

Satomy Arenas Kami

**Investigação química da alga parda *Canistrocarpus cervicornis* do Atol das Rocas**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.  
Orientadora: Prof. Dr.<sup>a</sup> Miriam de Barcellos Falkenberg

Florianópolis  
2018

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

Kami, Satomy Arenas

Investigação química da alga parda *Canistrocarpus cervicornis* do Atol das Rocas / Satomy Arenas Kami ; orientadora, Miriam de Barcellos Falkenberg, 2018. 109 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Canistrocarpus cervicornis*. 3. Diterpenos xenicanos. 4. Atol das Rocas. I. Falkenberg, Miriam de Barcellos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Satomy Arenas Kami

**Investigação química da alga parda *Canistrocarpus cervicornis* do Atol das Rocas**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Florianópolis, 26 de março de 2018.

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tania Beatriz Creczynski-Pasa,  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Profa. Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Profa. Dra. Christiane Meyre da Silva Bittencourt  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Prof. Dr. Diogo Robl  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)



Dedico este trabalho a minha família por sempre me incentivar a buscar meus objetivos. Com ternura, amor e carinho.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por me abençoar e me proteger, dando-me forças e coragem para lutar e vencer todos os obstáculos.

Agradeço aos meus pais, Moacir e Isabel, por absolutamente tudo. Pelos valores ensinados, educação, incentivo a sempre buscar o conhecimento e ser uma pessoa melhor. No meio da vida agitada sempre priorizaram os momentos em família, os quais sempre são os melhores, as melhores conversas, as maiores brigas, as melhores comidas, os melhores risos e o melhor acolhimento. Sou imensamente grata pelo amor, carinho e dedicação.

Agradeço imensamente a minha irmã Sayuri e cunhado Raphael, que sempre se mostraram dispostos a ajudar, substituindo-me no trabalho, liberando-me para que pudesse desenvolver o trabalho na bancada, ir às aulas e desenvolver a tão sonhada dissertação!

À minha irmã Akemi, que sempre me inspirou na busca de conhecimento e a ser uma profissional cada vez melhor. Ao meu irmão Eduardo, que me incentivou a ser uma cientista, com aqueles livros de alquimia desde criança.

Às minhas sobrinhas, Maria Eduarda, Joana e Valentina, que me fortaleceram para seguir em frente, e muitas vezes voltar a ser criança....

Aos amigos da vida: do Colégio, da UDESC, da UFSC, pela amizade, companheirismo e por todas as “histórias para contar pros netos”. Agradeço em especial a Ana Paula Gomes, Cadiele, Daniel, Franci e Fernanda, sempre dispostos a me escutar e aconselhar!

Aos meus novos amigos e colegas do grupo GEPRONAS, pela amizade, dedicação, pela convivência e troca de experiências diárias. Em especial a Maria Gabriela, minha parceira de bancada também a Ana Cláudia, a Gabriele e Tauana, que sempre estiveram dispostas a ajudar. Ao professor Louis Sandjo, que acompanhou a minha jornada desde o primeiro ano de mestrado, contribuindo com o aprendizado da tão desafiadora técnica e análise de RMN.

À minha orientadora, Professora Dr<sup>a</sup>. Miriam de Barcellos Falkenberg, por ser uma pessoa tão dedicada e por todo o carinho, profissionalismo, apoio e ensinamentos que me transmitiu ao longo dos últimos anos.

À UFSC, a qual me proporcionou os melhores anos da minha vida, permitindo conhecer inúmeras pessoas que de maneira direta ou indiretamente me inspiraram para continuar e criar constantemente os meus objetivos. Muito obrigada!



## RESUMO

Produtos naturais marinhos vêm sendo objeto de muitos estudos e interesse científico, por conta da sua diversidade e complexidade química, bem como potenciais atividades biológicas. Entre estas, destacam-se a atividade citostática (citarabina, trabectedina, brentuximabe vedotina) e antiviral (vidarabina) apresentadas por fármacos que estão no mercado. Entre as algas, destacam-se as algas pardas da família Dictyotaceae com a produção de metabólitos secundários com atividade biológica antifúngica, antibacteriana, antiviral, os quais tem papel relevante para defesa destas espécies contra predadores (*antifouling*, anti-herbivoria). O objetivo desta dissertação foi investigar quimicamente o extrato da alga parda *Canistrocarpus cervicornis* proveniente do Atol das Rocas (RN). O material coletado em março de 2015 foi extraído por mistura diclorometano/metanol (2:1). O extrato foi submetido a métodos cromatográficos diversos, sendo as frações monitoradas por cromatografia em camada delgada e análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear. O extrato e frações selecionadas foram submetidos a testes de atividade biológica: antibacteriana (frente a *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* apresentando inibição de crescimento de 46,3%; 13,3% e 95,6% respectivamente), antifúngica, citotóxica e anticoagulante. Tais processos permitiram o isolamento de dois terpenos do tipo xenicano, sendo um deles já descrito na literatura (ácido dilófico) e o outro, identificado como um metabólito de estrutura inédita, derivado do primeiro, que foi codificado como CS7. Ambos os metabólitos são reportados pela primeira vez para o gênero *Canistrocarpus*. O extrato e o composto ácido dilófico apresentaram significativa citotoxicidade frente a células HCT-116 com IC<sub>50</sub> de 11,39 e 7,17 µg/ML, respectivamente. A redução na agregação plaquetária pelo extrato bruto manifestou-se tanto mediante indução por epinefrina (15,5 ± 6,4) quanto por ADP (34,0 ± 4,2), sugerindo interessante potencial antiagregante plaquetário.

**Palavras-chave:** *Canistrocarpus cervicornis* 1. Diterpenos xenicanos 2. Atol das Rocas 3. HCT-116 4. Agregação plaquetária 5.



## ABSTRACT

KAMI, S.A. Chemical research of the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis* of the Rocas Atoll. 2018. 118p Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2018.

Marine natural products have been the object of many studies and scientific interest, due to their diversity and chemical complexity, as well as potential biological activities. Among these, cytostatic activities (cytarabine, trabectedin, brentuximab vedotin) and antiviral (vidarabine) are represented by drugs that are on the market. The brown algae of the family Dictyotaceae produce secondary metabolites with antifungal, antibacterial and antiviral activities, which play an important role in the defense of these species against predators (antifouling, anti-herbivory). The objective of this dissertation was to investigate chemically the extract of the brown algae *Canistrocarpus cervicornis* of Atol das Rocas (RN). The material was collected in March 2015, extracted with dichloromethane/methanol (2:1). The extract was subjected to several chromatographic methods, the fractions monitored by thin layer chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The extract and selected fractions were submitted to biological activity tests: antifungal, antibacterial (against *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* presenting growth inhibition of 46.3%, 13.3% and 95.6% respectively), cytotoxic and anticoagulant. These processes allowed the isolation of two xenican diterpenes, one of them already described in the literature (dilophic acid) while the second one was identified as a new dilophic acid derivative, which was designated as CS-7. Both metabolites are reported for the first time for the genus *Canistrocarpus*. The extract and dilophic acid showed significant cytotoxicity against HCT-116 cells with IC<sub>50</sub> of 11.39 and 7.17 µg/ml, respectively. The inhibition of platelet aggregation by crude extract was manifested by induction by epinephrine (15.5 + 6.4) and by ADP (34.0 + 4.2), suggesting an interesting antiplatelet potential.

**Keywords:** *Canistrocarpus cervicornis* 1. terpenes xenicans 2. Rocas atoll 3. HCT-116 4. Platelet aggregation 5.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dolastanos isolados de <i>C. cervicornis</i> por Philippus (2016) .	24
Figura 2. <i>Canistrocarpus cervicornis</i> : aspectos macro e microscópicos .....	33
Figura 3. Proposta biossintética para os diterpenos de Dictyotaceae, de acordo com a ciclização do geranyl-geraniol. (Adaptado de Vallim et al., 2005). .....	34
Figura 4. a) Local de coleta de <i>C. cervicornis</i> utilizada para a investigação química; b) Aspecto da alga <i>C. cervicornis</i> .....	50
Figura 5. Fluxograma resumindo os procedimentos cromatográficos que resultaram em compostos isolados a partir do extrato da espécie <i>C. cervicornis</i> .....	52
Figura 6. Esquema da metodologia aplicada na avaliação da atividade antimicrobiana.....	60
Figura 7. Espectros de $^1\text{H}$ RMN (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) dos extratos provenientes do Atol das Rocas, março de 2015. Extratos A, B e C estão representados, respectivamente, em azul, vermelho e verde.....	64
Figura 8. Esquema geral do fracionamento cromatográfico de <i>C. cervicornis</i> .....	65
Figura 9. Espectro de $^1\text{H}$ RMN (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto CS-6. ....	67
Figura 10. Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto CS-6. ....	68
Figura 11. Mapa de correlação HSQC (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto CS-6. ....	69
Figura 12. Mapa de correlação HMBC (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto CS6.....	70
Figura 13. Mapa de correlação COSY (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto CS-6. ....	71
Figura 14. Primeira estrutura parcial proposta para CS-6. Setas vermelhas representam correlações homonucleares (H x H) e verdes, heteronucleares (C x H).....	72
Figura 15. Segunda estrutura parcial proposta para CS-6. Setas vermelhas representam correlações homonucleares (H x H) e verdes, heteronucleares (C x H).....	73
Figura 16. Terceira estrutura parcial proposta para CS-6. Setas vermelhas representam correlações homonucleares (H x H) e verdes, heteronucleares (C x H).....	74
Figura 17. Estrutura proposta para o composto CS-6.....	75
Figura 18. Espectro de $^1\text{H}$ RMN (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CS-7.....	79

Figura 19. Expansão do espectro de $^1\text{H}$ RMN (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CS-7, região entre 5,5-5,0 e 0-2,5 ppm .....	80
Figura 20. Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de CS-7.....	81
Figura 21. Mapa de correlação HSQC (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto CS-7 .....	82
Figura 22. Mapa de correlação HMBC (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto CS-7. ....	83
Figura 23. Mapa de correlação COSY (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto CS-7 .....	84
Figura 24. Primeira estrutura parcial proposta para CS-7. Setas vermelhas representam correlações homonucleares (H x H) e verdes, heteronucleares (C x H) .....	85
Figura 25. Segunda estrutura parcial proposta para CS-7. Setas vermelhas representam correlações homonucleares (H x H) e verdes, heteronucleares (C x H) .....	86
Figura 26. Terceira estrutura parcial proposta para CS-7. Setas vermelhas representam correlações homonucleares (H x H) e verdes, heteronucleares (C x H) .....	87
Figura 27. Estruturas químicas que foram utilizadas para comparação, com vistas à elucidação estrutural de CS-7.....	89
Figura 28. Estrutura proposta para o composto CS-7 .....	90
Figura 29. CS-7 nomenclatura conforme IUPAC .....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produtos naturais marinhos que deram origem a Medicamentos.....	22
Tabela 2. Classificação das macroalgas .....	26
Tabela 3. Atividade biológica dos fucanos.....	30
Tabela 4. Estruturas de diterpenos relatados para <i>Canistrocarpus cervicornis</i> .....	36
Tabela 5. Atividades biológicas relatadas para espécie <i>C. cervicornis</i> .	41
Tabela 6. Esquema de solventes utilizados na CLV: Coluna A .....	53
Tabela 7. Esquema de solventes utilizados na Coluna AA .....	54
Tabela 8. Esquema de eluentes utilizados na Coluna AB .....	55
Tabela 9. Esquema de eluentes utilizados na Coluna EFS1 .....	55
Tabela 10. Esquema de solventes utilizados na Coluna EFS1 .....	56
Tabela 11. Esquema de solventes utilizados na Coluna AC.....	56
Tabela 12. Esquema de solventes utilizados na Coluna AD .....	57
Tabela 13. Esquema de solventes utilizados na Coluna E.....	57
Tabela 14. Esquema de solventes utilizados na Coluna I.....	58
Tabela 15. Comparação dos dados de RMN de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ de CS-6 e do ácido dilófico reportado por Schlenk e Gerwick (1986). Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hz. ....	76
Tabela 16. Comparação entre os dados de RMN de CS7 e os dados de compostos com estruturas semelhantes, reportados por Norte e colaboradores (1990). Deslocamentos químicos estão expressos em ppm e constantes de acoplamento, em Hz.....	88
Tabela 17. Resultados de atividade citotóxica .....	92
Tabela 18. Resultados de atividade anticoagulante: Agregação com estímulo por ADP.....	92
Tabela 19. Resultados de atividade anticoagulante: Agregação com estímulo por epinefrina.....	92



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
∫	Integração de hidrogênio em RMN
δC	Deslocamento químico em ppm no espectro de <sup>13</sup> C RMN
δH	Deslocamento químico em ppm no espectro de <sup>1</sup> H RMN
AcEOt	Acetato de etila
Ara-A	Vidarabina
Ara-C	Citarabina
<sup>13</sup> C RMN	Ressonância magnética nuclear de Carbono 13
CC	Coluna clássica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CI50	Concentração inibitória média
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
cHex	Ciclohexano
COSY	Espectro de correlação ( <i>Correlated spectroscopy</i> )
d	Duplete
dd	duplo duplete
<sup>1</sup> H RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
HCT-116	Adenocarcinoma colorretal humano
Hex	Hexano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	High performance liquid chromatography
HMBC	Correlação heteronuclear através de múltiplas ligações ( <i>Heteronuclear multiple bond correlation</i> )
HSQC	Correlação heteronuclear de quantum-simples ( <i>Heteronuclear single quantum correlation</i> )
Hz	Hertz
IC95%	Intervalo de confiança 95 %
INCA	Instituto Nacional do Câncer (Brasil)
<i>J</i>	Constante de acoplamento
L	Litro
m	Multiplete
mg	Miligramas

MHz	Megahertz
mL	Mililitro
Mult.	Multiplicidade
MeOH	Metanol
n.a.	Não atribuído
nm	Nanômetro
ppm	Partes por milhão
PN	Produtos naturais
Rf	Fator de retenção ( <i>Retardation factor</i> )
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Simpleto
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
2.1 PRODUTOS NATURAIS DE ORGANISMOS MARINHOS.....	21
<b>2.1.1 Metabólitos Primários e Secundários .....</b>	<b>24</b>
2.2 ALGAS .....	25
<b>2.2.1 Polissacarídeos.....</b>	<b>28</b>
2.2.1.1 Fucanos sulfatados .....	29
2.2.1.2 Ácidos algínicos .....	31
2.3 <i>Canistrocarpus cervicornis</i> (Kützing) De Paula & De Clerck.....	32
<b>2.3.1 Metabólitos isolados a partir de <i>C. cervicornis</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>2.3.2 Atividades biológicas reportadas para <i>C. cervicornis</i>.....</b>	<b>40</b>
2.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA .....	41
<b>2.4.1 Atividade anticoagulante .....</b>	<b>41</b>
<b>2.4.2 Atividade antimicrobiana .....</b>	<b>42</b>
<b>2.4.3 Atividade citotóxica.....</b>	<b>43</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
3.1 GERAL .....	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
4.1 ESPECIFICAÇÕES DOS REAGENTES E EQUIPAMENTOS....	47
<b>4.1.1 Equipamentos .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1.2 Métodos cromatográficos, solventes e reagentes aplicados.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1.3 Análise instrumental .....</b>	<b>49</b>
4.2 MATÉRIA PRIMA VEGETAL.....	49
4.3 EXTRAÇÃO .....	51
4.4 FRACIONAMENTO .....	51
<b>4.4.1 Fracionamento preliminar do extrato de <i>Canistrocarpus cervicornis</i>: CLV (A) .....</b>	<b>53</b>
<b>4.4.2 Fracionamento: Coluna AA .....</b>	<b>54</b>

<b>4.4.3 Fracionamento: Coluna AB</b> .....	<b>54</b>
<b>4.4.4 Fracionamento: Coluna AS1</b> .....	<b>55</b>
<b>4.4.5 Fracionamento: Coluna EFS1</b> .....	<b>55</b>
<b>4.4.6 Fracionamento: EFS2</b> .....	<b>56</b>
<b>4.4.7 Fracionamento: Coluna AC</b> .....	<b>56</b>
<b>4.4.8 Fracionamento: Coluna AD</b> .....	<b>56</b>
<b>4.4.9 Fracionamento: Coluna E</b> .....	<b>57</b>
<b>4.4.10 Fracionamento por CLAE “F”</b> .....	<b>57</b>
<b>4.4.11 Fracionamento por CLAE “G”</b> .....	<b>58</b>
<b>4.4.12 Fracionamento por CLAE “H”</b> .....	<b>58</b>
<b>4.4.13 Fracionamento: Coluna I</b> .....	<b>58</b>
<b>4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA</b> .....	<b>59</b>
<b>4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA</b> .....	<b>60</b>
<b>4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE</b> .....	<b>61</b>
<b>4.7.1 Coagulação sanguínea</b> .....	<b>61</b>
<b>4.7.2 Agregação plaquetária</b> .....	<b>61</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>5.1 INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DA ALGA <i>Canistrocarpus cervicornis</i> PROVENIENTE DO ATOL DAS ROCAS</b> .....	<b>63</b>
<b>5.2 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA ISOLADA CS-6</b> .....	<b>66</b>
<b>5.3 ELUCIDAÇÃO DA ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA ISOLADA CS-7</b> .....	<b>77</b>
<b>5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA</b> .....	<b>91</b>
<b>5.4.1 Atividade antimicrobiana</b> .....	<b>91</b>
<b>5.4.2 Atividade citotóxica</b> .....	<b>91</b>
<b>5.4.3 Atividade anticoagulante</b> .....	<b>92</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>93</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>97</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais (PN) (plantas, organismos marinhos e microrganismos) pelos homens ocorre há milhares de anos, não apenas como fonte de alimento para sobrevivência, mas também como recursos para tratamento de diversas patologias (DUTRA et al., 2016).

Nesse âmbito, especialmente matérias primas de origem vegetal têm sido exploradas pelo homem no tratamento de diversas doenças (DUTRA et al., 2016), com mais de 1.000 produtos derivados de plantas descritos na Mesopotâmia já em 2.600 a.C. (CRAGG; NEWMAN, 2013). Posteriormente foram encontrados registros no Egito, bastaste relevante conhecido como Papiro de Ebers, com cerca de 700 formulações, sendo a maioria de origem vegetal (NEWMAN; CRAGG; KINGSTON, 2008).

Enquanto os recursos naturais terrestres vêm sendo amplamente explorados há milênios, os oceanos são considerados ainda ambientes desconhecidos embora as algas sejam os organismos mais antigos da Terra, havendo evidências de sua existência já no período pré-cambriano, há aproximadamente 3,5 bilhões de anos (OHSE, 2009).

A água representa cerca de 70% da superfície da Terra, com destaque para os oceanos, que possuem a capacidade de promover ambientes únicos e ricos, repletos de recursos naturais (MENEZES, 2010), com grande diversidade de organismos com potencial na produção de compostos bioativos, que podem vir a se tornar produtos farmacêuticos, nutracêuticos e cosméticos (KIM et al, 2012).

A extensão territorial e área litorânea brasileira, com cerca de 8.500 km de costa, ainda pouco explorada, instiga a investigação química dos organismos marinhos, considerando que os compostos produzidos eles contribuem para sua adaptação ao ambiente em que estão inseridos, e que é radicalmente diverso do ambiente terrestre (STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

Os metabólitos secundários não são sintetizados pelas vias metabólicas gerais, e não têm função primária diretamente envolvida no crescimento normal, desenvolvimento ou reprodução de um organismo (MARTINS et al., 2014), sendo muitos deles, no caso de algas, compostos halogenados (HERRERA-RODRIGUEZ et al., 2011). São geralmente produzidos para controlar relações ecológicas, como forma de defesa, contra predadores, na competição de luz, nutrientes e espaço, também como fonte de comunicação entre espécies para acasalamento, entre outras (MARTINS et al., 2014).

O desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais tem sido um grande desafio, pois além da complexidade química, acredita-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies diferentes de algas (RAVEN et al., 2007; FELICIO, OLIVEIRA, DEBONSI, 2012). Em busca de novos fármacos provenientes dos oceanos, a indústria farmacêutica passou a procurar novos medicamentos a partir de produtos naturais marinhos (SMIT, 2004), as principais classes estudadas de organismos marinhos são algas, invertebrados (esponjas e moluscos), e micro-organismos (BLUNT et al., 2017).

Estudos relacionados aos produtos naturais de origem marinha (PNM) no Brasil iniciaram na década de 1960, mas já na década de 1980, o grupo de pesquisa da Universidade Federal Fluminense (UFF), hoje coordenado pela Professora Valéria Teixeira, já se destacava com estudos químicos de algas pardas.

Na Universidade Federal de Santa Catarina, o estudo químico de algas marinhas iniciou neste Programa de Pós-graduação, em colaboração com o Prof. Paulo Horta, do Departamento de Botânica da UFSC, no início deste milênio. Atualmente, vários departamentos da Universidade dedicam-se à pesquisa de organismos marinhos de ilhas oceânicas brasileiras através de um projeto integrado com várias universidades federais, englobando áreas relacionadas à bioprospecção, ecologia e biotecnologia (PROSPECMAR-Ilhas). Através deste projeto, foi possível o acesso ao material de algas utilizado para o desenvolvimento desta Dissertação, o qual foi coletado no Atol das Rocas.

Devido ao difícil acesso a matéria-prima de algas, provenientes de um atol (uma ilha oceânica em forma de anel, composto por corais e algas coralinas), no qual a inserção humana é praticamente nula, até o presente momento nenhum trabalho de investigação química havia sido realizado com a espécie *Canistrocarpus cervicornis* coletada nesse ambiente. Este aspecto representa um desafio ainda maior na busca de novos metabólitos secundários, inclusive pela dificuldade de obtenção de material abundante, já que se trata de área protegida.

O Atol das Rocas foi transformado em uma área de reserva biológica em 1979, sendo o principal ponto de preservação do Oceano Atlântico, é o único Atol do Atlântico sul, com uma área de 37.820 hectares que abriga duas ilhas (Ilha do Farol e Ilha do Cemitério), constituindo a primeira reserva biológica marinha do Brasil. As pesquisas até o momento realizadas no Atol das Rocas foram relacionadas com a fauna (aves, reptéis/quelônios, ictiofauna, equinodermas, crustáceos, malacofauna, cnidofauna, esponjofauna e zooplâncton) (ICMBio, 2007). Em termos de algas, apenas uma investigação da espécie *Dictyota pfaffii* (BARBOSA et al., 2003) foi encontrada.

