



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS (PPGCF)

Beatriz de Lima Santos

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AÇÃO  
ANTIOXIDANTE DO EXTRATO E FRAÇÕES DO  
MOLUSCO *Neoteredo reynei***

BELÉM-PA  
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS (PPGCF)

Beatriz de Lima Santos

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AÇÃO  
ANTIOXIDANTE DO EXTRATO E FRAÇÕES DO  
MOLUSCO *Neoteredo reynei***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará – UFPA. Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta Chagas Monteiro.

BELÉM-PA  
2021

BEATRIZ DE LIMA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AÇÃO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO E  
FRAÇÕES DO MOLUSCO *Neoteredo reynei***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará – UFPA. Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Data da Avaliação: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Conceito: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta Chagas Monteiro  
(Orientadora – PPGCF / UFPA)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Cristina Baetas Gonçalves  
(PPGCF/UFPA)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Solange Maria Vinagre Corrêa  
(IFPA)

Belém / PA  
2021

## DEDICATÓRIA

A minha mãe por todo amor, esforço  
dedicado à minha educação e por estar  
sempre ao meu lado.

Obrigada!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a espiritualidade por me ampararem e darem forças para seguir.

A minha mãe, Eliete Torres de Lima, por todo esforço para minha educação, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e torcendo por mim.

A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta Chagas Monteiro, pela orientação e pelo apoio para executar e concluir este trabalho.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Solange Corrêa pela oportunidade de prosseguir com esta pesquisa iniciada no IFPA, por todo apoio e carinho.

Aos amigos do Laboratório de Extração (UFPA), que me deram todo suporte desde o início e me ajudaram com o desenvolvimento deste trabalho, em especial ao Andersom Botelho.

A toda a equipe do Laboratório de Ensaio in vitro, Imunologia e Microbiologia (LBEIM).

Ao Laboratório de Cromatografia Líquida (LABCROL), por ceder a estrutura que tornou parte deste trabalho possível.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas pela oportunidade de realizar este curso.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

## RESUMO

### CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E BIOLÓGICO DO MOLUSCO BIVALVE *Neoteredo reynei*

Os organismos marinhos representam uma fonte alternativa e promissora às pesquisas de novos fármacos. Os teredinídeos (turu) são moluscos bivalves, largamente distribuídos sobre o globo terrestre, ocorrendo tanto em ambientes estuarinos como oceânicos. Na região norte do Brasil o turu é utilizado na medicina tradicional para o tratamento de anemia, tuberculose e câncer. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização química e avaliar a atividade antioxidante e microbiológica do extrato metanoico de *N. reynei* e suas partições em ensaios *in vitro*. O extrato metanoico do turu foi obtido após a identificação da espécie, seguida de posterior liofilização, maceração e concentração da amostra. Após a concentração o extrato foi submetido aos testes de caracterização química e atividade biológica. A caracterização química se deu por meio do uso de técnicas como: Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A avaliação da atividade microbiológica foi feita por análise da ação antibacteriana, por meio da microdiluição seriada para obtenção de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), além da análise dos parâmetros oxidativos para avaliação da atividade antioxidante com os radicais DPPH<sup>•</sup> (sequestro de radicais) e método TEAC (radical ABTS<sup>•+</sup>) do extrato e frações *N. reynei*. Os resultados indicam a presença de terpenos / esteroides, compostos fenólicos, alcaloides e potencial antioxidante. Ademais, a pesquisa mostrou que o extrato, nas concentrações utilizadas, não possui ação inibitória contra a *S. aureus*, *E. Coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*. Assim, este estudo contribuiu para aumentar o conhecimento sobre as características químicas e atividade biológica do extrato do turu, ainda tão pouco explorado, bem como demonstrar seu potencial como fonte de metabólitos secundários de possíveis interesses farmacológicos.

**Palavras-chave:** *Neoteredo reynei*; Turu; Caracterização química.

## ABSTRACT

### CHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANTIOXIDANT ACTION OF MOLLUSK EXTRACT AND FRACTIONS *Neoteredo reynei*

