AC ₅₀ ^b	PC ₅₀ ^c
TSH fraction	0.38 ± 0.12	6.41 ± 0.63	2.45 ± 1.33
Compound 1	0.48 ± 0.04	7.84 ± 1.03	5.67 ± 0.47
Compound 2	1.08 ± 0.36	12.26 ± 3.58	8.90 ± 1.86
Dextran sulfate	NA	<15.62	<15.62

Values represent the mean ± standard deviations of three independent experiments. NA = no activity; ^a 50% virucidal concentration (µg/mL); ^b 50% attachment inhibitory concentrations (µg/mL); ^c 50% penetration inhibitory concentrations (µg/mL).

In order to determine whether these samples were able to interfere with early events of HSV infection, their effects on HSV-1 attachment and penetration were investigated separately. All the

tested samples inhibited virus attachment and penetration, as shown in Table 2. Therefore, the inactivation of HSV-1 could be related to virions binding to heparan sulfate receptors, inhibiting these two early stages of viral replication. Other natural sulfated molecules, such as sulfated polysaccharides, were also active against HIV, HSV-1, and HSV-2 replication [43–46], inhibiting these same early events of viral replication.

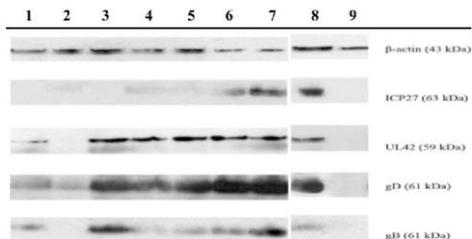
It is well documented that the antiviral potency of sulfated compounds depends on their degree of sulfation [4,47]. Moreover, it has become clear that the antiviral properties of sulfated compounds are not only a simple function of their detailed structural features, but also of their charge density. For instance, a highly charged molecule is more likely to interfere with electrostatic interactions between the positively charged region of a viral glycoprotein and the negatively charged HS chains of the cell-surface glycoprotein receptor, which could explain the blockade of viral attachment and penetration by competitive inhibition [48].

Additionally, we also tested the anti HSV-1 activity of halistanol disulfate (DS) and halistanol monosulfate (MS) (data not shown). It was observed that DS was less active than halistanol sulfate and halistanol sulfate C (compounds **1** and **2**, respectively, both trisulfated derivatives) as well as the MS being inactive against HSV-1.

In view of the fact that our results suggest that TSH fraction and compounds **1** and **2** affect the early stages of HSV replication, we also investigated the effects of these samples on protein expression during HSV-1 replication by Western blotting (Figure 3). The results showed that the TSH fraction was the only sample that reduced the expression of all the tested proteins, in a concentration-dependent manner. Nevertheless, the (α) immediate ICP27 protein expression of HSV-1 (KOS strain) was reduced by all the tested samples, confirming that they interfere with the early events of HSV-1 replication. In addition to this event, a concentration-dependent inhibition of gB glycoprotein synthesized in the late phase (γ) of HSV-1 replication was also observed. Only TSH fraction reduced gD expression. These results suggest that an alteration in immediate early protein expression could affect the expression of late proteins. This statement is supported by the findings of Fontaine-Rodrigues and Knipe [49], who demonstrated that ICP27 is required for the efficient expression of HSV late proteins.

Given the fact that TSH fraction, compounds **1** and **2** seemed to act in a different way than ACV, the potential synergistic effects between them were tested at different concentrations (Table 3). The results obtained suggest a strong synergism between TSH fraction, compound **2** and compounds **1** + **2** and ACV, and a moderate synergism when compound **1** was tested with this drug, at the higher concentration ($2 \times IC_{50}$). When compounds **1** and **2** were tested in association, a strong synergism was also detected, at the three tested concentrations. In relation to the other combinations, a slight or a moderate antagonism was detected, exception to the association of ACV and TSH fraction, at the intermediate concentration ($1 \times IC_{50}$), when an additive effect was detected.

Figure 3. Effects of samples obtained from *Petromica citrina* on HSV-1 (KOS strain) proteins expression.



Treated and untreated Vero cells were analyzed by SDS-PAGE/Western blotting using specific antibodies for viral (ICP27, UL42, gD or gB) and cellular (β -actin) proteins. Column 1: Infected cells treated with $1 \times \text{IC}_{50}$ TSH fraction; Column 2: Infected cells treated with $2 \times \text{IC}_{50}$ TSH fraction; Column 3: Infected cells treated with $1 \times \text{IC}_{50}$ Compound 1; Column 4: Infected cells treated with $2 \times \text{IC}_{50}$ Compound 1; Column 5: Infected cells treated with $1 \times \text{IC}_{50}$ Compound 2; Column 6: Infected cells treated with $2 \times \text{IC}_{50}$ Compound 2; Column 7: Infected cells without treatment (Viral control—VC); Column 8: Infected cells treated with $2 \times \text{IC}_{50}$ acyclovir (ACV); and Column 9: Not infected cells (cellular control—CC).

Table 3. Synergistic effects of combination of TSH fraction and compounds 1 and 2 with acyclovir (ACV) on anti-HSV activity.

Compounds Combination Ratio	$2 \times \text{IC}_{50}$	$1 \times \text{IC}_{50}$	$0.5 \times \text{IC}_{50}$
	Experimental CI Values (Description—Graded Symbols)		
ACV + TSH fraction	0.113	1.033	1.253
	(+++)	(±)	(--)
ACV + Compound 1	0.745	1.21	1.243
	(++)	(--)	(--)
ACV + Compound 2	0.102	1.169	1.202
	(+++)	(-)	(--)
Compound 1 + Compound 2	0.197	0.146	0.131
	(+++)	(+++)	(+++)
ACV + Compound 1 + Compound 2	0.104	1.131	1.121
	(+++)	(-)	(-)

CI, combination index, a quantitative measure calculated by CalcuSyn Software. This index quantifies the interaction between the tested compounds as described by Chou *et al.* [50]. In detail, CI from 0.1 to 0.3 means strong synergism (+++), 0.7 to 0.85 means moderate synergism (++) , 0.9 to 1.1 means additive effect (±), 1.1 to 1.2 means slight antagonism (-), and 1.2 to 1.45 means moderate antagonism (--). Obtained values represent the mean of three independent experiments.

The observed synergism between these samples and ACV could be explained by the fact that the samples act in different steps of HSV-1 replication than those affected by this anti-herpes drug, which could be considered an interesting result. Therefore, the most important result obtained was when compounds 1 and 2 were tested in association showing that the detected anti-HSV activity could be

explained by the strong synergic effects of these major compounds present in the TSH fraction. Other natural compounds with anti-herpes activity, such as sulfated polysaccharides [44,45], docosanol [51], and oxiresveratrol [52] have already been reported to present synergistic effects with ACV, which corroborate our results.

3. Experimental Section

3.1. General Experimental Procedures

General 1D and 2D NMR experiments were performed on a Bruker Avance 2 (500 MHz) instrument at 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C . All spectra were recorded in CD_3OD using the signals of residual non-deuterated solvent as internal reference. Mass spectrometric analyses were performed using a Bruker micrOTOF-Q II mass spectrometer (Bruker® Daltonics, Billerica, MA, USA), equipped with ESI. Multi-point mass calibration was carried out using a mixture of sodium formate from m/z 50 to 900. Data acquisition and processing were carried out using the Bruker Compass Data Analysis version 4.0 software supplied with the instrument. All the analytical solutions (0.5 mg/mL) were prepared using methanol LCMS grade. Compounds were infused into the source using a KDS 100 syringe pump (KD Scientific, Holliston, MA, USA) at a flow rate of 180 mL/min. General MS conditions: Capillary 3.5 kV (negative ion mode), dry heater 180 °C, nebulizer 0.4 bar, dry gas (N_2), 4 L/min (UHYMFOR/UBA). Silica gel 60 (70–230 mesh) Merck®, RP18 (Fluka®, Buchs, Switzerland), Sephadex LH-20 (GE healthcare®, Chalfont St Giles, UK), TLC analysis was performed on Silica gel F₂₅₄ and RP18 plates (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA).

3.2. Sponge Collection

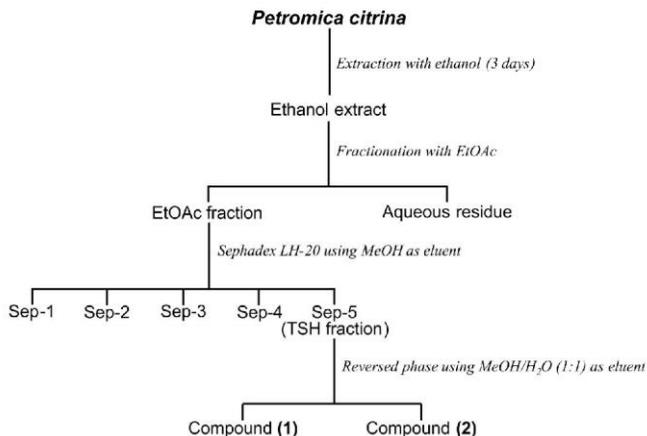
Petromica citrina was collected from January to July 2010 at Xavier Island (27°36'39" S; 48°23'32" W), Santa Catarina State, Brazil, at a depth of 9–17 m, and immediately frozen. The material was identified by Dr. João Luis Carraro and voucher specimens were deposited in the Porifera collection of the *Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul*, Brazil (MCNPOR 8777, 8778, 8779, 8780, 8781).

3.3. Extraction and Isolation of Compounds 1 and 2

The frozen sponge (1700 g, wet) was exhaustively extracted with ethanol for three days at room temperature. The crude ethanolic extract (CHE) was filtered, the ethanol was eliminated under reduced pressure, and the gummy residue was suspended in H_2O before being extracted successively with ethyl acetate (EtOAc) and *n*-butanol (*n*-BuOH) (3×500 mL) yielding three fractions: EtOAc (EAF), *n*-BuOH (BF) and aqueous residue (AR), respectively. Next, the BF fraction (2.0 g) was subjected to Sephadex LH-20 column chromatography (790 nm \times 25 mm) using methanol (MeOH) as eluent. A total of 180 tubes (20 mL) were collected and combined into five fractions (Sep-1, 650 mg; Sep-2, 450 mg; Sep-3, 350 mg; Sep-4, 250 mg; and Sep-5, 300 mg) based on Silica gel thin-layer chromatography (TLC) similarity. Because the fraction Sep-5 (named TSH fraction) showed only one spot by TLC analysis, this fraction was forwarded to ^1H NMR analysis and proved to be a mixture of halistanol sulfate (Compound 1) and halistanol sulfate C (Compound 2) as the major compounds.

The TSH fraction (200 mg) was then dissolved in methanol and submitted to a reversed-phase column chromatography (300 mm × 20 mm) packed with RP18 as stationary phase and MeOH:H₂O (1:1 v/v) as mobile phase. This procedure resulted in two isolated compounds: halistanol sulfate (30 mg, compound **1**) and halistanol sulfate C (12 mg, compound **2**). Figure 4 shows the steps of purification.

Figure 4. Overview of the strategy used for the purification of sulfate halistanol (compound **1**) and sulfate halistanol C (compound **2**) from the butanol fraction of *Petromica citrina*.



Halistanol sulfate (1): White amorphous powder; IR (KBr) ν_{\max} 3442, 2953, 1643, 1392, 1230, 1068 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ 4.83 (1H, sl, H-2), 4.76 (1H, sl, $J = 1.8$ Hz, H-3), 4.20 (1H, dt, $J = 4.4, 10.9$ Hz, H-6), 2.37 (1H, dl, $J = 10.2$ Hz, H-7a), 2.30 (1H, dl, $J = 14.5$ Hz, H-4a), 2.11 (1H, dl, $J = 14.3$ Hz, H-1a), 2.01 (1H, dl, $J = 12.4$ Hz, H-12a), 1.86 (1H, m, H-16a), 1.81 (1H, tl, $J = 14.4$ Hz, H-4b), 1.69 (1H, m, H-16b), 1.63 (1H, m, H-5), 1.64 (1H, m, H-15a), 1.58 (1H, m, H-22a), 1.55 (1H, m, H-11a), 1.54 (1H, m, H-8), 1.49 (1H, dd, $J = 4.0, 14.3$ Hz, H-1b), 1.38 (1H, m, H-20), 1.33 (1H, m, H-11b), 1.29 (1H, m, H-12b), 1.15 (1H, m, H-14), 1.12 (1H, m, H-15b), 1.10 (1H, m, H-17), 1.07 (3H, s, H-19), 1.02 (1H, m, H-7b), 0.99 (2H, m, H-24), 0.95 (3H, d, $J = 7.4$ Hz, H-21), 0.90 (1H, m, H-22b), 0.78 (2H, m, H-23), 0.86 (9H, sl, H-26, 27, 29), 0.84 (3H, d, H-28) 0.78 (1H, m, H-9), 0.70 (3H, sl, H-18); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz): δ 78.8 (CH, C-6), 75.6 (CH, C-3), 75.6 (CH, C-2), 57.7 (CH, C-17), 57.6 (CH, C-14), 55.8 (CH, C-9), 45.5 (CH, C-24), 45.4 (CH, C-5), 43.8 (C, C-13), 41.3 (CH_2 , C-12), 40.1 (CH_2 , C-7), 39.2 (CH_2 , C-1), 37.7 (CH_2 , C-22), 37.7 (CH, C-20), 37.7 (C, C-10), 35.2 (CH, C-8), 34.1 (C, C-25), 29.2 (CH_2 , C-16), 27.9 (CH_3 , C-26), 27.9 (CH_3 ,

C-27), 27.9 (CH₃, C-29), 25.2 (CH₂, C-15), 25.1 (CH₂, C-4), 21.9 (CH₂, C-11), 22.03 (CH₂, C-23), 19.6 (CH₃, C-21), 15.3 (CH₃, C-19), 15.0 (CH₃, C-28), 12.5 (CH₃, C-18). ESI-MS *m/z* 731.2198 [M – Na]⁺ (calcd for C₂₉H₄₉Na₃O₁₂, 754.2100).

Halistanol sulfate C (2): White amorphous solid; IR (KBr)_{vmax} 3442, 2949, 1625, 1384, 1226, 1070 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 4.83(1H, m, H-2), 4.76 (1H, q, *J* = 2.7 Hz, H-3), 4H-2), 4.20 (1H, td, *J* = 11.1, 4.4 Hz, H-6), 2.37 (1H, dt, *J* = 12.3, 4.4 Hz, H-7a), 2.30 (1H, dt, *J* = 15.0, 2.8, 1.1 Hz, H-4a), 2.11 (1H, dd, *J* = 14.7, 1.7 Hz, H-1a), 2.01 (1H, dl, *J* = 12.7, 3.5 Hz, H-12a), 1.86 (1H, m, H-16a), 1.81 (1H, ddd, *J* = 15.0, 13.2, 2.8 Hz, H-4b), 1.63 (1H, m, H-5), 1.61 (1H, m, H-15a), 1.53 (1H, m, H-8), 1.52 (2H, m, H-8, H-25), 1.48 (1H, dd, *J* = 14.7, 3.9 Hz, H-1b), 1.38 (1H, m, H-20), 1.31 (1H, qd, *J* = 13.1, 3.5 Hz, H-11), 1.29 (1H, m, H-16b), 1.14 (1H, m, H-12b), 1.12 (3H, m, H-14, H-15a, H-17), 1.07 (3H, sl, H-19), 1.02 (1H, m, H-7b), 0.94 (3H, d, *J* = 6.5 Hz, H-21), 0.9–1.4 (6H, m, H2-22, H2-23, H2-24), 0.87 (3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-26), 0.89(3H, d, *J* = 6.6 Hz, H-27), 0.78 (1H, m, H-9), 0.69 (3H, sl, H-18). ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ 78.7 (CH, C-6), 75.5 (CH, C-2), 75.5 (CH, C-3), 57.6 (CH, C-17), 57.5 (CH, C-14), 55.8 (CH, C-9), 45.3 (CH, C-5), 43.8 (C, C-13), 41.2 (CH₂, C-12), 40.8 (CH₂, C-24), 40.0 (CH₂, C-7), 40.0 (CH₂, C-7), 39.2 (CH₂, C-1), 37.6 (C, C-10), 37.3 (CH₂, C-22), 37.0 (CH, C-20), 35.1 (CH, C-8), 29.2 (CH₂, C-16), 29.1 (CH, C-25), 25.1 (CH₂, C-4), 25.0 (CH₂, C-23), 24.9 (CH₂, C-15), 23.1 (CH₃, C-26), 22.9 (CH₃, C-27), 21.8 (CH₂, C-11), 19.1 (CH₃, C-21), 15.2 (CH₃, C-19), 12.5 (CH₃, C-18). ESI-MS *m/z* 703.2032 [M – Na]⁺ (calcd for C₂₇H₄₅Na₃O₁₂S₃, 726.1800).

3.4. Anti-HSV-1 Activity

3.4.1. Virus and Cell Line

HSV-1 (KOS strain, Faculty of Pharmacy, University of Rennes, France) was propagated in Vero cells. Viral stocks were stored at –80 °C and titrated based on plaque forming units (PFU) counted by plaque assay as previously described [53].

Vero (ATCC: CCL 81) cells were grown in Eagle's minimum essential medium (MEM; Cultilab®, Campinas, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco®, Carlsbad, CA, USA), 100 U/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin, and 25 µg/mL amphotericin B (Cultilab®), and maintained at 37 °C in humidified 5% CO₂.

3.4.2. Cytotoxicity Assay

Vero cell viability was measured by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide—Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) [54]. Briefly, confluent Vero cells were exposed to different concentrations of samples for 72 h, and after incubation, the 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) of each one was calculated as the concentration that reduces cell viability by 50%, when compared to untreated controls.

3.4.3. Antiviral Activity Assays

Viral plaque number reduction assay: To evaluate the anti-herpes activity, a plaque reduction assay was performed following the general procedures described by Silva *et al.* [55]. Vero cell monolayers were infected with approximately 100 PFU of the virus for 1 h at 37 °C, then overlaid with MEM containing 1.5% carboxymethylcellulose (CMC; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) either in the presence or absence of different concentrations of the samples. After 72 h of incubation at 37 °C, cells were fixed and stained with naphthol blue-black (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), and the plaques were counted. The IC₅₀ of each sample was calculated as the concentration that reduced the number of viral plaques in 50%, when compared to the untreated controls. ACV was used as a positive control. The selectivity index (SI = CC₅₀/IC₅₀) was calculated for each sample tested.

Virucidal assay: Mixtures of serial two-fold dilutions of samples and 4×10^4 PFU of HSV-1 in serum free MEM were co-incubated for 15 min at 37 °C prior to the dilution of these mixtures to non-inhibitory concentrations (1:100) [56]. The residual infectivity was determined by the viral plaque number reduction assay, as described above.

Pretreatment: This assay was performed as described by Bettega *et al.* [57]. Briefly, Vero cell monolayers were pretreated with different concentrations of samples for 3 h at 37 °C prior virus infection. After washing, cells were infected with 100 PFU of HSV-1 for 1 h at 37 °C. The infected cells were washed, overlaid with MEM containing 1.5% CMC, incubated for 72 h, and treated as described earlier for the viral plaque number reduction assay.

Simultaneous treatment: This assay was performed as described by Silva *et al.* [55]. Briefly, 100 PFU of HSV-1 and different concentrations of samples were added concomitantly to Vero cells for 1 h at 37 °C. After washing, cells were overlaid with MEM containing 1.5% CMC, incubated for 72 h, and treated as described earlier for the viral plaque number reduction assay.

Adsorption and penetration assays: These assays followed the procedures described by Silva *et al.* [55], with minor modifications. Briefly, for the adsorption assay, confluent Vero cells, pre-chilled at 4 °C for 1 h, were infected with 100 PFU of HSV-1 and treated with different concentrations of samples, then incubated at 4 °C for 2 h. The unadsorbed viruses were removed by washing with cold PBS, the cells were covered with overlay medium, the temperature was raised to 37 °C, and treated as described earlier for viral plaque number reduction assay. Dextran sulfate (Sigma) was used as a positive control. For the penetration assay, 100 PFU of HSV-1 was adsorbed for 2 h at 4 °C on confluent Vero cells, after that incubated at 37 °C for 5 min to maximize virus penetration. The cells were then treated with different concentrations of samples. After 1 h at 37 °C, unpenetrated viruses were inactivated with warm citrate-buffer (pH 3.0) for 1 min. The cells were washed with PBS and treated as described above for the viral plaque number reduction assay.

Western blotting analysis: Procedures were performed as described by Bertol *et al.* [58]. Briefly, Vero cell monolayers were infected with HSV-1 at MOI 0.2 for 1 h. Next, residual viruses were removed with PBS and the cells were submitted to the different treatments for 18 h. The proteins were then extracted from the cells, separated on 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, Billerica, MA, USA) and

blocked with 5% non-fat milk in blotting buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20]. The membranes were incubated for 90 min with the following primary antibodies: Goat monoclonal antibody against ICP27 protein (1:700 dilution) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); mouse monoclonal antibody against UL42 protein (1:5000 dilution) (Millipore[®], St Charles, MO, USA); mouse monoclonal antibody against gD (1:5000 dilution) (Santa Cruz[®] Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); mouse monoclonal antibody against gB (1:5000 dilution) (Millipore[®], St Charles, MO, USA); and rabbit monoclonal antibody against beta-actin (1:5000 dilution) (Millipore[®], St Charles, MO, USA). After washing, the membranes were incubated with the respective secondary antibodies for 1 h. The immunoblots were developed and detected using the Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo[®] Scientific, Rockford, IL, USA), according to the manufacturer's instructions.

Synergistic effects: The effects of TSH fraction, compounds **1** and **2** in combination with ACV, and compounds **1** more **2** were evaluated by plaque reduction assay as described above and according to the experimental design proposed by Chou *et al.* [50]. Briefly, each sample alone or in combination was tested at a fixed ratio of its corresponding IC₅₀ value (*i.e.*, at IC₅₀ × 0.5 × 1 and × 2). The interaction degree between samples, based on the median-effect principle of the mass-action law, using Calcsyn software (version 2.1, Biosoft[®], Cambridge, UK). According to the CI theorem, CI values <1, =1, and >1 indicate synergism, additive effect, and antagonism, respectively.

4. Conclusions

In summary, these results suggest that the TSH fraction and compounds **1** and **2** present antiherpes activity through the reduction of viral infectivity, inhibition of virus entry into the cells, and by the impairment of levels of ICP27 and gD proteins of HSV-1.

The relevant selectivity index of 15.33 of TSH fraction and its content (compounds **1** and **2**) as well as the strong synergism effects observed suggest that the detected anti-HSV activity could be explained by the synergic effects of these major compounds present in the TSH fraction.

Acknowledgments

We would like to thank *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* [CNPq, MCTI (Grants 151561/2008-7, 306917/2009-2 and 471307/2011-4)], *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* [PNPD, CAPES, MEC (Grant 2207/2009)], *Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina* (FAPESC/BIODIVERSIDADE, Grant 14170/2010) for their financial support. The authors are also grateful to CNPq and CAPES for their research fellowships.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Nakakawa, E.; Reynold, S.J. The management of herpes simplex virus infections in HIV infected patients: Current issues and the role of cidofovir. *Virus Adapt. Treat.* **2011**, *3*, 35–43.
- Sagar, S.; Kaur, M.; Minneman, K.P. Antiviral lead compounds from marine sponges. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2619–2638.
- Snoeck, R. Antiviral therapy of herpes simplex. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2000**, *16*, 157–159.
- De Clercq, E. Antivirals: Past, present and future. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 727–744.
- Mayer, A.M.S.; Rodriguez, A.D.; Berlinck, R.G.S.; Fusetani, N. Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2011**, *153*, 191–222.
- Moura, L.A.; Ortiz-Ramirez, F.; Cavalcanti, D.N.; Ribeiro, S.M.; Muricy, G.; Teixeira, V.L.; Fuly, A.L. Evaluation of marine brown algae and sponges from Brazil as anticoagulant and antiplatelet products. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 1346–1358.
- Sepčić, K.; Kauterstein, S.; Mebs, D.; Tur, T. Biological activities of aqueous and organic extracts from tropical marine sponges. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 1550–1566.
- Uzair, B.; Mahmmod, Z.; Tabassum, S. Antiviral activity of natural products extracted from marine organisms. *BioImpacts* **2011**, *1*, 203–211.
- Abbas, S.; Kelly, M.; Bowling, J.; Sims, J.; Waters, A.; Hamann, M. Advancement into the arctic region for bioactive sponge secondary metabolites. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 2423–2437.
- Faulkner, D.J. Marine pharmacology. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *77*, 135–140.
- Gordaliza, M. Cytotoxic terpene quinones from marine sponges. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2849–2870.
- Kalinin, V.I.; Ivanchina, N.V.; Krasokhin, V.B.; Makarieva, T.N.; Stonik, V.A. Glycosides from marine sponges (*Porifera, Demospongiae*): Structures, taxonomical distribution, biological activities and biological roles. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 1671–1710.
- Noro, J.C.; Kalaitzis, J.A.; Neilan, B.A. Papua new guinea marine sponges. *Chem. Biodivers.* **2012**, *9*, 2077–2095.
- Donia, M.; Hamann, M.T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3*, 338–348.
- Molinski, T.F.; Dalisay, D.S.; Lievens, S.L.; Saludes, J.P. Drug development from marine natural products. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2009**, *8*, 69–85.
- Yasuhara-Bell, J.; Lu, Y. Marine compounds and their antiviral activities. *Antivir. Res.* **2010**, *86*, 231–240.
- Berlinck, R.G.S.; Hadju, E.; Rocha, R.M.; Oliveira, J.H.H.L.; Hernandez, I.L.C.; Seleguim, M.H.R.; Granato, A.C.; Almeida, E.V.R.; Nunez, C.V.; Muricy, G.; et al. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 510–522.
- Chairman, K.; Jeyamala, M.; Sankar, S.; Murugan, A.; Ranjit Singh, A.J.A. Immunomodulating Properties of Bioactive Compounds Present in *Aurora globostellata*. *Int. J. Mar. Sci.* **2013**, *3*, 151–157.

19. Mayer, A.M.; Hamann, M.T. Marine pharmacology in 2000: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Mar. Biotechnol.* **2004**, *6*, 37–52.
20. Tziveleka, L.A.; Vagias, C.; Roussis, V. Natural products with anti-HIV activity from marine organisms. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 1512–1535.
21. Zhou, X.; Lin, X.; Guo, X.; Yang, B.; Yang, X.W.; Liu, Y. Chemical constituents of the sponge *Mycale* species from south China sea. *Rec. Nat. Prod.* **2013**, *7*, 119–123.
22. Munro, M.H.; Blunt, J.W.; Dumdei, E.J.; Hickford, S.J.; Lill, R.E.; Li, S.; Battershill, C.N.; Duckworth, A.R. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotechnol.* **1999**, *70*, 15–25.
23. Sawadogo, W.R.; Schumacher, M.; Teiten, M.H.; Cerella, C.; Dicato, M.; Diederich, M. A Survey of marine natural compounds and their derivatives with anti-cancer activity reported in 2011. *Molecules* **2013**, *18*, 3641–3673.
24. Sipkema, D.; Franssen, M.C.; Osinga, R.; Tramper, J.; Wijffels, R.H. Marine sponges as pharmacy. *Mar. Biotechnol.* **2005**, *7*, 142–162.
25. Muricy, G.; Hajdu, E.; Minervino, J.V.; Madeira, A.V.; Peixinho, S. Systematic revision of the genus *Petromica* Topsent (*Demospongiae:Halichondrida*), with a new species from the southwestern Atlantic. *Hydrobiologia* **2001**, *443*, 103–128.
26. Marinho, P.R.; Muricy, G.R.S.; Silva, M.F.L.; Marval, M.G.; Laport, M.S. Antibiotic-resistant bacteria inhibited by extracts and fractions from Brazilian marine sponges. *Braz. J. Pharmacogn.* **2010**, *20*, 267–275.
27. Silva, A.C.; Kratz, J.M.; Farias, F.M.; Henriques, A.T.; Santos, J.; Leonel, R.M.; Lerner, C.; Mothes, B.; Barardi, C. R.M.; Simões, C.M.O. *In vitro* antiviral activity of marine sponges collected off Brazilian Coast. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 135–140.
28. Bianco, E.M.; Oliveira, S.Q.; Rigotto, C.; Tonini, M.; Guimarães, T.R.; Bittencourt, F.; Gouvêa, L.; Aresi, C.; Almeida, M.T.R.; Moritz, M.I.G.; *et al.* Anti-infective potential of marine invertebrates and seaweeds from the Brazilian coast. *Molecules* **2013**, *18*, 5761–5778.
29. Kossuga, M.H.; Lira, S.P.; Nascimento, A.P.; Gambardella, M.T.P.; Berlinck, G.S.; Torres, Y.R.; Nascimento, G.G.F.; Pimenta, E.F.; Silva, M.; Thiemann, O.H.; *et al.* Isolation and biological activities of secondary metabolites from the sponges *monanchora* aff. *arbuscula*, *aplysina* sp. *petromica* *ciocalyptoides* and *topsenticia* *ophiraphidies*, from the ascidian *didemnum* *ligulum* and from the octocoral *carijoa* *riisei*. *Quim. Nova* **2007**, *5*, 1194–1202.
30. Marinho, P.R.; Simas, N.K.; Kuster, R.M.; Duarte, R.S.; Fracalanza, S.E.L.; Ferreira, D.F.; Romanos, M.T.V.; Muricy, G.; Demarval, M.G.; Laport, M.S. Antibacterial activity and cytotoxicity analysis of halistanol trisulfate from marine sponge *Petromica citrina*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 2396–2400.
31. Fusetani, N.; Matsunaga, S.; Konosu, S. Bioactive marine metabolites II. Halistanol sulfate, as antimicrobial novel steroid sulfate from the marine sponge *Halichondria* cf. *moorei* Bergquist. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1985–1988.
32. Kanazawa, S.; Fusetani, N.; Matsunaga, S. Halistanol sulfates A–E. New steroids sulfates, from a marine sponge, *Epipolasis* sp. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 5467–5472.