Uma vez que na dissertação de mestrado desenvolvida no grupo de pesquisa por Philippus (2016) já haviam sido encontradas diferenças interessantes de composição química para uma mesma espécie de alga parda coletada na costa continental e em outra ilha oceânica (Ilha da Trindade), considerou-se relevante à investigação química da espécie *Canistrocarpus cervicornis* coletada no Atol. Para esta espécie, a partir do trabalho de Philippus (2016) já se dispunha de compostos isolados de material coletado no litoral do Nordeste Brasileiro, tendo sido identificados dois diterpenos já descritos para a espécie.

Considerando o potencial de produtos naturais marinhos no desenvolvimento de novos fármacos, este projeto teve como objetivo a investigação química do extrato de *Canistrocarpus cervicornis* coletada no Atol das Rocas, com vistas à obtenção de novos metabólitos bioativos.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PRODUTOS NATURAIS DE ORGANISMOS MARINHOS

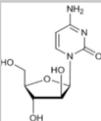
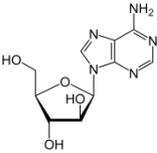
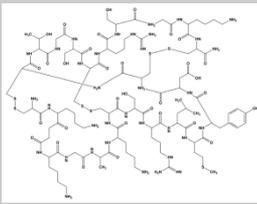
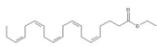
Os mares e oceanos ocupam mais de 2/3 da superfície da Terra e abrigam quase todos os grupos de organismos vivos. Os ecossistemas marinhos podem ser considerados como detentores da maior biodiversidade filética, com potencial biotecnológico associado praticamente ilimitado (MUNRO, 1999; CORDELL, 2000; COSTA-LOTUFO et al., 2009).

As pesquisas com PNM iniciaram na década de 50, na Universidade de Yale (E.U.A) pelo professor Werner Bergmann. Porém, foi a partir da década de 70 que se teve maior acesso às profundidades oceânicas (FENICAL, 2006). Mesmo com a evolução tecnológica de equipamentos para mergulho, ainda há uma grande dificuldade da coleta dos PNM por conta da necessidade de embarcações, mergulhadores, a dificuldade ao acesso em determinadas regiões (correntes, ondulação, rochas, baixas temperatura e luminosidade), inclusive pela presença de animais marinhos que representam perigo potencial para a vida humana. Tem-se, assim, um conjunto de fatores para cujo manejo se requer um grande investimento financeiro e material, no sentido de viabilizar uma logística adequada e mínimo de segurança às pessoas envolvidas no processo de aquisição da matéria prima de origem marinha (FENICAL, 2006; CRAGG; NEWMAN, 2013).

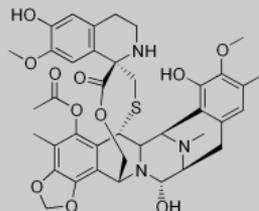
Alguns medicamentos no mercado farmacêutico já são provenientes de produtos naturais marinhos. Intensas pesquisas ao longo de décadas geraram alguns bons resultados (Tabela 1), como o desenvolvimento de fármacos como: citarabina (Ara-C), ainda hoje utilizada pela atividade citostática; vidarabina (Ara-A), com atividade antiviral (ambas desenvolvidas com base na molécula de um nucleosídeo isolado de esponjas); o analgésico ziconotida (Prialt®) foi isolado originalmente a partir de um molusco marinho do gênero *Conus* e é obtido hoje em dia por síntese total. Os ésteres de ômega-3 (Lovaza®), obtidos a partir de peixes, são utilizados para tratamento de hipertrigliceridemia;

trabectedina (Halaven<sup>®</sup>) é proveniente de um invertebrado (tunicado) e apresenta atividade antitumoral (GERWICK; MOORE; 2012), enquanto brentuximabe vedotina (Adcetris<sup>®</sup>) foi desenvolvido a partir de um metabólito isolado do molusco *Dolabella auricularia* e apresenta atividade frente ao Linfoma de Hodgkin (SEENTER; SIEVERS, 2012).

Tabela 1. Produtos naturais marinhos que deram origem a Medicamentos

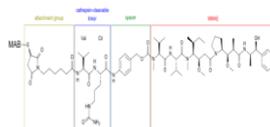
Composto isolado/Fonte	Estrutura química	Atividade biológica
citarabina (Ara-C) esponja		Citostática
vidarabina (Ara-A) esponja		antiviral
ziconotida (Prialt <sup>®</sup> ) molusco marinho do gênero <i>Conus</i>		analgésico
Ésteres ômega-3 (Lovaza <sup>®</sup> ) peixes		hipertrigliceridemia

trabectedina  
(Halaven®)  
tunicado



antitumoral

brentuximabe  
vedotina  
(Adcetris®)  
molusco *Dolabella*  
*auricularia*

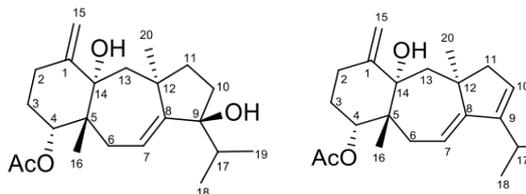


Linfoma de Hodgkin

Fonte: Autora

Em uma dissertação anterior desenvolvida com a alga parda *C. cervicornis* proveniente do Ceará (Pedra do Paraíso), houve o isolamento de diterpenos do tipo dolastano (PHILIPPUS, 2016) (Figura 1). O extrato foi testado quanto à atividade antimicrobiana para as cepas *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Candida albicans* (ATCC 90112), apresentando resultados interessantes frente a *S. aureus*, com inibição de crescimento de 59,3%. Porém as substâncias isoladas não chegaram a ser avaliadas, pelo baixo rendimento.

Figura 1. Dolastanos isolados de *C. cervicornis* por Philippus (2016)



### 2.1.1 Metabólitos Primários e Secundários

Os metabólitos produzidos pelos organismos podem ser primários ou secundários, sendo os primeiros essenciais à vida: lipídeos monossacarídeos, aminoácidos, etc. Já os metabólitos secundários são produzidos como forma de proteção e/ou adaptação do organismo ao meio ambiente (TEIXEIRA, 2013), são geralmente produzidos para controlar relações ecológicas, como forma de defesa, contra predadores, na competição por luz, nutrientes e espaço, como meio de comunicação entre espécies para acasalamento, entre outras (MARTINS, VIEIRA, GASPAS, SANTOS, 2014).

Dessa maneira, podemos considerar o metabolismo como conjunto complexo de reações que ocorrem ativando rotas metabólicas, visando à produção de energia através de ATP (trifosfato de adenosina) e também a biossíntese de substâncias indispensáveis à sua sobrevivência (CAPASSO; PASQUALE; GRANDOLINI, 2011).

Os metabólitos secundários não são sintetizados pelas vias metabólicas gerais, e não têm função primária diretamente envolvida no crescimento normal, desenvolvimento ou reprodução de um organismo (MARTINS, VIEIRA, GASPAS, SANTOS, 2014), sendo muitos deles, no caso de organismos marinhos, compostos halogenados (HERRERA-RODRIGUEZ et al., 2011), devido à abundância de cloro e bromo na água do mar. Estas substâncias são produzidas por rotas metabólicas que

evoluíram para possibilitar a adaptação e a conquista de novos ambientes, tornando-as assim complexas, diversificadas e particulares a determinados grupos de organismos (TEIXEIRA, 2009).

Dessa maneira, os metabólitos secundários incluem os terpenos, flavonóides, saponinas, alcalóides, esteróides (ANARAT-CAPPILLINO; SATTELY, 2014). Especificamente das algas *C. cervicornis* os metabólitos de maior interesse são os terpenos (TEIXEIRA, 2013).

## 2.2 ALGAS

Os oceanos são considerados ambientes ainda desconhecidos, porém as algas são os organismos mais antigos da Terra, havendo evidências de sua existência já no período pré-cambriano, há aproximadamente 3,5 bilhões de anos (OHSE, 2009).

Cerca de 70% da superfície da Terra é recoberta por água, especialmente pelos oceanos, e acredita-se que 90% dos organismos do planeta vivam neste ambiente (STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011; WANG, 2014). As algas são responsáveis por cerca de 50% da fotossíntese do planeta, que promove um efeito positivo sob a emissão de gases (QIN, et al 2012). Os oceanos promovem ambientes únicos e ricos, há diversos organismos com potencial na produção de compostos bioativos que podem vir a tornarem-se produtos farmacêuticos, nutracêuticos, cosméticos e biotecnológicos (KIM et al, 2012; PENGZHAN et al, 2003).

Podendo ser diferenciadas pela sua estrutura celular em Eucariontes (Cyanobactérias) e Procariontes (LEE,2008), as algas desenvolveram adaptação para se manterem mesmo em condições ambientais extremas, produzindo metabólitos secundários como defesa química, dessa maneira conseguem sobreviver a diversos nichos ecológicos (KELMAN et al., 2012).

As algas bentônicas são multicelulares e crescem fixas ao substrato, podendo haver adaptações à sobrevivência em substratos arenosos ou lodosos (TEIXEIRA, 2013). Podem ser

encontradas em água doce, nos mares e água salobra (LEE, 2008). Possuem papel extremamente importante na cadeia alimentar, servindo como fonte alimentar para crustáceos, peixes, moluscos, etc.

São organismos talófitos; ou seja, não são diferenciados entre raiz, caule e folha, sendo a maioria fotossintetizantes produtores de pigmentos, segundo os quais se classificam em: Chlorophyta (algas verdes), Phaeophyta (algas pardas) e Rhodophyta (algas vermelhas) (Tabela 2). As Chlorophytas (algas verdes) possuem como pigmentos acessórios as clorofilas *a* e *b*, carotenóides (beta-caroteno, luteína e zeaxantina) e possuem como material de reserva o amido. Rhodophytas (algas vermelhas) possuem como pigmento acessório as clorofilas *a* e *d*, carotenóides (beta-caroteno e alfa-caroteno) possuindo como material de reserva o amido das florídeas. Já as Phaeophytas são as algas pardas, que possuem como pigmentos acessórios as clorofilas *a* e *c*, carotenóides (beta-caroteno, xantofila, fucoxantina) e possuem como material de reserva a laminarina, enquanto na estrutura da parede celular possuem alginato (carboidrato estrutural) (REVIERS, 2006; OLIVEIRA, 2008).

Tabela 2. Classificação das macroalgas

<b>Divisão</b>	<b>Clorofilas</b>	<b>Carotenóides</b>	<b>Material de reserva</b>
Chlorophyta (Verdes)	<i>a, b</i>	beta-caroteno, luteína, zeaxantina	amido
Rhodophyta (vermelhas)	<i>a, d</i>	beta-caroteno, alfa- caroteno	Amido das florídeas
Phaeophyta (pardas)	<i>a, c</i>	beta-caroteno, xantofila, fucoxantina	laminarina

Fonte: Autora

A classe Phaeophyceae é reconhecida pelo elevado número de espécies de grande porte, servindo de fonte de alimento a inúmeros animais marinhos, também é responsável por criar autênticas florestas no Oceano Pacífico, podendo crescer 30 cm por dia e ir até aos 65 m de comprimento (GAMAL, 2010).

Existem cerca de 1800 espécies de algas pardas, em geral, as algas marrons são maiores e são encontradas em maior quantidade em águas mais frias (GUIRY; GUIRY, 2017). A cor castanha destas algas resulta da dominância do pigmento xantofílico fucoxantina, que mascara os outros pigmentos, (TEIXEIRA, 2013, GUIRY; GUIRY, 2017, O'SULLIVAN et al., 2010). As reservas alimentares são tipicamente polissacarídeos complexos, açúcares e álcoois.

Em nível alimentar, assim como outros vegetais, são capazes de fazer fotossíntese e possuem vias para produzir metabólitos visando à sobrevivência e defesa (LEE 2008). Muitas algas já eram utilizadas como fonte de alimentos, tratamento de doenças por alguns grupos étnicos e tribos, e mais recentemente utilizados como produtos químicos, tendo grande importância econômica (TORRES, 2014).

Algumas espécies de algas podem ser utilizadas como fonte de alimento, sendo produzidas e consumidas principalmente pelos países asiáticos (Japão, China, Coreia do Sul), que são grandes consumidores de macroalgas marinhas, uma vez que possuem alto valor nutritivo, sendo ricas em vitaminas (complexo B, K, D, E e C), carotenóides, proteínas, fibras, ácidos graxos e minerais diversos, como cálcio, fósforo, sódio, magnésio, ferro, cobre, manganês, potássio, iodo, etc. (BURTON, 2003, ORTIZ et al., 2009).

Muitas algas podem ser cultivadas, sendo o Japão e a China grandes produtores de *Undaria pinnatifida*, que fornece o Wakame (alga rica, muito utilizada na culinária oriental). Toda a biomassa no mundo vem de um número relativamente pequeno de espécies nas ordens Laminariales e Fucales, e o valor acumulado anual dessas algas chega a US\$ 300 milhões (GUIRY; GUIRY, 2017).

As paredes celulares das algas são compostas por celulose e ácido algínico, um heteropolissacarídeo de cadeia longa (GUIRY; GUIRY, 2017, DAEMI; BARIKANI, 2012). Os derivados de ácidos algínicos são utilizados comercialmente em pasta de dente, sabonetes, sorvetes, carnes enlatadas, impressão de tecido, entre outras (MURDZHEVA et al., 2016; GUIRY; GUIRY, 2017), agindo como ligantes, estabilizantes, emulsificantes ou agentes de moldagem.

Além do uso como fontes alimentares, as macroalgas são responsáveis em produzir metabólitos com potencial ação farmacológica: aminoácidos do tipo micosporinas, compostos sulfatados e halogenados, lectinas, terpenos, compostos polifenólicos, entre outros (O'SULLIVAN et al., 2010; FERNANDO et al., 2016).

### **2.2.1 Polissacarídeos**

As algas marinhas possuem grandes quantidades de polissacarídeos em sua parede celular, sendo esses compostos por açúcares simples (monossacarídeos) unidos por ligações glicosídicas (SENTHILKUMAR et al., 2013).

A concentração de polissacarídeos pode variar de 4 a 76% do peso seco das algas (HOLDT E KRAAN, 2011). Esses polissacarídeos são constituídos principalmente por celulose e hemiceluloses, responsáveis pela sustentação das algas nos oceanos, a concentração de polissacarídeos é espécie-específica (SENTHILKUMAR et al., 2013).

As algas verdes contêm galactanos sulfatados, polissacarídeos ácidos, enquanto as algas pardas contêm ácido algínico, polissacarídeos sulfatados (constituído por alfa-L-fucose sulfatada) (LI et al., 2008). Já as algas vermelhas contêm carragenanos, amilopectina e galactano sulfatado solúvel em água (PAL et al., 2014).

### 2.2.1.1 Fucanos sulfatados

Os fucanos são polímeros/polissacarídeos sulfatados, em que o açúcar em abundância é a L-fucose sulfatada, sendo encontradas nas paredes celulares de algas marrons e invertebrados marinhos (BERTEAU; MULLOY, 2003). Esses polissacarídeos não são encontrados em plantas terrestres nem nas plantas de água doce, acreditando-se que esses polissacarídeos sulfatados estão relacionados com o ambiente marinho, especialmente com a regulação mecânica, osmótica ou iônica (KLOAREG; QUATRANO, 1988).

Acredita-se que os fucanos constituem mecanismo de defesa por possuir característica higroscópica, com finalidade de proteção da alga quando submetida à exposição solar intensa e marés baixas, evitando a desidratação. O fato de apresentar parede celular mucilaginosa também contribui para a flexibilidade da alga, promovendo melhores características para crescimento em ambiente líquido para captar luz solar e nutrientes (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967).

Podem ser classificados como homofucanos ou heterofucanos; quando constituídas majoritariamente por unidades de fucose sulfatada (>90%) são consideradas homofucanos; quando apresentam além da fucose sulfatada, concentrações diversas de D-galactose, D-manose, D-xilose, L-ramnose, e/ou ácido D-glucurônico, além de grupos acetila, são chamadas de heterofucanos (PAINTER, 1983; NAGUMO; NISHINO, 1996; TAKO et. al., 2000, ROCHA et al., 2006).

O primeiro isolamento de fucanos em algas pardas foi relatado em 1913, pelo pesquisador Kelling. Em 1948, Vasseur verificou que os fucanos não são exclusivos de algas, mas também podem ser encontrados em organismos invertebrados marinhos (BERTEAU; MULLOY, 2003).

Há muitos estudos que buscam relacionar os fucanos com atividade biológica, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Atividades biológicas de fucanos.

<b>Atividade biológica</b>	<b>Autores</b>
Anticoagulante	Cumashi et al., 2007 Ustyuzhanina et al., 2013 Camara et al., 2013 Dore et al., 2013
Hipolipemiante	Yokota et al., 2009 Park et al., 2011 Cuong et al., 2015
Antitrombótica	Boisson-Vidal et al., 2000 Mouro, 2004 Drozd et al., 2011 Dore et al., 2013
Anti-inflamatória	Clement et al., 2010 Park et al., 2011 Marques et al., 2012 Pomin, 2015 Siqueira et al., 2011 Park et al., 2011
Antitumoral	Berteau; Mulloy, 2003
Antibacteriana	Berteau; Mulloy, 2003
Antiviral	Berteau; Mulloy, 2003
Anti-hipertensiva	Xueyan et al., 2004
Imunomodulatória	Liu et al., 2010 Zhang et al., 2015
Antiadesiva	Cumashi et al., 2007
Antioxidante	COSTA et al., 2010 Nariyoshi et al., 2013

Fonte: Autora

### 2.2.1.2 Ácidos algínicos

Os alginatos são polissacarídeos encontrados tanto na matriz intercelular de algas marrons, quanto recobrimo extracelularmente algumas espécies de bactérias (MOE et al, 1995). Foram descobertos no final do século XIX, tornando-se importante produto industrial, utilizado pela indústria alimentícia, têxtil, de papel, dermocosméticos, médica e farmacêutica (HAY et al., 2010, DRAGET; TAYLOR, 2009). Os ácidos algínicos podem estar associados a íons cálcio, magnésio e ferro, formando os alginatos (PAULA et al., 2007).

Os alginatos são derivados de ácidos algínicos, heteropolissacarídeos localizados na matriz extracelular de algas marrons, chegando a representar de 40 a 60% do peso do vegetal seco. As espécies de algas utilizadas e a época da colheita influenciam na quantidade e a qualidade dos alginatos extraídos (IWAKI, 2010, DAVIS, VOLESKY, MUCCI, 2003).

Devido à sua viscosidade, os alginatos são utilizados como agente gelificante, estabilizantes e emulsificante (IWAKI, 2010). Também são utilizados para controlar viscosidade em xaropes e molhos, como estabilizante na indústria de sorvetes, pois impedem a formação de cristais macroscópicos de gelo; na indústria de cervejas permitem a formação de espuma, criando uma película resistente à formação de bolhas provenientes da agitação do líquido (FACCINI, 2007; PAULA et al., 2007, GARCIA-CRUZ et al., 2008). Também são utilizados como agente de suspensão em bebidas e temperos para saladas; agentes de formação de filmes em salsichas, e agentes gelificantes em doces contendo leite e em geléias (SABRA; ZENG; DECKWER, 2001).

Em aplicações médicas, os alginatos são importantes na imobilização de células, tratamento do refluxo esofágico, dermatologia e cicatrização de feridas, também vem sendo utilizada na microencapsulação de fármacos, peptídeos ou sistemas de liberação controlada (REMMINGHORST; REHM, 2006).

Algumas aplicações dos alginatos já reportadas estão relacionadas com o estímulo a mediadores do sistema imune, como citoquinas, interleucina-1, interleucina-6 e TNF-alfa (Fator de necrose tumoral alfa), cuja resposta está associada à estrutura sequencial de biopolímeros constituídos exclusivamente de grupos manurônicos (SABRA; ZENG; DECKWER, 2001).

### 2.3 *Canistrocarpus cervicornis* (Kützing) De Paula & De Clerck

A alga *Canistrocarpus cervicornis*, pertencente a família Dictyotaceae e gênero *Canistrocarpus*, foi classificada pela primeira vez em 1859, como *Dictyota cervicornis* Kützing (GUIRY; GUIRY, 2017).

O gênero *Canistrocarpus* (Kützing) De Paula & De Clerck é composto pelas seguintes espécies: *Canistrocarpus cervicornis* (Kützing) De Paula & De Clerck, *Canistrocarpus crispatus* (J.V. Lamouroux) De Paula & De Clerck, *Canistrocarpus cervicornis* f. *pseudohamatus* (Cribb) M. J. Wynne e *Canistrocarpus magneanus* (De Clerck & Coppejans) De Paula & De Clerk (CLERCK, LELIAERT, VERBRUGGEN, 2006; GUIRY e GUIRY, 2017). Na Figura 1 podem-se observar os aspectos morfológicos microscópicos e macroscópicos da espécie *C. cervicornis*.

Figura 2. *Canistrocarpus cervicornis*: aspectos macro e microscópicos



(1) Padrão de ramificação jovem epifítica em *Padina*. (2) Sorus anterídeo cercado por parafísias. (3) Rizóides marginais. (4) Habitat, piscina intertidal (Vietnã).

Fonte: Algaebase ([www.algaebase.org](http://www.algaebase.org))

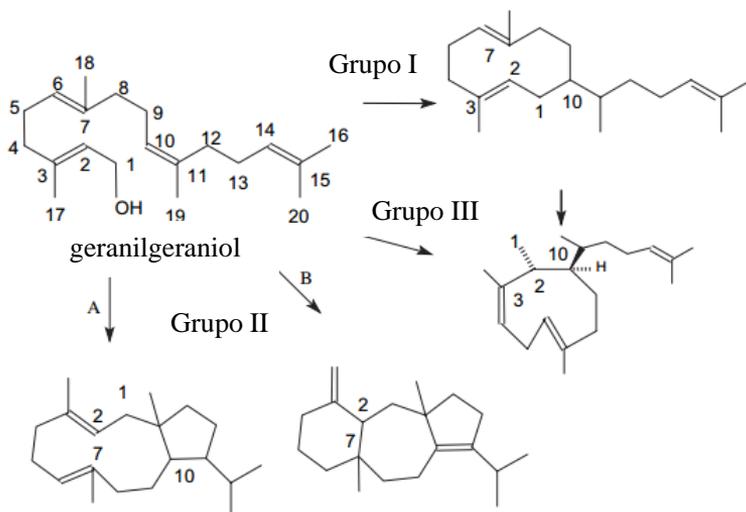
De Clerck e colaboradores (2006) sugeriram uma revisão da classificação de algumas espécies de *Dictyota*, propondo o novo gênero *Canistrocarpus*. A espécie *C. cervicornis* está presente em diversas partes do mundo, sendo considerada uma alga abundante na costa brasileira (FALCÃO; SZECHY 2005, GUIRY; GUIRRY, 2017).