Marine organisms represent an alternative and promising source for research into new drugs. Teredinids (turu) are bivalve molluscs, widely distributed over the globe, occurring in both estuarine and oceanic environments. In the northern region of Brazil, turu is used in traditional medicine for the treatment of anemia, tuberculosis and cancer. Thus, the objective of this work was to carry out the chemical characterization and evaluate the antioxidant and microbiological activity of the methane extract of *N. reynei* and its partitions in in vitro assays. Turu methane extract was obtained after species identification, followed by lyophilization, maceration and sample concentration. After concentration, the extract was subjected to chemical characterization and biological activity tests. The chemical characterization was carried out through the use of techniques such as: High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The evaluation of microbiological activity was carried out by analyzing the antibacterial action, through serial microdilution to obtain Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (CBM), in addition to the analysis of oxidative parameters to evaluate the antioxidant activity with DPPH<sup>•</sup> radicals (radical scavenging) and TEAC method (ABTS<sup>•+</sup> radical) of the *N. reynei* extract and fractions. The results indicate the presence of terpenes / steroids, phenolic compounds, alkaloids and antioxidant potential. Furthermore, the research showed that the extract, at the concentrations used, does not have an inhibitory action against *S. aureus*, *E. Coli*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa*. Thus, this study contributed to increase knowledge about the chemical characteristics and biological activity of turu extract, which is still so little explored, as well as to demonstrate its potential as a source of secondary metabolites of possible pharmacological interests.

**Keywords:** *Neoteredo reynei*; Turu; Chemical characterization.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - MECANISMO SIMPLIFICADO DOS METABOLISMOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO.....	17
FIGURA 2 – PRIMEIRAS SUBSTÂNCIAS PURAS ISOLADAS: (1) MORFINA, (2) QUININA E (3) ESTRICNINA. 18	
FIGURA 3 – (A) TODOS OS NOVOS MEDICAMENTOS APROVADOS 01JAN31 A 30SET19; N = 188; (B) TODOS OS NOVOS MEDICAMENTOS APROVADOS POR FONTE / ANO; N = 1881. ....	20
FIGURA 4 – ESTRUTURAS DOS NUCLEOSÍDEOS SPONGOTHYIMIDINE E SPONGOURIDINE ISOLADOS E SEUS ANÁLOGOS SINTÉTICOS.....	22
FIGURA 5 – (A) REPRESENTAÇÃO DO TEREDO SP.: 1 – CAPUZ; 2 – VALVA; 3 – MANTO; 4 – PALHETA; 5 – SIFÃO EXALANTE; 6– SIFÃO INALANTE. (B) PALHETAS DE DOIS GÊNEROS DE TEREDO SP.: GÊNERO BANKIA E TEREDO.....	26
FIGURA 6 – REAÇÕES DE NEUTRALIZAÇÃO DO ENSAIO DO DPPH• (A) E ABTS+• (B). ....	29
FIGURA 7 – TURU COLETADO EM TRONCO DE RHIZOPHORA MANGLE.....	30
FIGURA 8 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE ALCALOIDES EM SISTEMA ÁCIDO/BASE (STAS- OTTO) E OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES HEX, ACOET E BUTOH. ....	36
FIGURA 9 – ESQUEMA DE DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS NA MICROPLACA. ....	37
FIGURA 10 – MUDANÇA NA ESTRUTURA QUÍMICA DA RESAZURINA APÓS REAÇÃO DE REDUÇÃO AO ENTRAR EM CONTATO COM CÉLULAS VIÁVEIS. ....	38
FIGURA 11 – ESQUEMA DE DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS NA MICROPLACA PARA ENSAIO DA CBM. ....	38
FIGURA 12 – ESQUEMA DOS TIPOS DE ADIÇÃO DE DPPH• POR BIOAUTOGRAFIA.....	39
FIGURA 13 : ESQUEMA DA TÉCNICA DE INIBIÇÃO DE ABTS+ PELO MÉTODO TEAC. ....	41
FIGURA 14 – EXTRATO MEOH DE N. REYNEI.....	42
FIGURA 15 – CROMATOPLACAS DESENVOLVIDAS NO SISTEMA FRACO E VISUALIZADAS SOB RADIAÇÃO 254NM (A), 366 NM (B), COM SOLUÇÃO VAS. ....	44
FIGURA 16 – CROMATOPLACAS DESENVOLVIDAS NO SISTEMA FORTE E VISUALIZADAS SOB RADIAÇÃO 254NM (A) E 366 NM (B). ....	44
FIGURA 17 – CROMATOPLACAS DESENVOLVIDAS NO SISTEMA PARA ALCALOIDES E VISUALIZADAS SOB RADIAÇÃO 254NM (A) E 366 NM (B). ....	45
FIGURA 18 – CROMATOPLACAS REVELADAS COM SOLUÇÃO DE FBS (A), NP/PEG (B), KOH (C) E DRAGENDORFF (D), RESPECTIVAMENTE.....	46
FIGURA 19 – PERFIL CROMATOGRÁFICO (A E B).....	47
FIGURA 20 – ESPECTRO RMN 1H DO EXTRATO MEOH DE N. REYNEI. ....	48
FIGURA 21 – ENSAIO ANTIOXIDANTE POR BIOAUTOGRAFIA COM DPPH•. ....	51
FIGURA 22 – CURVA PADRÃO DO ÁCIDO GÁLICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO SEQUESTRO DE RADICAL DPPH• PARA AS FRAÇÕES E EXTRATO BRUTO DE N. REYNEI EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. ....	52
FIGURA 23 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO SEQUESTRO DE RADICAL ABTS+• DAS FRAÇÕES E EXTRATO BRUTO DE N. REYNEI EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. ....	53
<hr/>	
QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO TURU. ....	24
QUADRO 2 – DADOS SOBRE PADRÕES, MASSA APLICADA, SOLUÇÃO DE REVELADORES, CLASSES DE METABÓLITOS AVALIADAS E FORMA DE IDENTIFICAÇÃO. ....	34
<hr/>	
TABELA 1 – ABUNDÂNCIA RELATIVA DOS SINAIS DE 1H NO EXTRATO MEOH DE N. REYNEI.....	49
TABELA 2 – DADOS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CIM E CBM. ....	50

## LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ABTS - 2,2'- azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio  
aC. – Antes de Cristo  
ACN – Acetonitrila  
AcO – Acetona  
AcOEt – Acetato de Etila  
ALT – Aminotransferase de alanine  
AST – Aminotransferase de aspartame  
BHT – Butilidroxitolueno  
CBM – Concentração Bactericida Mínima  
CCDAE – Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência  
CIM – Concentração Inibitória Mínima  
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal  
DCM – Diclorometano  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DMSO-d6 – Dimetilsulfóxido deuterado  
Fr. AcOEt – Fração Acetato de Etila  
Fr. Aq – Fração Concentrada de Alcaloides Totais  
Fr. ButOH – Fração Butanólica  
Fr. HEX – Fração Hexânica  
ISARH – Instituto Socioambiental dos Recursos Hídricos  
DP – Desvio Padrão  
DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil  
MeOH – Metanol/Metanólico  
MO – Material Orgânico  
MTT – brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-1H-tetrazólio  
NCCLS – *National Committe for Laboratory Standards*  
NEQs – Novas Entidades Químicas  
OECD – *Organization for Economic Cooperation and Development*  
OMs – Organismos Marinhos  
P – Padrão  
PNs – Produtos Naturais  
PNMs – Produtos Naturais Marinhos  
RMN – Ressonância Magnética Nuclear  
TEAC – Capacidade antioxidante equivalente ao trolox  
Trolox – (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromono-2- carboxílico  
*N. reynei* – *Neoteredo reynei*

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UFPA – Universidade Federal do Pará

## LISTA DE SIMBOLOS

Å – Amperes

CC50 % – Concentração Citotóxica 50%

céls – Células

cm – Centímetros

g – gramas

h – hora/horas

kg – Quilograma

mg – Miligrama

min – Minutos

mL – Mililitro

mm – Milímetros

mol – Moléculas

n – Tamanho da Amostra

nm – Nanômetros

µg – Microgramas

pH – Potencial de hidrogênio

% – Porcentagem

< – Menor que

> – Maior que

°C – Graus celsius

<sup>1</sup>H – Hidrogênio

H<sub>2</sub>O – Água

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Ácido metanoico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1 GERAL.....	16
2.2 ESPECÍFICO .....	16
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
3.1 PRODUTOS NATURAIS .....	17
3.1.1 PRODUTOS NATURAIS MARINHOS (PNMs) .....	21
3.2 INVERTEBRADOS MARINHOS E O FILO MOLLUSCA.....	23
3.2.1 <i>TURU: BREVE HISTÓRICO</i> .....	24
3.3 ANTIOXIDANTE E MÉTODOS DE AVALIAÇÃO .....	27
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
4.1 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL ORGÂNICO (MO).....	30
4.2 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE .....	31
4.3 OBTENÇÃO DE EXTRATO BRUTO DE <i>N. REYNEI</i> .....	31
4.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO .....	32
4.4.1 PERFIL QUÍMICO E CROMATOGRÁFICO POR CCDAE.....	32
4.4.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE .....	33
4.4.3 PERFIL ESPECTROSCÓPICO POR RMN DE <sup>1</sup> H.....	34
4.5 EXTRAÇÃO PELO MÉTODO STAS-OTTO E PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO .....	35
4.6 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO BRUTO E DAS PARTIÇÕES DE <i>N. REYNEI</i> .....	36
4.6.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO FRAÇÕES DE <i>N. Reynei</i> POR MICRODILUIÇÃO .....	36
4.6.1.1 Obtenção da concentração inibitória mínima (CIM).....	37
4.6.1.2 Obtenção da concentração bactericida mínima (CBM) .....	38
4.6.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	39
4.6.2.1 Bioautografia com radical DPPH*.....	39
4.6.2.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH* .....	40
4.6.2.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical ABTS•+ (TEAC) .....	40
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
5.1 RENDIMENTO DO EXTRATO .....	42
5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO .....	42
5.2.1 TESTES DE SOLUBILIDADE E SELETIVIDADE .....	42
5.2.2 PERFIL QUÍMICO E CROMATOGRÁFICO POR CCDAE.....	43
5.2.3 PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE .....	46
5.2.3 PERFIL ESPECTROSCÓPICO POR RMN DE <sup>1</sup> H.....	47
5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	49
5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	50
5.4.1 BIOAUTOGRAFIA.....	50