33. Sperry, S.; Crews, P. Haliclostanoic acid and halistanol sulfate from an indo-pacific *Haliclona* sponge. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 29–32.
34. Bifulco, I.B.; Minale, L.; Riccio, R. Novel HIV-inhibitory halistanol sulfates F–H from a marine sponge, *Pseudoaximissa digitata*. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 164–167.
35. Aiello, A.; Fattorusso, E.; Menna, M. Steroids from sponges: Recent reports. *Steroids* **1999**, *64*, 687–714.
36. Kicha, A.A.; Ivanchina, N.V.; Kalinovskii, A.I.; Dmitrenok, P.S.; Sokolova, E.V.; Agafonova, I.G. Sulfated steroid glycosides from the vietnamese starfish *Linckia laevigata*. *Chem. Nat. Comp.* **2007**, *43*, 76–80.
37. Levina, E.V.; Aminin, D.L.; Kovalchuk, S.N.; Kozhemyako, V.B.; Dyslovoi, S.A.; Kalinovskii, A.I.; Dmitrenok, P.S. Polar steroids from *Solaster endeca* starfish and the physiological activity of polar steroids from three starfish species. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2010**, *36*, 233–239.
38. McKee, T.C.; Cardellina, J.H.; Riccio, R.; D'auria, M.V.; Iorizzi, M.; Minale, L.; Moran, R.A.; Gulakowski, R.J.; Memahan, J.B.; Buckheit, R.W.; et al. HIV-inhibitory natural products. 11. Comparative studies of sulfated sterols from marine invertebrates. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 793–797.
39. Whitson, E.L.; Bugni, T.S.; Chockalingam, P.S.; Concepcion, G.P.; Harper, M.K.; He, M.; Hooper, J.N.A.; Mangalindan, G.C.; Ritacco, F.; Ireland, C.M. Sphingosterol sulfates, PKC ζ inhibitors from a philippine sponge *Sphaciospongia* sp. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1213–1217.
40. Jin, Y.; Fotso, S.; Yongtang, Z.; Sevana, M.; Laatsch, H.; Zhang, W. Halichondria sulfonic acid, a new HIV-1 inhibitory guanidino-sulfonic acid, and halistanol sulfate isolated from the marine sponge *Halichondria rigosa* Ridley & Dendy. *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*, 1129–1135.
41. McKee, T.C.; Cardellina, J.H.; Tischler, M.; Snader, K.M.; Boyd, M.R. Ibisterol sulfate, a novel HIV-inhibitory sulfated sterol from the deep water sponge *Topsentia* sp. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 389–392.
42. Sun, H.H.; Cross, S.S.; Gunasekera, M.; Koehn, F.E. Weinbersterol disulfates A and B, antiviral steroid sulfates from the sponge *Petrosia weinbergi*. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 1185–1190.
43. Bouhlal, R.; Haslin, C.; Chermann, J.C.; Colliec-Jouault, S.; Sinquin, C.; Simon, G.; Cerantola, S.; Riadi, H.; Bourgougnon, N. Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 1187–1209.
44. Cardozo, F.T.G.S.; Camellini, C.M.; Mascarello, A.; Rossi, M.J.; Nunes, R.J.; Barardi, C.R.M.; Mendonça, M.M.; Simões, C.M.O. Antiherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. *Antivir. Res.* **2011**, *92*, 108–114.
45. Cardozo, F.T.G.S.; Camellini, C.M.; Larsen, I.; Carballo, E.; Jose, G.; Stern, R.; Brummel, R.; Rossi, M.; Simões, C.M.O.; Brandt, C. *In vivo* anti-HSV activity of a sulfated derivative of *Agaricus brasiliensis* mycelial polysaccharide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 2541–2549.
46. Zhu, W.; Chiu, L.C.M.; Ooi, V.E.C.; Chan, P.K.S.; Ang, P.O., Jr. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, *24*, 81–85.

47. Witvrouw, M.; De Clercq, E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen. Pharmacol.* **1997**, *29*, 497–511.
48. Ghosh, T.; Chattopadhyay, K.; Marschall, M.; Karnakar, P.; Mandal, P.; Ray, B. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure-activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology* **2009**, *19*, 2–15.
49. Fontaine-Rodrigues, E.C.; Knipe, D.M. Herpes simplex virus ICP27 increases translation of a subset of viral late mRNAs. *J. Virol.* **2008**, *28*, 3538–3545.
50. Chou, T.C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 621–681.
51. Marcelletti, J.F. Synergistic inhibition of herpesvirus replication by docosanol and antiviral nucleoside analogs. *Antivir. Res.* **2002**, *56*, 153–166.
52. Chuanasa, T.; Phromjai, J.; Lipipun, V.; Likhitwitayawuid, K.; Suzuki, M.; Pramyothin, P.; Hatton, M.; Shiraki, K. Anti-Herpes Simplex Virus (HSV-1) activity of oxysveratrol derived from Thai medicinal plant: Mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. *Antivir. Res.* **2008**, *80*, 62–70.
53. Burleson, F.G.; Chamberts, T.M.; Wiedbrauk, D.L. *Virology: A Laboratory Manual*; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1992; p. 250.
54. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **1983**, *65*, 55–63.
55. Silva, I.T.; Costa, G.M.; Stoco, P.H.; Schenkel, E.P.; Reginatto, F.H.; Simões, C.M.O. *In vitro* antiherpes effects of a c-glycosylflavonoid enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneath. *Lett. Appl. Microbiol.* **2010**, *51*, 143–148.
56. Ekblad, M.; Bergstrom, T.; Banwell, M.G.; Bonnet, M.; Renner, J.; Ferro, V.; Trybala, E. Anti-herpes simplex virus activities of two novel disulphated cyclitols. *Antivir. Chem. Chemother.* **2006**, *17*, 97–106.
57. Bettega, J.M.R.; Teixeira, H.; Bassani, V.L.; Barardi, C.R.M.; Simões, C.M.O. Evaluation of the antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. *Phytother. Res.* **2004**, *18*, 819–823.
58. Bertol, J.W.; Rigotto, C.; De Pádua, R.M.; Kreis, W.; Barardi, C.R.M.; Braga, F.C.; Simões, C.M.O. Antiherpetic activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. *Antivir. Res.* **2011**, *92*, 73–80.

**CAPÍTULO III- AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DA
ESPÉCIE *P. citrina***

3.1 INTRODUÇÃO

Um dos acontecimentos mais marcantes na história da ciência e da humanidade foi à descoberta da penicilina no início do século XX pelo médico microbiologista Alexander Fleming. Infecções até então incuráveis, e responsáveis pelas elevadas taxas de mortalidade, como pneumonia, sífilis, gonorreia, febre reumática e tuberculose puderam ser controladas e tratadas com eficácia (SINGH; BARRETT, 2006).

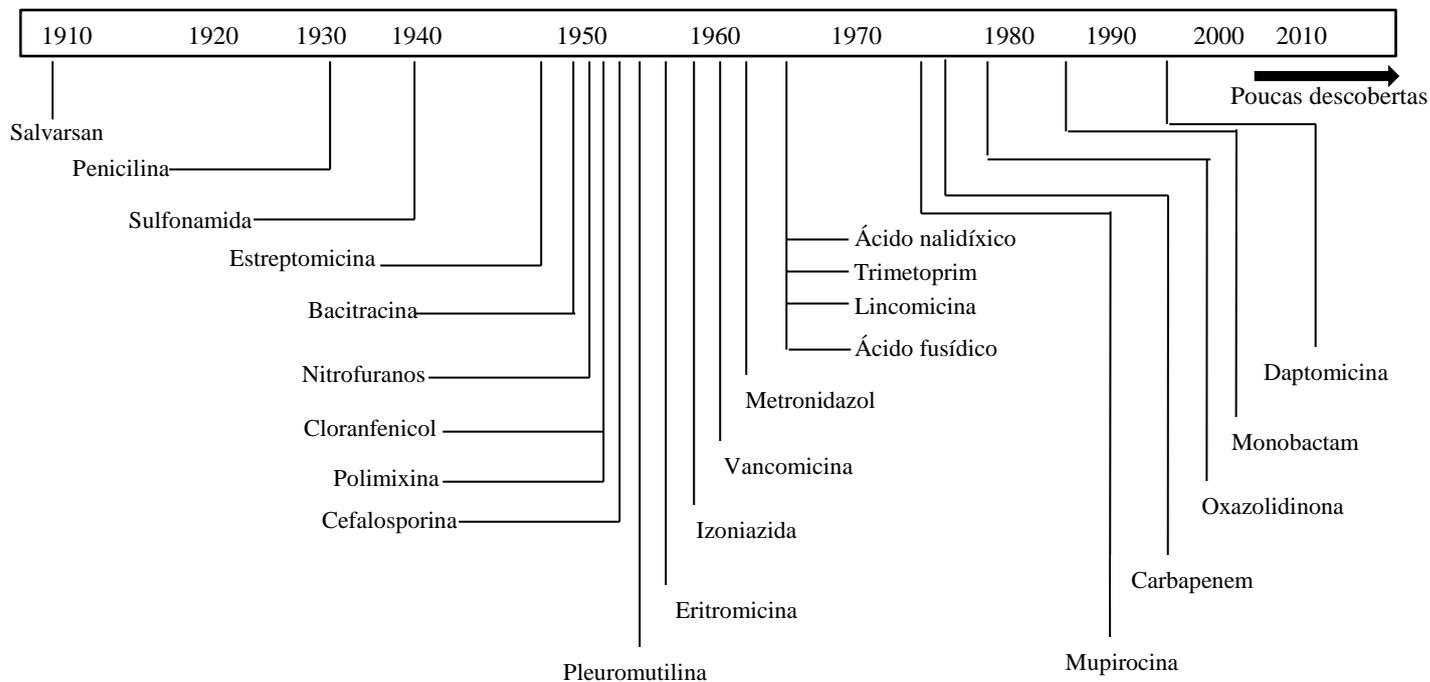
O impacto que a penicilina ocasionou na sociedade daquela época levou o governo, as instituições acadêmicas e as indústrias farmacêuticas a investirem na descoberta de outros compostos provenientes de fontes naturais, semissintéticas e sintéticas para o tratamento de infecções bacterianas, resultando em quase todas as novas classes de antibióticos que conhecemos hoje (GUIMARÃES; MOMESSO, PUP, 2010).

Nos meados do século XX, esse ciclo foi repetido e bem sucedido, considerando o elevado número de antibióticos que passaram a ser comercializados desde então, como as cefalosporinas, sulfonamidas, estreptomicina, clortetraciclina, eritromicina, vancomicina, cloranfenicol entre tantos outros fármacos que são apresentados na ilustração da Figura 7 (LIVERMORE, 2011; SILVER, 2011).

Contudo nos últimos 25 anos, essa estratégia fracassou. Observa-se o aumento da disseminação das bactérias que apresentam genes resistentes aos antibióticos, que em contrapartida têm sido desenvolvidos e licenciados em números cada vez menores, com uma determinada escassez, principalmente de novos agentes contra bactérias gram negativas (COLE et al., 2014; LIVERMORE, 2011).

De modo geral, o processo de desenvolvimento e planejamento (P&D) de novos medicamentos é custoso, longo e complexo envolvendo várias etapas que devem garantir a segurança e eficácia para administração na população. Basicamente a primeira etapa implica na descoberta de um composto com atividade terapêutica, que posteriormente terá suas propriedades biológicas avaliadas *in vitro* e sequencialmente, *in vivo* por meio de bioensaios que sejam capazes de investigar suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas em animais (“Estudos pré-clínicos”). Por fim, esses compostos são avaliados em humanos (“Estudos clínicos”) (GUIDO et al., 2010; DIAS; DESSOY, 2013).

Figura 7- Ilustração com as datas das descobertas ou das patentes das diferentes classes de antibióticos. Adaptado: Silver e colaboradores (2011).



Frente a tantas pesquisas e investimentos decorrentes aos processos de P&D, que podem durar cerca de doze anos, as indústrias farmacêuticas disponibilizam seus recursos para pesquisa sobre áreas terapêuticas mais lucrativas como é o caso dos fármacos utilizados nas terapias de doenças crônicas (LIMA et al., 2003).

Segundo Butler, Blaskovich e Cooper (2013) nos anos 90 existiam 18 grandes empresas farmacêuticas ativamente envolvidas na investigação e no desenvolvimento de antibióticos, ao passo que atualmente há apenas quatro: Astrazeneca e GSK (Reino Unido), Novartis (Suíça) e Sanofi-Aventis (França). Essa relutância por parte das mesmas pode ser explicada tanto pelos desafios regulatórios impostos pelo Food and Drug Administration (FDA) como pelo baixo retorno financeiro.

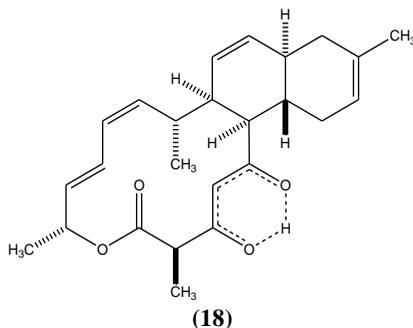
Em se tratando de novos antibióticos, desde os anos 70 ocorreram poucas inovações, sendo apenas observadas modificações estruturais em moléculas já existentes (LIVERMORE, 2011). A criação de novas classes de antibióticos é uma situação mais excepcional. Nos últimos 15 anos foram lançados apenas cinco novas classes: linezolida, daptomicina, retapamulina, fidaxomicina e bedaquilina, todos limitados à ação frente a bactérias gram positivas (Quadro 5) (BUTLER, BLASKOVICH; COOPER, 2013).

Segundo Takahashi e Lucas (2008) os esforços para se descobrir novas classes de antibióticos são decorrentes da necessidade de novos alvos bacterianos, especialmente pela evolução das doenças infecciosas nos últimos 20 anos, pelo desenvolvimento da resistência aos antibióticos existentes pelas bactérias patogênicas, pela elevada toxicidade de alguns antibióticos em uso clínico, como é o caso da gentamicina, além da melhor adequação da antibioticoterapia a indivíduos imunossuprimidos, portadores do vírus HIV, idosos, recém-nascidos, alérgicos, entre outros.

Quadro 5- Fármacos antimicrobianos lançados desde o ano 2000 no mercado farmacêutico. Adaptado: Butler, Blaskovich e Cooper (2013).

Ano	Nome fármaco	Classe	Tipo de Bactéria	Fonte Obtenção
2000	Linezolida	Oxazolidinona	Gram+	Sintético
2001	Telitromicina	Macrolídeo	Gram+ e Gam-	Derivado Produto Natural
2002	Biapenem	Carbapenem	Gram+ e Gam-	Derivado Produto Natural
2002	Ertapenem	Carbapenem	Gram+ e Gam-	Derivado Produto Natural
2002	Prulifloxacino	Fluoroquinolona	Gram+ e Gam-	Sintético
2002	Pazufloxacino	Fluoroquinolona	Gram+ e Gam-	Sintético
2002	Balofloxacino	Fluoroquinolona	Gram+ e Gam-	Sintético
2003	Daptomicina	Lipopeptídeo	Gram+	Produto Natural
2004	Gemifloxacino	Fluoroquinolona	Gram+ e Gam-	Sintético
2005	Doripenem	Carbapenem	Gram+ e Gam-	Derivado Produto Natural
2005	Tigeciclina	Tetraciclina	Gram+ e Gam-	Derivado Produto Natural
2007	Retapamulina	Pleuromutilina	Gram +	Derivado Produto Natural
2007	Garenoxacino	Quinolona	Gram+ e Gam-	Sintético
2008	Ceftobiprola medocaril	Cefalosporina	Gram+ e Gam-	Derivado Produto Natural
2008	Sitafloxacino	Fluoroquinolona	Gram+ e Gam-	Sintético
2009	Tebipenem pivoxil	Carbapenem	Gram+ e Gam-	Derivado Produto Natural
2009	Telavancina	Glicopeptídeo	Gram+	Derivado Produto Natural
2009	Antofloxacino	Fluoroquinolona	Gram+ e Gam-	Sintético
2009	Besifloxacino	Fluoroquinolona	Gram+ e Gam-	Sintético
2010	Ceftarolina fosamil	Cefalosporina	Gram+ e Gam-	Produto Natural
2011	Fidaxomicina	Tiacumicina	Gram+	Sintético
2012	Bedaquilina	Diarilquinolona	Gram+	Sintético

O isolamento da Antramicina (**18**) de um actinomiceto coletado na Califórnia é um dos exemplos que comprova o potencial que podemos encontrar nesse ambiente.



Essa substância foi bastante eficaz contra bactéria causadora da doença Antrax (*Bacillus anthracis*; cepa UM23C1-1) em baixas concentrações inibitórias (CIM= 0,031 mg/mL). Esse tipo de descoberta é de grande importância, considerando que os esporos dessa bactéria já foram utilizados como arma de bioterrorismo no ano de 2001, em que foram deliberadamente espalhados através do sistema postal dos Estados Unidos levando a morte de cinco pessoas naquela época (JANG et al., 2013). Em 2014, Hensler e colaboradores constataram uma nova aplicabilidade para essa molécula, que se mostrou ativa contra cepas *S. aureus* em ensaios realizados *in vitro* e *in vivo*, incluindo cepas *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) e meticilina (MRSA).

Recentes publicações científicas ressaltam o potencial de fontes marinhas na descoberta de novas substâncias com ação frente a bactérias (CHENG et al., 2013; ELLIS et al., 2014; LAPORT; SANTOS; MURICY, 2009; LIU et al., 2014; PROMPANYA et al., 2015).

3.1.1 Resistência bacteriana e fúngica

O surgimento dos antibióticos no início do século XX propiciou um notável progresso no tratamento das doenças infecciosas, suscitando inclusive na época a ideia equivocada da cura para todas as doenças causadas por microorganismos. De fato, a terapia com antibióticos associados ao advento de programas de vacinação em massa e as melhorias em serviços de saúde pública conduziram a sociedade a uma importante revolução social e cultural na área da saúde (BUTLER; BUSS, 2006; OVERBYE; BARRETT, 2005).

No entanto, desde a utilização dos primeiros antibióticos já houve relatos de resistência bacteriana (Figura 8). Inicialmente devido ao pouco entendimento sobre os mecanismos pelos quais os microorganismos adquirem resistência bacteriana, subestimou-se a importância dessas informações (SAGA; YAMAGUCHI, 2009).

Neste sentido, podemos destacar *S. aureus*, um dos mais comuns agentes patogênicos causadores de infecções hospitalares, que tem a capacidade de promover uma grande variedade de doenças, principalmente em procedimentos invasivos, como os associados a cateteres intravenosos, nos ventiladores utilizados em pacientes com pneumonia e em infecções de feridas cirúrgicas (UHLEMANN et al., 2014).

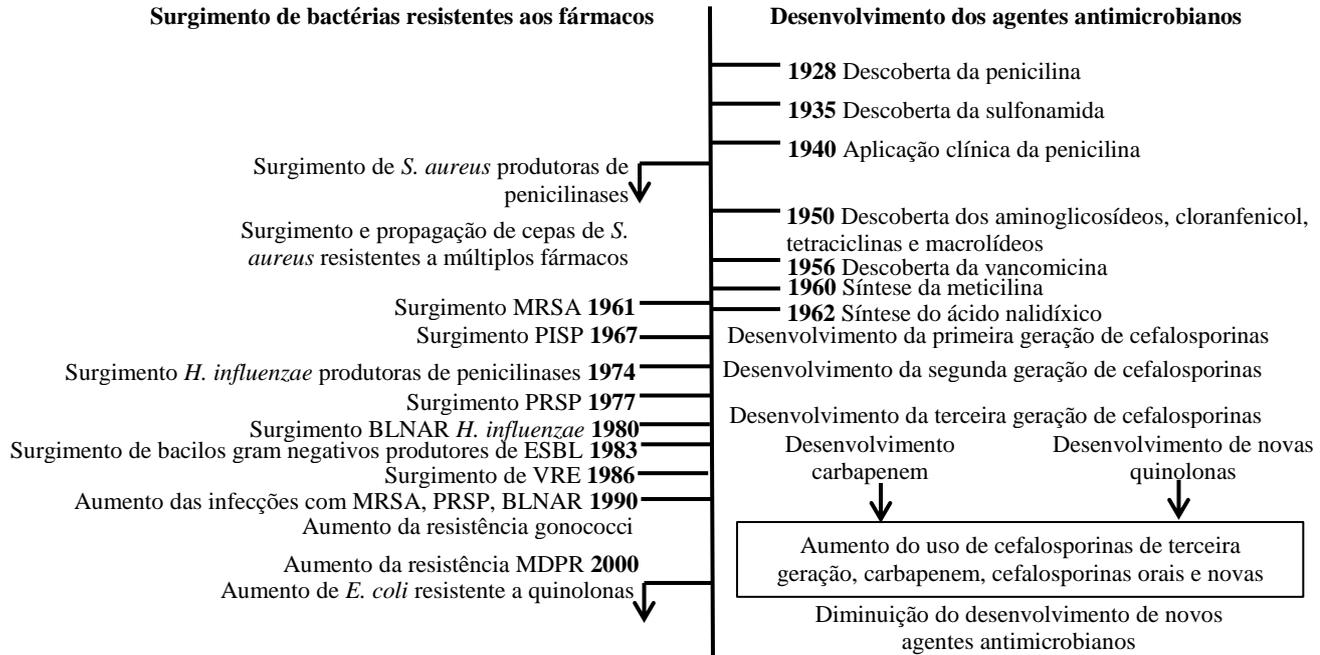
Até o início da década de 60 essa bactéria pode ser controlada com a utilização da penicilina, momento em que começaram a surgir os primeiros isolados resistentes a esse medicamento. Como solução, foi desenvolvida por via sintética uma nova penicilina denominada meticilina, resistente à ação das enzimas beta-lactamases voltadas para *S. aureus* (MRSA). Não obstante, passados poucos anos da sua descoberta surgiram registros de amostras resistentes também a esse antimicrobiano, além da expressão de multirresistência (GELATTI et al., 2009).

Desde então, o glicopeptídeo vancomicina isolado do fungo *Amycolatopsis orientalis* em 1956, tornou-se a opção de escolha clínica para o combate do MRSA. Apesar do excelente desempenho frente a tais cepas por um período, em 1996 foram identificados os primeiros isolados de *S. aureus* com susceptibilidade reduzida à vancomicina (VRSA) (SILVEIRA et al., 2006).

O problema da resistência bacteriana tomou proporções alarmantes, sendo vista como uma séria questão mundial de saúde pública diretamente vinculada ao aumento de morbidade e mortalidade. Segundo os autores Fischbach e Walsh (2009) cerca de 70% das bactérias causadoras de infecções hospitalares apresentam resistência a pelo menos um dos medicamentos considerados padrões nos tratamentos.

Particularmente, no Brasil a resistência bacteriana representa um grande desafio terapêutico nos hospitais, o que torna a situação ainda mais acentuada pela inexistência de um laboratório central de referência em microbiologia e pela falta de publicações oficiais contemplando dados nacionais sobre a resistência bacteriana. Até pouco

Figura 8- Cronograma de desenvolvimento de agentes antimicrobianos e surgimento de bactérias resistentes aos medicamentos. Adaptado: Saga e Yamaguchi, 2009.



PISP= *S. pneumoniae* resistente à penicilina; PRSP= *S. pneumoniae* resistente a macrolídeos; BLNAR= Enterobactérias resistente a Carbapenem; MDPR= Resistência múltipla a medicamentos.

tempo em nosso país, os antibióticos podiam ser comprados sem prescrição, levando a automedicação e consequentemente contribuindo para o aumento da prevalência da resistência antimicrobiana (ROSSI, 2011).

Atualmente os índices de resistência no Brasil e nos países latino americanos são superiores aos da Europa e dos Estados Unidos, principalmente entre bactérias gram-negativas não fermentadoras, *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) e algumas linhagens de bactérias gram positivas, como é o caso de *S. aureus* resistente à metilicina em que as taxas de cepas resistentes já ultrapassam 60% (ROSSI, 2011).

Outro fato a ser destacado, é que bactérias como *Escherichia coli* apresentam resistência as cefalosporinas e fluoroquinolonas, *Klebsiella pneumoniae* contra cefalosporina e carbapenems, *Staphylococcus aureus* contra metilicina, *Streptococcus pneumoniae* contra penicilina, *Salmonella* e *Shigella* contra fluoroquinolonas, *Neisseria gonorrhoeae* contra cefalosporina e *Mycobacterium tuberculosis* contra a rifampicina, isoniazida e fluoroquinolona (TANWAR et al., 2014).

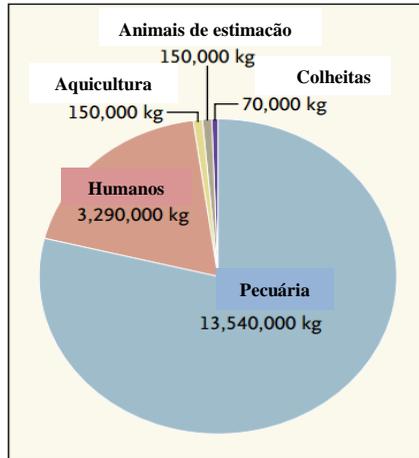
Da mesma forma, foi constatado nos últimos vinte anos que a frequência das infecções fúngicas sistêmicas têm crescido drasticamente, e medicamentos como anfotericina, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol e flucitosina já não satisfazem as necessidades clínicas (KATHIRAVAN et al., 2012; PFALLER et al., 2012).

Essa situação crítica foi fomentada principalmente pelo uso generalizado e empírico de antibióticos e antifúngicos, por meio de dosagens inadequadas e com baixas adesões de tratamentos. Além disso, o elevado aumento de pacientes imunocomprometidos (HIV), diabéticos e transplantados tornam os organismos alvos fáceis para adquirir doenças infecciosas contribuindo assim para uma maior propagação da multirresistência (COLE et al., 2014).

Paradoxalmente, ainda se pode mencionar a questão da utilização dos antibióticos na agricultura e como promotores de crescimento em animais. Somente nos Estados Unidos são consumidos diariamente um total de 51 toneladas de antibióticos, de modo que 80% desse recurso é utilizado na agricultura e na aquicultura (Figura 9), para as mais variadas finalidades como aceleradores de crescimento para suínos, adicionados em pellets em gaiolas para salmões, pulverizado em frutos nas árvores e incorporados a tintas para inibir o crescimento de cracas. Esse uso exacerbado pode ser justificado pelo baixo custo desses

medicamentos (\$25 por Kg) e principalmente, pela falta de regulamentação (HOLIS; AHMED, 2013).

Figura 9- Estimativa anual do uso de antibióticos nos Estados Unidos. Adaptado: Holis e Ahmed, 2013.



Ainda em relação ao gráfico acima, observa-se que o uso de antibióticos na pecuária é um dos principais contribuintes no problema da resistência, sendo que quando utilizados em doses subterapêuticas são associados a uma elevada frequência de bactérias resistentes presentes nas microbiotas intestinais de animais produtores de alimentos como frangos, bovinos e suínos (AARESTRUP; WITTE, 1999). Todavia, suas aplicações também são bastante abrangentes em outras áreas (HOLIS; AHMED, 2013).

A adoção generalizada do uso de antibióticos representa um risco para a saúde humana, à medida que o aparecimento de patógenos resistentes tem evoluído rapidamente e possam circular entre os seres humanos, animais, alimentos, água, levando a falha terapêutica e consequentemente, a limitação nas opções de tratamento (CHANG et al., 2015).

Dessa forma, o cenário atual exige a busca por novos compostos antimicrobianos, com novas estruturas e novos mecanismos de ação, capazes de atuar frente a estes microorganismos de forma efetiva. Nesse contexto, a espécie *P. citrina*, mais especificamente a fração BF, previamente reportada por sua atividade antimicrobiana contra *S.*

aureus, *E. faecalis* e *C. albicans* (BIANCO et al., 2013) surge como uma alternativa para obtenção de metabolitos ativos. A fração BF, a amostra TSH, os compostos isolados HS e HS-C, assim como as demais frações obtidas no fracionamento químico de *P. citrina* descritas no capítulo anterior, foram avaliadas paralelamente contra oito isolados clínicos bacterianos multirresistentes a medicamentos (Apêndice 13) provenientes de amostras de pacientes hospitalizados no hospital São José na cidade de Criciúma a partir de projetos de pesquisa previamente realizados em nosso laboratório em parceria com o Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol e contra 14 cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC) por meio dos ensaios de difusão em disco, bioautografia e microdiluição.

3.2 OBJETIVOS

Avaliar o potencial antimicrobiano de *P. citrina*, visando à identificação dos compostos ativos presentes na fração BF.

3.2.1 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o potencial antimicrobiano das amostras provenientes do fracionamento químico de *P. citrina* contra 8 cepas de isolados clínicos e 14 cepas ATCC por meio do ensaio de difusão em disco.
- ✓ Detectar as substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana através da técnica de bioautografia.
- ✓ Determinar através da técnica de microdiluição a concentração inibitória mínima (CIM) de frações e substâncias isoladas de *P. citrina*, como também a concentração bactericida mínima (CBM).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na avaliação antimicrobiana de *P. citrina* estão expostos na proposta de publicação para o periódico científico *Marine Drugs* a qual o mesmo será submetido.