Ainda, na tentativa de agrupar as algas conforme suas características quimiotaxonômicas e/ou marcadores químicos, Fenical (1980), Kelecom e Teixeira (1986) propuseram uma nova classificação relacionada com a produção de metabólitos secundários.

Kelecom e Teixeira (1988), Vallim et al., (2005) propuseram a divisão dos diterpenos da família Dictyotaceae em três grupos químicos de acordo com a ciclização do geranilgeraniol (precursor comum da via dos diterpenos) (Figura 2), sendo considerados pertencentes ao Grupo I os que possuem os derivados prenilados de sesquiterpenos (isolados a partir de *Dictyota pfaffii*), em que a ciclização ocorre entre os carbonos 1 e 10; o Grupo II é subdividido em II A e II B, sendo aqueles

derivados de ciclização entre os carbonos 1 e 11 pertencentes ao Grupo II A (dolabelanos); ocorrendo uma segunda ciclização entre os carbonos 2 e 7, tem-se o Grupo II B (dolastanos e secodolastanos), os quais já foram isolados de *C. cervicornis*. Por fim, pertencem ao Grupo III, os xenianos e seus derivados (como os isolados de *Dilophus guineensis* e *Dictyota menstrualis*) (TEIXEIRA; KELECOM, 1988; VALLIM et al., 2005).

Figura 3. Proposta biossintética para os diterpenos de Dictyotaceae, de acordo com a ciclização do geraniil-geraniol. (Adaptado de Vallim et al., 2005).



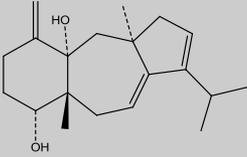
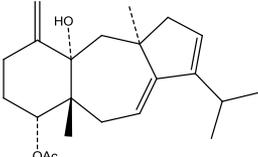
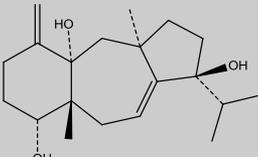
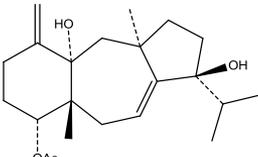
Fonte: Autora, adaptado de Vallim et al., 2005

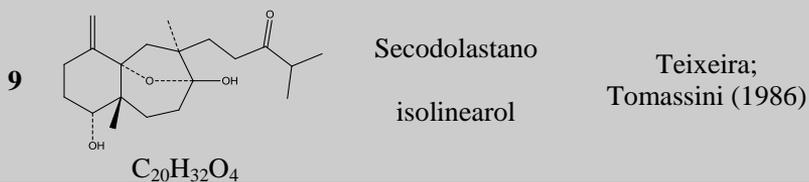
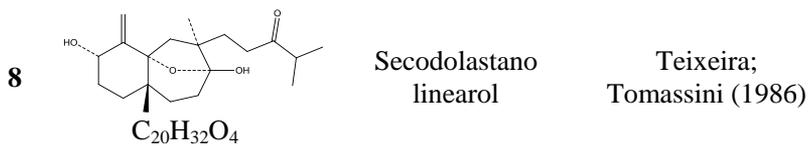
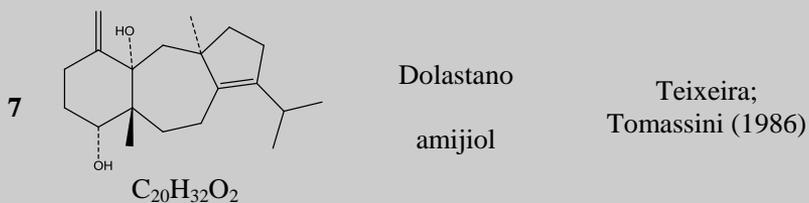
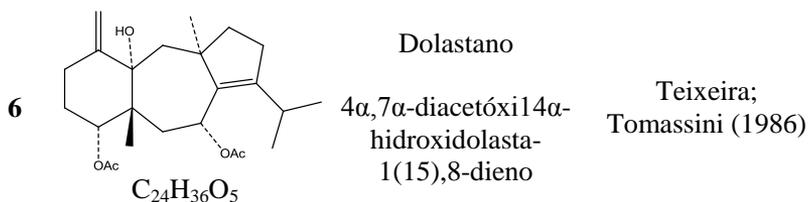
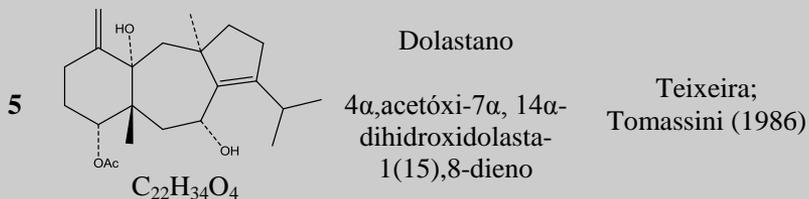
### 2.3.1 Metabólitos isolados a partir de *C. cervicornis*

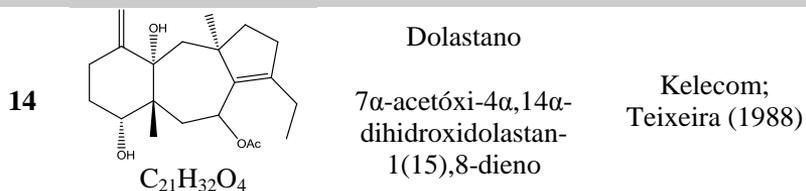
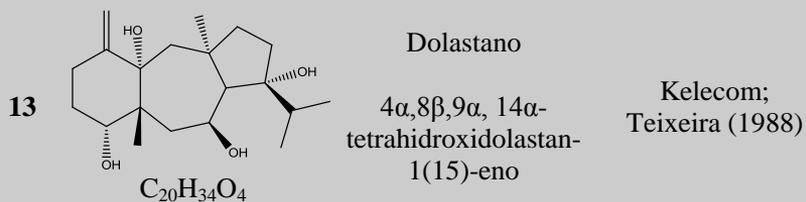
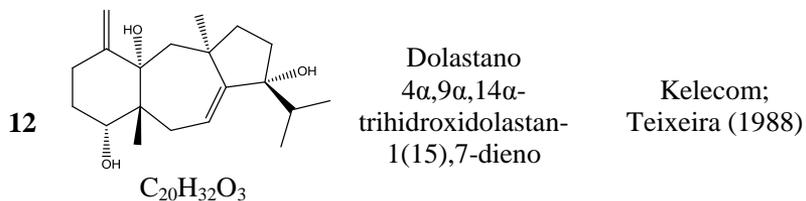
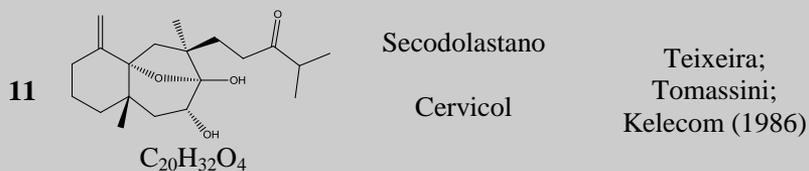
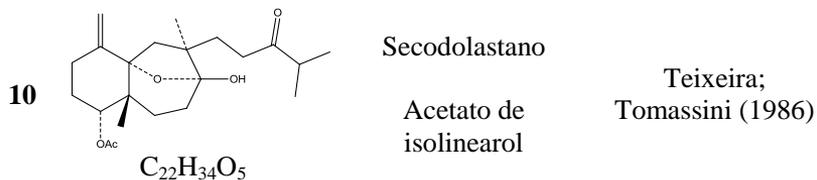
Os estudos a partir da alga parda *C. cervicornis* iniciaram no Brasil na década de 80 com matéria prima da costa brasileira, sendo considerados os metabólitos de maior interesse os terpenos do tipo dolastano e secodolastano (TEIXEIRA, 2013), sendo proposto que os principais metabólitos secundários encontrados na família Dictyotaceae estão diretamente relacionados ao controle da herbivoria (VALLIM et al., 2005).

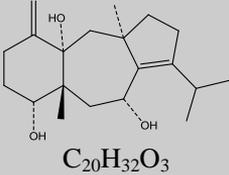
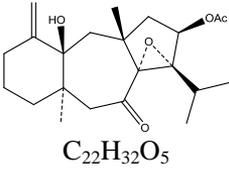
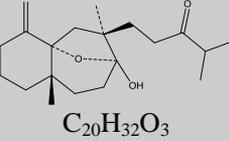
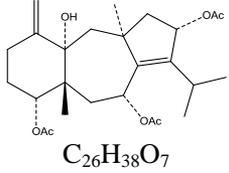
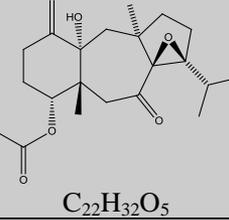
No Brasil, Teixeira e colaboradores (1986) tiveram grande sucesso ao realizarem o isolamento químico de sete diterpenos do tipo dolastano (**1-7**) e três do tipo secodolastano (**8-10**). A professora Valéria Teixeira foi uma das pioneiras no Brasil nos estudos com a espécie, obtendo sucesso no isolamento de diversos novos compostos químicos: cervicol (**11**) (TEIXEIRA; TOMASSINI; KELECOM, 1986), 4 $\alpha$ ,9 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -trihidroxidolasta-1(15),7dieno; 4 $\alpha$ ,8 $\beta$ ,9 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -tetrahidroxidolasta-1(15),-eno; 7 $\alpha$ acetóxi-4 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -dihidroxidolasta-1(15),8-dieno (**12-14**) (TEIXEIRA; KELECOM, 1988). Vallim et al. (2010) isolou 4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -trihidroxidolasta-1(15),8-dieno (**15**). Em 2015, Bianco e colaboradores isolaram mais um dolastano inédito: 4 $\alpha$ -acetoxiamijidictiol (**16-18**). Mais recentemente, Campbell et al. (2017) isolaram dois compostos inéditos 4*R*-acetoxi-8*S*,9*S*-epoxi-14*S*-hidroxi-7-oxodolastano (**19**) e 4*R*-hidroxi-8*S*,9*S*-epoxi-14*S*-hidroxi-7-oxodolastano (**20**). Todas as estruturas químicas estão representadas na Tabela 4.

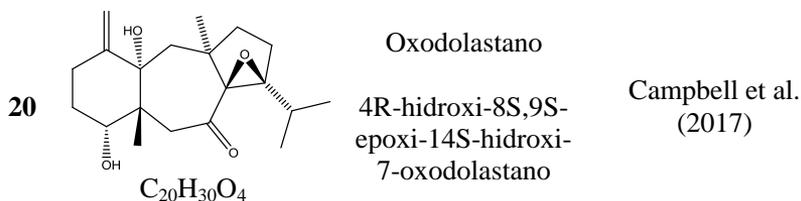
Tabela 4. Estruturas de diterpenos relatados *para Canistrocarpus cervicornis*

Estrutura química Fórmula molecular	Tipo de terpeno Nome químico	Referência
<p>1</p>  <p><math>C_{20}H_{30}O_2</math></p>	<p>Dolastano</p> <p>4<math>\alpha</math>,14<math>\alpha</math>- dihidroxiolasta- 1(15),7,9-trieno</p>	<p>Teixeira; Tomassini (1986)</p>
<p>2</p>  <p><math>C_{22}H_{32}O_3</math></p>	<p>Dolastano</p> <p>4<math>\alpha</math>-acetóxi-14<math>\alpha</math>- hidroxiolasta 1(15),7,9-trieno</p>	<p>Teixeira; Tomassini (1986)</p>
<p>3</p>  <p><math>C_{20}H_{32}O_3</math></p>	<p>Dolastano</p> <p>4<math>\alpha</math>,9<math>\beta</math>,14<math>\alpha</math>- trihidroxiolasta- 1(15),7-dieno</p>	<p>Teixeira; Tomassini (1986)</p>
<p>4</p>  <p><math>C_{22}H_{34}O_4</math></p>	<p>Dolastano</p> <p>4<math>\alpha</math>-acetóxi-9<math>\beta</math>,14<math>\alpha</math>- dihidroxiolasta- 1(15),7-dieno</p>	<p>Teixeira; Tomassini (1986)</p>





15	 <p><math>C_{20}H_{32}O_3</math></p>	<p>Dolastano</p> <p>4<math>\alpha</math>,7<math>\alpha</math>,14<math>\alpha</math>- trihidroxidolasta- 1(15),8-dieno</p>	<p>Vallim et al. (2010)</p>
16	 <p><math>C_{22}H_{32}O_5</math></p>	<p>Dolastano</p> <p>10<math>\beta</math>-acetóxi-8<math>\alpha</math>,9<math>\alpha</math>- epóxi-14<math>\beta</math>-hidroxi- 7-oxodolasta-1(15)- eno</p>	<p>Bianco et al. (2015)</p>
17	 <p><math>C_{20}H_{32}O_3</math></p>	<p>indicol</p>	<p>Bianco et al. (2015)</p>
18	 <p><math>C_{26}H_{38}O_7</math></p>	<p>4<math>\alpha</math>- acetoxiamijidictyol</p>	<p>Bianco et al. (2015)</p>
19	 <p><math>C_{22}H_{32}O_5</math></p>	<p>Oxodolastano</p> <p>4R-acetoxi-8S,9S- epoxi-14S-hidroxi- 7-oxodolastane</p>	<p>Campbell et al. (2017)</p>



Fonte: Autora

### 2.3.2 Atividades biológicas reportadas para *C. cervicornis*

Os organismos marinhos guardam muitas substâncias desconhecidas que atuam na comunicação entre espécie(m)es, na defesa contra herbívoros ou predadores, entre competidores, na reprodução ou simplesmente como produto de seu metabolismo. Uma substância que atua como mediador químico para um organismo pode também vir a se tornar uma possibilidade concreta para o tratamento ou cura de muitas doenças conhecidas (BRASIL, 2010).

Já foram descritas algumas funções para os metabólitos gerados pelas algas, como as relacionadas com aspectos ecológicos, como a defesa contra predadores ou anti-herbivoria (PEREIRA et al., 2002), anti-incrustante (BIANCO, TEIXEIRA, PEREIRA, 2010), também frente a microorganismos patogênicos (ENGEL, JENSEN, FENICAL, 2002). Também foram caracterizadas algumas atividades biológicas: antiviral (BARBOSA et al., 2004; VALLIM et al., 2010), antiprotozoária (SANTOS et al., 2011); antibacteriana (MORALES et al., 2006); antioxidante (ZUBIA et al., 2007) e anticoagulante (MEDEIROS et al., 2008), conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Atividades biológicas relatadas para a espécie *C. cervicornis*

<b>Atividade biológica</b>	<b>Referência</b>
Anti-herbivoria ( <i>Astrea latispina</i> )	Pereira et al., 2002
Anti-herbivoria ( <i>Lytechinus variegatus</i> )	Bianco et al., 2010, Ortiz-Ramírez et al., 2013
Anti-incrustante ( <i>Perna perna</i> )	Bianco et al., 2009
Antioxidante	Costa et al., 2010; Nariyoshi et al., 2013
Antiprotosoária ( <i>Leishmania amazonensis</i> )	Santos et al., 2011
Antiviral (HSV-1)	Vallim et al., 2010
Atividade anticoagulante (via intrínseca e/ou comum) e prolongamento do tempo de coagulação	Camara et al., 2011
Inibição da hemólise e neutralização da coagulação, hemorragia e proteólise causada pelo veneno de <i>Lachesis muta</i>	Moura et al., 2011
Inibição da hemólise e proteólise causada pelo veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	Domingos et al., 2015

Fonte: Autora

## 2.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA

### 2.4.1 Atividade anticoagulante

Uma das principais estratégias para prevenir a formação de trombos sanguíneos em pacientes é a administração de fármacos anticoagulantes, sendo a heparina ainda o mais utilizado na terapêutica (WEITZ e WEITZ, 2010). Apesar dos

benefícios, esse fármaco pode apresentar diversas reações indesejáveis, sendo as mais graves o risco de sangramento e a trombocitopenia tipo II (BEYER et al., 2010); osteopenia e efeito hemorrágico residual também já foram observados (NADER et al., 2004).

A heparina é o fármaco de escolha relacionado com a prevenção de distúrbios tromboembólicos, no entanto os polissacarídeos sulfatados provenientes de algas têm chamado atenção da indústria farmacêutica por prolongar o efeito anticoagulante (ATHUKORALA et al., 2007). Li e colaboradores (2008) extraíram da alga *Ecklonia kurome* um composto fucoidano que consegue inibir a geração de trombina, bloqueando a formação do complexo protrombinase, prevenindo a geração do fator Xa e intensificando a atividade da antitrombina via cofator II da heparina.

Os fucanos também podem atuar de forma indireta no processo de coagulação, promovendo a liberação do TFPI (inibidor do fator tecidual) ou de heparana sulfato (glicosaminoglicano) por células endoteliais (ALMEIDA-LIMA et al., 2010; ROCHA et al., 2005; NADER et al., 2004).

Para *C. cervicornis*, Câmara e colaboradores (2011) relatam atividade anticoagulante (via intrínseca e/ou comum) e prolongamento do tempo de coagulação a partir de heterofucanos isolados de *C. cervicornis*. Leite e colaboradores (1998) também relatam atividade anticoagulante e antitrombótica a partir de fucanos.

## **2.4.2 Atividade antimicrobiana**

A utilização de antibióticos é uma das intervenções terapêuticas mais importantes na história mundial, com relação direta com a redução da morbidade e mortalidade (ANDERSSON e HUGHIES, 2010). Porém, atualmente, há uma grande preocupação com o aumento da resistência das bactérias frente aos antibióticos disponíveis, o que se tornou um grande problema na saúde pública, como o caso da resistência à

penicilina, que iniciou na década de 40, após o seu uso em larga escala (WIESCH et al., 2011).

O aumento de casos de resistência bacteriana aos antibióticos eleva os custos com o paciente, pois aumenta o tempo de internação, além da necessidade de mais consultas médicas, e, possivelmente, de medicamentos mais caros ou até mesmo uso concomitante de diversas classes de antimicrobianos (ALHOMUD et al., 2017, FREITAS, 2006).

Em estudo de Padmakumar e Ayyakkannu (1997, apud PEREZ, FALQUE E DOMINGUEZ, 2016), os autores relatam a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de algas, sendo que 70% deles exibiram atividade antibacteriana e 27,5% apresentaram atividade antifúngica. *S. aureus*, *Vibrio* spp. e *Trichophyton mentagrophytes* foram os mais suscetíveis, enquanto *P. aeruginosa* e *Aspergillus flavus* foram mais resistentes.

Morales et al. (2006) testaram 6 extratos de macroalgas diferentes seus frente a *S. aureus*, *B. subtilis* e *T. mentagrophytes*, resultando em bons resultados para as cepas Gram positivas, porém perante as cepas Gram negativas os extratos apresentaram baixa atividade.

Assim, diante do rápido desenvolvimento de resistência bacteriana e fúngica, há a possibilidade de desenvolvimento de novos fármacos a partir de algas, que possam contribuir para o tratamento de microrganismos já resistentes aos antibióticos convencionais e sejam seguros para o ser humano.

### **2.4.3 Atividade citotóxica**

Câncer é um dos maiores problemas na saúde pública mundial, sendo necessárias pesquisas para o desenvolvimento de novos medicamentos, com maior seletividade para os alvos moleculares de interesse, possibilitando maior eficácia no tratamento e menos danos ao paciente pelos efeitos colaterais.

Nesse âmbito, a indústria PharmaMar, fundada em 1986, teve como objetivo principal a busca de novos protótipos na área oncológica, tendo como objeto de estudo organismos marinhos.

Em 2001, obtiveram o primeiro medicamento anti-câncer a partir de semi-síntese, com a trabectedina (Yondeles), a qual foi aprovada para uso clínico em 2007 para lipossarcoma, tendo uma segunda indicação aprovada em 2009 para o tratamento de câncer de ovário, nos Estados Unidos, pelo *Food and Drug Administration* (FDA).

Segundo dados obtidos na plataforma do Instituto Nacional de Câncer (INCA) (2018), estima-se que cerca de 59.700 novos casos de câncer de mama (o mais frequente entre as mulheres) ocorram entre os anos de 2018-2019. O câncer de colo de útero ocupa o sétimo lugar no *ranking* mundial, sendo o quarto mais comum na população feminina, e são estimados 16.370 novos casos no Brasil para o próximo biênio.

Dados apresentados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que cerca de 8,8 milhões de pessoas morrem ao ano por causa do câncer (OMS, 2017), e que aproximadamente 14 milhões de novos casos são relatados anualmente. Estima-se que os casos aumentem em até 70% até 2038, sendo a maioria dos casos registrados em países de baixa renda, principalmente pela falta de diagnóstico precoce e também pela precariedade ao acesso ao medicamento (OMS, 2018).

A busca constante por novos fármacos para combate aos diversos tipos de câncer é um grande desafio, muitas instituições de pesquisa acreditam nos oceanos como alternativa no desenvolvimento de novos fármacos a partir de organismos marinhos, inspirado principalmente no nucleosídeo isolado por Bergmann e Feeney (que serviram de protótipo para o desenvolvimento de Ara-C e Ara-A na década de 50. As ciências farmacêuticas também contam com a síntese, possibilitando a obtenção de maiores quantidades das moléculas ativas e também com o uso de anticorpos monoclonais para maximização de resultados, como foi o caso do brentuximabe vedotina, citado anteriormente.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Investigar a composição química dos extratos da espécie de alga *Canistrocarpus cervicornis*, proveniente de Atol das Rocas - Rio Grande do Norte.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Isolar e purificar os principais metabólitos secundários presentes no extrato, utilizando métodos cromatográficos;
- ✓ Identificar/elucidar a estrutura química das substâncias isoladas através de técnicas espectroscópicas.
- ✓ Investigar as substâncias isoladas para avaliar atividade biológica anticoagulante, antimicrobiana e citotóxica.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todo o processo de investigação fitoquímica foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais do CIF/CCS/UFSC, incluindo os experimentos de extração, fracionamento, isolamento, purificação e identificação dos compostos. As análises de atividade biológica foram realizadas em parceria com a professora Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Rabello de Moraes (atividade anticoagulante), da Universidade Federal de Santa Catarina, com a Dr<sup>a</sup>. Marcia Regina Franzolin (atividade antibacteriana) do Instituto Butantan, São Paulo, e professor Dr. Diego Wilke (atividade citotóxica) da Universidade Federal do Ceará.

### 4.1 ESPECIFICAÇÕES DOS REAGENTES E EQUIPAMENTOS

#### 4.1.1 Equipamentos

Para concentrar os extratos e frações obtidas, foi utilizado rotaevaporador Büchi<sup>®</sup> modelo R-210 sob pressão reduzida e banho em temperatura controlada (até 40 °C).