3.3.1 Manuscrito a ser submetido para avaliação ao periódico *Marine Drugs*

Brazilian marine sponge *Petromica citrina* (Demospongiae) as a potent source of bioactive compounds

Tatiana da Rosa Guimarães¹, Luiza Gabriela de Souza Pessoa¹, Simone Quintana de Oliveira¹, Éverson Miguel Bianco¹, Felipe Dal Pizzol², Eloir Paulo Schenkel¹ and Flávio Henrique Reginatto^{1,*}

¹ Laboratory of Natural Products, Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil; E-Mail: tatyguimaraes@gmail.com (T.R.G.); luiza.gabriella@hotmail.com (L.G.S.P.); simonequintana@hotmail.com (S.Q.O.); ebianco@chemist.com (E.M.B.); eloirschenkel@gmail.com (E.P.S.); flavio.reginatto@ufsc.br (F.H.R.)

² Department of Clinical Medical, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil; E-Mails: fdpizzol@gmail.com (F.P.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: flavio.reginatto@ufsc.br; Tel.: +55-48-3721-5075; Fax: +55-48-3721-5075.

Academic Editor:

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: The antimicrobial activity of marine sponge *Petromica citrina* (Demospongiae) was evaluated against twenty bacteria and two fungi strains by the disk diffusion method. Antimicrobial bioassay-directed fractionation of BF fraction by bioautography led to the identification of bioactive fraction (TSH) and its two major isolated compounds; halistanol sulfate (**HS**) and halistanol sulfate C (**HS-C**). The BF fraction, TSH fraction, halistanol sulfate (**HS**) and halistanol sulfate C (**HS-C**) inhibited, respectively, the growth of *E. faecalis* and *S. aureus* (MIC: 500, 125, 250 and 250 µg/mL) and *C. albicans* (MIC: 2000, 500, 1000 and 1000 µg/mL). Moreover, these samples were effective against *S. aureus* (MIC: 500, 125, 250 and 250 µg/mL), MRSA (MIC: 1000, 31.25, 125, and 125 µg/mL) and VRE (MIC: 1000, 62.5, 125, and 125 µg/mL), respectively.

Keywords: antimicrobial activity; *Petromica citrina*; halistanol sulfate

Abbreviations

BF, Butanol Fraction; DMSO, Dimethylsulfoxide; HS, Halistanol Sulfate; HS-C, Halistanol Sulfate C; HSV, Herpes Simplex Virus; MBC, Minimum Bactericidal Concentration; MIC, Minimum Inhibitory Concentration; MRSA, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*; TLC, Thin Layer Chromatography; TSH, Halistanol-Enriched Fraction; VRE-Vancomycin-Resistant Enterococci.

1. Introduction

Despite remarkable advances in antimicrobial chemotherapy, indiscriminate use of antibiotics has resulted in the emergence of resistant opportunistic pathogens through a variety of mechanisms. Antibiotic resistance is now a worldwide public health problem, involving a broad spectrum of microorganisms and different classes of antibiotics, including bacteria that are resistant to multiple antimicrobial drugs [1].

In this context, it is imperative to find novel drugs with new mechanisms of action, and treatments to overcome this problem. In this context, marine organisms constitute an important source of structurally diverse and biologically active secondary metabolites, with promising biological activities. Some such organisms have inspired the development of new classes of therapeutic agents [2-3]. Moreover, in recent years, bioprospecting of marine natural products has yielded a

considerable number of drug candidates. Most of these molecules possess a broad-spectrum of potential therapeutic targets, justifying an approach to identify new effective biomolecules for the prevention and treatment of diseases [4].

Petromica citrina (Porifera, Demospongiae) belongs to a marine sponge genus that occurs only on the Brazilian coast. It was recently, reported that anti-HSV-1 was isolated from *n*-butanol fraction (BF fraction) from *P. citrina*, and after a bioguided investigation, a halistanol trisulfate enriched fraction (TSH fraction), as well as its two major isolated compounds; halistanol sulfate and halistanol sulfate C, were identified as anti HSV-1 bioactive compounds [5].

A preliminary evaluation of antibacterial and antifungal activities of BF fraction from *P. citrina* against a yeast strain and gram-negative and gram-positive bacteria was also performed. The BF fraction showed activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) and *Candida albicans* (ATCC 10231) [6].

In view of our previous results, the aim of this study was to increase our knowledge of the antimicrobial properties of BF fraction; to investigate its action against clinical antibiotic-resistant bacteria including Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VRE); and to characterize the bioactive compounds responsible for these antimicrobial properties.

2. Results and Discussion

Antimicrobial activity of the BF fraction was evaluated against 12 bacterial and 2 yeast from the American Type Culture Collection (ATCC strains) [*Clostridium sporogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*]. Its potential antibacterial activity was also evaluated against eight clinical strains [*Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VRE)] by the disk diffusion assay.

The results for potential antimicrobial activity of the BF fraction against the microorganisms assayed are presented in Table 1. BF

fraction, showed moderate activity against *E. faecalis* (ATCC 29212), *S. aureus* (ATCC 25923), *C. albicans* (ATCC 10231), and the *S. aureus* clinical strain as well as the MRSA and VRE strains.

Table 1. Antibacterial and antifungal activity of BF fraction, TSH fraction, halistanol sulfate (HS) and halistanol sulfate C (HS-C) from *P. citrina* by the disk diffusion method.

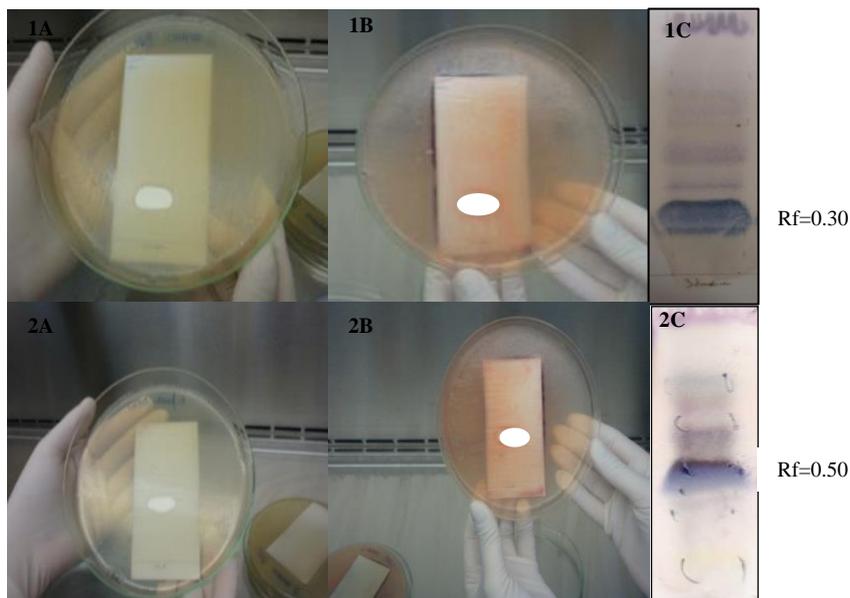
ATCC Strains	Fractions assayed			
	BF	TSH	HS	HS-C
<i>C. albicans</i>	++	++	++	++
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-
<i>C. sporogenes</i>	-	-	-	-
<i>E. cloacae</i>	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	++	+++	++	++
<i>E. coli</i>	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-
<i>S. flexneri</i>	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	++	+++	++	+++
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i>	-	-	-	-
<i>S. pyogenes</i>	-	-	-	-
Clinical Strains	BF	TSH	HS	HS-C
<i>A. baumannii</i>	-	-	-	-
<i>E. cloacae</i>	-	-	-	-
<i>E. faecium</i>	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	++	+++	++	++
MRSA	++	+++	+++	+++
VRE	++	+++	+++	+++

(-): not active; (+): 7-8.5 mm; (++) : 9-12 mm; (+++) : 13-16 mm; (++++): 17-20 mm. BF: n-BuOH fraction; TSH: halistanol fraction; HS: halistanol sulfate; HS-C: halistanol sulfate-C; MRSA: *Staphylococcus aureus* Methicillin-resistant; VRE: *Enterococcus faecalis* Vancomycin-resistant.

In view of the antibacterial activity of BF fraction detected, a bioautography assay was performed on silica gel TLC plates using two mobile phases conditions: [system 1: n-BuOH: acetic acid: H₂O (6:1:2

v/v) and system 2: *n*-BuOH: EtOH: H₂O (20:5:10 v/v)]. The results showed the presence of antimicrobial components at R_f 0.30 (system 1) and 0.50 (system 1) against *E. faecalis* (ATCC 29212), *S. aureus* (ATCC 25923), *C. albicans* (ATCC 10231), *S. aureus* clinical strain as well as the MRSA and VRE strains (Figure 1).

Figure 1. Bioautography assay of BF fraction from *P. citrina* against MRSA.



Mobile phase: system 1= *n*-BuOH: acetic acid: H₂O (6:1:2 v/v) and system 2: *n*-BuOH: EtOH: H₂O (20:5:10 v/v). (A) Bioautography assay/Vis, (B) Bioautography assay after spraying 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 0.5% reagent and (C) TLC analysis after spraying anisaldehyde sulfuric acid reagent.

These results enabled the targeting of the active sample (**TSH**) and two isolated compounds (**HS** and **HS-C**), as previously reported [5]. These sub-fractions were therefore assayed again by the disk diffusion method. The results are shown in Table 1.

The fractions that showed antibacterial activity by the disk diffusion method were further tested by the microplate assay, to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). In addition, the wells that showed negative visible growth after 18 h of incubation were replated

on agar nutrient plates, to obtain the minimum bactericidal concentration (MBC).

Among the samples screened, the **TSH** fraction displayed the most promising results, with an MIC range of 125 µg/ml against ATCC strains (*S. aureus* and *E. faecalis*). Additionally, this fraction also exhibited significant activity against clinical strains of *S. aureus* (MIC= 125 µg/ml), MRSA (MIC= 31.25 µg/ml) and VRE (MIC= 62.5 µg/ml). The isolated compounds, halistanol sulfate and halistanol sulfate C showed the same MIC values against the ATCC strains *S. aureus* and *E. faecalis* (250 µg/ml). Hence, their MICs against clinical strains were 250 µg/ml against *S. aureus* and 125 µg/ml against the MRSA and VRE strains. In regard to the MBC values, the **TSH** fraction showed 125 µg/ml (*S. aureus* and *E. faecalis*, ATCC strains), 250 µg/ml (*S. aureus*) and 62.5 µg/ml for MRSA and VRE. It is important to emphasize that the **TSH** fraction showed higher MIC and MBC values than halistanol sulfate and halistanol sulfate C. These results suggest that the antimicrobial activity of TSH fraction may be related to the synergic effects of compounds **HS** and **HS-C**. The results of the MIC, MBC and MBC/MIC ratio of BF fraction, **TSH** fraction, halistanol sulfate (**HS**) and halistanol sulfate C (**HS-C**) from *P. citrina* are presented in Table 2.

Olecha and co-workers [7] showed that low MBC/MIC ratios (≤ 4) demonstrate bactericidal activity, while ratios higher than four indicate the bacteriostatic mode of action. Our results therefore indicate bactericidal activity for all the samples assayed, against all the strains available.

These findings showed the higher antimicrobial potential of the samples assayed, particularly the TSH fraction, which was highlighted for its MIC and MBC values. Regarding the pharmacological effect of *Petromica* genus, there are only three reports of its antimicrobial activity. Kossuga and co-workers [9] performed the first study of this genus, involving antileishmanial and antifungal activities. The authors demonstrated that halistanol sulfate isolated from *P. ciocalyptoides* exhibited promising antifungal activity against *Candida krusei* (IC₅₀ of 25.81 µg/mL).

Table 2- Results of MIC ($\mu\text{g/mL}$), MBC ($\mu\text{g/mL}$) and MBC/MIC ratio of BF fraction, TSH fraction, halistanol sulfate (HS) and halistanol sulfate C (HS-C) from *P. citrina*.

ATCC strains	BF			TSH			HS			HS-C		
	MIC $\mu\text{g/mL}$	MBC	MBC/ MIC									
<i>C. albicans</i>	2000	2000	1	1000	1000	1	1000	1000	1	1000	1000	1
<i>E. faecalis</i>	500	1000	2	125	250	2	250	250	1	250	250	1
<i>S. aureus</i>	500	1000	2	125	250	2	250	250	1	250	250	1
Clinical strains	BF			TSH			HS			HS-C		
	MIC $\mu\text{g/mL}$	MBC	MBC/ MIC									
<i>S. aureus</i>	500	1000	2	125	250	2	250	250	1	250	250	1
MRSA	1000	1000	1	31.25	62.5	2	125	125	1	125	125	1
VRE	1000	1000	1	62.5	62.5	1	125	250	2	125	250	2

Samples with MIC > 1000 $\mu\text{g/mL}$ were considered inactive; MIC from 500-1000 $\mu\text{g/mL}$ antibacterial activity was considered weak; MIC from 100 to 500 $\mu\text{g/mL}$ the antibacterial activity was considered moderate; MIC is equal or smaller than 100 $\mu\text{g/mL}$, the antibacterial activity was considered significant. MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; VRE: Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*.

In another work, Marinho and co-workers [9] the *in vitro* screening of 12 Brazilian marine sponges in the search for novel antibacterial substances against 44 bacterial strains, including 14 antibiotic-resistant strains. The best result was obtained from the aqueous extract from *P. citrina* (collected in Rio de Janeiro state, Southeastern Brazil), which showed activity against resistant-bacteria strains. Hence, the same research group demonstrated that halistanol sulfate present in the aqueous extract of *P. citrina* had bactericidal effect against *S. aureus* [10]. These findings are in agreement with the results described here, although in the present study, it was found that **TSH** fraction, an enriched halistanol trisulfate fraction, had higher bactericidal potential than halistanol sulfate. Moreover, as far as we aware, this is the first time the antibacterial activity of halistanol sulfate C has been reported.

3. Experimental Section

3.1 General methods

Column chromatography was carried out using a Sephadex LH-20 (GE Healthcare[®]) and reverse phase C18 (Merck[®]). TLC analysis was performed on silica gel F254 plates (Merck[®]) and reverse phase C18 (Merck[®]). Spots were visualized by UV light (λ 254 and 366 nm) and sprayed with anisaldehyde/sulfuric acid reagent followed by heating.

3.2 Sponge Material

Petromica citrina was collected between January and July 2010, at Xavier Island (27°36'39" S, 48°23'32" W), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. The material was identified by the Dr. João Luís Fraga Carraro, and vouchers (MCNPOR no. 8777; 8778; 8779; 8780; 8781) were deposited in the Porifera collection of the Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

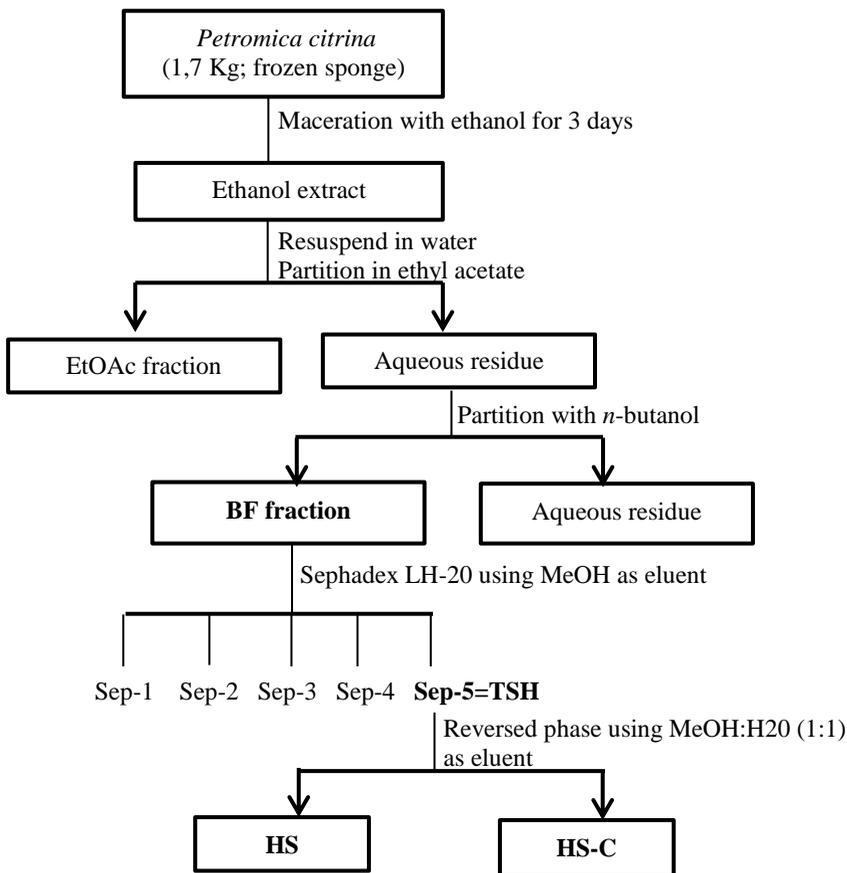
3.3 Extraction and isolation of the chemical constituents

The bioactive fraction and isolated compounds were obtained as previously described by Guimarães and co-workers [5]. Briefly, *P. citrina* (1.7 kg) was extracted by maceration at room temperature with ethanol 92% for three days. Solvent was removed at reduced pressure, yielding 49.0 g of crude extract (CHE). Subsequently, CHE extract was

dissolved in H₂O, extracted with ethyl acetate (EtOAc) and *n*-butanol (*n*-BuOH) yielding EtOAc fraction (3.20 g, EAF), *n*-BuOH fraction (6.10 g, BF) and residual aqueous fractions (39.70 g, AR), respectively.

An aliquot of the BF fraction (2.0 g) was then submitted to Sephadex LH-20 chromatography column and eluted with MeOH, yielding five sub-fractions including a halistanol trisulfate enriched fraction (TSH fraction). This fraction, after column chromatography fractionation, yielded the compounds halistanol sulfate (**HS**) and halistanol sulfate C (**HS-C**) (Figure 2).

Figure 2. Overview of the strategy used for the purification of sulfate halistanol (**HS**) and sulfate halistanol C (**HS-C**) from the butanol fraction of *Petromica citrina*.



3.4 Antimicrobial activity

3.4.1 Microorganisms

Twenty microbial species were analyzed, including 14 ATCC strains: *C. albicans* (ATCC 10231); *C. tropicalis* (ATCC 13803); *C. sporogenes* (ATCC 11437); *E. cloacae* (ATCC 13047); *E. faecalis* (ATCC 29212); *E. coli* (ATCC 25922); *K. pneumoniae* (ATCC 13883); *P. aeruginosa* (ATCC 27853); *S. typhimurium* (ATCC 14028); *S. flexneri* (ATCC 12022); *S. aureus* (ATCC 25923); *S. epidermidis* (ATCC 12228); *S. pneumoniae* (ATCC 49619); *S. pyogenes* (ATCC 19615), and 8 clinical strains (isolated from patients in São José Hospital [Criciúma city/Brazil]): *A. baumannii*; *E. cloacae*, *E. faecium*; *K. pneumoniae*; *P. aeruginosa*, *S. aureus*; Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and Vancomycin-resistant *E. faecalis* (VRE).

3.4.2 Disk diffusion method

The disk diffusion assay was performed according to the standard protocol described by the Clinical Laboratory Standard Institute [11-12]. Briefly, filter paper disks (6 mm diameter) were impregnated with 20 µl of the BF fraction and placed on Muller-Hinton agar plates (HiMedia®) which were inoculated with the testing microorganisms. The plates were incubated at 35°C (± 1°C, bacteria) and 25°C (± 1°C, fungus). After 18-24h (bacteria) and 24-48h (yeast), the diameters of the inhibition zones were measured. Filter paper disks containing DMSO without any test compound were used as negative control and no inhibition was observed. Standard antibiotic disks were selected according to the sensitivity of the microorganism tested. Each experiment was performed in triplicate.

3.4.3 Determination of the clinical strains sensitivity to antibiotics

Antibiotic sensitivity testing of the clinical isolates was performed using the disk diffusion method [11-12]. Antibacterial agents of different classes were used, including amikacin; ampicillin; ampicillin/sulbactam; cephepime; ceftazidime; ceftriaxone; ciprofloxacin; chloramphenicol; erythromycin; gentamicin; imipenem; levofloxacin; meropenem; oxacillin; penicillin; piperacillin/tazobactam; sulphazotrim; vancomycin and clindamycin.

3.4.4 Bioautography

Thin-layer chromatography (TLC) plates (Marcherey-Nagel[®]) were loaded with 20 µl of the BF fraction at 100 mg/ml. The plates were developed using two chromatographic systems as mobile phase: *n*-BuOH: acetic acid: H₂O (6:1:2; v/v/v) or *n*-BuOH: EtOH: H₂O (20:5:10 v/v). TLC plates were placed inside petri plates (150 mm diameter) in bacteriological incubator for 24h, when all the solvent was evaporated. Muller Hinton agar (HiMedia[®]) (40 ml) was deposited over the plates and after solidification the microorganism suspension was added over the culture medium. The plates were then incubated [35°C (bacteria) and 25°C (fungus)]. After 18-24h, the bioautogram was sprayed with an aqueous solution of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 0.5% (TTC) (Vetec[®]) and incubated for a further 4h. Inhibition zones indicate the presence of active compounds [13-14]. For all experiments, control plates were prepared in the same chromatographic systems as those used in the assays, but they were revealed with anisaldehyde/sulfuric acid.

3.4.5 Microdilution

The procedure to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs) was performed according to the Clinical and Laboratory Standards Institute criteria [15-16]. Briefly, 100 ml of culture medium [Muller Hinton broth (bacteria) and Sabourad broth (fungus)] was added to each well of the microplate. Next, 100 µl of the BF fraction and isolated compounds were placed in the first well of the microplate for subsequent serial dilutions (2000 to 3.9 µg/ml). The bacterial or fungal suspensions (density adjusted to McFarland 0.5 turbidity standard) were diluted at a ratio of 1:10 for the broth microdilution procedure. Microplates were incubated [35°C (bacteria) and 25°C (fungus)] and the MICs were recorded between 24-48h of incubation. Finally, subculture was performed in petri plates containing nutrient agar to determinate minimum bactericidal concentration (MBC). All experiments were performed in triplicate.

4. Conclusions

The BF fraction, TSH fraction, halistanol sulfate (HS) and halistanol sulfate C (HS-C) inhibited respectively, the growth of *E. faecalis*, *S. aureus* and *C. albicans*. Moreover, these samples were effective against the *S. aureus* clinical strain, and the MRSA and VRE strains.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. João Luís Carraro for the sponge collection and CAPES/CNPq for the financial support. Hence, we are grateful to clinical laboratory of São José Hospital (Criciúma city/Brazil) for furnished clinical bacterial strains.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References and Notes

1. Levy, S.B.; Marshall, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 122-129.
2. Montaser, R.; Luesch, H. Marine natural products: a new wave of drugs? *Future Med Chem.* **2011**, *3*, 1475-1489.
3. Gerwick, W.H.; Moore, B.S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 85-98.
4. Laport, M.S.; Santos, O.C.S.; Muricy, G. Marine sponges: Potential sources of new antimicrobial drugs. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2009**, *10*, 86-105.
5. Guimarães, T.R.; Quiroz, C.G.; Rigotto, C.; Oliveira, S.Q.; Almeida, M.T.R.; Bianco, E.M.; Moritz, M.I.G.; Carraro, J.L.; Palermo, J.A.; Cabrera, G.; Schenkel, E.P.; Reginatto, F.H.; Simões, C.M.O. Anti HSV-1 activity of halistanol sulfate and halistanol sulfate C isolated from brazilian marine sponge *Petromica citrina* (Demospongiae). *Mar. Drugs.* **2013**, *11*, 4176-4192.
6. Bianco, E.M.; Oliveira, S.Q.; Rigotto, C.; Tonini, M.; Guimarães, T.R.; Bittencourt, F.; Gouvêa, L.; Aresi, C.; Almeida, M.T.R.; Moritz, M.I.G.; Martins, C.D.L.; Scherner, F.; Carraro, J.L.; Horta, P.A.; Reginatto, F.H.; Steindel, M.; Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P. Anti-infective potential of marine invertebrates and seaweeds from the Brazilian coast. *Molecules.* **2013**, *18*, 5761-5778.

7. Olecha M.; Nowak, R.; Nowacka, N.; Pecio, L.; Oleszek, W.; Los, R.; Malm, A.; Rzymowska J. Evaluation of rose roots, a post-harvest plantation residue as a source of phytochemicals with radical scavenging, cytotoxic, and antimicrobial activity. *Ind Crop Prod*, **2014**, *69*, 129-136.
8. Kossuga, M.H.; De Lira, S.P.; Nascimento, A.M.; Gambardella, M.T.P.; Torres, R.G.S.Y.R.; Nascimento, G.G.F.; Pimenta, E.F.; Silva, M.; Thiemann, O.H.; Oivia, G.; Tempone, A.G.; Melhem, M.S.C.; Souza, A.O.; Galetti, F.C.S.; Silva, C.L.; Cavalcanti, B.; Pessoa, C.O.; Moraes, M.O.; Hadju, E.; Peixinho, S.; Rocha, R.M. Isolamento e atividades biológicas de produtos naturais das esponjas *Monanchora arbuscula*, *Aplysina* sp., *Petromica ciocalyptoides* e *Topsentia ophiraphidites*, da ascídia *Didemnum ligulum* e do octocoral *Carijoa riisei*. *Quím. Nova*. **2007**, *30*, 1194-1202.
9. Marinho, P.R.; Muricy, G.R.S.; Silva, M.F.L.; Marval, M.G.; Laport, M.S. Antibiotic-resistant bacteria inhibited by extracts and fractions from Brazilian marine sponges. *Rev.Bras.Farmacog.* **2010**, *20*, 267-275.
10. Marinho, P.R.; Simas, N.K.; Kuster, R.M.; Duarte, R.S.; Fracalanza, S.E.L.; Ferreira, D.F.; Romanos, M.T.V.; Muricy, G.; Giambiagi-Demerval, M.; Laport, M.S. Antibacterial activity and cytotoxicity analysis of halistanol trisulphate from marine sponge *Petromica citrina*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 2396-2400.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved standard M44-A2. *Wayne*: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard M02-A11.12. ed. *Wayne*: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
13. Choma, I.M.; Grzelak, M. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *J Chromatogr A*. **2011**, *1218*, 267-274.

14. Dewanjee, S.; Gangopadhya, M.; Bhattacharyaa, N.; Khanraa, R.; Duaa, T.K. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *J. Pharmac. Analysis.* **2015**, *5*, 75-84.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A3. 3. ed. *Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2008.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard M07-A09. 9. ed. *Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2012.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**CAPÍTULO IV- AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO POTENCIAL
DE AÇÃO DE *P. citrina* EM MODELO DE SEPSE**

Apesar de todos os progressos envolvendo a assistência de pacientes com sepse no decorrer dos últimos anos, e dos altos custos dispostos no tratamento, essa patologia permanece com elevada prevalência e mortalidade nas unidades de tratamento intensivo (UTIs) em todo mundo. Com base nos resultados da atividade antimicrobiana *in vitro* da espécie *P. citrina* contra seis cepas [ATCC (*S. aureus*, *E. faecalis* e *C. albicans*) e isolados clínicos (*S. aureus*, MRSA e VRE)] mostradas no capítulo III, o foco nessa parte do estudo foi avaliar a potencial atividade da fração TSH em dois modelos animais de indução de sepse: (1) Modelo Experimental de Sepse por Pneumonia (Pneumosepse) e (2) Modelo de Ligação e Perfuração Cecal (CLP).

4.1 INTRODUÇÃO

A sepse é uma síndrome complexa decorrente de uma infecção que pode ser ocasionada por diferentes microorganismos como fungos, helmintos, vírus e principalmente por bactérias. Esta patologia é caracterizada pela presença de um foco infeccioso, por alterações hemodinâmicas e pela resposta inflamatória (local e/ou generalizada), que pode levar a disfunção ou falência de um ou mais órgãos ou até mesmo a morte (BATISTA et al., 2011; CARVALHO; TROTTA, 2003).

Segundo os critérios propostos em 1991 pelo consenso *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM) a sepse pode se apresentar em diferentes graus de complexidade associados a uma variedade de fatores (HENKIN et al., 2009).

Nesse mesmo consenso, foram ainda estabelecidas algumas definições para auxiliar principalmente a equipe médica e pesquisadores no enquadramento da sepse. Com isso, ficou definido como Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) o processo inflamatório desencadeado por várias condições clínicas, e que independente da causa, apresente pelo menos dois desses sintomas: temperatura (maior que 38°C ou menor que 36° C), frequência cardíaca e respiratória aumentada (maior que 90 bpm e 20 rpm, respectivamente), pressão parcial de gás carbônico (PaCO₂) menor que 32 mmHg, leucometria alterada (maior que 12.000/mm³ ou menor que 4.000/mm³, ou 10% de formas jovens) (BONE et al., 1992).

Quando o processo da SIRS é resultado de uma infecção confirmada passa então a ser denominada sepse. No quadro de sepse grave, observa-se ainda disfunção orgânica, hipotensão ou hipoperfusão

(acidose láctica, oligúria e alteração do estado mental) (BONE et al., 1992).

Com a evolução da síndrome, pode ocorrer a apresentação do choque séptico que é um subconjunto da sepse grave, caracterizado como hipotensão induzida pela sepse, que não responde a administração por via intravenosa de drogas vasoativas, apesar da reanimação adequada com líquidos (BONE et al., 1992).