Na etapa de fracionamento cromatográfico por cromatografia líquida de média pressão (CLMP) foi utilizado sistema Sepacore/Syncore<sup>®</sup> da marca Büchi. Para cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizado cromatógrafo modelo Shimadzu SPD-10AV equipado com detector de ultravioleta SCL-10A.

Para revelação das placas de cromatografia em camada delgada (CCD) com indicador de fluorescência foi utilizada a câmara de luz ultravioleta (UV) da marca Prodicil, modelo VA 50.

Foram também utilizadas balanças de alta precisão das marcas Katashi e Ohaus<sup>®</sup>.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, e os mapas de correlação HSQC, HMBC e COSY

foram obtidos em equipamento Bruker, modelo Fourier 300 MHz.

#### **4.1.2 Métodos cromatográficos, solventes e reagentes aplicados**

Os solventes utilizados para análise química foram hexano, ciclohexano, acetato de etila, metanol, clorofórmio, de grau analítico (para extração e fracionamento cromatográfico gravimétrico ou por média pressão) ou HPLC, de procedência Lafan<sup>®</sup>, Neon<sup>®</sup> ou Vetec<sup>®</sup>.

No processo de avaliação das amostras em cromatografia em camada delgada (CCD), foram utilizadas cromatoplasas de alumínio com gel de sílica 60 F254 da marca Sigma Aldrich<sup>®</sup>, com indicador de fluorescência em 254 nm. Utilizou-se como agente revelador (cromogênico) solução de anisaldeído-sulfúrico, preparada com reagentes de grau analítico (0,5 mL de anisaldeído; 10,0 mL de ácido acético glacial; 85,0 mL de etanol; 5,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado), seguido de aquecimento das placas por alguns segundos em altas temperaturas.

Para etapa de fracionamento cromatográfico foram utilizados métodos de adsorção: cromatografia líquida a vácuo (CLV), cromatografia em coluna aberta (CCA), Sepacore/Syncore<sup>®</sup> sílica gel 60 de procedência Vetec<sup>®</sup> como fase estacionária, com granulometria na faixa de 0,040-0,063 mm (230-400 mesh). Para purificação por cromatografia de permeação em gel (exclusão por tamanho de partícula), foi utilizada resina Sephadex<sup>®</sup> LH20 como fase estacionária. Na extração em fase sólida (EFS) foi utilizado cartucho Chromafix<sup>®</sup> da marca Macherey-Nagel e seringa preenchida com gel de sílica 60. Para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada coluna de fase normal Supelcosil 25 cm x 10 mm, 5 µm e cromatógrafo com detector por absorção de Ultravioleta modelo Shimadzu SPD-10AV e SCL-10A.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos utilizando solventes deuterados: clorofórmio

deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e benzeno deuterado ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ), ambos da marca *Cambridge Isotope Laboratories*.

#### 4.1.3 Análise instrumental

As estruturas das substâncias isoladas foram determinadas a partir dos dados obtidos por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , e os mapas de correlação HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) e COSY (*Correlation Spectroscopy*).

Os dados adquiridos (FID – *Free Induction Decay*) foram processados no programa *TopSpin* (3.5pl 7), sendo utilizado com padrão interno de referência o TMS - tetrametilsilano ( $\delta = 0$  ppm) e os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos por ppm (partes por milhão). Para a multiplicidade dos sinais foram adotadas a convenção vigente, e a constante de acoplamento ( $J$ ) expressa em Hertz (Hz).

A identificação estrutural das substâncias isoladas foi confirmada por comparação dos dados obtidos com os já descritos na literatura.

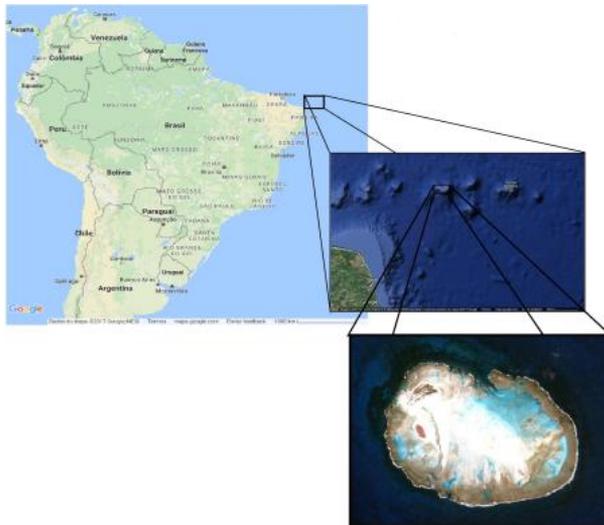
## 4.2 MATÉRIA PRIMA VEGETAL

O material selecionado para investigação, *Canistrocarpus cervicornis*, foi coletado em março de 2015, no litoral do Rio Grande do Norte a 260 km a nordeste de Natal, no Atol das Rocas (coordenadas -3.862559, -33.802187) (Figura 4), pela equipe do projeto PropecMar-Ilhas.

A conservação do material foi feita em água do mar, sendo posteriormente removidas epífitas e outros organismos. O material limpo e triado foi submetido a secagem sob ar frio, sendo confeccionada uma exsicata que foi encaminhada para o Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR0063021).

Figura 4. a) Local de coleta de *C. cervicornis* utilizada para a investigação química; b) Aspecto da alga *C. cervicornis*

a) Atol das Rocas - RN



b) *C. cervicornis*



Fonte: a) Google Earth™; b) GUIRY e GUIRY, 2017.

### 4.3 EXTRAÇÃO

Nesse processo foram realizadas sucessivas macerações de todas as partes da alga, com solvente diclorometano: metanol na proporção 2:1, em temperatura ambiente, por um período de sete dias. Os extratos obtidos foram reunidos e concentrados em rotaevaporador a temperatura inferior a 40 °C.

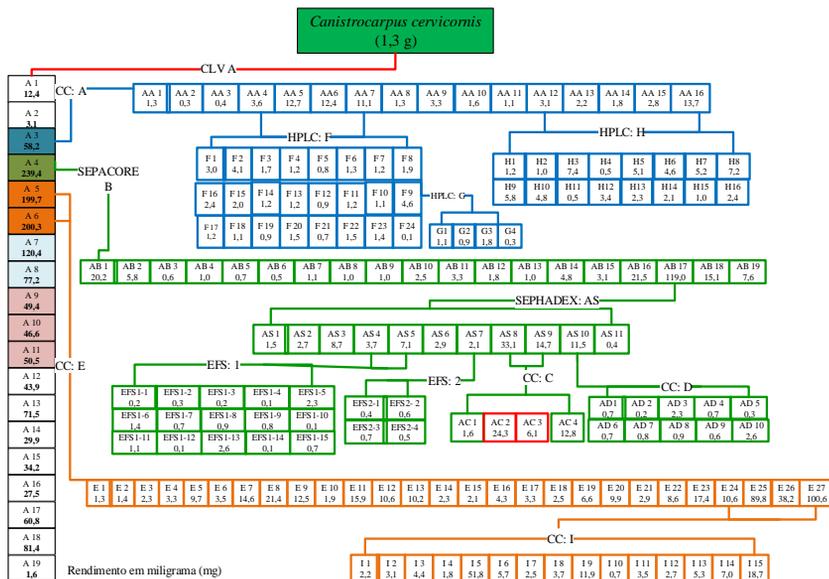
### 4.4 FRACIONAMENTO

O fracionamento do extrato bruto e frações foi realizado através de sucessivas separações cromatográficas sobre gel de sílica 60 e eluição realizada por gradiente, com eluentes de polaridade crescente. A cada fracionamento, as frações foram submetidas a análise cromatográfica por CCD e, para as frações consideradas promissoras, também por espectroscopia de RMN de hidrogênio, para verificar viabilidade de continuidade do fracionamento em função do rendimento e complexidade da amostra.

Para reunir as frações, foram avaliadas as semelhanças de perfil cromatográfico na CCD e as frações foram nomeadas por letras seguidas de números, em que a letra representa o nome da coluna e o número, o intervalo das frações.

A Figura 5 apresenta um fluxograma resumindo os procedimentos cromatográficos realizados com o extrato da espécie *C. cervicornis* que levaram aos compostos isolados.

Figura 5. Fluxograma resumindo os procedimentos cromatográficos que resultaram em compostos isolados a partir do extrato da espécie *C. cervicornis*. Rendimentos das frações estão expressos em miligramas.



Fonte: Autora

#### 4.4.1 Fracionamento preliminar do extrato de *Canistrocarpus cervicornis*: CLV (A)

O fracionamento por CLV foi realizado a partir de 1,3 g do extrato bruto, empregando gradiente crescente de polaridade com solventes hexano e acetato de etila (Tabela 6). Foram coletadas 19 frações, sendo cada uma coletada em frasco separado e posteriormente submetida a rotaevaporação. As frações consideradas mais promissoras foram selecionadas para dar continuidade ao fracionamento.

Tabela 6. Esquema de solventes utilizados na CLV: Coluna A

Fase móvel	Volume (mL)	Frações
Hex 100%	300	A 1
Hex 95 : 5 AcOEt	200	A 2
Hex 9 : 1 AcOEt	100	A 3
Hex 85 : 15 AcOEt	100	A 4
Hex 8 : 2 AcOEt	100	A 5
Hex 8 : 2 AcOEt	100	A 6
Hex 75 : 25 AcOEt	100	A 7
Hex 7 : 3 AcOEt	100	A 8
Hex 7 : 3 AcOEt	100	A 9
Hex 65 : 35 AcOEt	100	A 10
Hex 6 : 4 AcOEt	100	A 11
Hex 6 : 4 AcOEt	100	A 12
Hex 1 : 1 AcOEt	2x100	A 13
Hex 3 : 7 AcOEt	100	A 14
Hex 2 : 8 AcOEt	100	A 15
AcOEt 100%	100	A 16
AcOEt 1 : 1 MeOH	100	A 17
MeOH 100%	100	A 18
MeOH 1 : 1 H <sub>2</sub> O	100	A 19

Fonte: Autora

#### 4.4.2 Fracionamento: Coluna AA

A fração A3 obtida a partir da CLV-A na quantidade de 58,2 mg foi submetida a separação cromatográfica em coluna com sílica gel 60 (Coluna AA) de 25 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, com fluxo de 3 mL por minuto. Utilizaram-se como fases móveis proporções diversas de ciclohexano e acetato de etila (Tabela 7), obtendo-se 104 frações (5 mL aproximadamente), as quais foram agrupadas conforme semelhança do perfil cromatográfico em CCD, totalizando 16 frações reunidas. Realizou-se uma nova CCD com as frações reunidas, o que permitiu reagrupar as frações AA5, AA6 e AA7, cuja associação foi denominada como AA5'.

Tabela 7. Esquema de solventes utilizados na Coluna AA

Frações	Fase móvel	Volume (mL)
1-10	cHex 100%	50 qsp
11-58	cHex 98 : 2 AcOEt	200
59-71	cHex 97 : 3 AcOEt	50
72-92	cHex 95 : 5 AcOEt	100
93-104	AcOEt 100%	50

Fonte: Autora

#### 4.4.3 Fracionamento: Coluna AB

Para fracionamento da fração A4 (239,4 mg) foi utilizada cromatografia de média pressão em sistema Sepacore/Syncore®, por conta da complexidade da amostra e também da sua quantidade. O gradiente de solventes utilizado está apresentado na Tabela 8, o fluxo foi de 8 mL/min, resultando em 125 frações de 5 mL. Após avaliação por CCD, foram reunidas as de características semelhantes, originando 19 frações.

Tabela 8. Esquema de eluentes utilizados na Coluna AB

<b>Fase móvel</b>	<b>Tempo (minutos)</b>
Hexano 100%	10
Hex 98 : 2 AcOEt	10
Hex 97 : 3 AcOEt	100
Hex 95 : 5 AcOEt	20
AcOEt 100%	40

Fonte: Autora

#### 4.4.4 Fracionamento: Coluna AS1

A fração AB17 (119,0 mg) advinda da coluna AB foi submetida a separação por Sephadex LH20 em diclorometano 100%, resultando em 28 frações de 5 mL que, após avaliação por CCD foram reunidas, resultando em 11 frações denominadas AS.

#### 4.4.5 Fracionamento: Coluna EFS1

Foram reunidas as frações AS1-4 e AS1-5, advindas da coluna AS-1, pela semelhança apresentada em CCD, totalizado 10,8 mg. A fração foi submetida a extração em fase sólida (EFS), com gradiente de solventes conforme apresentado na Tabela 9. No total, foram obtidas 15 frações de 3 mL cada.

Tabela 9. Esquema de eluentes utilizados na Coluna EFS1

<b>Fase móvel</b>	<b>Frações</b>
Hex 100%	1-3
Hex 95 : 5 AcOEt	4-6
Hex 93 : 7 AcOEt	7-9
Hex 9 : 1 AcOEt	10 – 12
AcOEt 100%	13– 15

Fonte: Autora

#### 4.4.6 Fracionamento: EFS2

A amostra AS1-7 (2,1 mg) foi submetida a extração em fase sólida totalizando 4 frações de 3 mL cada (Tabela 10).

Tabela 10. Esquema de solventes utilizados na Coluna EFS1

<b>Fase móvel</b>	<b>Frações</b>
Hexano 100%	1
Hexano 95 : 5 Acetato de etila	2
Hexano 9 : 1 Acetato de etila	3
AcOEt 100%	4

Fonte: Autora

#### 4.4.7 Fracionamento: Coluna AC

As frações AS1-8 e AS1-9 foram unidas (47,8 mg) e submetidas a coluna gravimétrica sobre gel de sílica conforme gradiente de solventes apresentado na Tabela 11. A altura da coluna foi de 23 cm e diâmetro de 2 cm, com fluxo 0,9mL/min, totalizando 138 frações de 4 mL cada; após análise em CCD foram reagrupadas em 4 frações.

Tabela 11. Esquema de solventes utilizados na Coluna AC

<b>Frações</b>	<b>Fase móvel</b>	<b>Volume (mL)</b>
1 -2	Hex 100%	50 qsp
3 – 119	Hex 9: 1 AcOEt	450
120 -133	Hex 8 : 2 AcOEt	50
134 – 138	AcOEt 100%	50

Fonte: Autora

#### 4.4.8 Fracionamento: Coluna AD

A fração AS1-10 (11,5 mg) foi submetida a separação em coluna gravimétrica sobre gel de sílica, em coluna com 11 cm de altura, 1,5 cm de diâmetro, fluxo de 0,5 mL/min, seguindo o

gradiente de solventes conforme a Tabela 12, totalizando 47 frações de 3 mL; após análise em CCD, foram reunidas em 10 frações.

Tabela 12. Esquema de solventes utilizados na Coluna AD

Frações	Fase móvel	Volume (mL)
1 -2	Hex 100%	20
3 – 40	Hex 8 : 2 AcOEt	100
41 – 47	AcOEt 100%	20

Fonte: Autora

#### 4.4.9 Fracionamento: Coluna E

As frações da CLV-A 5 e 6 foram reunidas pela semelhança, avaliada por CCD e espectros de RMN. Esta amostra (400 mg) foi aplicada em coluna gravimétrica com gel de sílica, em coluna com 2,5 cm de diâmetro, 24 cm de altura e fluxo de 1,6 mL/min, utilizando gradiente de solventes conforme apresentado na Tabela 13.

Tabela 13. Esquema de solventes utilizados na Coluna E

Frações	Fase móvel	Volume (mL)
1 – 100	98:2	500
101 – 175	Hex 96 : 4 AcOEt	300
176 - 230	Hex 95 : 5 AcOEt	300
231 – 280	Hex 94 : 6 AcOEt	300
281 – 304	Hex 8 : 2 AcOEt	200
305	AcOEt 100%	100
306	MeOH 100%	160

Fonte: Autora

#### 4.4.10 Fracionamento por CLAE “F”

Após junção, as frações que originaram a AA5' (30 mg) foram submetidas a CLAE utilizando cHexano: acetato de etila 97:3, originando 23 novas frações denominadas F.

#### 4.4.11 Fracionamento por CLAE “G”

A fração F9 (4,6mg) foi submetida a CLAE utilizando um sistema de solvente de cHexano: acetato de etila 95:5, originando 4 novas frações denominadas G.

#### 4.4.12 Fracionamento por CLAE “H”

A junção das frações AA12-AA16 (23,6mg) foi submetida a CLAE utilizando um sistema de solvente de cHexano: acetato de etila 93:7, originando 16 novas frações denominadas de H.

#### 4.4.13 Fracionamento: Coluna I

A união das amostras E24-E27 (20 0mg) foi submetida ao fracionamento em coluna gravimétrica de gel de sílica 60, com 25 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro. Manteve-se um fluxo de 1 mL/min e coletaram-se 5 mL em cada fração. Foram utilizados como eluentes clorofórmio: metanol em diferentes proporções conforme Tabela 14.

Tabela 14. Esquema de solventes utilizados na Coluna I

Frações	Fase móvel	Volume (mL)
1-10	CHCl <sub>3</sub> 100%	60
11-33	CHCl <sub>3</sub> 99 : 1 MeOH	100
34-59	CHCl <sub>3</sub> 98 : 2 MeOH	100
60-72	CHCl <sub>3</sub> 97 : 3 MeOH	50
73-82	CHCl <sub>3</sub> 96 : 4MeOH	50
83- 97	CHCl <sub>3</sub> 95 : 5 MeOH	50
98-105	CHCl <sub>3</sub> 94 : 6 MeOH	50
106-109	CHCl <sub>3</sub> 93 : 7 MeOH	50
110-122	MeOH 100%	50

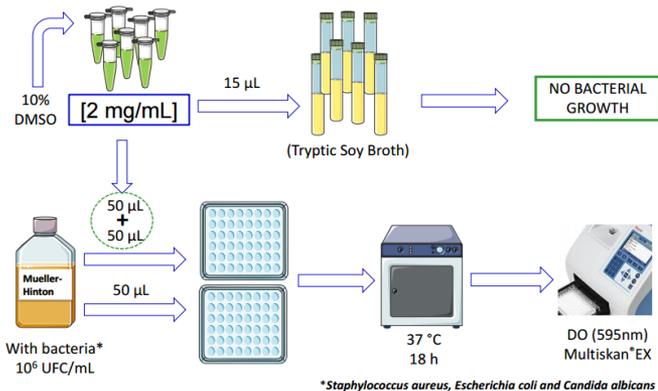
Fonte: Autora

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A investigação antimicrobiana foi realizada em parceria com a professora Dr<sup>a</sup>. Marcia Regina Franzolin, do Instituto Butantan, USP/SP. A metodologia aplicada na avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de *C. cervicornis* frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 90112 foi a de microdiluição em caldo em placas de ELISA de 96 poços de fundo chato (Figura 6).

Foram colocados 50  $\mu$ L dos extratos na concentração de 2 mg/mL por poço e em seguida foram adicionados 50  $\mu$ L de Caldo Müller-Hinton contendo  $10^6$  bactérias. Dessa maneira a concentração final do extrato testado foi de 1 mg/mL e das bactérias de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Após aplicação, a placa foi vedada e incubada a 37°C por 18 horas e, em seguida, foram realizadas as leituras das densidades ópticas (DO) a 595 nm em leitor de ELISA Multiskan<sup>®</sup>EX (Thermo Fisher Scientific, EUA) para avaliação da atividade antimicrobiana. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do crescimento microbiano, observados através da comparação do valor da DO das amostras com o controle, que foi preparado da mesma forma que os testes, porém sem adição de extratos.

Figura 6. Esquema da metodologia aplicada na avaliação da atividade antimicrobiana.



Fonte: Autora

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

Os testes de atividade citotóxica foram realizados em parceria com o professor Dr. Diego Wilke, do laboratório LaBBMar-UFC/CE. A metodologia aplicada na avaliação da atividade citotóxica foi o teste do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio]}, teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular. O princípio do teste está associado a mensuração da absorbância da formazana gerada após metabolização do sal de MTT pelas células tumorais viáveis (MOSMANN, 1983).

Células tumorais de adenocarcinoma de cólon (HCT-116) cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco modification of Minimum Essential Media*) suplementado com 10% de soro fetal bovino foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas com as amostras por 72 horas. Ao final, o sal de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado e a absorbância mensurada a 595 nm. A triagem inicial foi realizada utilizando concentração de 50 µg/mL das amostras para avaliar a porcentagem de inibição do crescimento da célula tumoral (%GI). Para amostras que demonstraram inibição maior que 75%, o valor de CI<sub>50</sub> foi

calculado por regressão não linear utilizando o GraphPad Prism 5.1 (Intuitive Software for Science).

## 4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

### 4.7.1 Coagulação sanguínea

O estudo de coagulação foi realizado de acordo com Triplett, Harms e Koepke (1978) utilizando-se coagulômetro semi-automatizado (CLOTimer, Quick Timer). Para os ensaios de coagulação, foi utilizado um *pool* de plasma pobre em plaquetas (PPP). Para a obtenção do *pool* de PPP, as amostras de sangue anticoagulado com citrato de sódio 0,38% foram centrifugadas a  $1 \times 10^7$  g por 15 minutos à temperatura de 8°C. Após a centrifugação, o sobrenadante (PPP) de todos os tubos foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL. Para a realização dos ensaios, 100 µL do *pool* de PPP foram incubados a 37 °C por 5 minutos com 10 µL de extrato bruto de alga ou de veículo de dissolução (DMSO 0,7 % concentração final) e, em seguida, foram realizados os testes de tempo de protrombina (TP) ou de tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) conforme a bula do kit HemosIL® (Instrumentation Laboratory, Massachusetts, EUA).

### 4.7.2 Agregação plaquetária

A agregação plaquetária foi avaliada de acordo com Born e Cross (1963), utilizando-se um agregômetro semi-automatizado (AgreGO, Qualitem). Depois de coletadas as amostras de sangue total, as plaquetas foram isoladas através de centrifugação do sangue citratado a 123 g por 10 minutos à temperatura ambiente para a obtenção do *pool* de plasma rico em plaquetas (PRP). As plaquetas foram contadas em câmara de Neubauer e reajustadas com PBS para 250.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> e foi utilizada a epinefrina (Hipolabor, Minas Gerais, BR) como agonista. Para avaliar os efeitos dos extratos brutos, frações e compostos sobre a agregação plaquetária, 400 µL do *pool* de

PRP foram incubados a 37 °C por 5 minutos com 10 µL de extrato bruto, de frações de extrato bruto, de composto ou de veículo de dissolução (DMSO 0,6 % concentração final). A seguir, as amostras foram estimuladas individualmente com epinefrina (6 µM) e a agregação foi acompanhada por 5 minutos. Para acertar a linha de base de turbidez da amostra, utilizou-se o PPP obtido pela centrifugação das amostras de sangue citratado a  $1 \times 10^7$  g por 15 minutos à temperatura de 8 °C.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DA ALGA

#### *Canistrocarpus cervicornis* PROVENIENTE DO ATOL DAS ROCAS.

Foram obtidos três extratos (A-azul, B-vermelho e C-verde) provenientes do Atol das Rocas. Todos os materiais foram coletados na mesma expedição, em março de 2015. Trabalhados de maneira independentes para aquisição do extrato. Seguindo análise em CCD e  $^1\text{H}$  RMN, para selecionar o extrato, seguindo fracionamento cromatográfico, selecionado por maior diversidade de sinais CC.AT1-3 (C-verde).

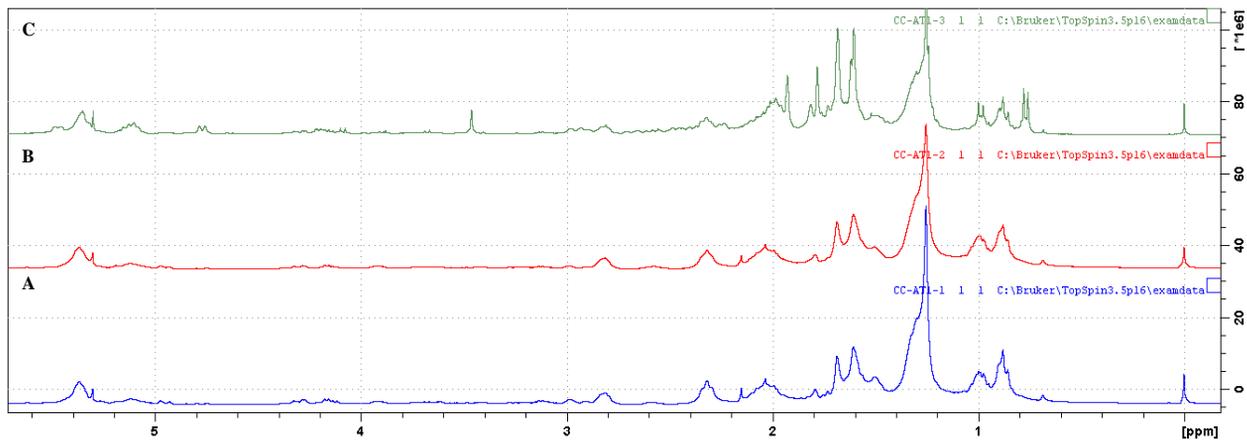
Em avaliação em CCD os perfis cromatográficos se mostraram bastante semelhantes, ao ponto que foi necessário avaliar também o perfil dos extratos pela análise do espectro de  $^1\text{H}$  RMN, o qual está representado na Figura 7. Os conjuntos de sinais apresentados pelos extratos A e B foram bastante similares, com sinais na região entre 1-2 ppm, característicos de metilas. Entretanto, a maior diversidade de sinais levou à escolha para investigação do extrato C, apresentando uma metila (dubleto), sinal em 3,55 ppm e hidrogênios olefínicos, considerando o conjunto de sinais distintos daqueles encontrados na literatura.

O fracionamento do extrato C da alga *C. cervicornis* (1,3 g) proveniente do Atol das Rocas está representado na Figura 8, assim como valores de rendimentos das frações obtidas, expressa em miligramas (mg).

Foram realizadas as seguintes técnicas cromatográficas: CLV (1), coluna em sílica gel (5), Sepacore (1), Sephadex LH20 (1), extração em fase sólida (2) e CLAE (3), obtendo como resultado duas substâncias puras, denominadas CS-6 e CS-7.

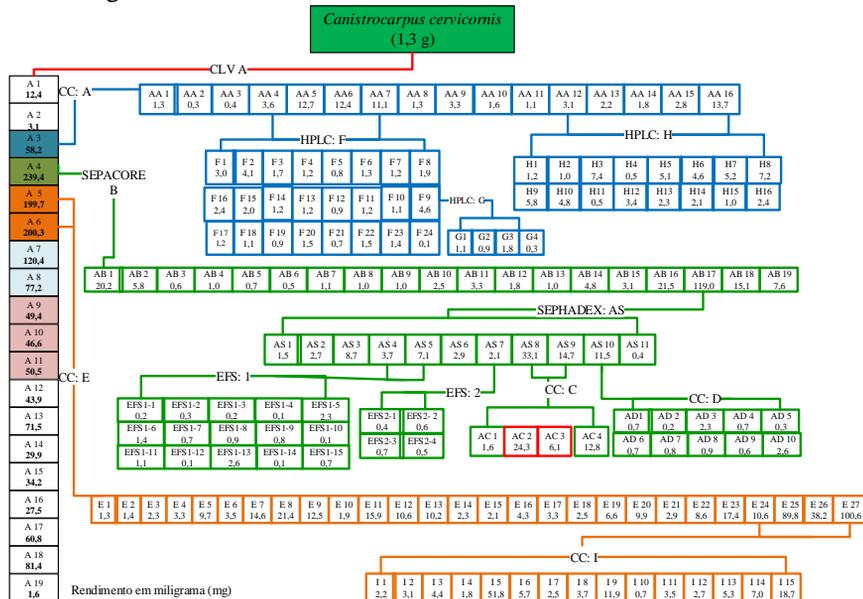
As substâncias isoladas foram identificadas como terpenos inéditos para a espécie.

Figura 7. Espectros de  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) dos extratos provenientes do Atol das Rocas, março de 2015. Extratos A, B e C estão representados, respectivamente, em azul, vermelho e verde.



Fonte: Autora

Figura 8. Esquema geral do fracionamento cromatográfico de *C. cervicornis*. Rendimentos das frações estão expressos em miligramas.



Fonte: Autora

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA ISOLADA CS-6

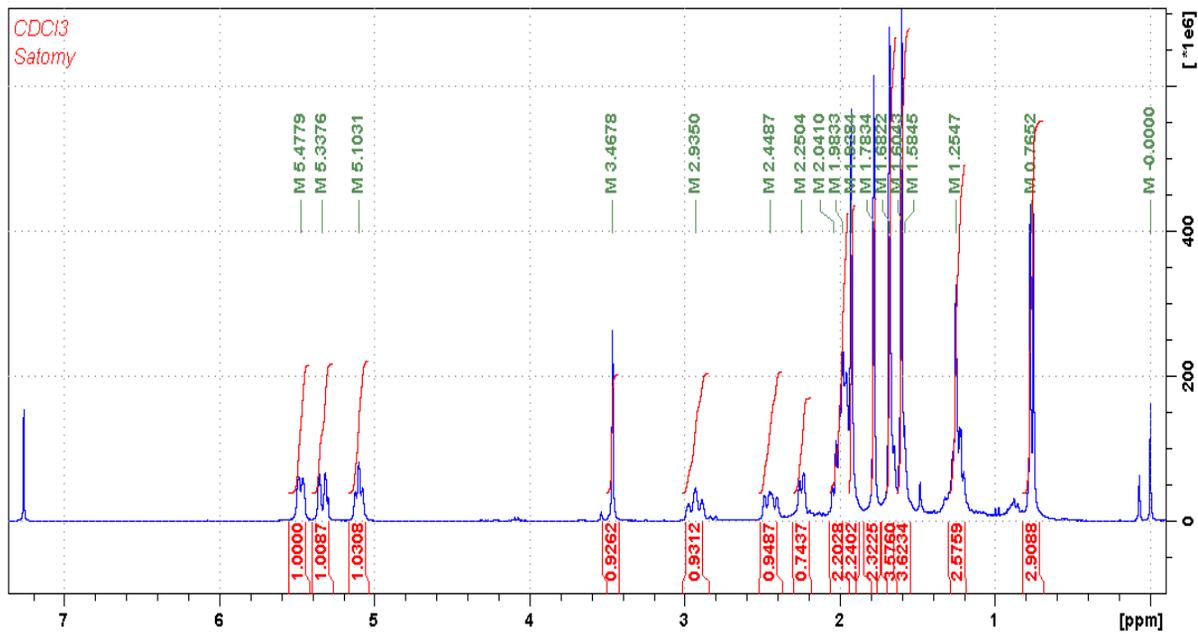
A substância CS-6 (24,3 mg) foi obtida na fração AC2 (coluna com sílica gel), como uma substância que apresenta extinção de fluorescência em 254 nm e não apresenta fluorescência em 366 nm. Apresentou Rf igual a 0,45 na CCD usando hexano: acetato de etila (8:2 v/v); após revelação com anisaldeído-sulfúrico adquire cor roxa, ficando marrom após algum tempo.

O espectro de  $^1\text{H}$  RMN (Figura 9) sugeriu tratar-se de um terpeno, pelos sinais de hidrogênios metílicos (5  $\text{CH}_3$ ) em  $\delta_{\text{H}}$  0,76 (d,  $J=6,7$ ),  $\delta_{\text{H}}$  1,60 (s),  $\delta_{\text{H}}$  1,78 (s),  $\delta_{\text{H}}$  1,93 (s),  $\delta_{\text{H}}$  1,98 (m). Destacaram-se ainda os hidrogênios olefínicos (3), ressonando em  $\delta_{\text{H}}$  5,47 (dd,  $J=6,91/1,84$ ),  $\delta_{\text{H}}$  5,38 (d,  $J=11,15$ ) e  $\delta_{\text{H}}$  5,10 (ddd,  $J=6,95$ ).

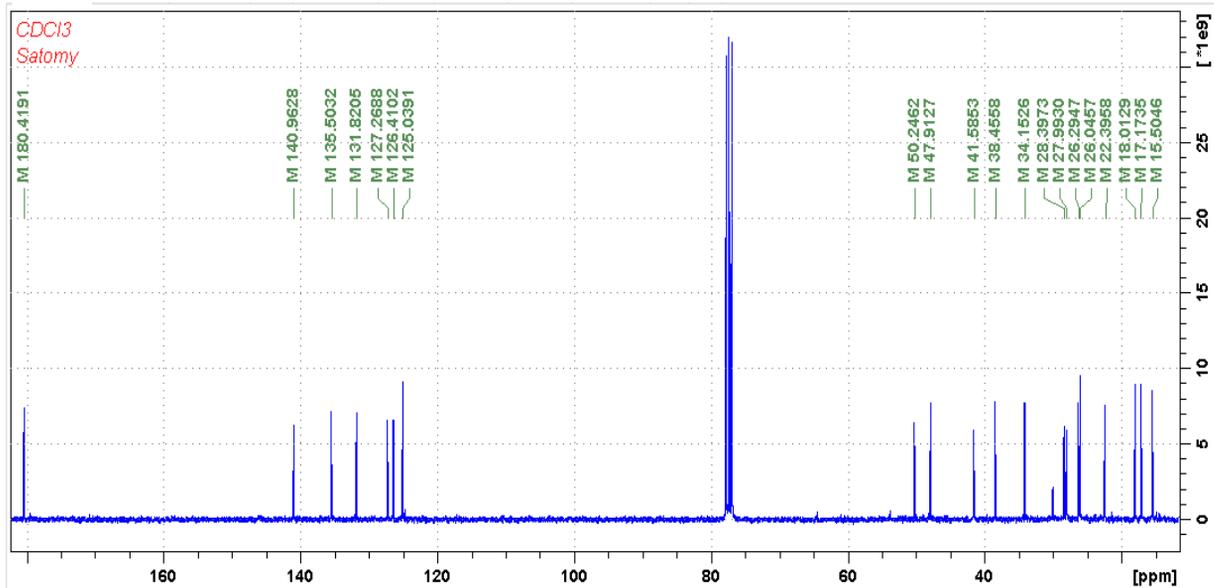
O espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (Figura 10) apontou a presença de 20 átomos de carbono, sendo que com auxílio do mapa de correlação HSQC (Figura 11) foi possível identificar o tipo de carbono, bem como a sua conectividade. Em ordem do mais blindado para o menos blindado, estão dispostos da seguinte maneira: carbonila (1  $\text{C}=\text{O}$ )  $\delta_{\text{C}}$  180,4; carbonos olefínicos (3  $\text{HC}=\text{C}$ )  $\delta_{\text{C}}$  140,9,  $\delta_{\text{C}}$  135,5,  $\delta_{\text{C}}$  131,8,  $\delta_{\text{C}}$  127,3,  $\delta_{\text{C}}$  126,4,  $\delta_{\text{C}}$  125,0; metinos alifáticos (2  $\text{CH}$ )  $\delta_{\text{C}}$  50,2,  $\delta_{\text{C}}$  34,1; metilenos alifáticos (6  $\text{CH}_2$ )  $\delta_{\text{C}}$  41,6,  $\delta_{\text{C}}$  38,5,  $\delta_{\text{C}}$  30,0,  $\delta_{\text{C}}$  28,4,  $\delta_{\text{C}}$  28,0,  $\delta_{\text{C}}$  26,3; metilas (5  $\text{CH}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  26,0,  $\delta_{\text{C}}$  22,4,  $\delta_{\text{C}}$  18,0,  $\delta_{\text{C}}$  17,1 e  $\delta_{\text{C}}$  15,49.

A partir do conjunto de dados espectrais foi realizada uma pesquisa na base de dados Marinlit<sup>®</sup>, a qual possui compilados dados de metabólitos de origem marinha, porém para CS6 a busca não apontou nenhuma hipótese de compostos conhecidos. Dessa maneira, prosseguiu-se a elucidação estrutural, com o auxílio dos mapas de correlação HMBC (Figura 12) e COSY (Figura 13). Os dados espectrais dos experimentos bidimensionais viabilizaram a proposição de estruturas parciais (Figura 14, 15 e 16) que, combinadas, possibilitaram a identificação estrutural do composto (Figura 17).

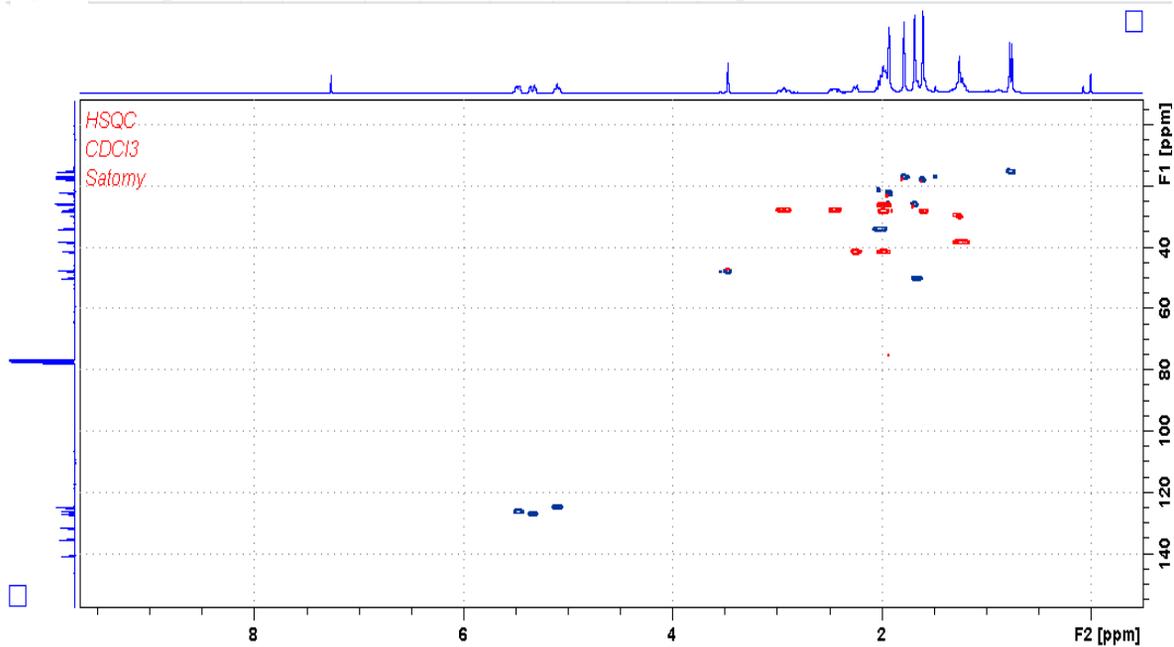
Figura 9. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto CS-6.



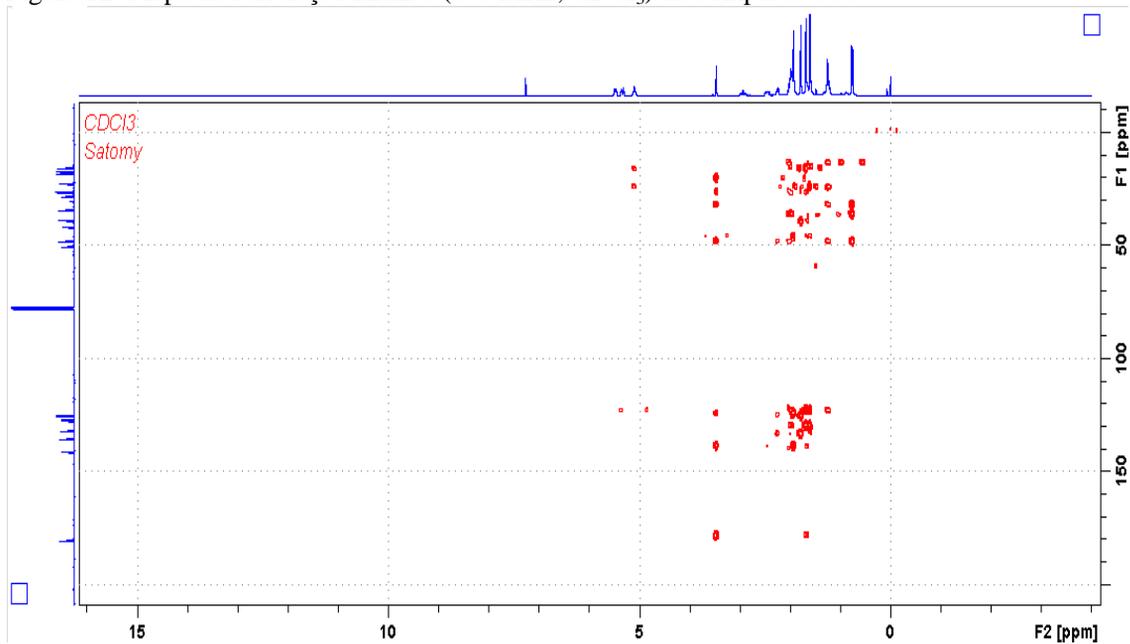
Fonte: Autora

Figura 10. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto CS-6.

Fonte: Autora

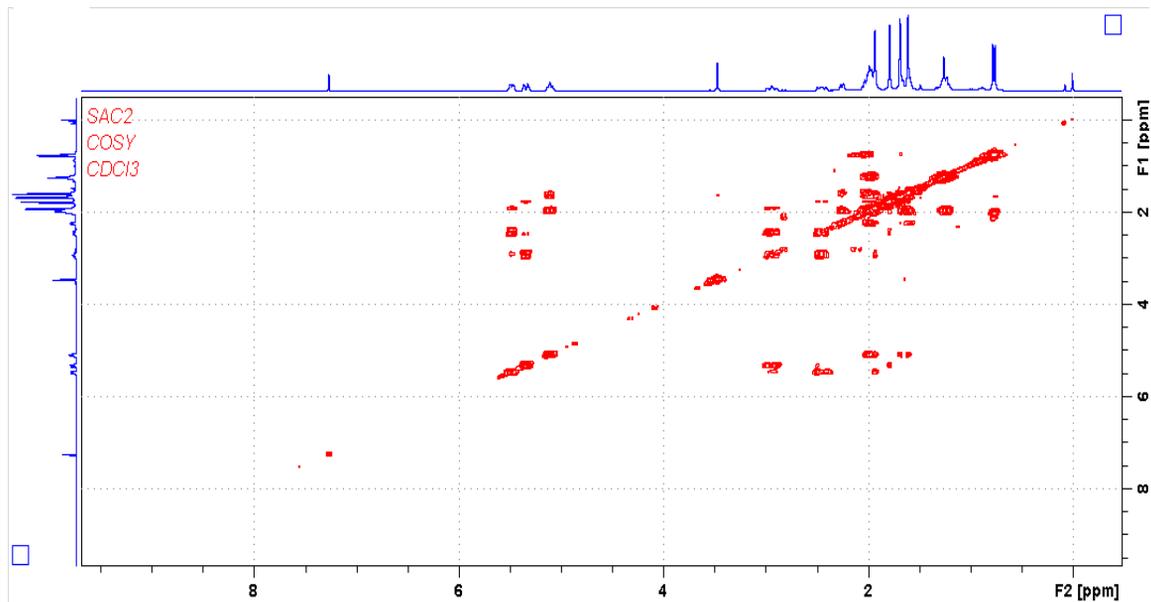
Figura 11. Mapa de correlação HSQC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto CS-6.

Fonte: Autora

Figura 12. Mapa de correlação HMBC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto CS6.

Fonte: Autora

Figura 13. Mapa de correlação COSY (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto CS-6.

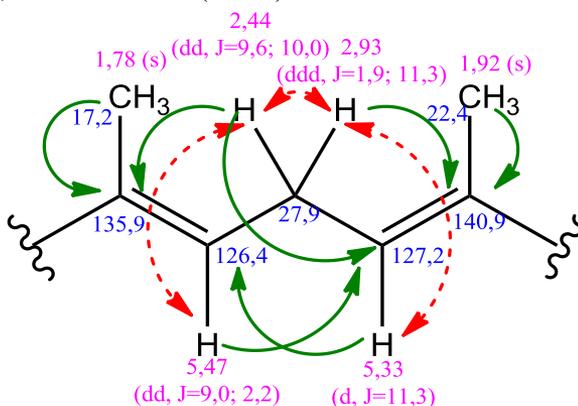


Fonte: Autora

A primeira estrutura parcial proposta (Figura 14) contém dois dos hidrogênios olefínicos; considerando as constantes de acoplamento é possível considerar o acoplamento vicinal do hidrogênio ressonando em  $\delta_{\text{H}} 5,47$  com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 2,44$ , assim como do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 5,33$  com o hidrogênio  $\delta_{\text{H}} 2,93$ . Também foram identificadas correlações  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  entre:  $\delta_{\text{H}} 5,33$  e  $\delta_{\text{H}} 2,93$ ;  $\delta_{\text{H}} 5,47$  e  $\delta_{\text{H}} 2,44$ .