O diagnóstico precoce dessa doença ainda é um grande desafio, pois a inespecificidade de uma variedade de sinais e sintomas também podem ser detectados para outras patologias (ANGUS; POOL, 2013). Contudo, a presteza na identificação e intervenção da sepse, aumenta a eficácia da terapia e a chance de sobrevivência do paciente, evitando as complicações inerentes a doença, além reduzir o tempo e custo do tratamento.

4.1.1 Dados Epidemiológicos

A sepse permanece como um problema de saúde pública emergente com altas taxas de incidência e de mortalidade, sendo considerada a principal causa de morte nas UTIs em todo mundo, inclusive em países desenvolvidos como os Estados Unidos, em que os índices de incidência dessa doença já superam aos da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e dos principais tipos de câncer (MORENO; MARTIN, 2013).

Em estudo realizado por Angus e colaboradores (2001) com acompanhamento de 192.980 casos de sepse grave com pacientes internados em 847 hospitais dos Estados Unidos, os autores constataram altos valores de incidência da sepse grave correspondendo 751.000 casos/ano (três casos por mil habitantes). Da mesma maneira esse perfil é observado para os países membros da União Europeia, cuja estimativa é de 150.000 óbitos/ano (BRUN-BUISSON, 1995).

Particularmente em relação ao Brasil, essa situação não é diferente, já que a incidência de sepse grave é de 400.000 novos casos por ano (SILVA et al., 2004). De fato, o *Brazilian Sepsis Epidemiological Study* (BASES) proporcionou o primeiro estudo brasileiro de grande porte que teve como objetivo avaliar a incidência da sepse em pacientes internados nas UTI das regiões Sul e Sudeste. Como resultado desse estudo, foi possível determinar uma incidência de 57,9 casos por 1000 pacientes/dia (30,5% das admissões na UTI). Além disso, a taxa de mortalidade escalonada com base na gravidade da

doença foi de 24,2%, 33,9%, 46,9% e 52,2% para SIRS, sepse, sepse severa e choque séptico, respectivamente (SILVA et al., 2004).

Em outro estudo realizado por Júnior e colaboradores (2006) foram avaliados 75 UTI distribuídas em diferentes regiões do Brasil, com a inclusão de 521 pacientes diagnosticados com sepse, sepse grave e choque séptico dos 3128 pacientes avaliados. Os autores constataram uma mortalidade global de 46,6% (243 pacientes) em 28 dias. Já quando analisados os pacientes com choque séptico, sepse grave e sepse os percentuais de mortalidade foram de 65,3%, 34,4% e 16,7%, respectivamente. Investigações desse caráter são de grande relevância, principalmente para nortear na elaboração de diretrizes internacionais e locais e sobremaneira, auxiliar no sentido da redução das taxas de incidência e mortalidade. Contudo, informações contemplando dados epidemiológicos de sepse são limitadas em todas as partes do mundo (Quadro 6) (JAWAD, LUKSIC; RAFNSSON, 2012).

Dados obtidos do relatório do Instituto Latino Americano (ILAS), comparados com os da *Sepsis Surviving Campaign* mostraram altos índices de mortalidade decorrentes dessa patologia tanto nos setores públicos como privados em nosso país. A mortalidade brasileira por choque séptico pode chegar a 65% dos casos registrados, enquanto que a média mundial não ultrapassa 40% (Tabela 1).

Quadro 6 - Principais estudos identificando a incidência, prevalência e mortalidade por sepse. Adaptado: Jawad, Lukšić e Rafnsson (2012).

País Estudo	Configuração geográfica	População Estudada	Tempo de Duração	Incidência conforme relatada	Mortalidade Reportada
Estados Unidos	Em todo país	750 milhões de internações, identificados 1.0319.418 casos de sepse	22 anos	240,4 por 100 000 habitantes	17,9% (1995-2000)
Brasil	Cinco UTIs (Estado de São Paulo e Santa Catarina)	O número total pacientes foi de 1383 dos 1688 pacientes internados	08 meses	Sepse: 61,4 por 1000 pacientes-dia; Sepse grave: 35,6 por 1000 pacientes-dia e Choque séptico: 30 por 1.000 pacientes-dia	Sepse: 33,9%, Sepse grave: 46,9% e Choque séptico: 52,2%
Kuwait	Hospital de ensino Mubarak Al-Kabeer na cidade de Jabriya-Kuwait	3845 casos de pacientes com sepse dos 19.606 pacientes internados	18 meses	10,9 por 1000 admissões hospitalares	-----
Noruega	Em todo país	Pacientes hospitalizados em 1999	01 ano	Nacional: 1,49 casos / 1000 habitantes	13,5%
Reino Unido	Em todo país	343.860 admissões de adultos de 172 unidades	05 anos	Sepse severa: 66 episódios por 100 000 habitantes	-----
Estados Unidos	Florida, Maryland, Massachusetts, Nova Jersey, Nova York, Virginia e Washington	942 hospitalais (Admitidos apenas menores de 19 anos)	01 ano	Sepse grave: 0,56 casos por 1000 crianças, Sepse grave lactantes (<1 ano): 5,16 por 1000, Sepse grave 1-4 anos: 0,49 por 1000; Sepse grave 5-9 anos: 0,22 por 1000; Sepse grave 10-14 anos: 0,20 por 1000; Sepse grave 15-19 anos: 0,37 por 1000	-----

Continuação

País Estudo	Configuração geográfica	População Estudada	Tempo de Duração	Incidência conforme relatada	Mortalidade Reportada
Vietnã	Cidade Ho Chi Minh (Sul do Vietnã)	Todos os pacientes admitidos no hospital com cultura de sangue Positiva	11 meses	20,4 episódios por 1000 admissões	6%
Estados Unidos	Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Oeste Estados Unidos	Inscritos em 16 planos	03 anos e 05 meses	Sepse severa: 0,91 casos por 1000 inscritos	-----
Austrália e Nova Zelândia	23 UTIs de 21 hospitais multidisciplinares	Os resultados são apresentados para 3543 internações em UTI	01 ano	0,77 por 1000 habitantes	-----
Alemanha	Amostra aleatória de 310 hospitais em dos 16 estados federais	1380 hospitais	-----	Prevalência sepse: 12,4% Prevalência sepse grave: 11,0%	-----
Itália	99 UTIs	1101 pacientes	11 meses	-----	Sepse: 36%, Sepse grave: 52% e Choque séptico: 88%

Tabela 1- Dados gerais de mortalidade.

	Dados Brasil Hospitais Públicos (n= 10.481)	Dados Brasil Hospitais Privados (n= 13.409)	Dados Brasil (ILAS 2005-2014) (n= 23.890)	Dados Mundiais *
Gravidade				
Sepse Grave	45,0%	23,1%	31,6%	23,9%
Choque séptico	72,5%	55,4%	64,2%	37,4%
Local de desenvolvimento				
Tratado na UTI (PS)	57,6%	28,3%	37,0%	26,5%
Tratado na UTI (Enf)	64,9%	42,7%	53,2%	39,8%
Sepse na UTI	63,1%	53,0%	57,4%	42,8%
Tratado no OS	47,4%	13,9%	39,5%	-
Tratado na Enf	49,6%	10,8%	36,4%	-
Global	58,0%	34,5%	44,8%	30,8%

PS - pronto socorro; Enf - enfermária; UTI - unidade de terapia intensiva. UTI (PS) – Tratado na UTI advindo do PS; UTI (Enf) – Tratado na UTI advindo da enfermária; UTI – Sepse na UTI; PS – tratado no pronto socorro; Enf – Tratado na enfermária. Dados expressos em percentagem. *Dados da Surviving Sepsis Campaign (Levy et al., 2010).

4.1.2 Tratamento da sepse

Em relação ao tratamento, já esta bem estabelecida a importância da administração da primeira dose dos agentes antimicrobianos em relação ao risco de vida do paciente. O ideal é que antibioticoterapia seja iniciada o mais rapidamente possível, com até uma hora após o diagnóstico (SWEET et al., 2012; KUMAR et al., 2006).

Segundo o guia Instituto Latino Americano Sepse, em um primeiro momento, a escolha do antibiótico acontece de maneira empírica, quando o foco da infecção é desconhecido, sendo priorizados medicamentos com amplos espectros de ação. Após a determinação do agente causador da infecção, é indicado buscar por terapias mais específicas. De modo geral, as classes mais prescritas são as cefalosporinas, carbapenêmicos e as quinolonas conforme mostrados no Quadro 7. De acordo ainda com as manifestações clínicas do paciente, são utilizadas medidas de suporte, que podem incluir emprego corticoesteróides, manobras de reposição volêmica, suporte respiratório e renal (BATISTA et al., 2011).

Quadro 7- Guia de antibioticoterapia empírica para sepse elaborado pelo Instituto Latino Americano de sepse.

Foco	Infecção Comunitária	Infecção Nosocomial
Sem foco definido	Cefalosporina de 4ª geração (cefepime) + metronidazol	Carbapenêmicos (imipenem ou meropenem) + Glicopeptídeos (vancomicina ou teicoplanina) ou linezolida
Pulmão	Cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona, cefotaxima) + claritromicina	Piperacilina-tazobactam ou cefalosporina de 4ª geração
	Quinolonas (levofloxacina, moxifloxacina)	Se alta prevalência de estafilococos resistente a oxacilina na instituição – associar glicopeptídeo (vancomicina ou teicoplanina) ou linezolida
	Se história de doença pulmonar crônica – utilizar cefalosporina de 4ª geração (cefepima)	Se uso prévio de cefalosporinas ou quinolonas = trocar piperacilina-tazobactam por carbapenêmicos (imipenem ou meropenem)
	Se pneumonia aspirativa – trocar associar clindamicina. A utilização de claritromicina nesse contexto não é necessária.	Se alta prevalência de germes multiresistentes (<i>Pseudomonas</i> / <i>Acinetobacter</i> e <i>Klebsiella</i> produtora de carbapenemase) – avaliar associação empírica de polimixinas (B ou E)
Infecção abdominal	Cefalosporina 3ª geração (ceftriaxona ou cefotaxima) + metronidazol + ampicilina + aminoglicosídeo (gentamicina ou estreptomicina)	Cefalosporinas de 4ª geração ou carbapenêmicos (imipenem ou meropenem) (se opção pela cefalosporina, associar metronidazol) + aminoglicosídeo (gentamicina ou estreptomicina)
Pele e partes moles	Cefalosporina de 1ª geração ou oxacilina. Se sinais de necrose – associar clindamicina	Glicopeptídeos (vancomicina ou teicoplanina) + cefalosporinas de 4ª geração
Infecção de corrente sanguínea associada a cateter	-----	Carbapenêmicos (imipenem ou meropenem) ou piperacilina-tazobactam + glicopeptídeos (vancomicina ou teicoplanina) Se fatores de risco para candidemia – avaliar necessidade de cobertura para fungos com imidazólicos (fluconazol) ou equinocandinas (caspofungina, anidulafungina ou micafungina)

Os dados apresentados quanto à prevalência da sepse no mundo, bem como no Brasil (Tabela 1), são alarmantes. Neste contexto, trabalhos que busquem novas terapias alternativas podem ser muito relevantes na melhora dos dados epidemiológicos apresentados, sobretudo no contexto atual de elevada resistência bacteriana.

Recentemente, alguns estudos demonstraram que moléculas com presença de enxofre em suas estruturas, como é caso do sulfeto de hidrogênio (H_2S), são capazes de regular o metabolismo celular, o sistema imunológico, respostas inflamatórias e vários aspectos cardiovasculares atuando na diabetes mellitus, na angiogênese e em disfunções miocárdicas (SZABO et al., 2012; SZABO et al., 2011; LORIGADOS; SORIANO; SZABO, 2010).

Assim, levando-se em consideração o potencial antimicrobiano e o núcleo fundamental dos compostos presentes na fração TSH, neste capítulo foram avaliados os efeitos dessa amostra na sepse induzida experimentalmente nos modelos de Pneumosepse e ligação e perfuração cecal (CLP).

Com o primeiro modelo foi possível investigar a ação direta da amostra TSH no foco infeccioso, por meio da instilação da suspensão bacteriana na traqueia dos camundongos, visto que as infecções pulmonares são as mais predominantes na sepse (69%) (Júnior 2006). Por outro lado, no modelo CLP, foi procedida à perfuração da parede intestinal, com consequente liberação do conteúdo fecal para a cavidade peritoneal, sendo este modelo o que mais se aproxima ao quadro de sepse em humanos (BENJAMIN, 2001).

4.2 OBJETIVOS

Avaliar por meio dos modelos de ligação e perfuração cecal (CLP) e Pneumosepse, o potencial da fração enriquecida em compostos sulfatados (fração TSH) contra a sepse.

4.2.1 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a eficácia da amostra enriquecida em compostos sulfatados (amostra TSH) sob parâmetro de mortalidade em modelos animais de sepse com foco pulmonar e abdominal.
- ✓ Avaliar a eficácia da amostra TSH sob a bacteremia no sangue durante o curso temporal da doença.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Obtenção da amostra TSH

Conforme metodologia descrita no artigo da Marine Drugs apresentada no Capítulo II.

4.3.2 Animais

Os procedimentos no modelo experimental de sepse por pneumonia foram realizados com camundongos da linhagem *Swiss*, todos machos, com idade média de 90 dias e peso entre 50 e 60g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Enquanto que para o modelo experimental de CLP foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* com peso entre 250-300g alocados no Biotério da Universidade do Sul de Santa Catarina. Os animais foram todos mantidos em condições padronizadas de temperatura e umidade, sob luz natural, em gaiolas apropriadas com acesso livre à dieta e água até o momento dos experimentos.

Foi concedido ao presente trabalho aprovação Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFSC PP00953) segundo normas da sociedade brasileira de ciência em animais de laboratório (COBEA).

4.3.3 Grupos Experimentais

4.3.3.1 Modelo experimental de sepse por pneumonia

O desenho experimental consiste na aplicação de 50 μ L da suspensão bacteriana intratraqueal de *K. pneumoniae* (1.10^9 UFC). Os animais foram divididos em três grupos:

- (1) **Sham:** Sem inoculação bacteriana, aplicação de volume equivalente de PBS (n= 5).
- (2) **Pneumosepse + Meropenem:** Inoculação bacteriana e administração intraperitoneal de Meropenem (12,5 mg/kg) uma vez ao dia por três dias (n= 8).
- (3) **Pneumosepse + Amostra TSH** (Composto extraído da esponja marinha *P. citrina*): Inoculação bacteriana e administração intraperitoneal da fração TSH (12 mg/kg, baseado na MBC 250 μ g/mL encontrada nos experimento *in vitro*) uma vez ao dia por três dias (n= 7).

4.3.3.2 Modelo experimental de sepse por ligação e perfuração cecal

O ensaio de CLP foi realizado no laboratório de Fisiopatologia e Clínica Experimental da Universidade do Sul de Santa Catarina em Tubarão em parceria com a Prof. Dra. Fabrícia Petronilho. Os animais foram divididos em três grupos:

- (1) **CLP+Sal** – Animais submetidos à ligação e perfuração cecal, mas tratados apenas com solução salina isotônica (s.c), no mesmo volume proposto para o composto de interesse (n= 10).
- (2) **CLP+Ceftriaxona** - Animais submetidos à ligação e perfuração cecal, mas tratados com Ceftriaxona 30 mg/kg (s.c), a cada 12 h, por 3 dias (n= 10).
- (3) **CLP + Amostra TSH** - Animais submetidos à ligação e perfuração cecal, mas tratados com amostra TSH 33 mg/kg (s.c), a cada 12 h, por 3 dias (n= 10).

Para realização da hemocultura, foi coletado em eppendorfs previamente heparinizados, uma alíquota de sangue (50 µL) da veia caudal de todos os animais, após 6 e 24 h do processo cirúrgico. Ao volume de sangue foi acrescido (450 µL) de meio de cultura Hemoprov[®], mantendo a proporção (1:10). Posteriormente a amostra foi incubada em estufa bacteriológica a 37 °C por 48 h. Transcorrido esse período, o conteúdo de cada eppendorff foi plaqueado em meio MacConkey para proceder à contagem de colônias. Essa contagem foi realizada 24 horas após o plaqueamento. Os resultados foram expressos como UFC/mL.

4.3.4 Procedimentos experimentais

4.3.4.1 Modelo experimental de sepse por pneumonia

Esse ensaio foi realizado com a bactéria patogênica *Klebsiella pneumoniae*, conforme descrito por Sordi e colaboradores (2013). A bactéria foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Jamil Assreuy do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Anteriormente ao processo cirúrgico, os animais foram previamente identificados, pesados e anestesiados com uma mistura de tribromoetanol e cetamina (375/25 mg/kg; i.p.). Após ausência de reações motoras, verificadas pela preensão com pinça no coxim adiposo

da pata dianteira, os animais foram colocados em posição supina inclinada a 45°.

Realizou-se a assepsia da região ventral do pescoço, para posterior incisão (5 mm) da pele. A musculatura da região foi levemente afastada e a traqueia identificada. Com auxílio de uma seringa de calibre 30 G foram injetados 50 µL da suspensão bacteriana (1.10^9 UFC) pela via intratraqueal.

Na sequência a pele dos animais foi suturada com monofilamento de nylon (5-0) com pontos simples. Todos os animais receberam, pela via subcutânea, 30 mL/kg de solução de tampão fosfato de sódio (PBS) para reposição fluidica. Adicionalmente, ao grupo II foi administrado Meropenem (50 mg/kg) e ao grupo III a amostra TSH (12 mg/kg) 1 vez ao dia, por 3 dias, por via intraperitoneal. Todos os animais foram mantidos em ambientes aquecidos até a recuperação da anestesia, que variou entre 30 a 45 minutos.

Os mesmos procedimentos cirúrgicos foram realizados com os animais controles, porém foi instilado pela via intratraqueal 50 µL de solução PBS estéril, ao invés da suspensão contendo a bactéria.

4.3.4.2 Modelo experimental sepse por ligação e perfuração cecal

Da mesma forma que no modelo anterior, procedeu-se no primeiro momento a anestesia dos ratos com cetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Posteriormente, os animais foram submetidos à laparotomia com incisão mediana abdominal. O ceco foi ligado abaixo da junção íleo-cecal com fio seda 3-0 e perfurado com uma agulha 14 G, delicadamente comprimido até a extrusão de conteúdo fecal. Em seguida, o ceco foi recolado na cavidade peritoneal e os planos cirúrgicos foram suturados com fio de seda. Imediatamente após o processo cirúrgico, os animais receberam reposição fluidica (salina em 50 mL/kg) e foram colocados nas gaiolas, mantidas aquecidas, até a recuperação dos animais, que levou cerca de 60 minutos. O grupo Sham foi constituído por animais submetidos à laparotomia, sem ligação ou perfuração (RITTER et al., 2003).

4.3.5 Análise Estatística

Para a análise de sobrevivência foram utilizadas curvas Kaplan-Meier, com teste de significância Logrank Test para comparação entre os grupos. Para a análise da hemocultura, foi utilizado ANOVA de uma via, com pos teste Tukey e para a comparação entre os grupos foi

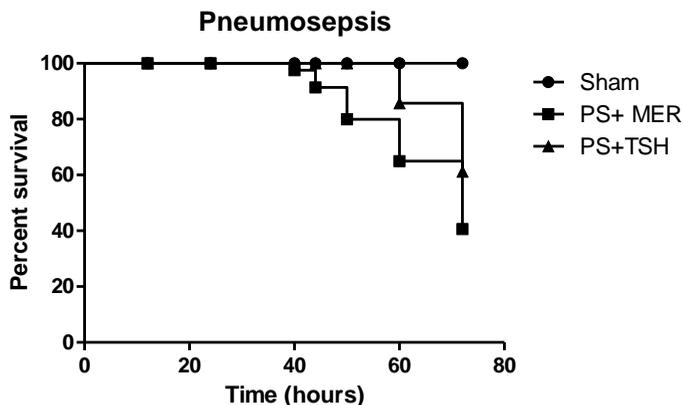
realizado um Teste t não pareado. O nível de significância considerado com diferença estatística foi $p \leq 0,05$. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 5.0.

4.4 RESULTADOS

A amostra de TSH foi analisada nos modelos experimentais de Pneumosepse e CLP nas doses 12 e 33 mg/kg, respectivamente. Ao final dos sete dias observados, foi avaliada a sobrevivência dos animais pela determinação entre o tempo transcorrido da indução da sepse e a hora do óbito do animal. Os resultados foram expressos através da curva de sobrevivência de Kaplan-Meier.

A figura 10 mostra os resultados para o modelo de Pneumosepse. Como é possível observar, foi verificada diferença quanto à mortalidade entre os três grupos: Sham, pneumosépticos tratados com fármaco meropenem (PS+MER) e com amostra TSH (PS+TSH) (qui-quadrado= 9,357 e $p= 0,0093$). Dos oito animais que compunham o grupo PS+MER morreram três no início das 40 horas, do grupo PS+TSH morreram dois animais no início das 60 horas. Nenhum animal do grupo Sham morreu nesse experimento.

Figura 10- Avaliação da atividade *in vivo* da amostra TSH em modelo de Pneumosepse.

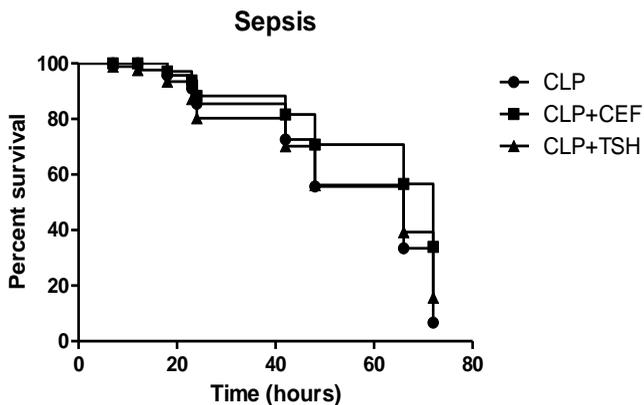


Em termos estatísticos, quando os grupos foram avaliados individualmente foi possível observar que o grupo Sham é diferente do grupo com pneumosepse tratado com meropenem (qui-quadrado= 8,135 e $p= 0,0043$). No entanto, não houve diferença entre os animais doentes tratados com meropenem ou amostra TSH (qui-quadrado= 3,522 e $p= 0,0606$), nem dos animais Sham em comparação aos com pneumosepse tratados com a amostra TSH (qui-quadrado= 3,063 e $p= 0,0801$).

Com base nessa semelhança entre o tratamento proposto e o grupo sham e o valor de p próximo à margem quando comparado o antibiótico padrão a fração de estudo, sugere-se que estes ensaios sejam realizados com aumento do número (n) de animais. Além do aumento do n , um intervalo menor entre cada aplicação, a utilização de outra via de administração, como a via intravenosa, para que a amostra TSH possa atuar mais rapidamente no foco da infecção, devem ser investigadas para uma avaliação mais eficaz do potencial da fração TSH. Essas modificações no desenho experimental podem melhorar a eficácia do tratamento, visto que a fração TSH parece retardar a mortalidade no modelo animal proposto.

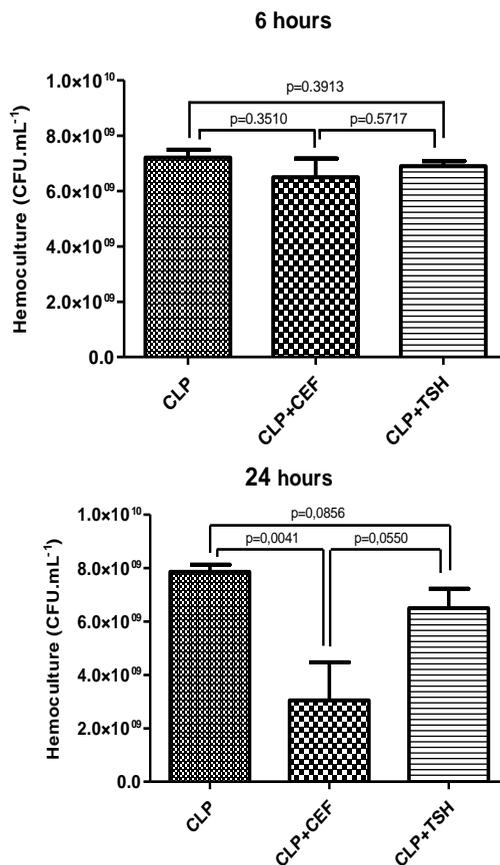
Analisando a Curva de sobrevivência Kaplan-Meier para o modelo CLP (Figura 11), não foram encontradas diferenças entre os três grupos analisados (qui-quadrado= 4,750 e $p= 0,0930$). Comparando a diferença entre os grupos, foi possível observar que o tratamento padrão do modelo, Ceftriaxona reduz a mortalidade quando comparado aos animais tratados apenas com salina (qui quadrado= 5,532 e $p= 0,0187$) e com a amostra TSH (qui-quadrado= 4,092 e $p= 0,0431$), principalmente no intervalo entre 40 e 70 h, período em que ocorre a maior mortalidade nesse modelo animal. Esses dados nos permitem inferir que o tratamento proposto com a amostra TSH nesse delineamento experimental, não apresentou efeito sobre a sobrevivência dos animais.

Figura 11- Avaliação da atividade *in vivo* da amostra TSH no modelo CLP.



Adicionalmente, foi realizada a hemocultura com os três grupos desse modelo nos tempos de 6 e 24 h (Figura 12). Os dados encontrados na hemocultura corroboram com os achados da análise de sobrevivência, o tempo de 6 horas já indica a presença de bactérias na corrente sanguínea, ainda sem a presença de efetividade dos tratamentos propostos, na análise realizada 24 horas após a indução de sepse, o tratamento com Ceftriaxona reduziu significativamente a contagem bacteriana no plasma dos animais, o que em longo prazo cursou com a diminuição da mortalidade. O tratamento com a amostra TSH não conseguiu reduzir significativamente a contagem bacteriana e, por conseguinte, não teve impacto na mortalidade dos animais.

Figura 12- Dados microbiológicos de hemocultura dos três grupos no modelo CLP.



4.5 CONCLUSÕES

Quando comparados os dois modelos experimentais, é possível concluir que a amostra TSH mostrou melhores resultados no modelo de Pneumosepse, ainda que novos parâmetros devam ser avaliados em ensaios futuros, como uma maior amostragem e um intervalo menor entre as administrações dessa amostra. Já em relação ao ensaio de CLP não foram constatados resultados promissores.

3 DISCUSSÃO GERAL

A avaliação dos potenciais anti-infecciosos (antiviral, antimicrobiano e antiprotozoário) de diferentes espécies de invertebrados marinhos e algas coletados na costa brasileira foi o ponto inicial para determinação dos objetivos deste trabalho (BIANCO et al., 2013), visto que os resultados obtidos durante essas triagens preliminares permitiram a identificação das espécies promissoras sob o ponto de vista farmacológico e, por consequência, o direcionamento dos estudos subsequentes.

Os primeiros estudos farmacológicos publicados com os extratos brutos da espécie *P. citrina* datam de 2002 e 2006. Contudo naquela época não foram observados resultados promissores para a espécie (MONKS et al., 2002; SILVA et al., 2006).

Pouco se conhece especificamente sobre a constituição química dessa esponja. Como vimos previamente, até o presente momento a única substância que havia sido identificada para o gênero era o sulfato de halistanol (KOSSUGA et al., 2007; MARINHO et al., 2012).

Esse fato pode ser decorrente da limitada distribuição geográfica da espécie e dos poucos grupos de pesquisas que existiam em nosso país até o fim dos anos 1990 dedicados a estudos com esponjas marinhas.

De posse dos resultados da triagem realizada e com intuito de isolar as substâncias ativas presentes na fração *n*-butanol (BF) de *P. citrina*, foram realizados fracionamentos monitorados pelas atividades antimicrobiana e antiviral. Cabe destacar, que especificamente em relação à atividade antimicrobiana, visando tornar mais preciso o monitoramento e a identificação da substância (s) ativa (s) presente em tal fração, foi realizado o ensaio bioautográfico antes do fracionamento químico, o que permitiu o conhecimento antecipado das características de polaridade da(s) substância(s) ativas para tal atividade através dos valores dos fatores de retenção (0,30 e 0,50), conforme relatadas no Capítulo III.

A metodologia adotada para a purificação da fração BF foi realizada em duas etapas. A primeira caracterizou-se pelo fracionamento por cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex LH-20, (Sep-1 a Sep-5), as quais foram posteriormente avaliadas nos ensaios biológicos propostos. Em ambos os testes (antimicrobiano e antiviral) a fração ativa foi à mesma (TSH= Sep-5).

No caso da avaliação antimicrobiana, os resultados positivos da amostra TSH frente às cepas ATCC (*S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*) e clínicas (*S. aureus*, MRSA e VRE) foram obtidos empregando-se as

técnicas de difusão em disco, e corroboraram os primeiros resultados constatados na bioautografia. No que tange a potencial ação antiherpética (cepa KOS) evidenciada previamente para a fração BF de *P. citrina* foi constatado para a amostra TSH um índice de seletividade (IS) de 15,33.

Quando analisada por CCD, TSH apresentou uma única mancha de coloração azulada após revelação com agente cromogênico anisalaldeído sulfúrico, levando a conclusão preliminar de se tratar de um único composto. Contudo, as integrações dos hidrogênios observados nos espectros de RMN ^1H apresentados no Capítulo III não permitiram a identificação estrutural da mesma, assim como sugeriram tratar-se de uma mistura de compostos.

Baseado nestas informações, foi realizada uma nova etapa de purificação com a amostra TSH utilizando uma coluna empacotada com sílica de fase reversa (C18), que acarretou na obtenção de dois compostos codificados como HS e HS-C, nas quantidades de 30 mg e 12 mg, respectivamente.