As metilas em  $\delta_{\text{H}} 1,92$  e  $\delta_{\text{H}} 1,78$  apresentam-se como simpleto e não apresentaram COSY, sugerindo estarem conectadas com carbonos quaternários. Com dados adicionais das correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a longa distância, foi possível evidenciar algumas correlações do hidrogênio que ressona em  $\delta_{\text{H}} 5,47$  com os átomos de carbono ressonando em:  $\delta_{\text{C}} 127,2$ ;  $\delta_{\text{C}} 47,9$ ;  $\delta_{\text{C}} 22,4$ ; também do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 5,33$ , com o carbonos em:  $\delta_{\text{C}} 17,2$ ;  $\delta_{\text{C}} 41,6$ ; ainda, do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 1,78$  com o carbono em:  $\delta_{\text{C}} 135,9$ ; do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 1,92$  com o carbono  $\delta_{\text{C}} 140,9$ ; do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 2,44$  com os carbonos em  $\delta_{\text{C}} 135,9$ ;  $\delta_{\text{C}} 140,8$ ;  $\delta_{\text{C}} 127,2$ ;  $\delta_{\text{C}} 50,2$  e finalmente do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 2,93$  com o carbono  $\delta_{\text{C}} 140,9$ .

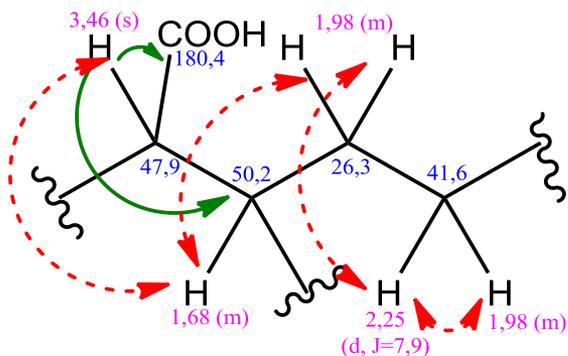
Figura 14. Primeira estrutura parcial proposta para CS-6. Setas vermelhas representam correlações homonucleares (H x H) e verdes, heteronucleares (C x H).



Fonte: Autora

A segunda estrutura parcial (Figura 15) inclui a carbonila de ácido carboxílico com deslocamento químico  $\delta_c$  180,4, tendo um carbono vizinho com deslocamento químico em  $\delta_c$  47,9 acoplado ao hidrogênio  $\delta_H$  3,46.

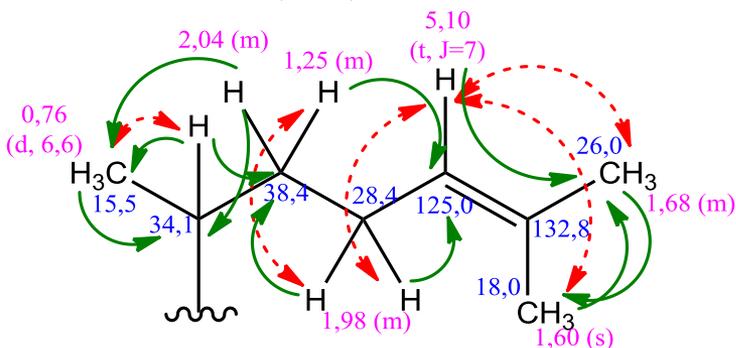
Figura 15. Segunda estrutura parcial proposta para CS-6. Setas vermelhas representam correlações homonucleares (H x H) e verdes, heteronucleares (C x H).



Fonte: Autora

As correlações a longa distância  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no mapa de correlação HMBC permitiram estabelecer a conectividade entre os átomos de mais uma parte da molécula (Figura 16).

Figura 16. Terceira estrutura parcial proposta para CS-6. Setas vermelhas representam correlações homonucleares (H x H) e verdes, heteronucleares (C x H).



Fonte: Autora

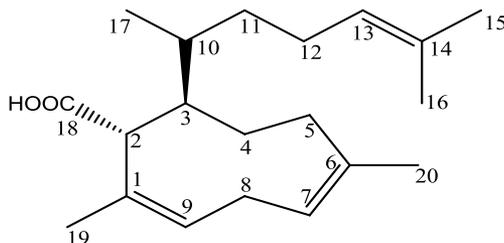
Reunindo as informações obtidas com os mapas de correlações, representadas na Figura 14, 15 e 16, combinando as estruturas parciais foi possível propor a estrutura do composto CS-6 como sendo a substância representada na Figura 17.

A mesma estrutura química proposta para CS-6 foi descrita pelos pesquisadores Schlenk e Gerwick, em 1986, como de um composto inédito na época, que foi nomeado ácido dilófico, em alusão a origem do composto, obtido da alga parda *Dilophus guineensis*, da ordem Dictyotales. Os solventes usados por aqueles autores para extração foram clorofórmio: metanol, sendo o extrato metanólico escolhido para prosseguir o fracionamento, e para obtenção dos dados espectroscópicos foi utilizado equipamento de 400 MHz e benzeno-d<sub>6</sub> como solvente (SCHLENK; GERWICK, 1986).

Os dados espectroscópicos obtidos inicialmente para CS-6 foram como solvente CDCl<sub>3</sub>-d, sendo obtidos novos espectros de RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H em benzeno deuterado, apresentados na Tabela 15, para fins de comparação com os dados da literatura.

A alga investigada por aqueles autores foi coletada em Porto Rico no mês de março, período no qual a alga (*C. cervicornis*) em estudo neste trabalho também foi coletada.

Figura 17. Estrutura proposta para o composto CS-6



**ácido dilófico**

Os dados da tabela 15 confirmam a estrutura proposta para CS-6, como sendo a mesma de Schlenk e Gerwick (1986). Considerando o conjunto de sinais, deslocamentos químicos e multiplicidade dos sinais bastante semelhantes, propôs-se também a mesma estereoquímica, principalmente pela constante de acoplamento do hidrogênio do C-7.

Os metabólitos secundários do tipo xeniano estão relacionados a atividades antipredatórias ou *antifouling* (inibindo o assentamento de espécies competitivas). Porém, alguns derivados de diterpenos xenianos apresentam relatos de atividade biológica frente a HIV-1 (herpes simples tipo 1) e HIV-1 (DEPAULA, 2012).

Até o presente momento foi relatada apenas baixa atividade antimicrobiana para o ácido dilófico contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (sem maiores detalhes) e atividade considerada mais significativa, com halo de inibição de 8 mm, na concentração de 100 mg/mL frente a *Bacillus subtilis* (SCHLENK e GERWICK, 1986).

Tabela 15. Comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  de CS-6 e ácido dilófico, conforme Schlenk e Gerwick (1986). Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hz.

	CS-6 300 MHz benzeno- d6		Schlenk e Gerwick (1986) 400 MHz benzeno-d6	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	140,8		140,78	
2	48,0	3,71 (1H, s)	48,02	3,71 (1H, s)
3	50,3	1,85 (1H, m)	50,37	1,85 (1H, m)
4	28,3	1,58 (1H, m) 2,10 (1H, m)	28,34	1,58 (1H, m) 2,10 (1H, m)
5	41,6	2,05 (1H, m) 2,15 (1H, m)	41,62	2,05 (1H, m) 2,15 (1H, m)
6	135,0		135,04	
7	127,3	5,46 (2H, d, $J = 10$ )	128,23	5,46 (2H, br d, $J = 10,0$ )
8	27,9	2,95 (1H, ddd $J = 12,7; 12,7$ e $2,05$ ) 2,40 (1H, m)	27,95	2,95 (1H, ddq, $J = 12,7, 12,7$ e $1,9$ ) 2,40 (1H, br dd, $J = 12,7$ e $7,3$ )
9	126,5	5,46 (2H, d, $J = 10$ )	126,59	5,46 (1H, br d, $J = 10,0$ )
10	34,1	2,30 (1H, t, $J = 2 \times 7,0$ )	34,12	2,30 (1H, tq, $J = 2 \times 6,5$ )
11	38,4	1,32 (2H, d, $J = 7,7$ )	38,41	1,32 (2H, dt, $J = 2 \times 7,0$ )
12	26,3	2,15 (2H, m)	26,39	2,15 (2H, m)
13	125,2	5,25 (1H, $J = 6,6$ )	125,25	5,25 (1H, br t, $J = 6,7$ )
14	131,2		131,26	
15	25,8	1,75 (3H, s)	25,83	1,76 (3H, s)
16	17,7	1,64 (3H, s)	17,73	1,65 (3H, s)
17	15,5	1,00 (3H, d, $J = 6,7$ )	15,56	1,00 (3H, d, $J = 7,0$ )
18	180,5		181,12	
19	22,4	2,21 (3H, sl)	22,43	2,21 (3H, br s)
20	16,8	1,81 (3H, s)	16,87	1,82 (3H, s)

### 5.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA ISOLADA CS-7

A substância CS-7 (6,1 mg) foi obtida da fração AC3 (coluna gravimétrica), como uma substância que não apresenta extinção de fluorescência sob luz UV em 254 nm, nem fluorescência no comprimento de onda de 366 nm.

Apresenta Rf igual a 0,13 na CCD em hexano: acetato de etila (8:2 v/v); após revelação com anisaldeído sulfúrico adquire cor roxa, ficando marrom após algum tempo. Os sinais apresentados no espectro de  $^1\text{H}$  RMN (Figura 18) sugeriram tratar-se de um terpeno. Os terpenos derivados de organismos marinhos são produtos metabólicos secundários, formados por unidades isoprênicas, havendo combinação das unidades por ligações cabeça-cauda, com grupos metílicos em ramificação de cadeia ou anel (DEWICK, 2009).

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 18), observaram-se diversos sinais de hidrogênios metílicos (5 CH<sub>3</sub>) em  $\delta_{\text{H}}$  0,78 (3H, d,  $J = 6,6$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1,48 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1,58 (3H, s),  $\delta_{\text{H}}$  1,67 (3H, s) e  $\delta_{\text{H}}$  2,03 (3H, s). Também se destacam os sinais dos hidrogênios olefínicos de dois metinos (=CH) ressonando em  $\delta_{\text{H}}$  5,08 (1H, dddd,  $J = 7,26; 6,98; 1,2; 1,01$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  5,50 (1H, d,  $J = 6,8$  Hz), conforme expansão da região entre 5,0 e 6,0 ppm apresentada na Figura 19.

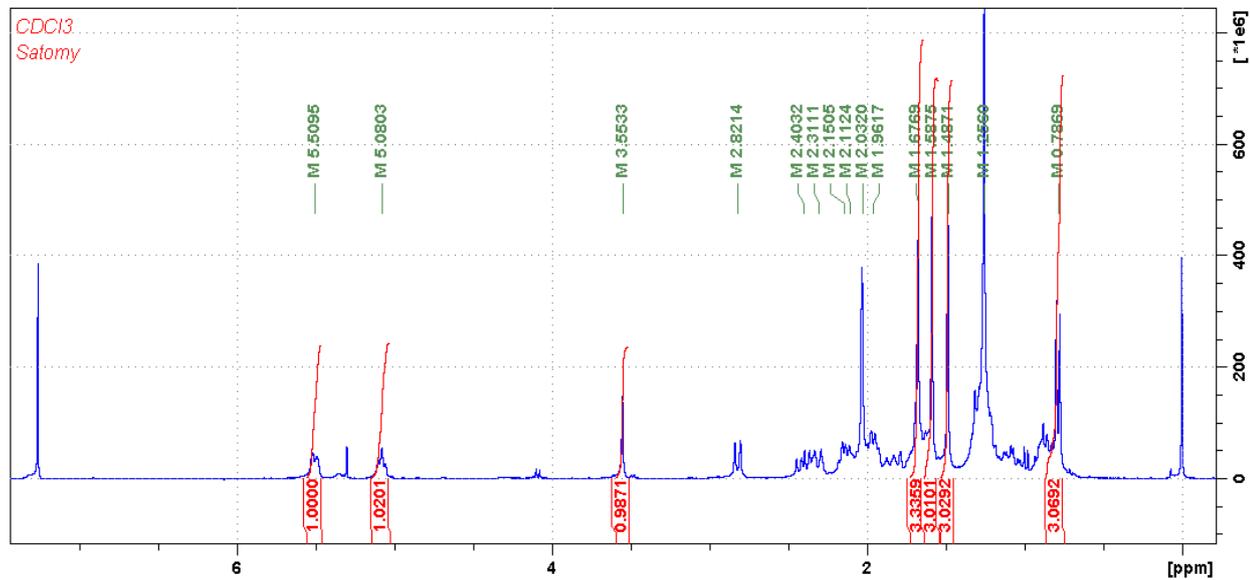
Os sinais do espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (Figura 20) em conjunto com o mapa de correlação HSQC (Figura 21) permitiram atribuir o tipo de carbono, bem como sua conectividade. Os mapas de correlação HSQC e HMBC (respectivamente, figuras 21 e 22) demonstraram a presença de 20 carbonos: cinco metilas:  $\delta_{\text{C}}$  14,9 ( $\delta_{\text{H}}$  0,78);  $\delta_{\text{C}}$  17,1 ( $\delta_{\text{H}}$  1,48);  $\delta_{\text{C}}$  18,0 ( $\delta_{\text{H}}$  1,58);  $\delta_{\text{C}}$  21,4 ( $\delta_{\text{H}}$  2,03) e  $\delta_{\text{C}}$  26,0 ( $\delta_{\text{H}}$  1,67). Cinco metilenos:  $\delta_{\text{C}}$  25,2 ( $\delta_{\text{H}}$  2,41 e 2,13);  $\delta_{\text{C}}$  39,6 ( $\delta_{\text{H}}$  2,31 e 1,08);  $\delta_{\text{C}}$  23,8 ( $\delta_{\text{H}}$  1,80 e 1,58);  $\delta_{\text{C}}$  38,5 ( $\delta_{\text{H}}$  1,25) e  $\delta_{\text{C}}$  26,2 ( $\delta_{\text{H}}$  1,96), seis metinos:  $\delta_{\text{C}}$  33,9 ( $\delta_{\text{H}}$  2,15);  $\delta_{\text{C}}$  48,1 ( $\delta_{\text{H}}$  3,55);  $\delta_{\text{C}}$  48,9 ( $\delta_{\text{H}}$  1,67);  $\delta_{\text{C}}$  64,5 ( $\delta_{\text{H}}$  2,82);  $\delta_{\text{C}}$  123,1 ( $\delta_{\text{H}}$  5,50) e 124,8 ( $\delta_{\text{H}}$  5,08) além de três carbonos quaternários:  $\delta_{\text{C}}$  60,9;  $\delta_{\text{C}}$  142,1 e  $\delta_{\text{C}}$  132,1 e de uma carbonila (C=O)  $\delta_{\text{C}}$  178,8.

O deslocamento químico da carbonila sugere tratar-se de grupamento ácido carboxílico (RUCKER et al., 2001). Os carbonos em  $\delta_C$  60,9 e  $\delta_C$  64,5 possuem deslocamentos sugestivos de ligação a átomo de oxigênio (-OR). Com tal deslocamento químico, seria possível tratar-se de éteres simples, álcool ou epóxido.

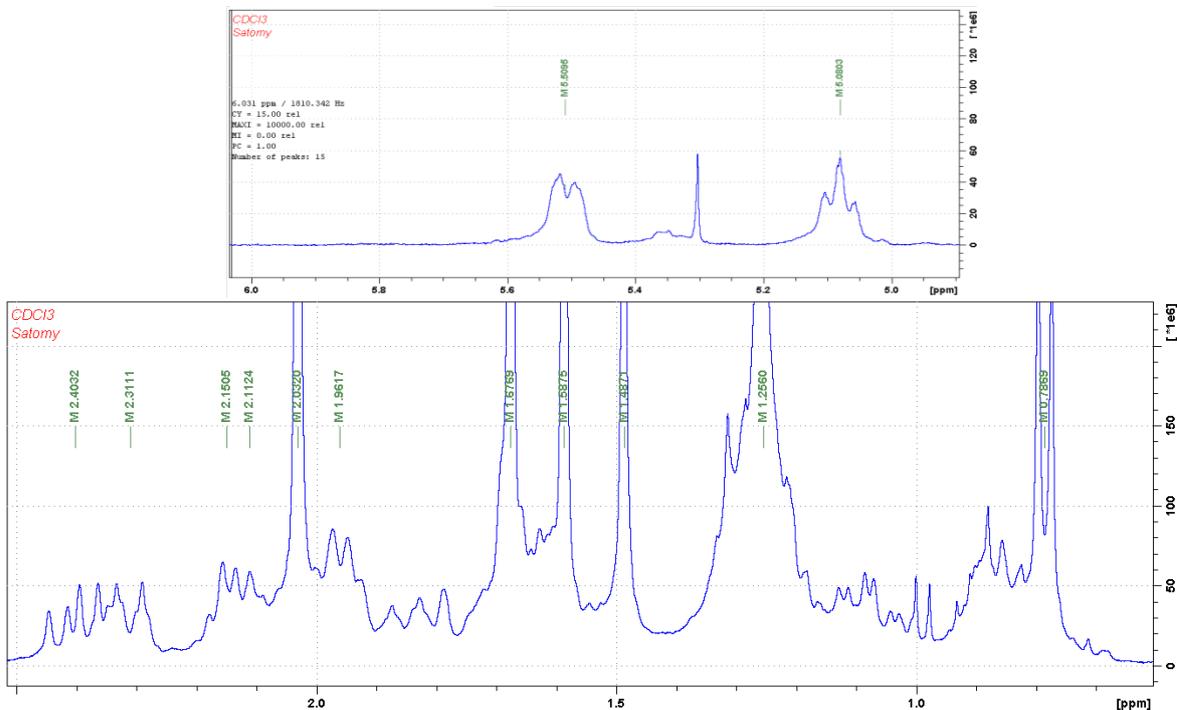
Para ser considerado álcool ou éter, o carbono em  $\delta_C$  64,5 que está conectado com o hidrogênio ressonando em  $\delta_H$  2,82, deveria estar ligado a um hidrogênio menos blindado em torno de  $\delta_H$  3,5-4,0 ppm (PAVIA, 2006), correlação que não é vista no HSQC.

Foram descartados da análise os carbonos em  $\delta_C$  30,0 e  $\delta_C$  14,5, pois correlacionam com  $\delta_H$  1,25 (s), sugerindo tratar-se de composto do tipo graxa, comum como resíduo em compostos purificados cromatograficamente, e o sinal de carbono em  $\delta_C$  27,2 que provavelmente se trata de resíduo de solvente ciclohexano.

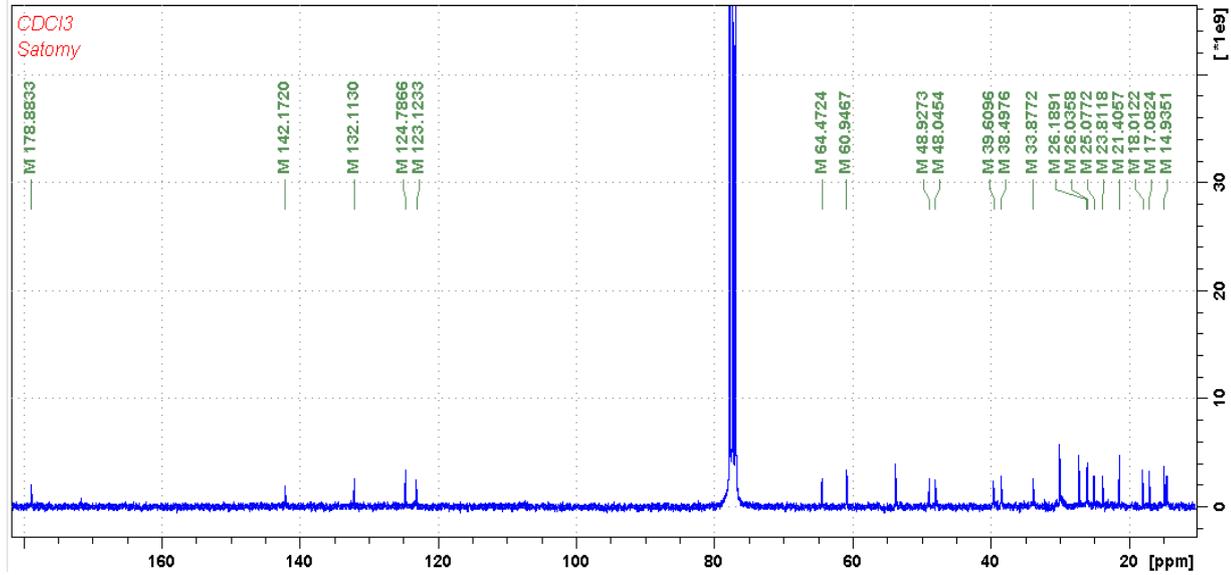
Para CS-7 também o experimento de correlação COSY (Figura 23) permitiu auxiliar na identificação de hidrogênios vicinais e geminais, para dar início a montagem das estruturas parciais do composto. Também foi realizada pesquisa na base de dados Marinlit<sup>®</sup> com base nas estruturas parciais disponíveis a partir dos dados de RMN, porém novamente a pesquisa não apontou nenhuma hipótese de composto conhecido. Partiu-se, dessa maneira, para a elucidação estrutural, considerando a possibilidade de ser um composto inédito. Nas Figuras 24, 25 e 26 estão representadas algumas estruturas parciais para CS-7.