No que concerne aos espectros de RMN ^1H da amostra TSH esta característica de similaridade de sinais também é verificada, visto que os compostos HS e HS-C possuem sinais com valores de deslocamentos químicos muito semelhantes. Esta característica é verificada principalmente para os sinais considerados diagnósticos na identificação dos halistanóis, como H-2, H-3, H-6 e as metilas em C-18 e C-19. Somente após a obtenção dos espectros de RMN ^1H das substâncias isoladas foi possível observar as diferenças estruturais entre os compostos HS e HS-C. As diferenças mais evidentes são a presença de um duplete em δ_{H} 0,84 ($J= 6,8$ Hz) atribuído à metila ligada ao carbono na posição 28 para o sulfato de halistanol, característica que não é observada no sulfato de halistanol C, além da presença de um simpleto em δ_{H} 0,86 atribuído para as metilas ligadas aos carbonos nas posições C-26, C-27 e C-29 no sulfato de halistanol, enquanto que no sulfato de halistanol C não é verificada a presença deste sinal, mas sim de dois dupletos em δ_{H} 0,87 ($J= 6,6$ Hz) atribuídos para as metilas ligadas aos carbonos C-26 e C-27.

Os espectros ESI-MS (Apêndices 9 e 10), revelaram a presença dos íons com a razão m/z 731 e m/z 703, os quais propõem-se ser resultante das perdas de íons de Na^+ , confirmando as estruturas químicas propostas para o HS e HS-C, com os mesmos perfis de fragmentação. O espectro de ESI-MS do composto HS fornece íons de m/z 611 [$\text{M}^+ - \text{NaHSO}_4$], m/z 491 [$\text{M}^+ - (\text{NaHSO}_4)_2$] e m/z 354 [$\text{M}^+ - (\text{NaHSO}_4)_3$],

enquanto que para o composto HS-C são observado íons de m/z 583 [$M^+ - NaHSO_4$], m/z 463 [$M^+ - (NaHSO_4)_2$] e m/z 340 [$M^+ - (NaHSO_4)_3$].

Os trabalhos científicos englobando substâncias da classe dos halistanóis indicam a presença destas substâncias em diferentes espécies marinhas, predominantemente em esponjas e equinodermas e que as mesmas são reconhecidas por suas propriedades biológicas, principalmente atividade anti-HIV (BIFULCO; MINALE; RICCIO, 1994; MCKEE et al., 1994; SPERRY; CREWS, 1997; WHITSON et al., 2008). Por outro lado, para a nomenclatura e as atribuições dos valores de deslocamentos químicos (RMN) são verificados diversos equívocos entre os autores, visto que tem sido observada em recentes publicações a denominação equivocada de sulfato de halistanol A, quando na realidade as estruturas apresentadas são do sulfato de halistanol (FUSETANI et al., 1981; KOSSUGA et al., 2007; LIMA et al., 2014).

Até o presente momento, nenhuma publicação científica com o gênero *Petromica* abordava a questão da obtenção de uma mistura contendo duas substâncias da classe dos halistanóis (estruturalmente muito semelhantes). De maneira geral, os autores descrevem o isolamento do sulfato de halistanol (HS) em uma única etapa do processo de fracionamento químico com a fração *n*-butanol (Sephadex LH-20) e em nenhum momento é abordado o isolamento do sulfato de halistanol C (HS-C) para esta espécie (KOSSUGA et al., 2007; MARINHO et al., 2010; MARINHO et al., 2012). Isso pode ser justificado pela ideia equivocada da observação de um perfil cromatográfico contendo uma única mancha quando analisada por CCD de fase normal, além da interpretação errônea dos dados contemplados nos espectros de RMN, que na maior parte dos estudos não são apresentados e/ou discutidos, ao contrário dos dados apresentados nesta tese.

Os resultados obtidos nos dois testes farmacológicos realizados (antimicrobiano e antiviral) mostraram resultados promissores tanto para a amostra TSH como para os compostos isolados. Em relação à atividade antimicrobiana, as pequenas diferenças estruturais observadas entre o sulfato de halistanol e sulfato de halistanol C, não foram capazes de tornar uma substância mais ativa quando comparada a outra, pois ambas apresentaram atividade frente às mesmas cepas [ATCC *S. aureus* (CIM= 250 µg/mL), *E. faecalis* (CIM= 250 µg/mL), *C. albicans* (CIM= 1000 µg/mL) e clínicas *S. aureus* (CIM= 250 µg/mL), MRSA (CIM= 125 µg/mL) e VRE (CIM= 125 µg/mL)] com os mesmos valores de

CIM. Da mesma forma, a amostra TSH mostrou-se capaz de inibir o crescimento dessas seis cepas mencionadas, porém com menores valores de concentrações inibitórias mínimas para todas elas [ATCC *S. aureus* (CIM= 125 µg/mL), *E. faecalis* (CIM= 125 µg/mL), *C. albicans* (CIM= 500 µg/mL) e clínicas *S. aureus* (CIM= 125 µg/mL), MRSA (CIM= 31.25 µg/mL) e VRE (CIM= 62.5 µg/mL)], sugerindo uma potencial ação sinérgica dos compostos HS e HS-C.

Cabe destacar ainda que diferentemente das demais publicações científicas, tanto a amostra TSH como os compostos isolados de *P. citrina* tiveram seus valores de CIM e CBM determinados para as seis cepas que se mostraram ativas, incluindo a levedura *C. albicans*, que assim como a substância sulfato de halistanol C foram pelas primeiras vezes avaliadas em ensaios antimicrobianos frente a amostras do gênero *Petromica* (KOSSUGA et al., 2007; MARINHO et al., 2010; MARINHO et al., 2012).

Ainda que não tenha sido avaliado o mecanismo de ação frente às bactérias e a levedura dessas substâncias isoladas, em recente trabalho realizado por Marinho e colaboradores (2012) foram realizados ensaios para examinar o efeito do sulfato de halistanol isolado de *P. citrina* frente ao crescimento de *S. aureus* (ATCC 29213). Para isso, foram utilizadas amostras de células em fase log de crescimento desta cepa. Segundo os autores foram observadas mudanças nas morfologias das células de *S. aureus* e de protoplastos, após 1 hora da cultura em presença do sulfato de halistanol. Além disso, foram verificadas lises celulares drásticas nas placas tratadas com o sulfato de halistanol, enquanto que nos controles, as células encontravam-se intactas após 4 horas com a cultura. Estes dados sugerem que essa substância age rompendo as membranas celulares, originando um efeito direto sobre a membrana ou ainda propiciando o efluxo de pequenas moléculas (por exemplo, potássio e aminoácidos) (MARINHO et al., 2012).

Em relação à atividade antiherpética e virucida das substâncias isoladas foram detectados perfis similares, ainda que em diferentes graus de eficiência. O sulfato de halistanol foi mais ativo (IS= 2,46) quando comparado ao sulfato de halistanol C (IS= 1,45) nos ensaios de redução do número das placas de lise frente HSV-1. Contudo, da mesma forma que na avaliação da atividade antimicrobiana, essas substâncias mostraram resultados significativamente mais promissores quando associadas (TSH; IS= 15,33), sugerindo uma ação sinérgica dos compostos. Essa possibilidade de ação sinérgica das substâncias sulfato de halistanol e sulfato de halistanol C frente ao HSV-1 foi investigada e

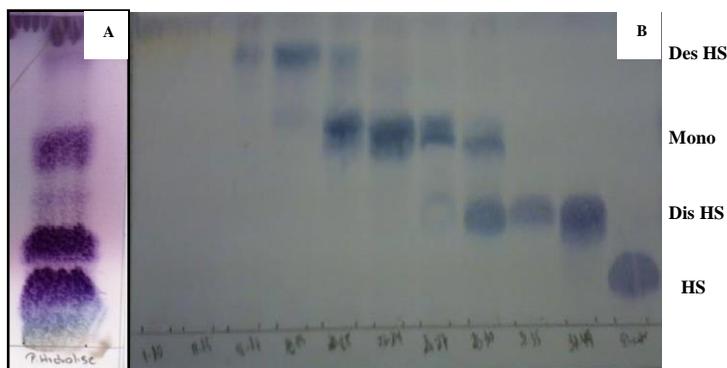
está descrita de forma detalhada na publicação científica mostrada no Capítulo II.

Foi verificado também que o sulfato de halistanol, sulfato de halistanol C e a amostra TSH agem inibindo a adsorção e penetração do HSV-1 (cepa KOS), assim como possuem a capacidade de interferir de forma distinta na expressão de importantes proteínas virais, como ICP27, gB e gD as quais estão envolvidas em diferentes etapas da replicação viral.

Em relação às duas substâncias isoladas previamente, sulfato de halistanol (HS) e sulfato de halistanol C (HS-C), existem algumas questões ainda a serem avaliadas como o grau de influência dos grupamentos sulfatos e das posições que os mesmos ocupam nessas moléculas frente às atividades antiviral e antimicrobiana. Cabe destacar, que ambas as substâncias ativas apresentam em suas estruturas três grupamentos sulfatos ligados nas posições C-2, C-3 e C-6 do núcleo esteroidal, confirmadas por ESI-MS.

Dessa forma, foram procedidas reações de hidrólise em coluna de vidro empacotada com resina de troca iônica IR-120 com o composto HS a fim de romper essas ligações, o que levou a obtenção de diferentes substâncias. Os produtos da hidrólise do composto HS já foram submetidos à purificação em coluna com sílica gel usando uma mistura de solventes (*n*-butanol: ácido acético: água; 6:1:2) (Figura 13).

Figura 13- Perfil cromatográfico (CCD) da amostra HS hidrolisada em coluna IR120 (A) e dos produtos hidrolisados após purificação (B).



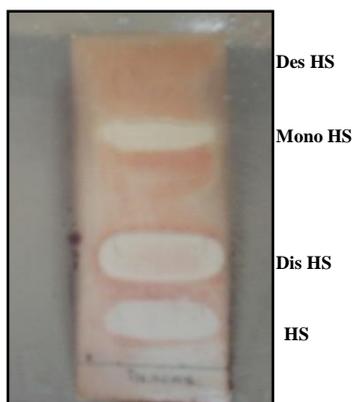
Fase móvel= *n*-butanol:ácido acético:água (6:2:1).

Revelador: Anisaldeído sulfúrico/aquecimento.

Como informações prévias, foi possível observar a obtenção substâncias com comportamento cromatográfico distinto das substâncias originais (CCD) e com uma redução na intensidade dos sinais referentes aos grupamentos sulfatos nos espectros de infravermelho (IR) (dados não apresentados). Por outro lado, as técnicas utilizadas naquele momento não foram capazes de caracterizar estruturalmente tais moléculas, apenas sugeriram que ocorreu o rompimento de tais ligações e a perda de grupamento(s) sulfato (s), sem ser possível estabelecer a localização dessas ligações.

Uma alíquota da amostra contendo os produtos obtidos com a hidrólise do composto HS (Figura 14) foi testada no ensaio da bioautografia. Pode-se observar que outros dois compostos codificados como Dis HS e Mono HS também foram capazes de inibir o crescimento da cepa MRSA.

Figura 14- Resultado do ensaio de bioautografia dos produtos da hidrólise HS frente MRSA.



Fase móvel: *n*-butanol: ácido acético: água (6:1:2). Placa revelada com cloreto de trifeniltetrazólio, (TTC; 0,5%).

No momento novas purificações estão sendo realizadas com a finalidade de obter uma maior quantidade desses compostos hidrolisados para que possam ser efetuadas novas avaliações biológicas e a caracterização química estrutural dos compostos por RMN, já que em ensaios prévios também foi constatada atividade antiherpética contra o vírus HSV-1 para amostra Dis HS, diferentemente do observado nos ensaios de avaliação da atividade tripanocida frente *Trypanosoma cruzi* em que a amostra Des HS na concentração de 50 μ M mostrou IS= 5,4.

Sendo assim, mediante as comprovadas atividades antiviral e antimicrobiana observadas para o sulfato de halistanol e sulfato de halistanol C e por meio das modificações moleculares com tais substâncias, será possível propor um estudo prévio de relação estrutura-atividade. Este resultado permitirá determinar o quão essenciais são os grupamentos sulfato e em que posição devem estar dispostos nestas moléculas para que haja a manutenção das atividades biológicas mencionadas.

Além disso, os resultados promissores obtidos nas triagens preliminares das atividades antiviral e principalmente antimicrobiana com a amostra TSH isolada da esponja marinha *P. citrina* por meio do desenvolvimento de métodos *in vitro*, propiciaram uma nova possibilidade de investigação *in vivo* com esta amostra envolvendo o Modelo de Pneumosepse e Modelo de Ligação e Perfuração Cecal.

Comparando os resultados preliminares obtidos nos dois modelos experimentais, a amostra TSH mostrou-se mais efetiva no Modelo de Pneumosepse, promovendo o prolongamento da vida dos animais sépticos, ainda que sem efeito na taxa de sobrevivência. Possivelmente, por esse modelo utilizar a cepa da bactéria gram negativa *K. pneumoniae* e a amostra TSH se mostrar mais seletiva as bactérias gram positivas, os resultados podem estar relacionados com a diferença na estruturação da parede celular bacteriana.

A fim de uma melhor avaliação da amostra TSH *in vivo* é importante que sejam realizados novos experimentos nos dois modelos de sepse anteriormente mencionados, com intuito de observar o efeito da alteração de alguns parâmetros, como aplicação da amostra TSH pela via endovenosa e administração em intervalos menores de tempo.

4 CONCLUSÕES

✓ Os estudos de triagem com espécies marinhas brasileiras permitiram direcionar nossos estudos a partir da constatação da atividade antiviral e antimicrobiana para a fração BF de *P. citrina*.

✓ O fracionamento químico em gel de permeação Sephadex LH-20 com a fração BF propiciou a obtenção da amostra TSH, que após purificação em coluna de vidro com sílica de fase reversa levou ao isolamento de dois compostos majoritários HS e HS-C, identificados e caracterizados por RMN e espectrometria de massas como sulfato de halistanol e sulfato de halistanol C.

✓ A amostra TSH e os compostos isolados HS e HS-C apresentaram atividade antiherpética contra HSV-1. A amostra TSH apresentou promissores índices de seletividade (IS= 15,33) quando comparados HS (IS= 2,46) e HS-C (IS= 1,46).

✓ A amostra TSH e os compostos isolados HS e HS-C apresentaram atividade virucida e inibiram a adsorção e penetração por células VERO. Adicionalmente, através da análise de expressão proteica viral foi possível constatar que os compostos HS e HS-C, assim como amostra TSH inibiram em diferentes intensidades a expressão das proteínas ICP27 (α) e gB (γ).

✓ Pelo ensaio de difusão em disco foi possível verificar a atividade antimicrobiana da fração BF, da amostra TSH e dos compostos HS e HS-C por meio da inibição do crescimento de três cepas ATCC (*S. aureus*, *E. faecalis* e *C. albicans*) e três isolados clínicos bacterianos (*S. aureus*, MRSA e VRE).

✓ A concentração inibitória mínima determinada através da técnica de microdiluição mostrou CIM semelhantes para os compostos HS e HS-C frente a seis cepas. Contudo, os resultados mais promissores foram observados para a amostra TSH contra cepas de MRSA e VRE, com CIM= 31,25 $\mu\text{g/mL}$ e de 62,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

✓ Baseado nos valores de CIM e CBM foi possível inferior que a amostra TSH, assim como os compostos HS e HS-C possuem ação bactericida frente às três cepas ATCC (*S. aureus*, *E. faecalis* e *C. albicans*) e três isolados clínicos bacterianos (*S. aureus*, MRSA e VRE).

✓ Análise dos dados de sobrevivência, expressos por curvas Kaplan-Meier não apontou diferença na mortalidade entre os animais doentes tratados com meropenem ou a fração TSH. No modelo de sepsis por CLP, o tratamento com amostra TSH não foi capaz de reduzir a mortalidade.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.12, p. 279-285, 1999.

ABBAS, S.; KELLY, M.; BOWLING, J.; SIMS, J.; WATERS, A.; HAMANN, M. Advancement into the arctic region for bioactive sponge secondary metabolites. **Marine Drugs**, v.9, p. 2423-2437, 2011.

ANGUS, D.C.; LINDE-ZWIRBLE, W.T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, v.29, p.1303-1310, 2001.

ANGUS, D.C.; POOL, T.V. Severe Sepsis and Septic Shock. **The NewEngland Journal of Medicine**, v.369, p. 840-851, 2013.

BASTOS, J.C.S.; KOHN, L.K.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; PADILLA, M.A.; FLORES, E.F.; SILVA, B.P.; MENEZES, C.B.A.; ARNS, C.W. Antiviral activity of *Bacillus* sp. isolated from the marine sponge *Petromica citrina* against bovine viral diarrhea virus, a surrogate model of the hepatitis C virus. **Viruses**, v.5, p. 1219-1230, 2013.

BATISTA, R.S.; GOMES, A.P.; CALIXTO-LIMA, L.; VITORINO, R.R.; PEREZ, M.C.A.; MENDONÇA, E.G.; OLIVEIRA, M.G.A.; GELLER, M. Sepse: atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v.23, p. 207-216, 2011.

BENJAMIN, C.F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Medicina**, v.34, p. 18-26, 2001.

BERGMANN, W.; FEENEY, R.J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. **Journal of Organic Chemistry**, v.16, p. 981-987, 1951.

BERLINCK, R.G.S.; HAJDU, E.; ROCHA, R.M.; OLIVERIA, J.H.L.L.; HERNANDEZ, I.L.C.; SELEGHIM, M.H.R.; GRANATO, A.C.; ALMEIDA, E.V.R.; NUÑEZ, C.V.; MURICY, G.; PEIXINHO,

S.; PESSOA, C.; MORAES, M.O; CAVALCANTI, B.C.; NASCIMENTO, G.F.; THIEMANN, O.H.; SILVA, M. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, v.67, p. 510-522, 2004.

BIANCO, E.M.; OLIVEIRA, S.Q.; RIGOTTO, C.; TONINI, M.; GUIMARAES, T.R.; BITTENCOURT, F.; GOUVÊA, L.; ARESI, C.; ALMEIDA, M.T.R.; MORITZ, M.I.G.; MARTINS, C.D.L.; SCHERNER, F.; CARRARO, J.L.; HORTA, P.A.; REGINATTO, F.H.; STEINDEL, M.; SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. Anti-infective potential of marine invertebrates and seaweeds from the Brazilian coast. **Molecules**, v.18, p. 5761-5778, 2013.

BIFULCO, G.; MINALE, B.I., RICCIO, R. Novel HIV-inhibitory halistanol sulfates F-H from a marine sponge, *Pseudoaxinissa digitata*. **Journal of Natural Products**. v.37, p. 164-167, 1994.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; KEYZERS, R.A.; MUNRO, M.H.G.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v.31, p. 160-258, 2014.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; KEYZERS, R.A.; MUNRO, M.H.G.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v.32, p. 116-211, 2015.

BONE, R.C.; BALK, R.A.; CERRA, F.B.; DELLINGER, R.P.; FEIN, A.M.; KNAUS, W.A.; SCHEIN, R.M.; SIBBALD, W.J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest Journal*, v.101, p. 1644-1655, 1992.

BOUCHER, H.W.; TALBOT, G.H.; BRADLEY, J.S.; EDWARDS, J.E.; JR GILBERT, D.; RICE, L.B.; SCHELD, M.; SPELLBERG, B.; BARTLETT, J. Bad bugs, no drugs: No escape! An update from the infectious diseases society of America. **Clinical Infections Diseases**, v. 48, p. 1-12, 2009.

BOUZON, J.; BRANDINI, F.P.; ROCHA, R. Biodiversity of sessile fauna on rocky shores of coastal islands in Santa Catarina, Southern Brazil. **Marine Science**, v.2, p. 39-47, 2012.

BRUN-BUISSON, C.; DOYON, F.; CARLET, J.; DELLAMONICA, P.; GOUIN, F.; LEPOUTRE, A.; MERCIER, J.C.; OFFENSTADT, G.; RÉGNIER, B. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. **Journal of the American Medical Association**, v.274, p. 968-974, 1995.

BUTLER, M.S.; BUSS, A.D. Natural products - the future scaffolds for novel antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, v.71, p. 919-929, 2006.

BUTLER, M.S.; BLASKOVICH, M.A.; COOPER, M.A. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. **The Journal of Antibiotics**, v.66, p. 571-591 2013.

CARRARO, J.L.F. Esponjas marinhas do Sul do Brasil: estrutura das assembléias, interações e biodiversidade. 2012. 104f. **Tese** (Doutorado em Ecologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2012.

CARVALHO, M.A.; CARRARO, J.L.; LERNER, C.B.; HADJU, E. First record of *Cyocalypa* (Demospongiae: Halichondrida) from Brazil, south western atlantic, with description of a new valid species. **Zootaxa**, v.302, p. 1-8, 2003.

CARVALHO, P.R.A.; TROTTA, E.A. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse. **Jornal de Pediatria**, v.79, p. 195-204, 2003.

CHANG, Q.; WANG, W.; YOCHAY, G.R.; LIPSITCH, M.; HANAGE, W.P. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? **Evolutionary Applications**, v.8, p. 240-245, 2015.

CHENG, C.; LIU, Y.; SONG, H.; PAN, L.; LI, J.; QIN, Y.; LI, R. Marinopyrrole Derivatives as Potential Antibiotic Agents against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (II). **Marine Drugs**, v.11, p. 2927, 2948, 2013.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830, p. 3670-3695, 2013.

CRISTANCHO, J.M.; ZEA, S.; ACEVEDO, M.S.; UMBREIT, F.N. Capacidad antimicrobica de extractos de esponjas marinas del caribe colombiano. **Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras**, v.36, p. 167-179, 2007.

COLE, S.T. Who will develop new antibacterial agents? **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v.369, p. 1-7, 2014.

COSTA-LOTUFO, L.V.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C.; Epifânio, R.A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos - histórico & perspectivas. **Química Nova**, v.32, p. 703-716, 2009.

DAYSRING, T.D. Understanding hypertriglyceridemia in women: clinical impact and management with prescription omega-3-acid ethyl esters. **International Journal Womens Health**, v.3, p. 87-97, 2011.

DE CLERCQ. Antivirals: Past, present and future. **Biochemical Pharmacology**, v.85, p. 727-744, 2013.

DIAS, D.A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v.2, p.303-306, 2012.

DIAS, L.C.; DESSOY, M.A. Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades. **Química Nova**, v.36, p. 1552-1556, 2013.

ELLIS, G.S.; WYCHE, T.P.; ERY, C.G.; BRAUN, D.R.; BUGNI, T.S. Solwaric Acids A and B, Antibacterial Aromatic Acids from a Marine *Solwaraspora* sp. **Marine Drugs**, v.12, p. 1013-1022, 2014.

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

FUSETANI, N.; MATSUNAGA, S.; KONOSU, S. Halistanol sulfate, an antimicrobial novel steroid sulfate from the sponge *Halichondria cf. moorei* Bergquist. **Tetrahedron Letters**, v.21, p. 1985-1988, 1981.

GELLATI, L.C.; BECKER, A.P.; BONAMIGO, R.R.; AZEVEDO, P.A. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente

na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, p. 501-506, 2009.

GERWICK, W.H.; MOORE, B.S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry & Biology**, v.19, p. 85-98, 2012.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Revista Estudos Avançados**, v.24, p. 81-98, 2010.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUP, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v.33, p. 667-679, 2010.

GUIMARAES T.R.; QUIROZ C.G.; RIGOTTO C.; OLIVEIRA, S.Q.; ALMEIDA, M.T.R.; BIANCO, E.M.; MORITZ, M.I.G.; CARRARO, J.L.; PALERMO, J.A.; CABRERA, G.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H.; Simões, C.M.O. Anti HSV-1 activity of halistanol sulfate and halistanol sulfate C isolated from brazilian marine sponge *Petromica citrina* (Demospongiae). **Marine Drugs**, v.11, p. 4176-4192, 2013.

HENKIN, C.S.; COELHO, J.C.; PAGANELLA, M.C.; SIQUEIRA, R.M.; DIAS, F.S. Sepse uma visão atual. **Scientia Medica**, v.19, p. 135-145, 2009.

HENSLER, M.E.; JANG, K.H.; THIENPHRAPA, W.; VUONG, L.; TRAN, D.N.; SOUBIH, E.; LIN, L.; HASTE, N.M.; CUNNINGHAM, M.L.; KWAN, B.P.; SHAW, K.J.; FENICAL, W.; NIZET, V. Anthracimycin activity against contemporary methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Antibiotics**, p. 1-5, 2014.

HILL, M.S.; LOPES, N.A.; YOUNG, K.A. Anti-predator defenses in western North Atlantic sponges with evidence of enhanced defense through interactions between spicules and chemicals. **Marine Ecology Progress Series**, v.291, p. 93-102, 2005.

HOLLIS, A.; AHMED, Z. Preserving antibiotics, rationally. **The New England Journal of Medicine**, v.369, p. 2474–2476, 2013.

HU, Y.; CHEN, J.; HU, G.; YU, J.; ZHU, X.; LIN, Y.; CHEN, S.; YUAN, J. Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. **Marine Drugs**, v.13, p. 202-221, 2015.

HUSSAIN, S.; FAREED, S.; ANSARI, S.; KHAN, M.S. Marine natural products: a lead for anti-cancer. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v.41, p. 27-39, 2012.

JAIME, M.F.V.; REDKO, F.; MUSCHIETTI, L.V.; CAMPOS, R.H.; MARTINO, V.S.; CAVALLARO, L.V. In vitro antiviral activity of plant extracts from Asteraceae medicinal plants. **Virology Journal**, v.10, p. 1-10, 2013.

JAIN, S.; VAHDAT, L.T. Eribulin mesylate. **Clinical Cancer Research**, v.17, p. 6615-6622, 2011.

JANG, K.H.; NAM, S.J.; LOCKE, J.B.; KAUFFMAN, C.A.; BEATTY, D.S.; PAUL, L.A.; FENICAL, W. Anthracimycin, a potent anthrax antibiotic from a marine-derived actinomycete. **Angewandte Chemie International Edition**, v.52, p.7822-7824, 2013.

JAWAD, I.; LUKSIC, I.; RAFNSSON, S.B. Assessing available information on the burden of sepsis: global estimates of incidence, prevalence and mortality. **Journal of Global Health**, v.2, 2012.

JOLY, C.A.; HADDAD, C.F.B.; VERDADE, L.M.; OLIVERIA, M.C.; BOLZANI, V.S.; BERLINCK, R.G.S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, v.89, p. 114-133, 2011.

JUNIOR, J.A.L.S.; DAVID, C.M.; HATUM, R.; SOUZA, P.C.S.P.; JAPIASSÚ, A.; PINHEIRO, C.T.S.; FRIEDMAM, G.; SILVA, O.B.; DIAS, M.A.; KOTERBA, E.; DIAS, F. S.; PIRAS, C.; LUIZ, R.R. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em unidades de terapia intensiva Brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.18, p. 9-17, 2006.

KATHIRAVAN, M.K.; SALAKE, A.B.; CHOTHE, A.S.; DUDHE, P.B.; WATODE, R.P.; MUKTA, M.S.; GADHWE, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.20, p. 5678-5698, 2012.

KIMBERLIN, D.W.; WHITLEY, R.J. Antiviral resistance: mechanisms, clinical significance, and future implications. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.37, p.403-421, 1996.

KITAZATO, K.; WANG, Y.; KOBAYASHI, N. Viral infectious disease and natural products with antiviral activity. **Drug Discovery Therapy**, v.1, p. 14-22, 2007.

KOSKI, R.R. Omega-3-acid ethyl esters (lovaza) for severe hypertriglyceridemia. **Pharmacological and Therapeutics**, v.33, p. 271-303, 2008.

KOSSUGA, M.H.; DE LIRA S.P.; NASCIMENTO, A.M.; GAMBARDELLA, M.T.P.; TORRES, R.G.S.Y.R.; NASCIMENTO, G.G.F.; PIMENTA, E.F.; SILVA, M.; THIEMANN O.H.; OIVIA, G.; TEMPONE A.G.; MELHEM, M.S.C.; SOUZA, A.O.; GALETTI, F.C.S.; SILVA, C.L.; CAVALCANTI, B.; PESSOA, C.O.; MORAES, M.O.; HADJU, E.; PEIXINHO, S.; ROCHA, R.M. Isolamento e atividades biológicas de produtos naturais das esponjas *Monanchora arbuscula*, *Aplysina* sp., *Petromica ciocalyptoides* e *Topsentia ophiraphidites*, da ascídia *Didemnum ligulum* e do octocoral *Carijoa riisei*. **Química Nova**, v.30, p. 1194-1202, 2007.

KUMAR, A.; ROBERTS, D.; WOOD, K.E.; LIGHT, B.; PARRILLO, J.E.; SHAMA, S.; SUPPES, R.; FEINSTEIN, D.; ZANOTTI, S.; TAIBERG, L.; GURKA, D.; KUMAR, A.; CHEANG, M. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. **Critical Care Medical**, v.34, p.1589-1596, 2006.

LAHLOU, M. The success of natural products in drug discovery. **Pharmacology and Pharmacy**, v.4, p. 17-31, 2013.

LAPORT, M.S.; SANTOS, O.C.S.; MURICY, G. Marine sponges: Potential sources of new antimicrobial drugs. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.10, p. 86-105, 2009.

LEAL, M.G.; PUGA, J.; SERÔDIO, J.; GOMES, N.C.M.; CALADO, R. Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades – where and what are we bioprospecting? **New Marine Natural Products from Invertebrates**, v.7, 2012.

LERNER, C. B. Esponjas da ilha da Galé (Porifera, Demospongiae), reserva biológica marinha do arvoredo, Santa Catarina, Brasil. **Biociências**, v.4, p. 101-124, 1996.