Figura 18. Espectro de  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CS-7

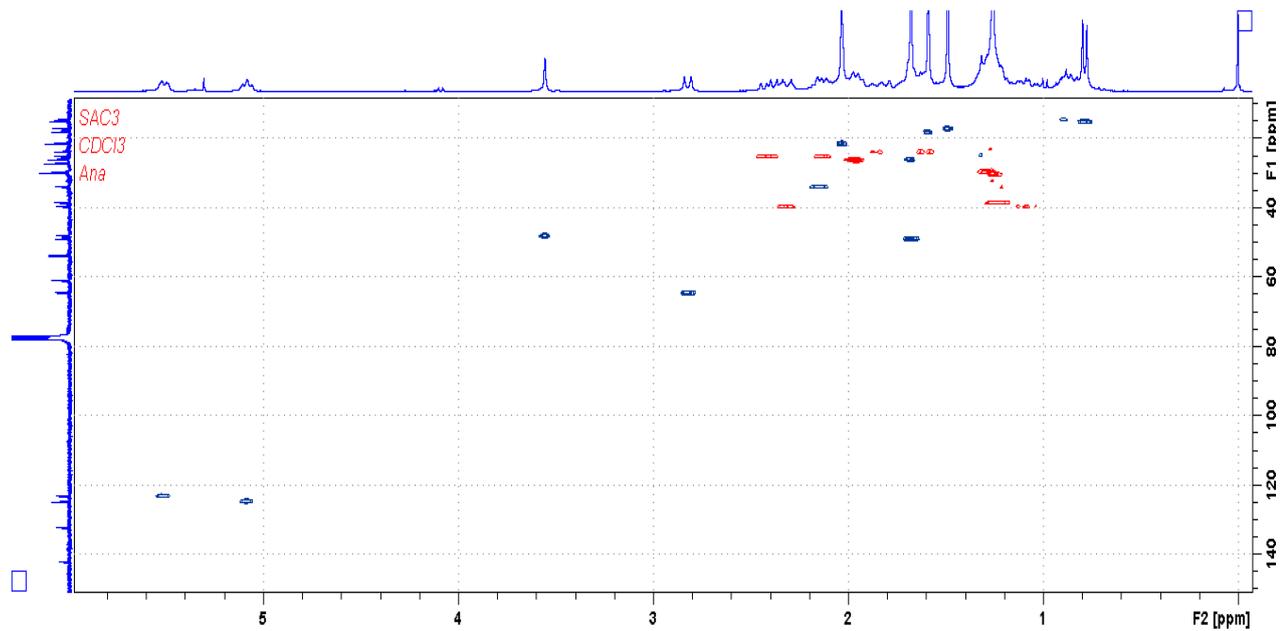
Fonte: Aurtora

Figura 19. Expansão do espectro de  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CS-7, região entre 5,5-5,0 e 0-2,5 ppm

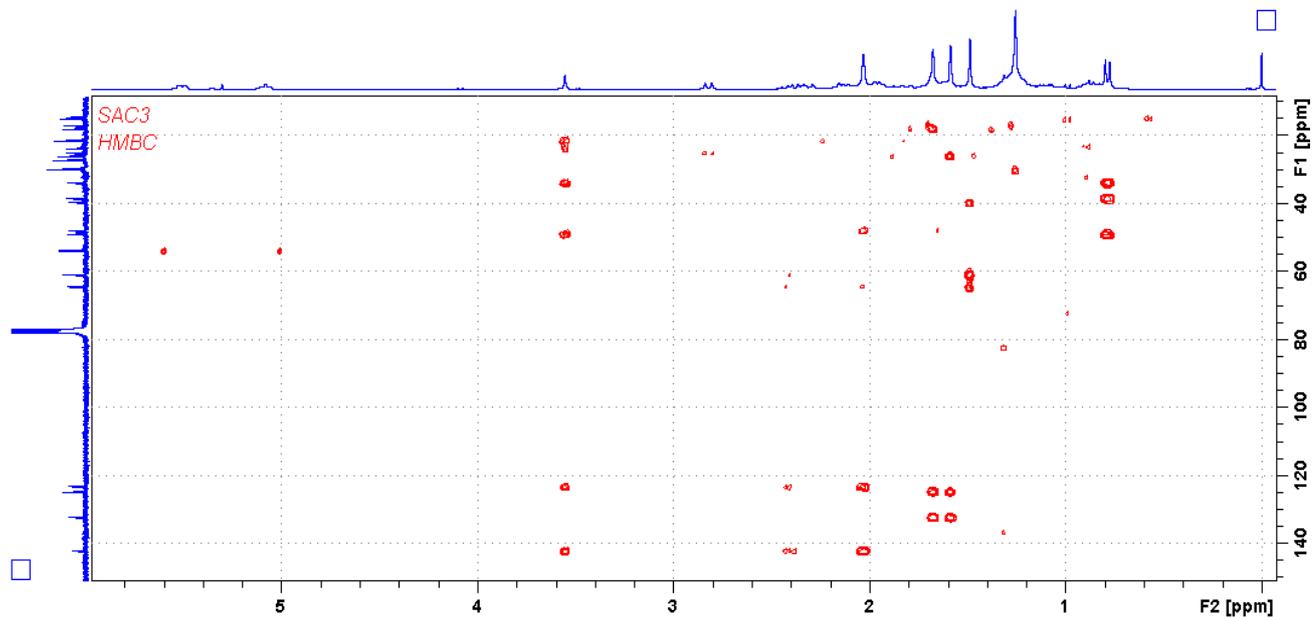
Fonte: Autora

Figura 20. Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de CS-7

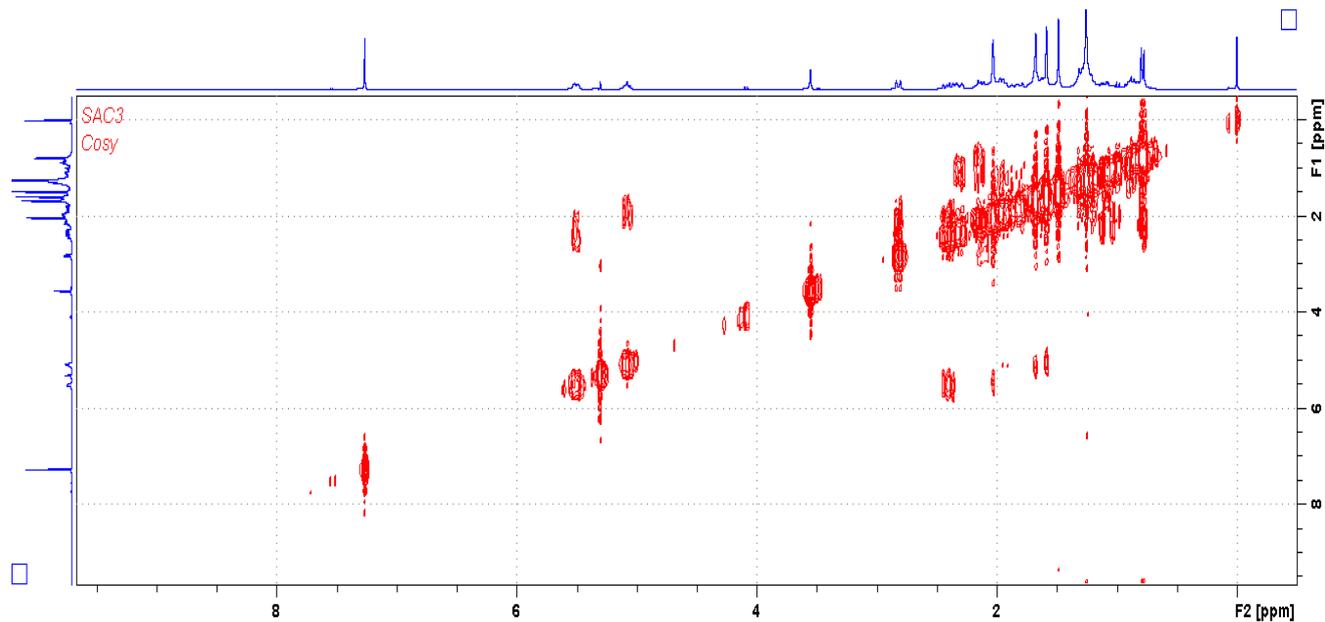
Fonte: Autora

Figura 21. Mapa de correlação HSQC (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do composto CS-7

Fonte: Autora

Figura 22. Mapa de correlação HMBC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto CS-7.

Fonte: Autora

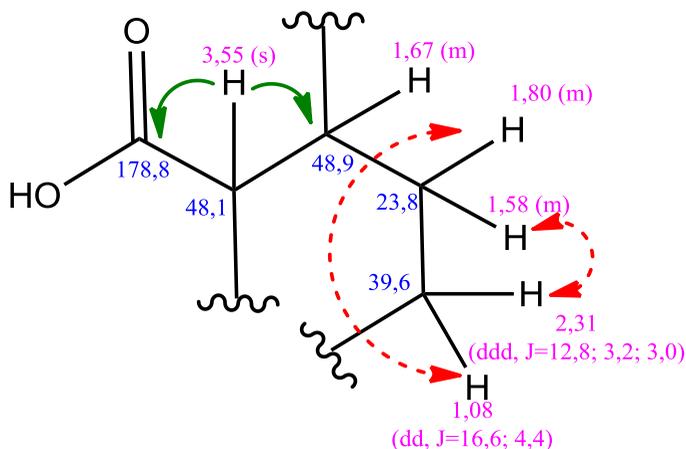
Figura 23. Mapa de correlação COSY (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto CS-7

Fonte: Autora



A segunda estrutura parcial (Figura 25) pode ser deduzida com base nas correlações a partir do COSY, do hidrogênio em  $\delta_H$  1,80 (1H, m) com o hidrogênio em  $\delta_H$  1,08 (1H, dd  $J=12,6; 4,4$ ), bem como do hidrogênio em  $\delta_H$  1,58 (1H, m) com aquele em  $\delta_H$  2,31 (1H, ddd,  $J=12,8; 3,2; 3,0$ ) e ainda deste com o hidrogênio em  $\delta_H$  1,08. Correlações heteronucleares foram visualizadas para o hidrogênio em  $\delta_H$  3,55 com os carbonos em  $\delta_C$ : 178,8; 48,9 e 23,8; 21,4; 33,9; 123,1; 142,1.

Figura 25. Segunda estrutura parcial proposta para CS-7. Setas vermelhas representam correlações homonucleares (H x H) e verdes, heteronucleares (C x H)



Fonte: Autora

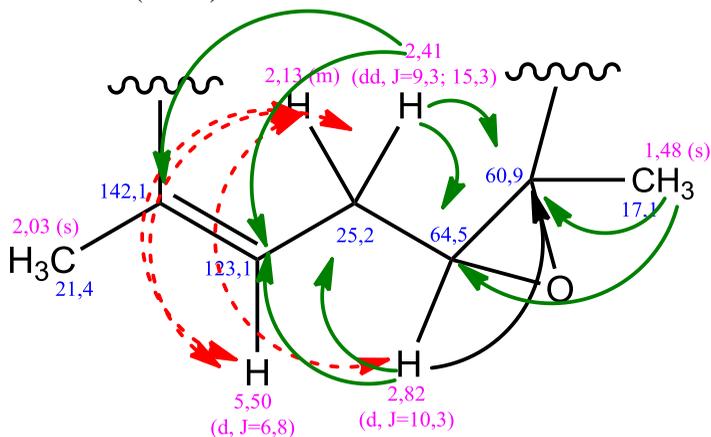
A carbonila de ácido, também presente no ácido dilófico apresentou o mesmo perfil de sinal, com os hidrogênios próximos ressonando com sinais semelhantes de deslocamento de  $^{13}C$ , obtidos do composto CS-7 com os apresentados por Schlenk e Gerwick (1986).

Na terceira parcial (Figura 26), o sinal em  $\delta_H$  5,5 (d,  $J=6,8$ ), à primeira vista mostra-se como um sinal de dubleto, porém ao ser ampliado, percebe-se um sinal assimétrico, podendo ter mais de uma constante de acoplamento; com uma constante  $J= 9,3$  Hz, pode-se pressupor o acoplamento com o hidrogênio em  $\delta_H$  2,41 (1H, dd,  $J=9,3; 15,3$ ). Os hidrogênios ressonando em  $\delta_H$  2,13 e  $\delta_H$  2,41 são hidrogênios geminais.

No experimento de COSY, percebem-se os acoplamentos do hidrogênio em  $\delta_H$  5,50 com aqueles em  $\delta_H$  2,13 e  $\delta_H$  2,41; também, dos hidrogênios em  $\delta_H$  2,82 e  $\delta_H$  2,13.

Muitas correlações heteronucleares foram visualizadas entre o  $\delta_H$  2,41 e os carbonos em  $\delta_C$ : 142,1; 123,1; 64,5 e 60,9; ainda, do hidrogênio em  $\delta_H$  2,82 com os carbonos  $\delta_C$ : 60,9; 25,2 e 123,1; finalmente, do hidrogênio em  $\delta_H$  1,48 com os carbonos  $\delta_C$  60,9; 64,5.

Figura 26. Terceira estrutura parcial proposta para CS-7. Setas vermelhas representam correlações homonucleares (H x H) e verdes, heteronucleares (C x H)



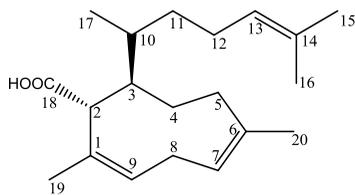
Fonte: Autora

Comparando os dados de CS-7 com diversos estudos que relatem terpenos com grupamento ácido e/ou carbonos com deslocamento de grupamento epóxido, foram encontrados alguns dados espectrais de carbono semelhantes (Tabela 16), como os de Norte e colaboradores (1990) e Schlenk e Gerwick (1986) (Figura 27), em que as algas de estudo também pertencem ao grupo das algas pardas e família Dictyotaceae. Com base nos dados apresentados por Norte e colaboradores (1990), foi possível avançar na elucidação estrutural, propondo-se então que CS-7 seja um derivado do ácido dilófico contendo grupamento epóxido.

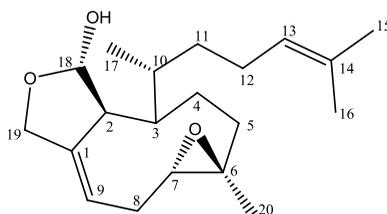
Tabela 16. Comparação entre os dados de RMN de CS7 e os dados de compostos com estruturas semelhantes, reportados por Norte e colaboradores (1990). Deslocamentos químicos estão expressos em ppm e constantes de acoplamento, em Hz.

	CS-7 300/75 MHz		Norte et al. (1990) 200/50 MHz	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
<b>1</b>	142,1	-	146,6	-
<b>2</b>	48,1	3,55 (1H, s)	44,9	2,56 bs
<b>3</b>	48,9	1,67 (3H, s)	53,8	-
<b>4</b>	23,8	1,80 (1H, m) 1,58 (3H, s)	37,9	-
<b>5</b>	39,6	2,31 (1H, ddd, $J = 12,76$ ; 3,2; 2,8) 1,08 (1H, dd, $J = 4,4$ , 12,6)	39,8	-
<b>6</b>	60,9		60,4	-
<b>7</b>	64,5	2,82 (1H, d, $J = 10,3$ )	63,9	3,03 dd ( $J = 1,9$ ; 10,8)
<b>8</b>	25,2	2,41 (1H, dd, $J = 9,3$ , 15,2) 2,13 (1H, m)	26,1	2,33 ddd ( $J = 1,9$ ; 8,4; 10,8)
<b>9</b>	123,1	5,50 (1H, d, $J = 6,8$ )	116,6	5,64 dd ( $J = 1,6$ ; 8,4)
<b>10</b>	33,9	2,15 m	31,9	1,88 m
<b>11</b>	38,5	1,25 m	38,1	1,16 m
<b>12</b>	26,2	1,96 m	26,6	1,92 m
<b>13</b>	124,8	5,08 (1H, dddd, $J = 7,26$ ; 6,98; 1,2; 1,01)	124,4	5,03 bt
<b>14</b>	132,1	-	131,4	-
<b>15</b>	26,0	1,67 (3H, s)	17,6	1,65
<b>16</b>	18,0	1,58 (3H, s)	25,5	1,58
<b>17</b>	14,9	0,78 (3H, d, $J = 6,6$ )	17,3	0,98
<b>18</b>	178,8		100,2	5,67 bs
<b>19</b>	21,4	2,03 (3H, s)	71,1	4,39 bs
<b>20</b>	17,1	1,48 (3H, s)	17,0	1,40 (s)

Figura 27. Estruturas químicas que foram utilizadas para comparação, com vistas à elucidação estrutural de CS-7



Schlenk e Gerwick (1986)  
Ácido dilófico



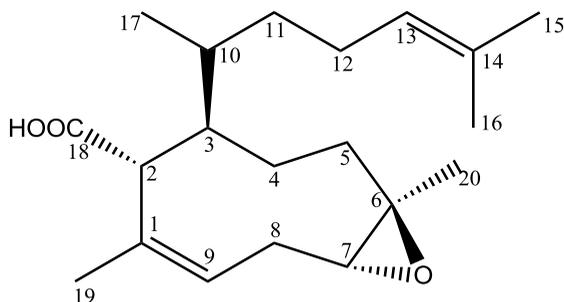
Norte e colaboradores (1990)  
6,7 epoxi isodictiohemiacetal (**2**)

Considerando os deslocamentos químicos de carbono em  $\delta_C$  60,9 e  $\delta_C$  64,5, característicos de grupamento epóxido (PAVIA, 2006), também semelhantes ao encontrado no estudo de Norte et al. (1990), pode-se estabelecer a estereoquímica de CS-7, considerando que os carbonos C-5 a C-8 e C-20 de CS-7 apresentam praticamente os mesmos deslocamentos químicos que o composto **2** de Norte et al. (1990), que utilizaram dados de difração de raios X para estabelecer a estereoquímica da molécula.

Deste modo, pode-se determinar a estrutura química e estereoquímica do composto CS-7, sendo um terpeno inédito do tipo xenicano (Figura 28). Esta dissertação apresenta os primeiros relatos de compostos do tipo xenicano para a espécie, considerando o local de coleta o Atol das Rocas, local amparado por leis ambientais, sendo de difícil acesso para seres humanos, dado o isolamento geográfico.

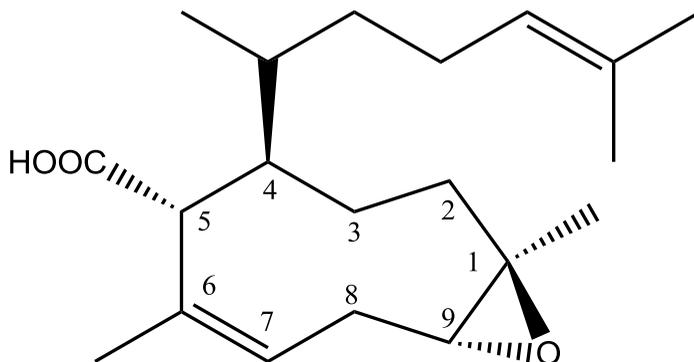
O Atol das Rocas apresenta piscinas naturais de baixa profundidade, com pouca variação de temperatura e de salinidade ao longo do ano, tendo aumento máximo na primavera (máximo 36,2 mg/g). O atol tem papel fundamental na reprodução (servindo de berçário para peixes e crustáceos) e alimento para diversos peixes, tubarões, tartarugas, etc. A ausência de população humana na região cria condições especiais para estudos de biodiversidade em ambientes prístinos.

Figura 28. Estrutura proposta para o composto CS-7



Foi utilizada na discussão da elucidação estrutural, por conveniência, a numeração já utilizada por outros autores para o ácido dilófico, mas essa não corresponde à numeração preconizada pela IUPAC. Assim, CS-7 teria como nome químico ácido (1*R*,4*R*,5*R*,9*R*,*Z*)-1,6-dimetil-4-((*R*)-6-metilhept-5-en-2-il)-10-oxabicyclo[7.1.0]dec-6-eno-5-carboxílico, pelas regras da IUPAC. A numeração preconizada pela IUPAC para o anel encontra-se representada na Figura 29.

Figura 29. Nomenclatura de CS-7 conforme IUPAC



Ácido (1*R*,4*R*,5*R*,9*R*,*Z*)-1,6-dimetil-4-((*R*)-6-metilhept-5-en-2-il)-10-oxabicyclo[7.1.0]dec-6-eno-5-carboxílico

## 5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

O extrato de *C. cervicornis* em estudo foi submetido a avaliação da atividade antimicrobiana, anticoagulante e citotóxica.

As substâncias isoladas também foram encaminhadas para testes após a elucidação estrutural, como o CS-6 (ácido dilófico), submetido a testes para avaliação de atividade citotóxica.

### 5.4.1 Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos no teste de atividade antimicrobiana, a qual foi testada para o extrato na concentração de 1 mg/mL, foram interessantes: *E.coli* (ATCC 25922) obteve um percentual de inibição de 46,3; *S. aureus* (ATCC 25923) de 13,3 e *C. albicans* (ATCC 90112) de 95,6.

Novas alternativas terapêuticas para reduzir os casos de resistência a fungos patogênicos, principalmente em âmbito hospitalar, são consideradas necessárias (NUNES et al., 2011). O risco é maior em pacientes internados entre 3 a 30 dias, especialmente em unidades/centros de terapia intensiva, sendo as infecções do trato urinário e hematogênica as mais comuns. Em estudo publicado em 2001, Miller e colaboradores estimaram que os gastos dos Estados Unidos no manejo das candidemias chega a 1 bilhão de dólares, evidenciando a relevância destas infecções em termos de saúde pública.

As espécies patogênicas testadas para avaliar atividade antimicrobiana do extrato foram Gram positiva, Gram negativa e fungo, Schlenk e Gerwick (1986) submeteram o ácido dilófico para teste na concentração de 100 µg/mL, levando a inibição da bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis*, porém não foi observada inibição significativa no crescimento das outras cepas de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E.coli* e *C. albicans*. Contudo, não podemos afirmar que a inibição do crescimento de *C. albicans* se deve à presença do ácido dilófico (CS-6).

### 5.4.2 Atividade citotóxica

Os ensaios de citotoxicidade realizados preliminarmente com o extrato foram com células da linhagem de câncer de cólon do tipo HCT-116; posteriormente, os metabólitos isolados CS-6 e CS-7 também foram enviados para avaliação de citotoxicidade.

Na etapa de triagem, o composto CS-7 apresentou baixa ação citotóxica, porém para o extrato e CS-6, os resultados se mostraram bastante promissores, superiores a 75%, de modo que os estudos prosseguiram com estas amostras no sentido de determinar as suas  $CI_{50}$  (concentração inibitória média), conforme apresentado na Tabela 17.

Tabela 17. Resultados de atividade citotóxica

<b>Amostras</b>	<b><math>CI_{50}</math> (IC 95%) - <math>\mu\text{g/mL}</math> HCT 116</b>
<b>Extrato</b>	11,39 (8,97 a 14,44)
<b>CS-6</b>	7,17 (5,89 a 8,78)

Fonte: Autora

### 5.4.3 Atividade anticoagulante

Os ensaios de atividade anticoagulante foram realizados com o extrato bruto, o qual obteve resultados interessantes frente a agregação plaquetária com estímulo por ADP e epinefrina, como estão representados nas Tabelas 18 e 19. Verificou-se interessante redução da agregação plaquetária induzida por ADP ( $34,0 \pm 4,2\%$ ) e epinefrina ( $15,5 \pm 6,4\%$ ), em relação ao controle.

Tabela 18. Resultados de atividade anticoagulante: Agregação com estímulo por ADP

<b>Amostras</b>	<b>Agregação (%)</b>
<b>Controle</b>	$84,5 \pm 9,6$
<b>Extrato</b>	$34,0 \pm 4,2$

Fonte: Autora

Tabela 19. Resultados de atividade anticoagulante: Agregação com estímulo por epinefrina

<b>Amostra</b>	<b>Agregação (%)</b>
<b>Extrato</b>	$15,5 \pm 6,4$

Fonte: Autora

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O propósito do desenvolvimento deste trabalho foi a busca de novos metabólitos secundários potencialmente bioativos a partir da alga do gênero *C. cervicornis* proveniente do Atol das Rocas, ilha oceânica cercada pelo oceânico Atlântico.