LERNER, C.B.; HADJU, E. Two new *Mycale* (*Naviculina*) (*Mycalidade*, *Poecilosclerida*, *Demospongiae*) from the Paulista biogeographic province (swatlantic). *Revista Brasileira de Zoologia*, v.1, p. 109-122, 2002.

LEVY, M.M.; DELLINGER, R.P.; TOWNSEND, S.R.; LINDE-ZWIRBLE, W.T.; MARSHALL, J.C.; BION, J.; SCHORR, C.; ARTIGAS, A.; RAMSAY, G.; BEALE, R.; PARKER, M.M.; GRELACH, H.; REINHART, K.; SILVA, E.; HARVEY, M.; REGAN, S.; ANGUS, D.C. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. **Critical Care Medicine**, v.38, p.367-374, 2010.

LIMA, J. S.; REZA, D. L.; TEIXEIRA, S.; COSTA, C. Pesquisa clínica: fundamentos, aspectos éticos e perspectivas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**, v.16, p. 225-233, 2003.

LIMA, B.A.; LIRAC, S.P.; KOSSUGA, M.H.; GONÇALVES, R.B.; BERLINCK, R.G.S.; KAMIYAF, R.U. Halistanol sulfate A and rodriguesines A and B are antimicrobial and antibiofilm agents against the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 651-659, 2014.

LIU, Y. Renaissance of marine natural product drug discovery and development. **Marine Science Research and Development**, v.2, p.1-2 2012.

LIU, Y.; HASTE, N.M.; THIENPHRAPA, W.; LI, J.; NIZET, V.; HENSLER, M.; LI, R. Marinopyrrole Derivatives as Potential Antibiotic Agents against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (III). **Marine Drugs**, v.12, p. 2458-2470, 2014.

LIVERMORE, D.M. Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p.1-4, 2011.

LORIGADOS, C.B.; SORIANO, F.G.; SZABO, C. Pathomechanisms of myocardial dysfunction in sepsis. **Endocrine, Metabolic and Immune Disorders**, v.10. p.274-284, 2010.

MARINHO, P.R.; MURICY, G.R.S.; SILVA, M.F.L.; MARVAL, M.G.; LAPORT, M.S. Antibiotic-resistant bacteria inhibited b extracts and fractions from Brazilian marine sponges. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, p. 267–275, 2010.

MARINHO, P.R.; SIMAS, N.K.; KUSTER, R.M.; DUARTE, R.S.; FRACALANZZA, S.E.L.; FERREIRA, D.F.; ROMANOS, M.T.V.; MURICY, G.; GIAMBIAGI-DEMERVAL, M.; LAPORT, M.S. Antibacterial activity and cytotoxicity analysis of halistanol trisulphate from marine sponge *Petromica citrina*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.67, p. 2396-2400, 2012.

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, p. 1066-1101, 2014.

MAYER, A.M.; 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**, v.31, p. 255-265, 2010.

MAYER, A.M.; RODRIGUEZ, A.D.; SCAFATI, O.T.; FUSETANI, N. Marine Pharmacology in 2009–2011: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Marine Drugs**, v.11, p. 2510-2573, 2013.

MCKEE, T.C.; CARDELLINA, J.H.; RICCIO, R.; D'AURIA, V.; IORIZZI, M.; MINALE, L.; MORAN, R.A.; GULAKOWSKI, J.; MCMAHON, J.B.; BUCKHEIT, R.W.; SNADER, K.M.; BOYD, M.R. -Inhibitory natural products. Comparative studies of sulfated sterols

from marine invertebrates. **Journal Medicinal Chemistry**, v.37, p. 793-797, 1994.

MEHBUB, M.F.; LEI, J.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. **Marine Drugs**, v.12, p. 4539-4577, 2014.

MISHRA, B.; TIWARI, V.K. Natural products: An evolving role in future drug Discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, 4769-4807, 2011.

MOLINSKI, T.F.; DALISAY, D.S.; LIEVENS, S.L.; SALUDES, J.P. Drug development from marine natural products. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.8, p. 69-85, 2009.

MONKS, N. R.; LERNER, C.; HENRIQUES, A. T.; FARIAS, F. M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SUYENAGA, E. S.; DA ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G.; MOTHEs, B. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.281, p. 1-12, 2002.

MONTASER, R.; LUESCH, H. Marine natural products: a new wave of drugs? **Future Medicinal Chemistry**, v.3, p. 1475-1489, 2011.

MORENO, R.P.; MARTIN, G.S. Sepsis without borders. **Intensive Care Medicinal**, 2013.

MOTHEs-DE-MORAES, B. Ocorrência de poríferos na zona de maré da Ilha de João da Cunha, Porto Belo, Santa Catarina, Brasil (Porifera - Demospongiae). **Iheringia**, v.66, p. 129-139, 1987.

MOTHEs, B.; LERNER, C. B. Esponjas marinhas do infralitoral de Bombinhas (Santa Catarina, Brasil) com descrição de três espécies novas (Porifera: Calcarea e Demospongiae). **Biociências**, v.2, p. 47-62, 1994.

MOTHEs, B.; KASPER, G.L.; LERNER, C.B.; CAMPOS, M.; CARRARO, J.L. *Spongia (Heterofibria) catarinenses* sp. nov. (Porifera,

Spongiidae) no litoral de Santa Catarina, Brasil. **Iheringia**, Série Zoológica, v.96, p. 335-338, 2006.

MOURA, L.A.; ORTIZ-RAMIREZ, F.; CAVALCANTI, D.N.; RIBEIRO, S.M.; MURICY, G.; TEIXEIRA, V.L.; FULY, A.L. Evaluation of marine brown algae and sponges from Brazil as anticoagulant and antiplatelet products. **Marine Drugs**, v.9, p. 1346-1358, 2011.

MURICY, G.; HAJDU, E.; MINERVINO, J.V.; MADEIRA, A.V.; PEIXINHO, S. Systematic revision of the genus *Petromica* Topsent (Demospongiae: Halichondrida), with a new species from the Southwestern Atlantic. **Hydrobiologia**, v.443, p. 103-128, 2001.

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

OVERBYE, K.; BARRETT, J.F. Antibiotics: where did we go wrong? **DDT**, v. 10, p. 45-52, 2005.

PAWLIK, J. R.; CHANAS, B.; TOONEN, R. J.; FENICAL, W. Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence. **Marine Ecology Progress Series**, v.127, p. 183-194, 1995.

PFALLER, M.A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v.125, p. S3- S13, 2012.

PIRET, J.; BOVIN, G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms prevalence, and management. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.55, p. 459-472, 2011.

PROMPANYA, C.; FERNANDES, C.; CRAVO, S.; PINTO, M.M.M.; DETHOUP, T.; SILVA, A.M.S.; KIJJOA, A. A New Cyclic Hexapeptide and a New Isocoumarin Derivative from the Marine Sponge-Associated Fungus *Aspergillus similanensis* KUFA 0013. **Marine Drugs**, v.13, p. 1432-1450, 2015.

RIBEIRO, S.M.; ROGERS, R.; RUBEM, A.C.; DA GAMA, B.A.P.; MURICY, G.; PEREIRA, R.C. Antifouling activity of twelve

demosponges from Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.73, p. 501-506, 2013.

RITTER, C.; ANDRADES, M.; FROTA, M.L.C.; BONATTO, F.; PINHO, R.A.; POLYDORO, M.; KLAMT, F.; PINHEIRO, C.T.S.; MENNA-BARRETO, S.S.; MOREIRA, J.C.F.; DAL-PIZZOL, F. **Intensive Care Medicine**, v.29, p. 1782-1789, 2003.

RODRÍGUEZ, W.; OSORNO, O.; RAMOS, F.A.; DUQUE, C.; ZEA, S. New fatty acids from Colombian caribbean sea sponges. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.38, p. 774-783, 2010.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v.52, p. 1138-1143, 2011.

SAGA, T.; YAMAGUCHI, K. History of Antimicrobial Agents and Resistant Bacteria. **Journal of the Japan Medical Association**, v.52, p.103-108, 2009.

SAGAR, S.; KAUR, M.; MINNEMAN, K.P; Antiviral lead compounds from marine sponges. **Marine Drugs**, v.8, p. 2619-2638, 2010.

SAWADOGO, W.R.; SCHUMACHER, M.; TEITEN, M.H.; CERELLA, C.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. A Survey of marine natural compounds and their derivatives with anti-cancer activity reported in 2011. **Molecules**, v.18, p. 3641-3673, 2013.

STRASFELD, L.; CHOU, S. Antiviral drug resistance: mechanisms and clinical implications. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.24, 413-437, 2010.

SZABO, C. Hydrogen sulphide and angiogenesis: mechanisms and applications. **British Journal of Pharmacology**, v.164, p. 853-865, 2011.

SZABO, C. Roles of hydrogen sulfide in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.17, p. 68-80, 2012.

SENER, P.D.; SIEVERS, E. L. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and

systemic anaplastic large cell lymphoma. **Nature Biotechnology**, v.30, p. 631-637, 2012.

SENTHILKUMAR, K.; KIM, S.K. Marine Invertebrate Natural Products for Anti-Inflammatory and Chronic Diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-10, 2013.

SILVA, E.; PEDRO, M.A.; SOGAYAR, A.C.B.; MOHOVIC, T.; SILVA, C.L.O.; JANISZEWSLI, M.; CAL, R.G.R.; SOUSA, E.F.; ABE, T.P.; ANDRADE, J.; MATOS, J.D.; REZENDE, E.; ASSUNÇÃO, M.; AVEZUM, A.; ROCHA, P. C.S.; MATOS, G.F.J.; BENTO, M.; CORRÊA, A.D.; VIEIRA, P.C.B.; KNOBEL, E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**, v.8, 251-260, 2004.

SILVA, A.C.; KRATZ, J.M.; FARIAS, F.M.; HENRIQUES, A.T.; SANTOS, J.; LEONEL, R.M.; LERNER, C.; MOTHES, B.; BARARDI, C. R.M.; SIMÕES, C.M.O. *In vitro* antiviral activity of marine sponges collected off Brazilian Coast. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, p. 135-140, 2006.

SILVER, L.L. Challenges of antibacterial discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, p. 71-109, 2011.

SINGH, S.B.; BARRETT, J.F. Empirical antibacterial drug discovery-foundation in natural products. **Biochemical Pharmacology**, v.71, p. 1006-1015, 2006.

SORDI, R.; LIMA, O.M.; JUSTINA, A.M.D.; REZENDE, E.; ASSREUY, J. Pneumonia-induced sepsis in mice: temporal study of inflammatory and cardiovascular parameters. **International Journal of Experimental Pathology**, v.94, p. 144-155, 2013.

SPERRY, S.; CREWS, P. Haliclostanone sulfate and halistanol sulfate from an Indo-Pacific *Haliclona* sponge. **Journal Natural Products**, v. 60, p. 29-32, 1997.

SWEET, D.; MARSDEN, J.; HO, K.; KRAUSE, C.; RUSSEL, J.A. Emergency management of sepsis: The simple stuff saves lives. **British Columbia Medical Journal**, v.54, p. 176-182, 2012.

TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v.31, p. 1807-1813, 2008.

TANWAR J.; DAS, S.; ZESSHAN, F.; Hameed S. Multidrug resistance: an emerging crisis. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, 2014.

TAYLOR, M.W.; RADAX, R.; STEGER, D.; WAGNER, M. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.71, p. 295-347, 2007.

THOMAS, T.R.A.; KAVLEKAR, D.P.; LOKABHARATHI, P.A. Marine drugs from sponge-microbe association-a review. **Marine Drugs**, v.8, p. 1417-1468, 2010.

TURK, T.; AVGUSTIN, A.; BATISTA, U.; STRUGAR, G.; KOSMINA, R.; CIVOVIC, S.; JANUSSEN, D.; KAUFERSTEIN, S.; MEBS, D.; SEPCIC, K. Biological activities of ethanolic extracts from deep-sea antarctic marine sponges. **Marine Drugs**, v.11, p. 1126-1139, 2013.

TURQUE, A.S.; BATISTA, D.; SILVEIRA, C.B.; CARDOSO, A.M.; VIEIRA, R.P.; MORAES, F.C.; CLEMENTINO, M.M.; ALBANO, R.M.; PARANHOS, R.; MARTINS, O.B.; MURICY, G. Environmental shaping of sponge associated archaeal communities. **PlosOne**, v.5, 2010.

UHLEMANN, A.C.; OTTO, M.; LOWY, F.D.; DELEO, F.R. Evolution of community and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetical and Evolution**, v.21, p. 563-574, 2014.

UZAIR, B.; MAHMOOD, Z.; TABASSUM, S. Antiviral activity of natural products extracted from marine organisms. **BioImpacts**, v.1, p. 203-211, 2011.

VO, T.S.; NGO, D.H.; TA, Q.V.; KIM, S.K. Marine organisms as a therapeutic source against herpes simplex virus infection. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.44, p. 11-20, 2011.

VOGEL, G. The Inner Lives of Sponges. **Science**, v.320, p. 1028-1030, 2008.

APÊNDICE 1- Potencial anti-infeccioso de invertebrados marinhos e algas da costa brasileira.

Molecules **2013**, *18*, 5761–5778; doi:10.3390/molecules18055761

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

Anti-Infective Potential of Marine Invertebrates and Seaweeds from the Brazilian Coast

Éverson Miguel Bianco^{1,2}, Simone Quintana de Oliveira¹, Caroline Rigotto^{3,†},
Maiko Luis Tonini^{4,†}, Tatiana da Rosa Guimarães^{1,†}, Francine Bittencourt¹,
Lidiane Pires Gouvêa², Cassandra Aresi¹, Maria Tereza Rojo de Almeida¹,
Maria Izabel Goularte Moritz¹, Cintia Dalcuche Leal Martins², Fernando Scherner²,
João Luis Carraro⁵, Paulo Antunes Horta², Flávio Henrique Reginatto¹, Mario Steindel⁴,
Cláudia Maria Oliveira Simões³ and Eloir Paulo Schenkel^{1,*}

¹ Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88.040-900, Florianópolis, SC, Brasil; E-Mails: ebianco@chemist.com (E.M.B.); simonequintana@hotmail.com (S.Q.d.O.); tatyguimaraes@gmail.com (M.T.d.R.G.); francine-fb@hotmail.com (F.B.); cassandraaresi@hotmail.com (C.A.); terezarojo@gmail.com (M.T.R.d.A.); mizabelgm@gmail.com (M.I.G.M.); freginatto@hotmail.com (F.H.R.)

² Laboratório de Ficologia, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88.040-900, Florianópolis, SC, Brasil; E-Mails: lidi_pel@hotmail.com (L.P.G.); cintia_ufrpr@yahoo.com.br (C.D.L.M.); fscherner@yahoo.com (F.S.); pahorta@hotmail.com.br (P.A.H.)

³ Laboratório de Virologia Aplicada, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88.040-900, Florianópolis, SC, Brasil; E-Mails: nigottoecarol@gmail.com (C.R.); claudias@reitoria.ufsc.br (C.M.O.S.)

⁴ Laboratório de Protozoologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88.040-900, Florianópolis, SC, Brasil; E-Mails: maikotonini@hotmail.com (M.L.T.); mario.steindel@ufsc.br (M.S.)

⁵ Programa de Pós-graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP 91.501-970, Porto Alegre, RS, Brasil; E-Mail: joao.porifera@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: eloirschinkel@gmail.com; Tel.: +55-48-3721-5076; Fax: +55-48-3721-9542.

Received: 28 March 2013; in revised form: 3 May 2013 / Accepted: 10 May 2013 /

Published: 16 May 2013

Abstract: This manuscript describes the evaluation of anti-infective potential *in vitro* of organic extracts from nine sponges, one ascidian, two octocorals, one bryozoan, and 27 seaweed species collected along the Brazilian coast. Antimicrobial activity was tested against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Candida albicans* (ATCC 10231) by the disk diffusion method. Antiprotozoal activity was evaluated against *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/96/LSC96-H3) promastigotes and *Trypanosoma cruzi* (MHOM/BR/00/Y) epimastigotes by MTT assay. Activity against intracellular amastigotes of *T. cruzi* and *L. braziliensis* in murine macrophages was also evaluated. Antiviral activity was tested against Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1, KOS strain) by the plaque number reduction assay (IC₅₀). Cytotoxicity on VERO cells was evaluated by the MTT assay (CC₅₀). The results were expressed as SI = CC₅₀/IC₅₀. The most promising antimicrobial results were obtained against *S. aureus* and *C. albicans* with *Dragmacidon reticulatum*. Among the seaweeds, only *Osmundaria obtusiloba* showed moderate activity against *P. aeruginosa*. Concerning antiprotozoal activity, *Bugula neritina*, *Carijoa risei*, *Dragmaxia anomala* and *Haliclona (Halichoclona)* sp. showed the most interesting results, mainly against extracellular promastigote forms of *L. braziliensis* (66, 35.9, 97.2, and 43.6% inhibition, respectively). Moreover, six species of seaweeds *Anadyomene saldanhae*, *Caulerpa cupressoides*, *Canistrocarpus cervicornis*, *Dictyota* sp., *Ochtodes secundiramea*, and *Padina* sp. showed promising results against *L. braziliensis* (87.9, 51.7, 85.9, 93.3, 99.7, and 80.9% inhibition, respectively), and only *Dictyota* sp. was effective against *T. cruzi* (60.4% inhibition). Finally, the antitherpes activity was also evaluated, with *Haliclona (Halichoclona)* sp. and *Petromica citrina* showing the best results (SI = 11.9 and SI > 5, respectively). All the active extracts deserve special attention in further studies to chemically characterize the bioactive compounds, and to perform more refined biological assays.

Keywords: marine natural products; seaweeds; marine invertebrates; antileishmanial activity; antitypanosomal activity; antimicrobial activity; anti-HSV-1 activity

1. Introduction

Marine natural products represent an immeasurable potential source of new drugs with diverse and often unique structures [1], and diverse biological properties, such as antiviral [2], antibacterial [3], antiprotozoal [4–6], antifungal [7], cytotoxic [8–10] and antitumoral activities [11,12] have been reported. Success in these areas is demonstrated by several new compounds in pre- or clinical evaluation [13,14].

Brazil is a continental country, with 8,500 km of Atlantic coastline that supports an exclusive and rich diversity of endemic marine fauna and flora that can offer rich rewards for the chemical study of marine natural products in the search for novel bioactive secondary metabolites with potential medicinal properties. However, so far only a few classes of Brazilian marine organisms have been

investigated for their chemical and pharmacological properties [15–25]. We therefore believe that the identification of Brazilian organisms with significant biotechnological potential for use in drugs is an important goal [18].

Some studies regarding bioprospection of Brazilian marine organisms have been reported. In 2002, Monks and co-workers performed the first biological screening with marine sponges collected from the Santa Catarina coast, in the south of Brazil. Several activities, such as cytotoxic, antichemotactic and antimicrobial properties were detected for the organic and aqueous extracts of 10 marine sponges [19].

Silva *et al.* [20] evaluated the *in vitro* antiherpes (HSV-1, KOS strain), anti-adenovirus (human AdV serotype 5) and anti-rotavirus (simian RV SA11) activities of extracts from 27 different marine sponges (Porifera) collected from the Brazilian coast. The results showed that the aqueous extracts from *Cliona* sp., *Agelas* sp., *Tethya* sp., *Axinella* aff. *corrugata*, *Polymastia janeirensis* and *Protosuberites* sp. were highly promising and deserve special attention in further studies. Furthermore, Frota-Jr and co-authors reported the antitumor activity of the marine sponge *P. janeirensis* in human U138MG glioma cell line [21,22].

Jimenez and colleagues performed the first ascidian antitumor screening with organisms from the Northeast coast of Brazil. The results suggest these are a rich source of natural compounds with cytotoxic properties [23].

Selegim *et al.* screened 349 crude extracts from marine sponges, ascidians, bryozoans, and octocorals collected along the Brazilian coastal against bacteria strains, yeasts, *Mycobacterium tuberculosis*, cancer cell lines [MCF-7 (breast cancer), B16 (murine melanoma) and HCT8 (colon)]. The results showed a high percentage of bioactive extracts from the phyla Porifera, Ascidiacea, Cnidaria and Bryozoa [24].

Recently, Soares and colleagues [25] evaluated the antiviral activity of extracts from 36 species of seaweeds from seven locations of the Brazilian coastline against HSV-1 and HSV-2 strains. The results obtained reinforce the role of seaweeds as an important source of compounds with for the development of new drugs against herpes.

The marine biodiversity loss that has been observed worldwide [26], but especially in Brazil, is driving an unprecedented loss of biotechnological potential related with these organisms [27,28]. In attention to the human constant need for new drugs and therapies in the present work, we performed an anti-infective (antibacterial, antifungal, antiprotozoal and antiviral) screening of 95 different extracts and fractions from 13 marine invertebrates collected from the southern Brazilian coast, and 27 seaweeds from the northeastern Brazilian coast.

2. Results and Discussion

This paper describes the *in vitro* antimicrobial, antiprotozoal and antiviral evaluation of organic extracts and fractions from 13 marine invertebrate species (nine sponges, one ascidian, two octocorals, and one bryozoans (Table 1), and 27 seaweeds species [sixteen Rhodophyta (59.2%), seven Phaeophyceae (26%), and five Chlorophyta (14.8%) (Table 2). A total of 95 extracts and fractions (65 from marine invertebrates and 30 from seaweeds) were assayed. The results showed that 53 samples (56%) exhibited some anti-infective activity against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*,

Pseudomonas aeruginosa, *Escherichia coli* and *Candida albicans* (antimicrobial), *Leishmania braziliensis* and *Trypanosoma cruzi* (anti-protozoal), as well as against HSV-1 replication (antiviral).

Table 1. Marine invertebrates collected for biological assays.

Species	Collection local and deep	Collection date
Phylum Cnidaria (Octocorallia)		
<i>Carijoa riisei</i>	Xavier Island (10–14 m deep)	May 2011
<i>Leptogorgia punicea</i>	Aranhas Island (10–14 m deep)	April 2011
Phylum Bryozoa		
<i>Bigula meritima</i>	Sambaqui Beach (1–2 m deep)	October 2011
Phylum Porifera		
<i>Cliona celata</i>	Xavier Island (10–12 m deep)	March 2011
<i>Dragnacidon reticulatum</i>	Xavier Island (10–14 m deep)	May 2011
<i>Dragnacia anomala</i>	Aranhas Island (10–14 m deep)	December 2011
<i>Guitarra sepia</i>	Xavier Island (7–14 m deep)	May 2011
<i>Haliclona (Haliclona) sp.</i>	Aranhas Island (10–14 m deep)	April 2011
<i>Petronica citrina</i>	Xavier Island (9–17 m deep)	January–July 2010
<i>Polynastia janaeirensis</i>	Xavier Island (10–14 m deep)	December 2011
<i>Tedania ignis</i>	Aranhas Island (6–10 m deep)	April 2011
<i>Trachyladus sp.</i>	Campeche Island (15 m deep)	May 2011
Phylum Urochordata (Tunicate)		
<i>Didemnum granulatum</i>	Aranhas Island (7–14 m deep)	April 2011

Table 2. Marine seaweeds collected for biological assays.

Species	Collection local and deep ^a	Collection date
Phylum Rhodophyta		
<i>Acanthophora specifera</i>	Conceição Lagoon, SC (27°36'29" S; 48°26'31" W)	March 2012
<i>Botryocladia occidentalis</i>	Taiba Beach, CE (03°30'27" S; 38°55'11" W)	August 2011
<i>Bryothamnion seaforthii</i>	Taiba Beach, CE (03°30'27" S; 38°55'11" W)	August 2011
<i>Bryothamnion triquetrum</i>	Taiba Beach, CE (03°30'27" S; 38°55'11" W)	August 2011
<i>Bryothamnion triquetrum</i>	Farol de Itapoã Beach, BA (12°57'25" S; 38°21'15" W)	September 2011
<i>Cryptonemia seminervis</i>	Taiba Beach, CE (03°30'27" S; 38°55'11" W)	August 2011
<i>Digenea simplex</i>	Atol das Rocas, RN (03° 51'03" S, 33° 40'29" W)	February 2012
<i>Gracilaria caudate</i>	Taiba Beach, CE (03°30'27" S; 38°55'11" W)	August 2011
<i>Gracilaria cervicornis</i>	Taiba Beach, CE (03°30'27" S; 38°55'11" W)	August 2011
<i>Gracilaria cervicornis</i>	Arraial d'Ajuda Beach, BA (16°29'54" S; 39° 04'07" W)	September 2011
<i>Grateloupia canifolia</i>	Canasvieiras Beach, SC (27°25'29" S; 48°26'43" W)	October 2011
<i>Hypnea cenomyce</i>	Taiba Beach, CE (03°30'27" S; 38°55'11" W)	August 2011
<i>Hypnea musciformis</i>	Taiba Beach, CE (03°30'27" S; 38°55'11" W)	August 2011
<i>Laurencia dendroidea</i>	Arraial d'Ajuda Beach, BA (16°29'54" S; 39° 04'07" W)	September 2011
<i>Ochtodes secundiramea</i>	Arraial d'Ajuda Beach, BA (16°29'54" S; 39° 04'07" W)	September 2011
<i>Osmundaria obtusiloba</i>	Cabo Branco Beach, PB (07°07'31" S; 34°49'19" W)	July 2012
<i>Palisada flagellifera</i>	Enseada dos Corais Beach, PE (08°19'23" S; 34° 56'55" W)	March 2012
<i>Palisada papillosa</i>	Arraial d'Ajuda Beach, BA (16°29'54" S; 39° 04'07" W)	September 2011
Class Phaeophyceae		
<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	Arraial d'Ajuda Beach, BA (16°29'54" S; 39° 04'07" W)	September 2011
<i>Dictyopteris delicatula</i>	Da Barra Beach, BA (16°29'54" S; 39° 04'07" W)	September 2011
<i>Dictyopteris jolyana</i>	Cabo Branco Beach, PB (07°07'31" S; 34°49'19" W)	July 2012
<i>Dictyota sp.</i>	Arraial d'Ajuda Beach, BA (16°29'54" S; 39° 04'07" W)	March 2012
<i>Padina sp.</i>	Farol de Itapoã Beach (12°57'25" S; 38°21'15" W)	September 2011
<i>Padina gymnospora</i>	Arraial d'Ajuda Beach, BA (16°29'54" S; 39° 04'07" W)	March 2012
<i>Sargassum sp.</i>	Arraial d'Ajuda Beach, BA (16°29'54" S; 39° 04'07" W)	September 2011

Table 2. Cont.

Species	Collection local and deep #	Collection date
Phylum Chlorophyta		
<i>Anadyomene saldanhae</i>	Arraial d'Ajuda Beach, BA (16°29'54" S; 39° 04'07" W)	September 2011
<i>Anadyomene stellata</i>	Arraial d'Ajuda Beach, BA (16°29'54" S; 39° 04'07" W)	May 2012
<i>Caulerpa sertularioides</i>	Arraial d'Ajuda Beach, BA (16°29'54" S; 39° 04'07" W)	September 2011
<i>Caulerpa cupressoides</i> ^a	Farol da Barra Beach, BA (13°00'40" S 38°31'55" W)	September 2011
<i>Caulerpa cupressoides</i> ^b	Arraial d'Ajuda Beach, BA (16°29'54" S; 39° 04'07" W)	September 2011

All seaweeds were collected in the intertidal zone. ^{ab} same species, but collected in different locales.

2.1. Marine Invertebrates

Thirteen species of marine invertebrates were assayed against bacteria and fungus. Of these, seven [*Dragnacidon reticulatum*, *Dragnaxia anomala*, *Haliclona (Halichoelona)* sp., *Leptogorgia punicea*, *Petromica citrina*, *Tedania ignis*, and *Trachycladus* sp.], showed some activity (Table 3).

The most interesting antimicrobial results were obtained with the sponge *D. reticulatum* that showed significant growth inhibition (13–16 mm) against *S. aureus* and *C. albicans*. A similar result was proved in another screening carried out with marine organisms from the southeastern Brazilian coast where the sponge *D. reticulatum* showed a weak antimicrobial activity against *S. aureus* and *C. albicans* [24]. As far as we are aware, this is the first report of this biological activity for *D. reticulatum*, *D. anomala*, and *Trachycladus* sp.

Furthermore, a weak antimicrobial activity against *S. aureus*, *E. faecalis*, and *E. coli* was also detected in the present study for *Haliclona (Halichoelona)* sp. and *Petromica citrina* (9–12 mm inhibition zone), and *T. ignis* (6–8 mm inhibition zone). In the same way, we verified a weak antimicrobial activity against *S. aureus* and *C. albicans* of the *n*-hexane extract from the octocoral *Leptogorgia punicea*.

Table 3. Antibacterial and antifungal screening of marine invertebrates by disc diffusion method.

Species	Extracts	Bacterial and fungal strains				
		<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Dragnaxia anomala</i>	E1	+	+	–	–	–
<i>Dragnacidon reticulatum</i>	E3F1	+++	–	–	–	+++
<i>Haliclona (Halichoelona)</i> sp.	E3F2	++	++	+	–	+
<i>Leptogorgia punicea</i>	E1	++	–	–	–	++
<i>Petromica citrina</i>	E3F2	++	++	–	–	++
<i>Tedania ignis</i>	E2	–	+	–	–	–
<i>Trachycladus</i> sp.	E3F2	++	++	+	–	+
	E3F3	–	+	–	–	–

(–): no activity; (+): 6–8 mm of inhibition zone; (++) 9–12 mm of inhibition zone; (+++): 13–16 mm of inhibition zone. Positive controls: *S. aureus*: oxacillin (1 µg) 18–24 mm; *E. faecalis*: ampicillin (10 µg) > 17 mm; *P. aeruginosa*: ceftazidime (30 µg) 22–29 mm; *E. coli*: ampicillin (10 µg) 16–22 mm; *C. albicans*: fluconazole (25 µg) > 19 mm; E1: *n*-hexane extract; E2: dichloromethane extract; E3F1: ethyl acetate fraction from E3 (methanol extract); E3F2: *n*-butanol fraction from E3 (methanol extract); E3F3: aqueous residue from E3 (methanol extract).