As ilhas oceânicas possuem um ecossistema único, rico e ainda pouco explorado. Até o presente estudo nenhum trabalho com a alga *C. cervicornis* proveniente do Atol das Rocas foi publicado, deste modo pode-se considerar o estudo químico inédito.

Foram realizadas análises preliminares dos extratos: A (AT1), B (AT2) e C (AT3); todos foram coletados na mesma época, em março de 2015, sendo submetidos ao mesmo processo de maceração utilizando como solvente diclorometano: metanol (2:1 v/v).

A partir da análise comparativa dos três extratos de RMN foram avaliados o conjunto de sinais e seus deslocamentos químicos de hidrogênio, sendo os extratos de AT1 e AT2 bastante semelhantes e AT3 apresentava sinais diferentes e mais interessantes para se trabalhar. Dessa maneira partiu-se do extrato AT-3 para busca de novos compostos químicos.

Como resultados obtiveram-se os diterpenos xenicanos denominados de CS-6 e CS-7, os quais foram obtidos em frações próximas.

A substância CS-6 ( $C_{20}H_{32}O_2$ ) trata-se de uma substância com cinco insaturações, sendo três provenientes de carbonos olefínicos ( $\delta_C$  140,8;  $\delta_C$  126,5;  $\delta_C$  135,0;  $\delta_C$  127,3;  $\delta_C$  125,2;  $\delta_C$  131,2), uma da carbonila ácida ( $\delta_C$  180,5) e outra da ciclização do anel contendo nove átomos de carbono. Também possui quatro metilas ressonando como singletos ( $\delta_C$  16,8;  $\delta_C$  22,4;  $\delta_C$  25,8 e  $\delta_C$  17,7) e uma metila duplete ( $\delta_C$  15,5). Esta substância é aqui reportada para o gênero pela primeira vez, porém já havia sido descrita para *Dilophus guineensis*, da ordem Dictyotales.

O segundo metabólito isolado, CS-7 ( $C_{20}H_{32}O_3$ ), apresenta quatro insaturações, sendo duas provenientes de carbonos olefínicos ( $\delta_C$  142,1;  $\delta_C$  123,1;  $\delta_C$  124,8;  $\delta_C$  132,1), uma do ácido carboxílico ( $\delta_C$  178,8) e outra da ciclização do anel composto por nove átomos de carbono. A diferença encontrada em relação ao ácido dilófico é a presença de grupamento epóxido em C-7 e C-6, característica nunca reportada para a espécie. Assim, CS-7 apresenta uma estrutura inédita.

Os resultados encontrados nesse estudo contradizem os apresentados por Teixeira et al. (2013), nos quais há a proposição de determinados marcadores taxonômicos de terpenos da família

Dictyotaceae. Segundo aqueles autores, terpenos isolados do gênero *Canistrocarpus* seriam apenas dos tipos dolastano e secodolastano, e os xenianos seriam pertencentes ao Grupo III. Em estudo anterior, com *Dictyota mertensii* de ilha oceânica, Philippus (2016) também isolou composto cuja estrutura contraria a proposta de Teixeira (2013). Tais divergências apenas contribuem para evidenciar a diversidade química do ambiente marinho, principalmente em ambientes prístinos, ainda pouco explorados.

## 7 CONCLUSÕES

O estudo do extrato AT1-3, de *C. cervicornis* proveniente do Atol das Rocas resultou no isolamento de dois diterpenos do tipo xenicano.

O composto isolado codificado como CS-6 foi identificado como ácido dilófico, inédito para o gênero;

A estrutura do composto codificado como CS-7 foi elucidada como sendo um composto inédito, derivado do ácido dilófico, mas contendo um grupamento epóxido na posição onde se encontrava uma das duplas ligações do anel.

O extrato AT3 apresentou moderada citotoxicidade para HCT116 e boa atividade antimicrobiana frente a *C. albicans*.

O composto CS-6 (ácido dilófico) apresentou  $CI_{50}$  de 7,17  $\mu\text{g/mL}$  frente a células HCT116.



## REFERÊNCIAS

- ALHOMOUD, F. et al. Self-medication and self-prescription with antibiotics in the Middle East — do they really happen? A systematic review of the prevalence, possible reasons, and outcomes. **International Journal of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 57, p.3-12, 2017.
- ALMEIDA-LIMA, J. et al. Evaluating the possible genotoxic, mutagenic and tumor cell proliferation-inhibition effects of a non-anticoagulant, but antithrombotic algal heterofucan. *JAT. Journal of Applied Toxicology*, [s.l.], v. 30, p. 708-715, 2010.
- ANARAT-CAPPILLINO, G.; SATTELY, E. S. The chemical logic of plant natural product biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, [s.l.], v. 19, p. 51-58, 2014.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.260-271, 2010.
- ATHUKORALA, Y.; KIM K.N.; JEON Y.J. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. **Food Chem Toxicol.** [s.l.], v. 44, p. 1065–1074, 2007.
- BARBOSA, J.P. et al. In vitro antiviral diterpenes from the Brazilian brown alga *Dictyota pafalii*. **Planta Medica**, [s.l.], v. 70, p. 856-860, 2004.
- BARROS, C.S. et al. Anti-HIV-1 activity of compounds derived from marine alga *Canistrocarpus cervicornis*. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.2523-2527, 2015.
- BERTEAU, O.; MULLOY, B.. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, [s.l.], v. 13, n. 6, p.29-40, 2003.
- BEYER, T.M.M. et al. Antifoulant diterpenes produced by the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis*. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.] v. 21, p. 341–346, 2009.

BIANCO, E.M. et al. Antifoulant diterpenes produced by the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis*. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 21, p. 341–346, 2009.

BIANCO, E.M.; TEIXEIRA, V.L.; PEREIRA, R.C. Chemical defenses of the tropical marine seaweed *Canistrocarpus cervicornis* against herbivory by sea urchin. **Brazilian Journal of Oceanography**, [s.l.], v. 58, n. 3, p. 213-218, 2010.

BIANCO, E.M. et al.  $10\beta$ -Acetoxy- $8\alpha,9\alpha$ -epoxy- $14\beta$ -hydroxy-7-oxodolastane – A new diterpene isolated from the Brazilian brown macroalga *Canistrocarpus cervicornis*. **Helvetica Chimica Acta**, [s.l.], v. 28, p. 785-194, 2015.

BIANCO, E.M. et al.  $4\alpha$ -acetoxyamijidictyol – A New Antifeeding dolastane diterpene from the Brazilian Brown Alga *Canistrocarpus cervicornis*. **Chemistry & Biodiversity**, [s.l.], v. 12, p. 1665- 1677, 2015.

BLUNT, J.W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, [s.l.], v. 34, n. 3, p.235-294, 2017.

BOISSON-VIDAL, C. et al. Relationship between antithrombotic activities of fucans and their structure. **Drug Development Research**, [s.l.], v. 51, n. 4, p.216-224, 2000.

BRASIL, Organização Pan-Americana da Saúde. **Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia Marinha no Brasil**. Brasília, 2010. 134p.

BURTIN, P. Nutritional Value of seaweeds. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, [s.l.], v. 2, p. 498–503, 2003.

CAMARA, R.B.G. et al. Heterofucans from the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with anticoagulant and antioxidant activities. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 9, p. 124–138, 2011.

CAMPBELL, S. et al. Two New Oxodolastane Diterpenes from the Jamaican Macroalga *Canistrocarpus cervicornis*. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 15, n. 12, p.150-167, 2017.

CAPASSO, F.; PASQUALE, R.; GRANDOLINI, G. **Farmacognosia: Botanica**, chimica e farmacologia delle piante medicinali. 2<sup>a</sup> ed. Itália: Springer, 2011.

CARDOZO, K. et al. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 146, n. 1-2, p.60-78, 2007.

CLÉMENT, M. et al. NMR characterization and molecular modeling of fucoidan showing the importance of oligosaccharide branching in its anticomplementary activity. **Glycobiology**, [s.l.], v. 20, n. 7, p.883-894, 2010.

CLERCK, O. et al. A revised classification of the Dictyoteae (Dictyotales, Phaeophyceae) based on rbcL and 26S ribosomal DNA sequence data analyses. **Journal of Phycology**, [s.l.], v. 42, p. 1271-1288, 2006.

COSTA, L.S. et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 64, n. 1, p.21-28, 2010.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**, [s.l.], v. 1830, n. 6, p.3670-3695, 2013.

CUMASHI, A. et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, [s.l.], v. 17, n. 5, p.541-552, 2007.

CUONG, H.D. et al. Structure and hypolipidaemic activity of fucoidan extracted from brown seaweed *Sargassum henslowianum*. **Natural Product Research**, [s.l.], v. 29, n. 5, p.411-415. 2014.

DAEMI, H.; BARIKANI, M. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. **Scientia Iranica**, [s.l.], v. 19, n. 6, p.2023-2028, 2012.

DAVIS, T.; VOLESKY, B.; MUCCI, A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. **Water Research**, [s.l.], v. 37, n. 18, p.4311-4330, 2003.

DOMINGOS, T.F.S. et al. Anti-snake venom effect of secodolastane diterpenes isolated from Brazilian marine brown alga *Canistrocarpus cervicornis* against *Lachesis muta* venom. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, [s.l.], v. 21, n. 2, p. 234-238, 2011.

DORE, C.M.P.G. et al. A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 91, n. 1, p.467-475, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.075>.

DRAGET, K.I.; TAYLOR, C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.251-256, 2011.

DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRÆK, G. Alginates from Algae. **Biopolymers Online**, [s.l.], p.1-11, 15, 2005.

DROZD, M. et al. Antithrombotic and hemorrhagic activities of fucoidan isolated from *Fucus evanescens* brown algae. **Eksp Klin Farmakol** 74:26–30. 2011.

DUTRA, R.C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, [s.l.], v. 112, p.4-29, 2016.

ENGEL, S.; JENSEN, P.R.; FENICAL, W. Chemical ecology of marine microbial defense. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, p. 1971–1985, 2002.

FACCINI, A. L. Importância econômica e cultivo de algas marinhas. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MARINHA DA UNISANTA, 10., 2007, Santos. **Anais eletrônicos...** Santos, 2007. Disponível:<<http://sites.unisanta.br/simposiobiomar/2007/downloads/material/apostila%20do%20curso%20economica%20e%20cultivo.pdf>> . Acesso em: 29 mar. 2017.

FALCÃO, C.; MENEZES S. Changes in shallow phyto-benthic assemblages in southeastern Brazil following the replacement of *Sargassum vulgare* (Phaeophyta) by *Caulerpa scalpelliformis* (Chlorophyta). **Botanica Marina**, [s.l.], v. 48, p. 208-217, 2005.

FELÍCIO, 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**, [s.l.], v. 64, n. 3, p. 39-42, 2012.

FENICAL, W. Distributional and taxonomic features of toxin-producing marine algae. In: Abbott IA, Foster MS, Eklund LF (eds) **Pacific seaweed aquaculture**. California Sea Grant College Program, Institute of Marine Resources, University of California, 1980.

FERNANDO, I.P.S. et al. Antioxidant Activity of Marine Algal Polyphenolic Compounds: A Mechanistic Approach. **Journal of medicinal food**, [s.l.], v. 19, n. 7, p.615-628, 2016.

FREITAS, O.S.P. et al. Chemical variation in the diterpenes from the Brazilian brown alga *Dictyota mertensii* (*Dictyotaceae*, *Phaeophyta*). **Natural Product Communications**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 13-15, 2007.

GAMAL, A.A. El Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-25, 2010.

GARCIA, D.G. et al. Inhibition of mammal Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> -ATPase by diterpenes extracted from the Brazilian brown alga *Dictyota cervicornis*. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 23, p. 943-947, 2009.

GARCIA-CRUZ, C.H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A.N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, n. 7, p.1800-1806, 2008.

GERWICK, W.; MOORE, B. Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. **Chemistry & Biology**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.85-98, jan. 2012.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. Algaebase. **World-wide electronic publication**, Disponível em: <<http://www.algaebase.org/>>. Acesso em 14 Jan. 2017.

HAY, I.D. et al. Bacterial biosynthesis of alginates. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s.l.], v. 85, n. 6, p.752-759, 2010.

HOLDT, S.L.; KRAAN, S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.543-597, 2011.

IWAKI, Y.O. **Eletrólitos sólidos poliméricos a base de alginato de sódio**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010. Disponível: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/88/88131/tde-23032010-170752/publico/YurikaMErevisada.pdf>. Acesso em: 04 abr. 2017.

KELECOM, A., TEIXEIRA, V.L. Diterpenes of marine brown algae of the family Dictyotaceae: their possible role as defense compounds and their use in chemotaxonomy. **Sci. Total Environ.** v. 58, p. 109–115, 1986.

KELECOM, A.; TEIXEIRA, V.L., Dolastane diterpenes from the marine brown alga *Dictyota cervicornis*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 9, p. 2907- 2902, 1988.

KELMAN, D. et al. Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 10, n. 12, p.403-416, 2012.

KIM, R.E. Is a New Multilateral Environmental Agreement on Ocean Acidification Necessary? **Review of European Community & International Environmental Law**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.243-258, 2012.

KLOAREG, B. et al. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. **Oceanography and Marine Biology: An Annual Review**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.259-315, 1988.

LEE, R.E. **Phycology**. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.

LEE, R.E. **Phycology**. Cambridge: University Press. 2008. 547p.

- LEITE, E.L. et al. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schröderi*. **Plant Science**, v. 132, p. 215–228, 1998.
- LI, B. et al. Fucoidan: Structure and Bioactivity. **Molecules**, [s.l.], v. 13, n. 12, p.1671-1695, 2008.
- MARQUES, C.T. et al. Sulfated fucans extracted from algae *Padina gymnospora* have anti-inflammatory effect. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.115-122, 2012.
- MARTINS, A. et al. Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 12, n. 12, p.1066-1101, 2014.
- MEDEIROS, V.P. et al. Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: Anticoagulant and anti-inflammatory properties. **Biochemistry (moscow)**, [s.l.], v. 73, n. 9, p.1018-1024, 2008.
- MENEZES, C.B. et al. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 165, n. 6, p.466-482, 2010.
- MOE, S.T.; DRAGET, K.I.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginates. In: Stephen, A.M., Editor, **Food polysaccharides and their applications**, Marcel Dekker, New York, pp. 245–286. 1995.
- MORALES, J.L. et al. Screening of Antibacterial and Antifungal Activities of Six Marine Macroalgae from Coasts of Yucatán Peninsula. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 44, n. 8, p.632-635, 2006.
- MURDZHEVA, D. Physicochemical properties of new alginic acids derivatives. **Industrial Technologies**, [s.l.], v. , n. , p.59-66, 2016.
- NADER, H.B. et al. Heparins and heparinoids: occurrence, structure, and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], v. 10, p. 951-966, 2004.

NAGUMO, T.; NISHINO, T. Fucan sulfates and their anticoagulant activities. **Polysaccharides in Medicinal Applications**. New York: Marcel Dekker, 1996. 545-574p.

NARIYOSHI, Y.N. et al. Partial characterization and evaluation of antioxidant activity from fractionated polysaccharides obtained of brown algae. **International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 3, n. 5, p.815-818, 2013.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; KINGSTON, D.G.I. Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures. **The Practice of Medicinal Chemistry**, [s.l.], p.159-186, 2008.

NORTE, M. et al. New xenicane diterpenes from the brown algae of dictyotaceae. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 46, n. 17, p.6125-6132. 1990.

O'SULLIVAN, L. et al. Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 8, n. 12, p.2038-2064, 2010.

OHSE, S. et al. Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 39, n. 6, p.1760-1767, 2009.

ORTIZ, J. et al. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 99, n. 1, p.98-104, jan. 2006.

ORTIZ-RAMÍREZ, F.A.; VALLIM, M.A.; CAVALCANTI, D.N.; TEIXEIRA, V.L. Effects of the secondary metabolites from *Canistrocarpus cervicornis* (Dictyotales, Phaeophyceae) on fertilization and early development of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 2, p. 296-304, 2013.

PADMAKUMAR, K.; AYYAKKANNU, K., Seasonal variation of antibacterial and antifungal activities of marine algae from southern coast of India, **Bot. Mar.**40, 507-515,1997.

PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. In: ASPINALL, G.O. Ed. The polysaccharides. **New York: Academic Press**. [s.l.], v. 2, p. 195-285, 1983.

PAL, A.; KAMTHANIA, M.C.; KUMAR, A. Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds - A Review. **Oalib**, [s.l.], v. 01, n. 04, p.1-17, 2014.

PARK, M.; JUNG, U.; ROH, C. Fucoïdan from Marine Brown Algae Inhibits Lipid Accumulation. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 9, n. 12, p.1359-1367, 2011.

PAULA, É.J. et al. **Introdução à biologia das criptógamas**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2007. Disponível em: [http://felix.ib.usp.br/apostila\\_cripto.pdf](http://felix.ib.usp.br/apostila_cripto.pdf). Acesso em: 31 mar. 2017.

PAVIA, D.L. et AL. **Introdução à Espectroscopia**. São Paulo, Cengage Learning, 2015.

PENGZHAN, Y. et al. Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.21-27, 2003.

PERCIVAL, E.; McDOWELL, R.H. **Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides**. New York: Academic Press, 1967.

PEREIRA, R.C.; PINHEIRO, M.D.; TEIXEIRA, V.L.; GAMA, B.A.P. Feeding preferences of the endemic gastropod *Astraea latispina* in relation to chemical defenses of Brazilian tropical seaweeds. **Brazilian Journal of Biology**, [s.l.], v. 62, n.1, p. 33-40, 2002.

PHILIPPUS, A. C. **Investigação química de extratos de algas pardas do Atlântico sul brasileiro**. 2016.150 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

POMIN, V. Marine Non-Glycosaminoglycan Sulfated Glycans as Potential Pharmaceuticals. **Pharmaceuticals**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.848-864, 2015.

QIN, S.; LIN, H.; JIANG, P. Advances in genetic engineering of marine algae. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 30, n. 6, p.1602-1613, 2012.

RAVEN, P.H.; EVEREST, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007. 830p.

REMMINGHORST, U.; REHM, B.H.A. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 28, n. 21, p.1701-1712, 2006.

RINAUDO, M. Biomaterials based on a natural polysaccharide: alginate. **Revista Especializada en Ciencias Químico-biológicas**, [s.l.], v. 1, n. 17, p.92-96, ago. 2014.

ROCHA, H.A.O. et al. A xylogalactofucan from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi* stimulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate from endothelial. **Planta Medica**, [s.l.], v. 71, n. 4, p. 379-81, 2005.

ROCHA, M.C. et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.153-160, 2006.

SABRA, W.; ZENG, A.; DECKWER, W. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 56, n. 3-4, p.315-325, 2001.

SANTOS, A.O. et al. 4-Acetoxydolastane diterpene from the Brazilian brown algae *Canistrocarpus cervicornis* as antileishmanial agent. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 9, p. 2369-2383, 2011.

SCHLENK D., GERWICK W. Dilophic acid, a diterpenoid from the tropical brown seaweed (*Dilophus guineensis*). **Phytochemistry**. [s.l.] 26: 1081-1084. 1986.

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**, [s.l.], v. 30, n. 7, p.631-637, 2012.

SETHILKUMAR, K. et al. Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 60, p.366-374, 2013.

SIQUEIRA, R.C.L. et al. In vivo anti-inflammatory effect of a sulfated polysaccharide isolated from the marine brown algae *Lobophora variegata*. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 49, n. 2, p.167-174, 2010.

SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.245-262, 2004.

STENGEL, D.B.; CONNAN, S.; POPPER, Z.A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 29, n. 5, p.483-501, 2011.

TAKO, M.; YOZA, E.; TOHMA, S. Chemical Characterization of Acetyl and Alginate from Commercial Cultured *Cladophora okamuranus*. **Bot. Mar.**, Berlin, v. 43, p. 393- 398, 2000.

TEIXEIRA, V.L. **Em Biologia Marinha**. Interciência: Rio de Janeiro, 2009. Cap 19.

TEIXEIRA, V.; KELECOM, A. A chemotaxonomic study of diterpenes from marine brown algae of the genus *Dictyota*. **The science of the total environment**, [s.l.], v. 75, p. 271-283, 1988.

TEIXEIRA, V.L.; TOMASSINI, T.; FLEURY, B.G.; KELECOM, A. Dolastane and secodolastane diterpenes from the marine brown alga, *Dictyota cervicornis*. **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 49, n. 4, p. 570- 575, 1986.

TEIXEIRA, V.L.; TOMASSINI, T.; KELECOM, A. Cervicol, a further secodolastane diterpene from the marine brown alga *Dictyota cervicornis* Kützinger (Phaeophyceae, Dictyotaceae). **Bulletin des Sociétés Chimiques Belges**, [s.l.], v. 95, n. 4, 1986.

TEIXEIRA, V.L.. Produtos Naturais de Algas Marinhas Bentônicas. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.343-362, 2013.

TORRES, F.A. et al. New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.265-276, 2014.

USTYUZHANINA, N. et al. Influence of Fucoidans on Hemostatic System. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 11, n. 12, p.2444-2458, 2013.

VALLIM, M.A. et al. In vitro antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.2379-2382, 2010.

VALLIM, M.A. et al. The diterpenes from Dictyotacean marine brown algae in the Tropical Atlantic American region. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.1-16, 2005.

WANG, H.D. et al. Exploring the potential of using algae in cosmetics. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 184, p.355-362, 2015.

WEITZ, D.S.; WEITZ, J.I. Update on heparin: what do we need to know? **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**. v. 29(2), p. 199-207, 2010.

WELLS, M.L. et al. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.949-982, 2016.

WIESCH, P.A. et al. Population biological principles of drug-resistance evolution in infectious diseases. **Lancet Infectious Diseases**. [s.l.], v. 11, p. 236-247.2011.

XUEYAN, F. et al. Acute antihypertensive effects of fucoidan oligosaccharides prepared from *Laminaria japonica* on renovascular hypertensive rats. **Journal of Ocean University of China (natural Science)**, [s.i.], v. 1, n. 1, p.560-564, 2004.

YOKOTA, T. et al. Increased effect of fucoidan on lipoprotein lipase secretion in adipocytes. **Life Sciences**, [s.l.], v. 84, n. 15-16, p.523-529, abr. 2009.

ZHANG, W. et al. Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* Has Powerful Immune-Modulatory Effects Compared to Three Other Fucoidans. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 13, n. 12, p.1084-1104, 2015.

ZUBIA, M.; ROBLEDOS, D.; FREILE-PELEGRIN, Y. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 19, n. 5, p.449-458, 2007.