As far as we aware, this is the first report for antimicrobial activity for this gorgonian species. On the other hand, the extracts from *B. neritina*, *C. riseii*, *C. celata*, *D. granulatum*, *G. sepia* and *P. janeirensis* did not show antimicrobial activity against the assayed microorganism strains.

Recently it was reported that aqueous extract of *P. citrina* (collected in Rio de Janeiro State, southeast of Brazil) showed a large spectrum of activity against clinical strains and resistant-bacteria including *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *E. faecalis*, *M. fortuitum* and *N. gonorrhoeae*. All these activities were related to the presence of halistanol trisulphate A in this marine sponge [29,30]. Moreover, the antifungal activity for this substance, isolated from *Petromica ciocalyptoides* was also reported [31].

Another study led by Monks *et al.* [19] concerning the antimicrobial activity against *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermis*, *B. subtilis*, and *M. luteus* strains of southern Brazilian sponges, including *Guitarra* sp., *T. ignis*, *Haliclona* aff. *nubifera*, demonstrated that *H. aff. nubifera* showed moderate activity against *E. coli* and weak activity against *S. aureus*, *S. epidermis*, and *M. luteus*. Our results are in agreement with those obtained by these authors, although we used different libraries of microbial strains and extracts.

Concerning antiprotozoal activity, few studies reporting antileishmanial and tripanocidal activities have been described for marine invertebrates. In this work, 13 marine invertebrate species were evaluated against *L. brasiliensis* and *T. cruzi* (Table 4).

Table 4. Antiprotozoal activity expressed as growth inhibition (%) of extracts and fractions obtained from marine invertebrates.

Species	Samples	<i>Leishmania braziliensis</i> (promastigotes)	<i>Trypanosoma cruzi</i> (epimastigotes)
<i>Bugula neritina</i>	E1	66	–
	E3F2	47	–
	E3F3	30.7	–
<i>Carijoa riisei</i>	E1	35.9	43.4
	E2	–	29
	E3F1	–	26.1
	E3F2	14.6	2.6
	E3F3	–	5.5
<i>Didemnum granulatum</i>	E1	–	21.5
	E3F1	15.7	13.2
	E3F2	17.9	–
<i>Dragmacidon reticulatum</i>	E1	24.1	11.4
	E2	–	20
	E3F1	–	21.2
	E3F2	19.8	–
	E3F3	13.8	15.3
<i>Dragmaxia anomala</i>	E1	97.2	71.7
	E3F2	12.5	–
<i>Guitarra sepia</i>	E1	–	–
	E3F3	14.9	–

Table 4. Cont.

Species	Samples	<i>Leishmania braziliensis</i> (promastigotes)	<i>Trypanosoma cruzi</i> (epimastigotes)
<i>Haliclona (Halichoelona) sp.</i>	E1	–	14.6
	E3F1	–	28.3
	E3F2	43.6	33
	E3F3	16.9	–
<i>Leptogorgia punicea</i>	E1	–	19.2
	E2	–	38.8
	E3F2	–	11.1
	E3F3	15	–
<i>Tedania ignis</i>	E2	16.1	–
	E3F1	12.2	–
	E3F2	18.4	–
	E3F3	19.1	–

Extracts and fractions concentration: 50 µg/mL; (–): no activity; E1: hexane extract; E2: dichloromethane extract; E3F1: ethyl acetate fraction from E3 (methanol extract); E3F2: *n*-butanol fraction from E3 (methanol extract); E3F3: aqueous residue from E3 (methanol extract).

Out of these 13 species tested, *Bugula neritina* (E1 extract), *Carijoca riisei* (E1 extract), *Dragnaxia anomala* (extract E1), and *Haliclona (Halichoelona) sp.* (fraction E3F2) showed the best results, particularly against extracellular promastigote forms of *L. braziliensis* (66, 35.9, 97.2 and 43.6% grown inhibition, respectively). However, only two species, *C. riisei* and *D. anomala* showed some tripanocidal effects (43.4 and 71.7% growth inhibition, respectively).

Additionally, these extracts and fractions were assayed on *L. braziliensis* amastigotes in bone marrow macrophages from mice, and only the sponge *Haliclona (Halichoelona) sp.* and the octocoral *C. riisei* were active (Table 5). Based on these preliminary results, the E1 extract from *C. riisei* was fractionated by chromatographic techniques leading to the isolation of an active pregnane steroid [32]. Finally, the extracts from *C. celata*, *P. citrina*, *P. janeirensis* and *Trachycladus sp.* were not active against *L. braziliensis* or *T. cruzi*.

Table 5. Effects of marine invertebrates extracts and fractions on *Leishmania braziliensis* amastigotes in bone marrow macrophages from mice, and cytotoxicity on J774.G8 macrophage cell line.

Species	Samples	CC ₅₀ ± SD (µg/mL)	IC ₅₀ ± SD (µg/mL)	Selective index (CC ₅₀ /IC ₅₀)
<i>Bugula neritina</i>	E1	ND	>50	ND
<i>Carijoca riisei</i>	E1	48.6 ± 4.8	43.3 ± 8.5	1.1
<i>Dragnaxia anomala</i>	E1	54.3 ± 1.9	>15	<3.6
<i>Haliclona (Halichoelona) sp.</i>	E3F2	279.7 ± 21.2	43.9 ± 3.4	6.8

Positive Control: amphotericin B (IC₅₀ = 0.06 ± 0.02 µM), ND: not determined; E1: hexane extract; E3F2: *n*-butanol fraction from E3 (methanol extract); E3F3: aqueous residue from E3 (methanol extract).

In this work, the antiviral activity against Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1, KOS strain) was also evaluated. Before the evaluation of the antiviral activity, the cytotoxic effects of the selected samples were investigated on VERO cells by MTT assay, and for each tested sample, a CC_{50} value was calculated. Of the 95 extracts and fractions tested, only the E3F2 fractions from the sponges *Haliclona* (*Halichoelona*) sp. and *P. citrina* showed antiviral activity (SI = 11.92 and, SI > 5, respectively).

In 2006, Silva and co-workers [20] performed an *in vitro* study on the antiherpes, anti-adenovirus and anti-rotavirus activities of marine sponges collected from the Brazilian coast, including *Haliclona* sp., *Polymastia janeirensis* and *T. ignis*. Of these, only the organic extract (methanol/toluene, 3:1 v/v) from *P. janeirensis* showed antiherpetic activity [20].

2.2. Marine Seaweeds

Only five out of 27 species from seaweeds assayed (Rhodophyta: *Digenea simplex*, *Laurencia dendroidea*, *Ochtodes secundiramea*, *Osmundaria obtusiloba*, and Phaeophyta: *Dictyota* sp.) showed weak growth inhibition zone (6 to 8 mm, (Table 6). Otherwise, *A. specifera*, *A. saldanhae*, *A. stellata*, *B. occidentalis*, *B. seaforthii*, *B. triquetrum*, *C. cervicornis*, *C. serntilarioides*, *C. cupressoides*^a, *C. cupressoides*^b, *C. seminervis*, *D. delicatula*, *D. jolyana*, *G. caudata*, *G. cervicornis*, *G. cuneifolia*, *H. cenomyce*, *H. musciformis*, *P. gymnospora*, *Padina* sp., *P. flagellifera*, *P. papillosa* and *Sargassum* sp. did not show any antimicrobial activity.

Antibacterial activity may vary according to the species division [33]. In this study species from the phylum Rhodophyta exhibited better results than species from Chlorophyta and Phaeophyceae. In this context, our results are in agreement with the findings of Padmakumar and Ayyakannu [34]. Members of the family Rhodophyceae are prolific producers of acetogenins as well as mono-, sesqui-, di- and triterpenes, many of them halogenated [35]. Many articles have reported antimicrobial activity of halogenated sesquiterpenes and acetogenins derived from *Laurencia* species, especially for (–)-elatol, obtusol, (+)-obtusane, cartilagineol, and triquinane derivatives [36,37]. Studies performed with *Osmundaria* species are scarce, but some compounds so far described have potential antimicrobial activity, particularly the halogenated phenol derivatives, such as lanosol and sulfated oligobromophenols [38,39].

Table 6. Antibacterial and antifungal screening of marine seaweeds by disc diffusion method.

Species	Extracts	Bacterial and fungal strains				
		<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Dictyota</i> sp.	DS	+	+	–	+	–
<i>Digenea simplex</i>	DS	+	+	–	+	–
<i>Laurencia dendroidea</i>	FS	+	+	–	–	–
<i>Ochtodes secundiramea</i>	FS	+	–	–	–	–
<i>Osmundaria obtusiloba</i>	DS	–	–	–	++	–

(–): no activity; (+): 6–8 mm of inhibition zone; (++) 9–12 mm of inhibition zone; (+++): 13–16 mm of inhibition zone. Positive controls: *S. aureus*: oxacillin (1 µg) 18–24 mm; *E. faecalis*: ampicillin (10 µg) > 17 mm; *P. aeruginosa*: ceftazidime (30 µg) 22–29 mm; *E. coli*: ampicillin (10 µg) 16–22 mm; *C. albicans*: fluconazole (25 µg) > 19 mm; DS: extract obtained from dried seaweeds using CH₂Cl₂: MeOH (2:1); FS: extract from fresh seaweeds using Me₂CO.

Regarding the antiprotozoal activity, of the 27 species assayed, six showed interesting activity against *L. braziliensis* and *T. cruzi*. Extracts from *Anadyomene saldanhae* (FS extract), *Caulerpa cupressoides*^(a) (FS extract), *Canistrocarpus cervicornis* (FS extract), *Diclyota* sp. (FS extract), *Ochtodes secundiramea* (FS extract), and *Padina* sp. (FS extract) showed promising results against *L. braziliensis* (87.9, 51.7, 85.9, 93.3, 99.7, and 80.9% growth inhibition, respectively). Only *Diclyota* sp. was effective against *T. cruzi* (60.4% growth inhibition) (Table 7). Otherwise, *B. triquetrum*, *C. sertularioides*, *C. cupressoides*^b, *D. delicatula*, *G. caudata*, *H. ctenomyce*, *H. musciformis*, *P. papillosa* and *Sargassum* sp., none antiprotozoal activity was detected.

As far as we are aware, there are no reports in the literature on the antiprotozoal activity for four of these seaweeds species (*A. saldanhae*, *C. cupressoides*^a, *Padina* sp., and *O. secundiramea*). Concerning the activity of FS extract from the red seaweed *L. dendroidea* (= formerly *Laurencia obtusa*), only a weak (14.6%) antileishmanial activity against the promastigote forms of *L. braziliensis* was observed (Table 7). Furthermore, two species of seaweeds, *A. saldanhae* (SI = 12.3) and *Padina* sp. (SI = 7.5), were effective against *L. brasiliensis* amastigotes. Additionally, *C. cervicornis*, *C. cupressoides*^a, *Diclyota* sp., and *O. secundiramea* were strongly cytotoxic for bone marrow macrophages (Table 8).

Table 7. Antiprotozoal activity expressed as growth inhibition (%) of extracts and fractions obtained from marine seaweeds.

Species	Extracts	<i>Leishmania braziliensis</i> (promastigotes)	<i>Trypanosoma cruzi</i> (epimastigotes)
<i>Anadyomene saldanhae</i>	FS	87.9	–
<i>Botryocladia occidentalis</i>	DS	20.7	–
<i>Bryothamnion seaforthii</i>	DS	33.5	–
<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	FS	85.8	–
<i>Caulerpa cupressoides</i>	FS	51.7	–
<i>Diclyota</i> sp.	DS	93.3	60.4
<i>Digenea simplex</i>	DS	26	–
<i>Gracilaria caudata</i>	DS	9.3	–
<i>Grateloupia cuneifolia</i>	FS	35.2	15.9
	DS	37	23.98
<i>Laurencia dendroidea</i>	FS	14.6	–
<i>Ochtodes secundiramea</i>	FS	99.7	–
<i>Padina</i> sp.	FS	80.9	–
<i>Palisada flagellifera</i>	DS	21	–

Extracts and fractions concentration: 50 µg/mL; (–): no activity; DS: extract obtained from dried seaweeds using CH₂Cl₂/MeOH (2:1); FS: extract from fresh seaweeds using Me₂CO.

Table 8. Effects of marine seaweeds extracts and fractions on *Leishmania brasiliensis* amastigotes in bone marrow macrophages from mice, and cytotoxicity on J774.G8 macrophage cell line.

Species	Samples	CC ₅₀ ± SD (µg/mL)	IC ₅₀ ± SD (µg/mL)	Selective index (CC ₅₀ /IC ₅₀)
<i>Anadyomene saldanhae</i>	FS	294.2 ± 28.2	23.9 ± 2.3	12.3
<i>Caulostrocarpus cervicornis</i>	FS	>50	ND	ND
<i>Caulerpa cupressoides</i> ^(b)	FS	>50	ND	ND
<i>Dictyota</i> sp.	DS	>50	ND	ND
<i>Ochtodes secundiramea</i>	FS	>50	ND	ND
<i>Padina</i> sp.	FS	300.4 ± 28.5	40.2 ± 4.3	7.5

Positive Control: amphotericin B (IC₅₀ = 0.06 ± 0.02 µM); ND: not determined; DS: extract obtained from dried seaweeds using CH₂Cl₂/MeOH (2:1); FS: extract from fresh seaweeds using Me₂CO.

Previous studies performed by Veiga-Santos *et al.* [5] and Machado *et al.* [37] showed that lipophilic extracts from *L. dendroidea* collected from the southeastern coast of Brazil strongly inhibited the growth of *T. cruzi* and *L. amazonensis*. These results are not completely in agreement with our findings for *L. dendroidea* and this discrepancy may be due to the different geographic regions where this species was collected, as well as the seawater conditions.

Another study led by Santos and colleagues [4] found that lipophilic extracts from the brown seaweed *C. cervicornis* collected from the northeastern coast of Brazil also strongly inhibited the growth of *L. amazonensis*. From this species, a 4-acetoxydolastane diterpene was isolated, which demonstrated dose-dependent activity during 72 h of treatment, exhibiting IC₅₀ values of 2.0, 12.0 and 4.0 µg/mL for promastigotes, axenic amastigotes and intracellular amastigotes of *L. amazonensis*, respectively.

Concerning antiviral activity, none of the species tested displayed any anti-HSV-1 activity. Although Soares and colleagues [25] reported the anti-HSV-1 activity for the red alga *L. dendroidea* collected from the coast of Rio de Janeiro, in our work this species showed high cytotoxicity against VERO cells and none antiviral activity was detected.

To summarize, the present work reports the antimicrobial, antiprotozoal and antiviral evaluation of organic extracts from nine sponges, two octocorals, one ascidian, one bryozoan, and 27 seaweeds species, collected along the Brazilian coastline. Of a total of 95 extracts and fractions, 53 (56%) showed some anti-infective activity against *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *L. brasiliensis*, *T. cruzi*, and HSV-1.

Clearly, the marine invertebrates and seaweeds from the Brazilian coast could play an important part in the future control of the global infectious-disease burden. Although substantial progress has been made in identifying new biotechnological potential from these organisms, further chemical analysis and biological studies are required for investigating the mechanism of action, the chemical content as well as the potential use of these marine organisms extracts in the prevention of pathologies.

3. Experimental

3.1. Collection of the Marine Organisms

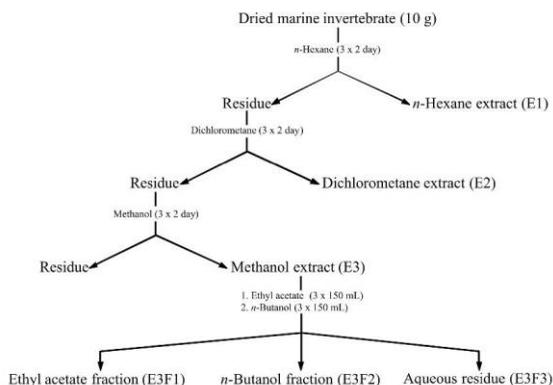
Marine invertebrates were collected in April/May 2011, at Xavier (27°36'39"S; 48°23'32"W), Arvoredo (27°17'00"S; 48°22'00"W) and Aranhas (27°29'12"S; 48°21'37"W) Islands, Florianópolis, Santa Catarina State, Brazil, at a depth of 9–17 m. They were immediately frozen and then lyophilized. For the identification, the sponges were submitted to dissociated spicule preparations, and thick sections were made according to Mothes-de-Moraes [40]. Voucher specimens were deposited in the Porifera Collection of the Museu de Ciências Naturais, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (MCNPOR). Tunicate and bryozoa were deposited in the Invertebrate Collection of the Departamento de Ecologia e Zoologia, Universidade Federal de Santa Catarina (Table 1).

Seaweeds specimens (Rhodophyta, Pheophyceae, and Chlorophyta) were collected in the midlittoral zone of the southern and northeastern Brazilian coast, in August/October 2011 (Table 2). The epiphytic organisms from the seaweeds were manually cleaned immediately after collection, and air dried. The voucher specimens were deposited at the Herbarium of the Department of Botany at Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil.

3.2. Preparation of the Extracts

Organic extracts from marine invertebrates were prepared according to a standard procedure (Figure 1). Organic extracts from marine seaweeds were obtained using two distinct methods: CH₂Cl₂/MeOH (2:1) for dried seaweeds (DS extracts), and Me₂CO for fresh seaweeds (FS extracts).

Figure 1. Procedure for obtaining the marine invertebrate extracts.



3.3. Antibacterial and Antifungal Assays

The microorganism strains tested were from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), and *Candida albicans* (ATCC 10231).

The antibacterial and antifungal activities were evaluated by the disk diffusion method as previously described by de Oliveira *et al.* [41], with minor modifications. Briefly, filter paper disks (5 mm) were impregnated with 20 μ l of the extracts or fractions solutions (100 mg/mL) and then placed on Muller-Hinton agar plates (HIMEDIA®), which were inoculated with the microorganisms according to the standard protocol described by the Clinical Laboratory Standard Institute [42]. The plates were incubated at 35 °C (\pm 1°C), and after 18 h, the diameters of the inhibition zones were measured. Filter-paper disks containing DMSO were used as negative control and no inhibition was observed. Standard antibiotic disks were selected according to the sensitivity of the microorganism tested: ampicillin (10 μ g), oxacillin (1 μ g), ceftazidime (30 μ g) and fluconazole (25 μ g) [43].

3.4. Antiprotozoal Activity

3.4.1. Antileishmanial and Antitrypanosomal Activities

Leishmania braziliensis (MHOM/BR/96/LSC96-H3) promastigotes were grown at 26 °C in Schneider's medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) supplemented with 5% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) and 2% urine. *Trypanosoma cruzi* (MHOM/BR/00/Y) epimastigotes were grown at 26 °C in Liver Infusion Tryptose (LIT) medium containing 10% FBS. Both parasite cultures were grown in 10 U/mL penicillin and 10 μ g/mL of streptomycin (Gibco®). For the growth inhibition assays, *L. braziliensis* promastigotes or *T. cruzi* epimastigotes in the exponential phase of growth were harvested and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) by centrifugation at 1,500 \times g for 10 min. The parasites were counted in a Neubauer hemocytometer and seeded in 96-well microplates at 5.4 \times 10⁶ (*T. cruzi*) or 3 \times 10⁶ parasites/mL (*L. braziliensis*) in a final volume of 180 μ l in LIT or Schneider's medium, respectively. Parasites were incubated for 48 h at 26 °C in the presence of 20 μ l of the samples (final concentration = 50 μ g/mL). The standard drugs amphotericin B (Sigma) at 0.1 μ M and benznidazole (Sigma) at 30 μ M were used as positive controls and 1% DMSO was used as negative control. Parasite survival was assessed by the MTT assay [44]. The assays were carried out in triplicate, and the results were expressed as percentage of parasite growth inhibition.

3.4.2. Activity against Intracellular Amastigotes of *T. cruzi* and *L. braziliensis* in Murine Macrophages

In this work, only the samples that showed parasite growth inhibition higher than 40% against the extracellular forms were analyzed through this methodology. Murine (Balb/C) bone marrow derived macrophages were differentiated for 7 days in 6 well plates, with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-Gibco) supplemented with HEPES (25 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL), FBS (10%) and 25% (v/v) supernatant of the murine fibroblast cell line L929 at 37 °C

and 5% CO₂, as described by Marim and co-workers [45], with minor modifications. Adherent cells were washed with PBS, trypsinized, counted in a Neubauer hemocytometer and concentration adjusted to 4.10⁵ cells/mL. Cell viability was assessed using Trypan Blue (0.04%). Next, 100 µL of cell suspension were seeded in 96 well plates and cultivated for 24 h at 37 °C. Thereafter, macrophages were infected with *L. braziliensis* axenic amastigotes (10 parasites/cell) for 3 h, at 34 °C and 5% CO₂ or with VERO cell derived *T. cruzi* trypomastigotes (5 parasites/cell) for 4 h, at 37 °C and 5% CO₂. Non-internalized parasites were removed by washing with PBS. After 24 h of incubation, 20 µL of the samples was added to the infected cell monolayers starting from 50 µg/mL and incubated for 48 h in 5% CO₂ (34 °C for *L. braziliensis* and 37 °C for *T. cruzi*). The cells were washed with PBS, methanol fixed and Giemsa stained. The percentage of infected cells and the number of intracellular amastigotes were assessed using an Olympus IX70 optical inverted microscope, randomly counting 100 cells/well at a magnification of 400×. The reduction of the parasitic index was calculated as described elsewhere [46], and the 50% inhibitory concentration was calculated by linear least squares regression, using the software GraphPad Prism 5.0. Amphotericin B (0.2 µM) and benzimidazole (15 µM) were used as positive controls. DMSO 1% was used as negative control. The experiments were carried out in triplicate and repeated at least twice.

3.4.3. Cytotoxic Activity against J774.G8 Macrophage Cell Line

Murine J774.G8 phagocytic cells were seeded in 96 well plates with DMEM supplemented with HEPES (25 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and FBS (10%), and incubated for 72 h with the samples starting from 500 µg/mL. The assays were carried out in triplicate and cell viability was determined as described above for VERO cells. The CC₅₀ was calculated by minimum square linear regression with the software GraphPad Prism 5.0.

3.5. Anti-HSV-1 Assay

3.5.1. Virus and Cell Line

The cell line used (VERO-ATCC: CCL81) was grown in Eagle's minimum essential medium (MEM; Cultilab, Campinas, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Carlsbad, CA, USA), 100 U/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin and 25 µg/mL amphotericin B (Cultilab®). Cell cultures were maintained at 37 °C and 5% CO₂. The HSV-1 (KOS strain, Faculty of Pharmacy, University of Rennes, France) was propagated in VERO cells. Viral stock was prepared, titrated based on plaque forming units (PFU), counted by the plaque assay as previously described [47] and stored at -80 °C.

3.5.2. Cytotoxicity Assay

Confluent VERO cells were exposed to different concentrations of the samples for 72 h. After incubation, cell viability was assessed by the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide)] assay [44]. The assays were carried out in triplicate, and the results were expressed as the CC₅₀, which was defined as the concentration that reduced cell viability by 50%, when compared to the untreated controls.

3.5.3. Viral plaque Number Reduction Assay

This assay followed the procedures described by Kuo *et al.* [48], with minor modifications. Approximately 100 PFU of HSV-1 was adsorbed for 1 h at 37 °C on confluent VERO cells. Cultures were then overlaid with MEM containing 1.5% carboxymethylcellulose (CMC, Sigma) with or without different concentrations of the samples. After 72 h, the cells were fixed and stained with naphtol blue-black (Sigma), and the plaques were counted. The assays were carried out in triplicate, and the results were expressed as the IC₅₀, which was defined as the concentration that reduced the number of viral plaques formed by 50%, when compared to the untreated controls. Acyclovir (Sigma) was used as a positive control.

4. Conclusions

In this work, we screened 95 different extracts and fractions from Brazilian marine seaweeds and invertebrates, for their potential anti-infective properties (antibacterial, antifungal, antiprotozoal and antiviral activities). The studies showed that invertebrates *Bugula neritina*, *Carijoa riisei*, *Dragmoxia anomala*, *Haliclona (Halichoelona)* sp. and *Petromica citrina* and seaweeds *Anadyomene saldanhae*, *Canistrocarpus cervicornis*, *Caulerpa cupressoides*, *Dictyota* sp., *Digenea simplex*, *Laurencia dendroidea*, *Ochtodes secundiramea* and *Osmundaria obtusiloba* showed some type/level of anti-infective property.

Moreover, this work also shows the importance of bioprospecting studies highlighting the importance of marine biodiversity as sources of potential natural compounds with pharmacological properties or biotechnological potential that could be used in the development of new drugs. All the active extracts deserve special attention in further studies to chemically characterize the bioactive compounds as well as more refined biological assays.

Acknowledgments

We would like to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq, MCTI (Grants 151561/2008-7, 306917/2009-2 and 471307/2011-4), SISBIOTAMar (Grant 381235/2011-4)], Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [PNPD, CAPES-MEC (Grant 2207/2009)], Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC/BIODIVERSIDADE—Grant 14170/2010) for their financial support. The authors P. A. Horta, F. H. Reginatto, M. Steindel, C. M. O. Simões and E. P. Schenkel are also grateful to the CNPq for granting research fellowships.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Fusetani, N. *Drugs from the Sea*; S. Karger AG: Basel, Switzerland, 2000; p. 158.
2. Sagar, S.; Kaur, M.; Minneman, K.P. Antiviral lead compounds from marine sponges. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2619–2638.

3. Mancini, I.; Defant, A.; Guella, G. Recent synthesis of marine natural products with antibacterial activities. *Anti-Infect Agents Med. Chem.* **2007**, *6*, 17–48.
4. Santos, A.O.; Veiga-Santos, P.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B.P.; Sudatti, D.B.; Bianco, E.M.; Pereira, R.C.; Nakamura, C.V. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2733–2743.
5. Veiga-Santos, P.; Rocha, K.J.P.; Santos, A.O.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B.P.; Lautenschlager, S.O.S.; Sudatti, D.B.; Bianco, E.M.; Pereira, R.C.; Nakamura, C.V. *In vitro* anti-trypansomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. *Parasitology* **2010**, *137*, 1661–1670.
6. Santos, A.O.; Britta, E.A.; Bianco, E.M.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B.P.; Pereira, R.C.; Nakamura, C.V. Leshmanicidal activity of an 4-acetoxy-dolastane diterpene from the Brazilian brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 2369–2383.
7. Wattanadilok, R.; Sawangwong, P.; Rodrigues, C.; Cidade, H.; Pinto, M.; Pinto, E.; Silva, A.; Kijjoa, A. Antifungal activity evaluation of the constituents of *Haliclona baeri* and *Haliclona cymaeformis*, collected from the Gulf of Thailand. *Mar. Drugs* **2007**, *5*, 40–51.
8. Moore, R.E.; Scheuer, P.J. Palytoxin: A new marine toxin from a coelenterate. *Science* **1971**, *172*, 495–498.
9. Friedman, M.A.; Fleming, L.E.; Fernandez, M.; Bienfang, P.; Schrank, K.; Dickey, R.; Bottein, M.; Backer, L.; Ayyar, R.; Weisman, R.; *et al.* Ciguatera fish poisoning: Treatment, prevention and management. *Mar. Drugs* **2008**, *6*, 456–479.
10. Wang, D. Neurotoxins from marine dinoflagellates: A brief review. *Mar. Drugs* **2008**, *6*, 349–371.
11. Rinehart, K.L., Jr; Gloer, J.B.; Hughes, R.G., Jr; Renis, H.E.; McGovern, J.P.; Swynenberg, E.B.; Stringfellow, D.A.; Kuentzel, S.L.; Li, L.H. Didemmins: Antiviral and antitumor depsipeptides from a Caribbean tunicate. *Science* **1981**, *212*, 933–935.
12. Simmons, T.L.; Andrianasolo, E.; Flatt, K.M.P.; Gerwick, W.H. Marine natural products as anticancer drugs. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 333–342.
13. Costa-Lotufo, L.V.; Wilke, D.V.; Jimenez, P.C.; Epifanio, R.A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. *Quim. Nova* **2009**, *32*, 703–716.
14. Molinski, T.F.; Dalisay, D.S.; Lievens, S.L.; Saludes, J.P. Drug development from marine natural products. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 69–85.
15. Kelecom, A. Marine natural products in Brazil. Part 1. Isolation and structure determination. *Cienc. Cult.* **1997**, *49*, 321–330.
16. Bianco, E.M.; Teixeira, V.L.; Pereira, R.C. Chemical defenses of the tropical marine seaweed *Canistrocarpus cervicornis* against herbivory by sea urchin. *Braz. J. Oceanogr.* **2010**, *58*, 213–218.
17. Pereira, R.C.; Oliveira, A.S.; Sudatti, D.B. Ecologia química marinha: origem, evolução e perspectivas no Brasil. *Oecol. Aust.* **2011**, *15*, 412–435.
18. Teixeira, V.L. *Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia Marinha no Brasil. Organização Pan-Americana da Saúde, Ministério da Saúde, Ministério da Ciência e Tecnologia, Série B. Textos Básicos de Saúde: Brasília, Brasil (In Portuguese language)*, 2010; p. 134.

19. Monks, N.R.; Lerner, C.; Henriques, A.T.; Farias, F.M.; Schapoval, E.E.S.; Suyenaga, E.S.; Rocha, A.B.; Schwartsmann, G.; Mothes, B. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2002**, *281*, 1–12.
20. Silva, A.C.; Kratz, J.M.; Farias, F.M.; Henriques, A.T.; Santos, J.; Leonel, R.M.; Lerner, C.; Mothes, B.; Barardi, C.R.M.; Simões, C.M.O. *In vitro* antiviral activity of marine sponges collected off Brazilian coast. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 135–140.
21. Frota, M.L.C., Jr; Braganhol, E.; Canedo, A.D.; Klamt, F.; Apel, M.A.; Mothes, B.; Lerner, C.; Battastini, A.M.O.; Henriques, A.T.; Moreira, J.C.F. Brazilian marine sponge *Polymastia janeirensis* induces apoptotic cell death in human U138MG glioma cell line, but not in a normal cell culture. *Invest. New Drugs* **2009**, *27*, 13–20.
22. Frota, M.L.C., Jr; Braganhol, E.; Canedo, A.D.; Klamt, F.; Apel, M.A.; Mothes, B.; Lerner, C.; Battastini, A.M.O.; Henriques, A.T.; Moreira, J.C.F. Extracts of marine sponge *Polymastia janeirensis* induce oxidative cell death through a caspase-9 apoptotic pathway in human U138MG glioma cell line. *Invest. New Drugs* **2009**, *27*, 440–446.
23. Jimenez, P.C.; Fortier, S.C.; Lotufo, T.M.C.; Pessoa, C.; Moraes, M.E.A.; Moraes, M.O.; Costa-Lotufo, L.V. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2003**, *287*, 93–101.
24. Seleguim, M.H.R.; Lira, S.P.; Kossuga, M.H.; Batista, T.; Berlinck, R.G.S.; Hajdu, E.; Muricy, G.; da Rocha, R.M.; do Nascimento, G.G.F.; Silva, M.; *et al.* Antibiotic, cytotoxic and enzyme inhibitory activity of crude extracts from Brazilian marine invertebrates. *Braz. J. Pharmacog.* **2007**, *17*, 287–318.
25. Soares, A.R.; Robaina, M.C.S.; Mendes, G.; Silva, T.S.L.; Gestinari, L.M.S.; Pamplona, O.S.; Yoneshigue-Valentin, Y.; Kaiser, C.R.; Romanos, M.T.V. Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. *Braz. J. Pharmacog.* **2012**, *22*, 714–722.
26. Halpern, B.S.; Walbridge, S.; Selkoe, K.A.; Kappel, C.V.; Micheli, F.; D'Agrosa, C.; Bruno, F.F.; Casey, E.C.; Fox, H.E.; Fujita, R.; *et al.* Global map of human impact on marine ecosystems. *Science* **2008**, *319*, 948–952.
27. Horta, P.A.; Vieira-Pinto, T.; Martins, C.D.L.; Sissini, M.; Ramlov, F.; Lhullier, C.; Scherner, F.; Sanches, P.; Farias, J.; Bastos, E.; *et al.* Evaluation of impacts of climate change and local stressors on the biotechnological potential of marine macroalgae: A brief theoretical discussion of likely scenarios. *Braz. J. Pharmacog.* **2012**, *22*, 768–774.
28. Cordell, G.A. Biodiversity and drug discovery—A symbiotic relationship. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 463–480.
29. Marinho, P.R.; Muricy, G.R.S.; Silva, M.F.L.; de Marval, M.G.; Laport, M.S. Antibiotic-resistant bacteria inhibited by extracts and fractions from Brazilian marine sponges. *Braz. J. Pharmacog.* **2010**, *20*, 267–275.
30. Marinho, P.R.; Simas, N.K.; Kuster, R.M.; Duarte, R.S.; Fracalanza, S.E.L.; Ferreira, D.F.; Romanos, M.T.V.; Muricy, G.; Giambiagi-Demerval, M.; Laport, M.S. Antibacterial activity and cytotoxicity analysis of halistanol trisulphate from marine sponge *Petromica citrina*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 2396–2400.

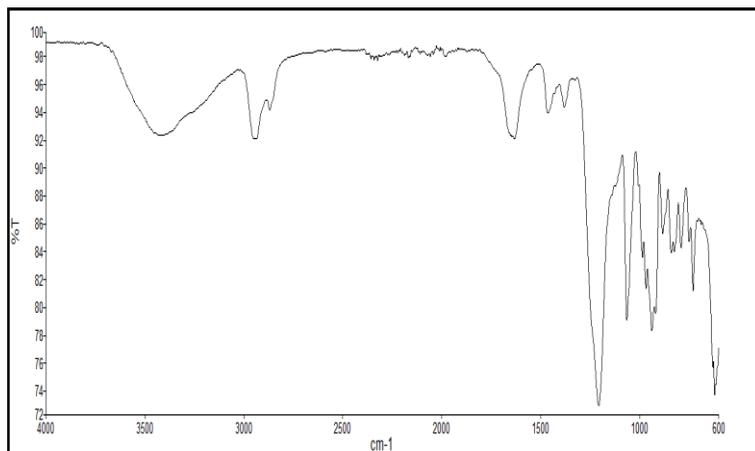
31. Kossuga, M.H.; de Lira S.P.; Nascimento, A.M.; Gambardella, M.T.P.; Torres, R.G.S.Y.R.; Nascimento, G.G.F.; Pimenta, E.F.; Silva, M.; Thiemann, O.H.; Olivia, G.; Tempone A.G. *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1194–1202.
32. Almeida, M.T.R.; Tonini, M.L.; Guimarães, T.R.; Bianco, E.M.; Moritz, M.I.G.; Oliveira, S.Q.; Cabrera, G.M.; Palermo, J.; Reginatto, F.H.; Steindel, M.; *et al.* Anti-infective pregnane steroid from the octocoral *Carrijoa ritsesi* collected in South Brazil. *Lat. Am. J. Pharm.* **2012**, *31*, 1489–1495.
33. Manivaman, K.; Karthikai, D.G.; Anantharaman, P.; Balasubramanian, T. Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalai coastal waters, Gulf of Mannar. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2011**, *1*, 114–120.
34. Padmakumar, K.; Ayyakkannu, K. Seasonal variation of antibacterial and antifungal activities of the extracts of marine algae from Southern coasts of India. *Bot. Mar.* **1997**, *40*, 507–516.
35. Bhakuni, D.S.; Rawat, D.S. *Bioactive Marine Natural Products*; Anamaya Publishers: New Delhi, India, 2005; p. 382.
36. Bansenir, A.; Just, N.; Michalik, M.; Lindequist, U.; Lalk, M. Extracts and sesquiterpene derivatives from the red alga *Laurencia chondrioides* with antibacterial activity against fish and human pathogenic bacteria. *Chem. Biodivers.* **2004**, *1*, 463–467.
37. Machado, F.L.S.; Pacienza-Lima, W.; Rossi-Bergmann, B.; Gestinari, L.M.S.; Fujii, M.T.; de Paula, J.C.; Costa, S.S.; Lopes, N.P.; Kaiser, C.R.; Soares, A.R. Antileishmanial sesquiterpenes from the Brazilian red alga *Laurencia dendroidea*. *Planta Med.* **2011**, *77*, 733–735.
38. Barreto, M.; Meyer, J.J.M. Isolation and antimicrobial activity of a lanosol derivative from *Osmundaria serrata* (Rhodophyta) and a visual exploration of its biofilm covering. *S. Afr. J. Bot.* **2006**, *72*, 521–528.
39. Carvalho, L.R.; Guimarães, S.M.P.B.; Roque, N.F. Sulfated bromophenols from *Osmundaria obtusiloba* (C. Agardh) R. E. Norris (Rhodophyta, Ceramiales). *Revista Brasil. Bot.* **2006**, *29*, 453–459.
40. Mothes-de-Moraes, B. Primeiro registro de *Myriastra purpurea* (Ridley, 1884) para a costa brasileira (Porifera, Demospongiae). *Rev. Bras. Zool.* **1985**, *2*, 321–326.
41. De Oliveira, S.Q.; Trentin, V.H.; Kappel, V.D.; Barelli, C.; Gosmann, G.; Reginatto, F.H. Screening of antibacterial activity of south Brazilian *Baccharis* species. *Pharm. Biol.* **2005**, *43*, 434–438.
42. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard M2-A8. In *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical and Laboratory Standards Institute*, 8th ed.; CLSI document M2-A8; CLSI: Wayne, PA, USA, 2002; pp. 1–58.
43. Kappel, V.D.; Costa, G.M.; Scola, G.; Silva, F.A.; Landell, M.F.; Valente, P.; Souza, D.G.; Vanz, D.C.; Reginatto, F.H.; Moreira, J.C.F. Phenolic content and antioxidant and antimicrobial properties of fruits of *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* at different maturity stages. *J. Med. Food* **2008**, *11*, 267–274.
44. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *16*, 55–63.

45. Marim, F.M.; Silveira, T.N.; Lima, D.S., Jr; Zamboni, D.S. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PLoS One* **2010**, *5*, e15263.
46. Sereno, D.; Holzmüller, P.; Lemesre, J.L. Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Tropica* **2000**, *74*, 25–31.
47. Burlinson, F.G.; Chambers, T.M.; Wiedbrauk, D.L. *Virology: a Laboratory Manual*; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1992, p. 250.
48. Kuo, Y.C.; Chen, C.C.; Tsai, W.J.; Ho, Y.H. Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by *Psychotria serpens*: relationship to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. *Antiviral Res.* **2001**, *51*, 95–109.

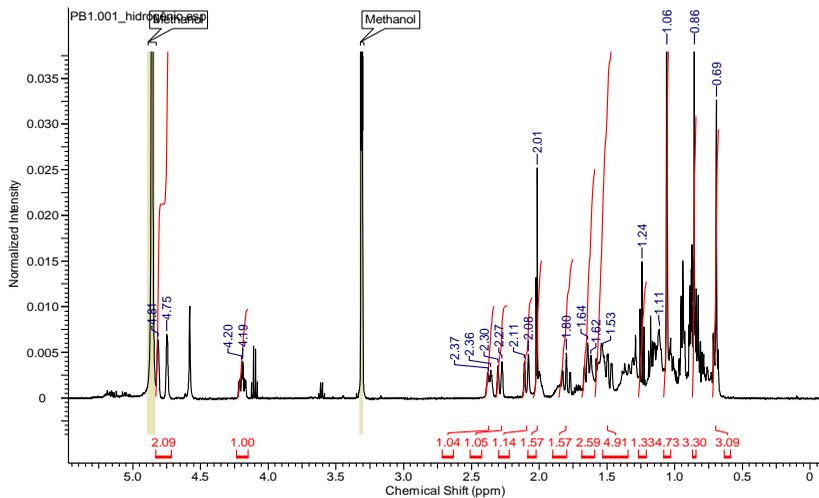
Sample Availability: Not available.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

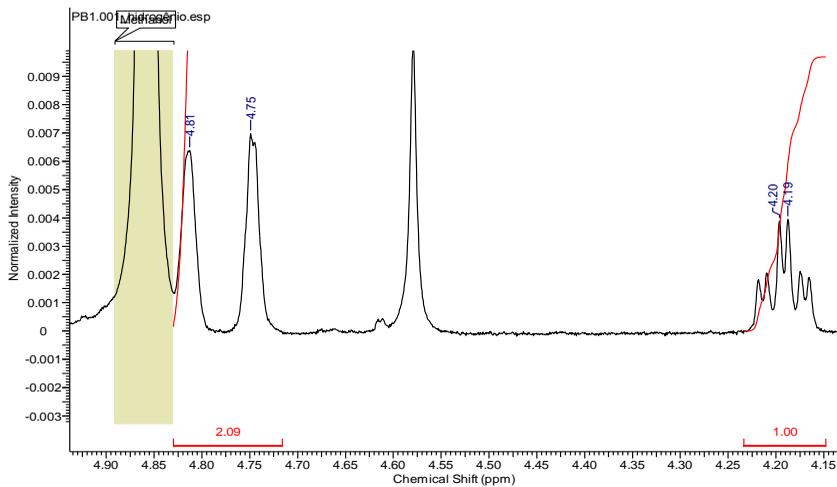
APÊNDICE 2- Espectro de infravermelho da amostra TSH obtida por pastilha de KBr.



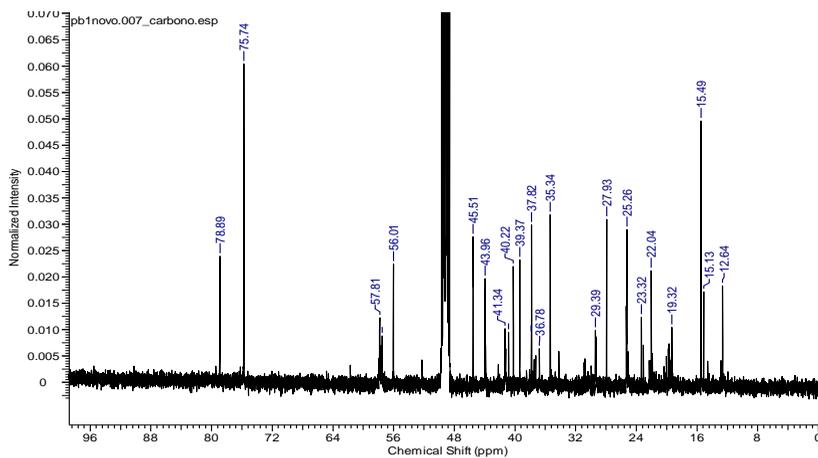
APÊNDICE 3- Espectro de RMN ^1H (500 MHz; CD_3OD) da amostra TSH.



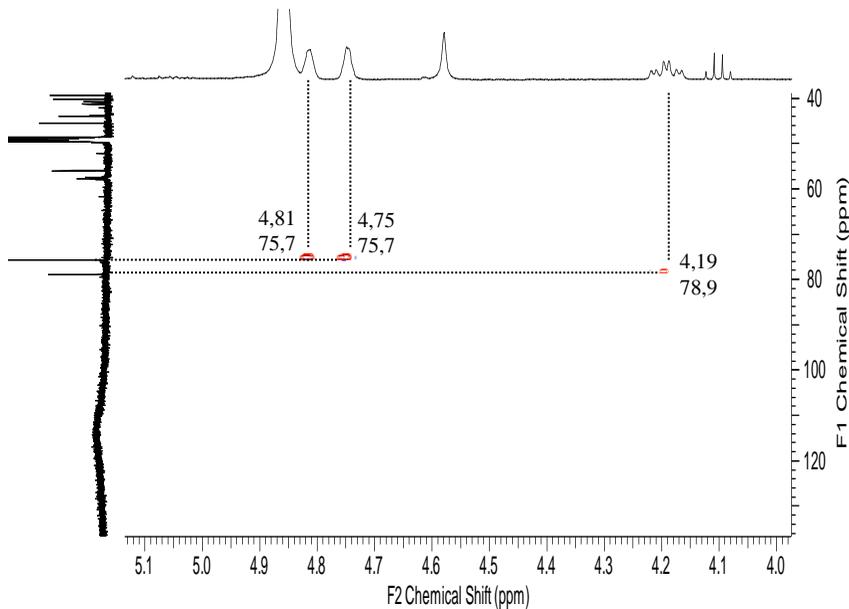
APÊNDICE 4- Espectro de RMN ^1H (500 MHz; CD_3OD) da amostra TSH ampliado na região entre 4,90-4,15 ppm.



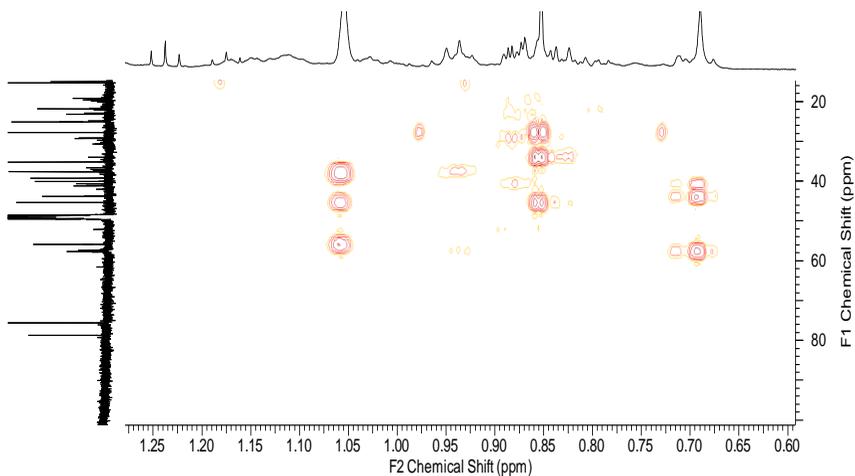
APÊNDICE 5- Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz; CD_3OD) da amostra TSH.



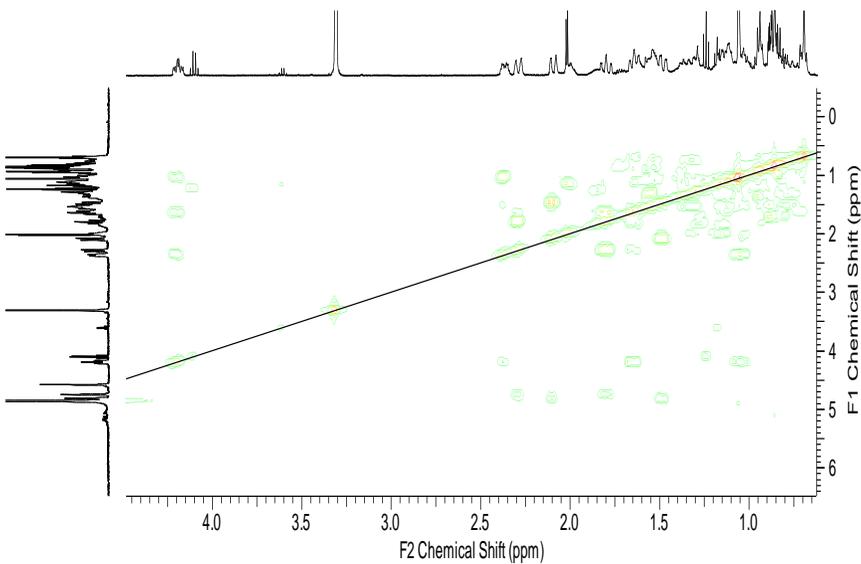
APÊNDICE 6- Mapa de correlação heteronuclear HSQC (500 MHz; CD_3OD) da amostra TSH ampliado.



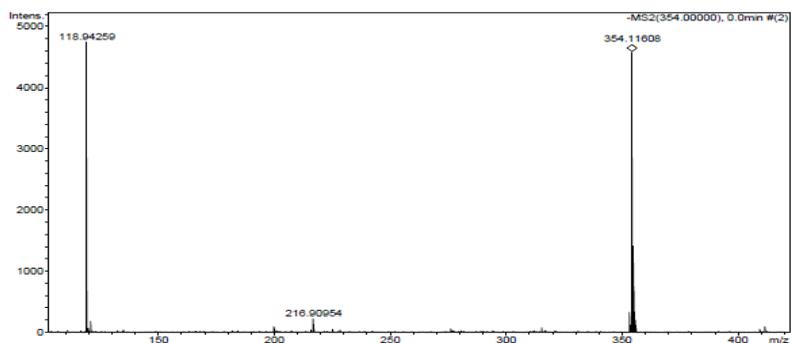
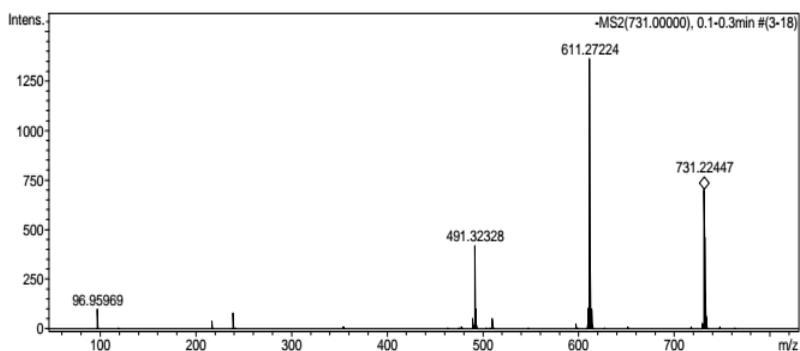
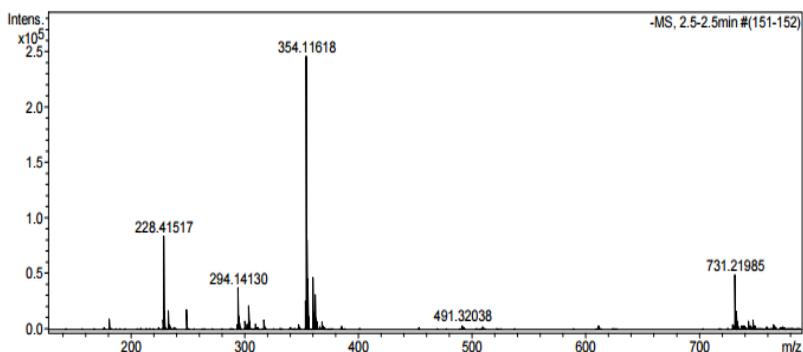
APÊNDICE 7- Mapa de correlação HMBC (500 MHz; CD₃OD) da amostra TSH ampliado.

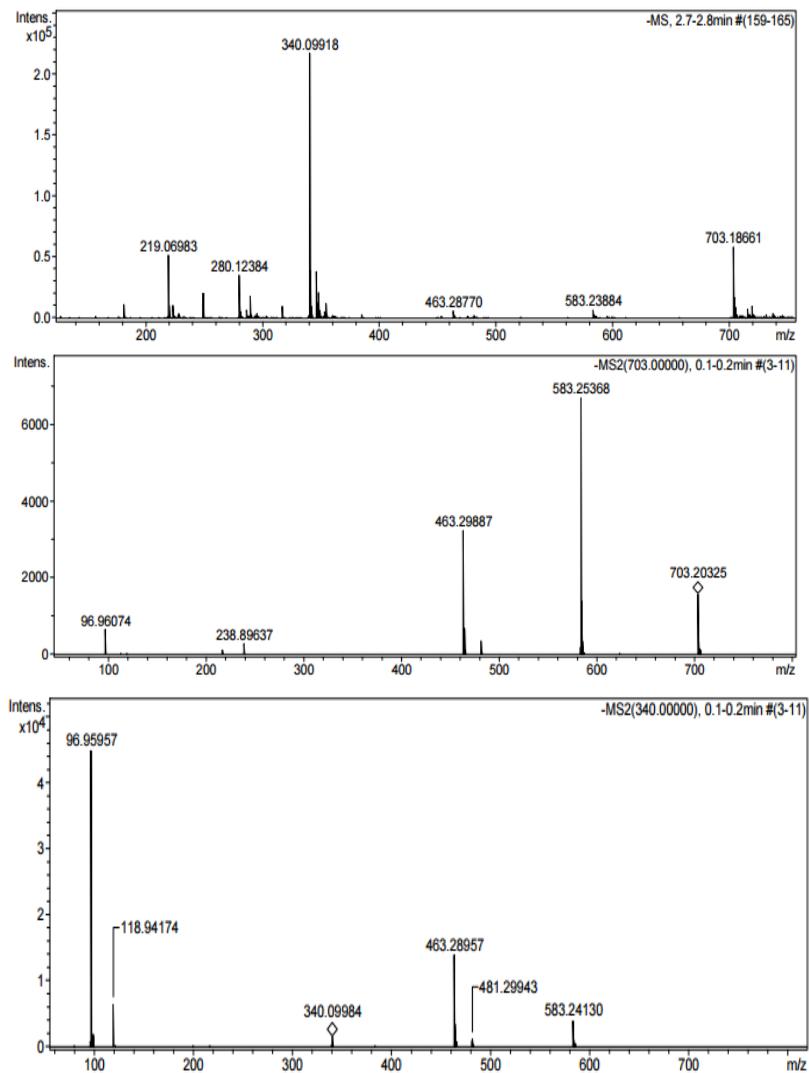


APÊNDICE 8- Mapa de correlação Homonuclear COSY (500 MHz; CD₃OD) da amostra TSH ampliado.

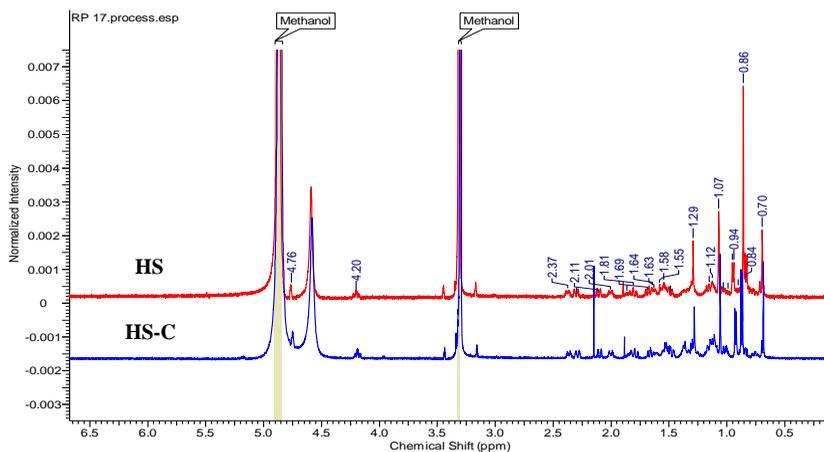


APÊNDICE 9-Espectro de massas de alta resolução do composto HS
(HRESI-MS; modo negativo).

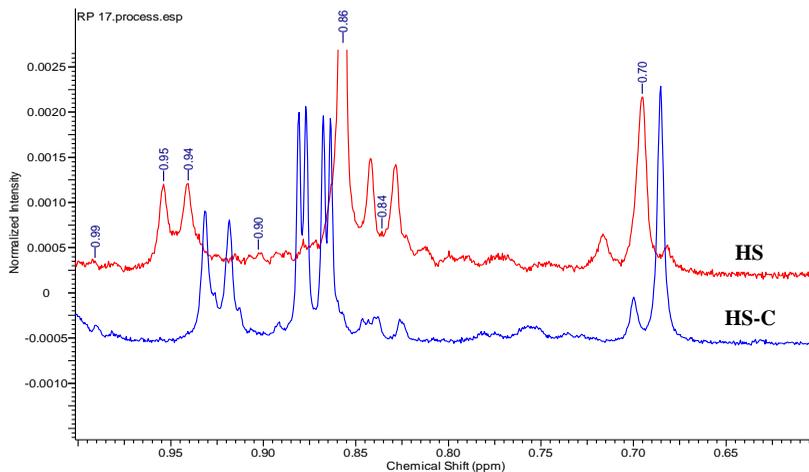


APÊNDICE 10- Espectro de massas de alta resolução do composto HS-C (HRESI-MS; modo negativo).

APÊNDICE 11- Comparação entre os espectros de RMN ^1H (500 MHz; CD_3OD) dos compostos HS e HS-C.



APÊNDICE 12- Comparação entre os espectros ampliados de RMN ^1H (500 MHz; CD_3OD) dos compostos HS e HS-C.



APÊNDICE 13- Antibiograma dos isolados clínicos realizados pelo Laboratório La Vita (Criciúma/SC). Diâmetros de sensibilidade medidos e interpretados de acordo com os valores padronizados pelo CLSI (2012).

Antibiograma	<i>A. baumannii</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. faecium</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA	VRE
	Material Ponta de Catéter	Material Urina	Material Líquido abdominal	Material Urina	Material Aspirado traqueal	Material Líquido sinovial	Material Lesão cutânea	Material Líquido abdominal
Amicacina	Resistente	-	-	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	-
Ampicilina	-	-	Resistente	Resistente	-	-	-	Resistente
Ampicilina/Sulbactam	Resistente	Resistente	-	Resistente	-	-	-	-
Cefalotina	-	Resistente	-	Resistente	-	-	-	-
Cefepime	Resistente	Resistente	-	Resistente	Sensível	-	-	-
Cefuroxima	-	Resistente	-	Resistente	-	-	-	-
Ceftriaxona	Resistente	Resistente	-	-	-	-	-	-
Ceftazidima	Resistente	-	-	Resistente	Sensível	-	-	Resistente
Ciprofloxacino	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível
Cloranfenicol	Resistente	-	Intermediário	-	-	Sensível	Sensível	Resistente
Eritromicina	-	-	Resistente	-	-	Resistente	Resistente	Resistente
Gentamicina	Resistente	Resistente	-	Intermediário	Sensível	Sensível	Sensível	-
Imipenem	Resistente	Sensível	-	Resistente	Resistente	-	-	-
Levofloxacino	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sensível	Sensível	Sensível	Resistente
Linezolda	-	-	Sensível	-	-	-	-	-
Meropenem	Resistente	-	-	Resistente	Resistente	-	-	-
Nitrofurantóina	-	Resistente	-	-	-	-	-	-
Norfloxacino	-	Resistente	-	Resistente	-	-	-	-
Oxacilina	-	-	-	-	-	Resistente	Resistente	-
Penicilina	-	-	Resistente	-	-	Sensível	Resistente	Resistente
Piperacilina/Tazobactam	Resistente	Sensível	-	Resistente	Sensível	-	-	-
Polimixina B	Sensível	-	-	-	Sensível	-	-	-
Sulfazotrim	Resistente	Resistente	-	Resistente	-	Sensível	-	-
Tetraciclina	-	-	Sensível	-	-	-	-	-
Vancomicina	-	-	Resistente	-	-	-	-	Resistente