5.4.2 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE COM OS RADICAIS DPPH (SEQUESTRO DE RADICAIS) E METODO TEAC (RADICAL ABTS <sup>+</sup> ) .....	51
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A química dos produtos naturais (PNs) desperta o interesse do homem desde os primórdios da humanidade, visto que existem relatos sobre os benefícios da utilização de extratos de plantas e animais há milênios, para os mais diversos fins, tais como: remédios, cosméticos, corantes, pesticidas, venenos e outros (JIMENEZ et al, 2020; GRABLEY et al., 1998). Acredita-se, no entanto, que a primeira forma de uso tenha sido por meio da ingestão de ervas e folhas na busca por alívio de dores e cura de doenças, fato que se estendeu por diversas civilizações. Como exemplo, os chineses que desenvolveram preparos de remédios a partir de ervas medicinais para tratar vários tipos de doenças, os egípcios que faziam uso de plantas na mumificação de corpos, os romanos que usavam venenos encontrados na natureza para execução de prisioneiros e várias civilizações indígenas americanas que faziam uso de corantes naturais para fins estéticos, religiosos e de proteção ao longo da História (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

A princípio, existem relatos esporádicos, de pelo menos dois milênios atrás, de agentes farmacologicamente ativos de organismos marinhos (OMs) sendo isolados e identificados. No entanto, a exploração de produtos naturais marinhos (PNMs) de modo sistemático, pela comunidade científica, como fonte de compostos bioativos, ocorreu apenas no século XX. Assim, do início da década de 1960 ao início da década de 1970, grupos acadêmicos nos Estados Unidos e Organizações vinculadas às empresas farmacêuticas, como o Instituto Roche de Farmacologia Marinha na Austrália, relataram suas descobertas em uma variedade de formatos, sendo considerada a melhor fonte de informações sobre estes e estudos anteriores à revisão de 1976 de Ruggieri (RUGGIERI, 1976; NEWMAN; CRAGG, 2016). Segundo Blunt e colaboradores (2018) no período de 1957 a 2016, foram descritos cerca de 28.609 novos compostos, e embora cerca de 25% destas substâncias estejam relacionadas a estudos de bioatividade, muitas já apresentaram potenciais biológicos relevantes.

Os compostos marinhos isolados de animais invertebrados, algas, fungos e bactérias, demonstraram ter diversas atividades biológicas, tais como: antioxidante, antineoplásica, antibacteriana, anticoagulante, antifúngica, antimalárica, antituberculose, antiviral, anti-inflamatória, cicatrizante, dentre outras (NAZEER, NAQASH, 2011; PACHAIYAPPAN et al., 2014; CARROLL et al., 2020; NWEZE et al. 2020; SHIN, 2020; SOUZA et al., 2020; STIEN et al., 2020; BLUNT et al., 2018). Nesse contexto, têm-se como exemplo de atividade de invertebrados marinhos com potencial biológico relevante, as propriedades antioxidantes, analgésicas, anti-inflamatórias e antineoplásicas, respectivamente, de alguns compostos, como a Briostatina I, isolada do briozoário *Bugula neritina*, Halicondrina B, primeiramente isolada de *Halicondria okadai* e Dolastatina, isolada do molusco *Dolabella auricularia* e cianobactérias que estão sendo avaliadas em testes clínicos. Onde, atualmente, 8 PNMs já foram aprovados para uso clínico (5 como medicamentos antitumorais) e 38 estão sendo testados em ensaios clínicos pela FDA<sup>1</sup> (*Food and Drug Administration* – EUA). (JIMENEZ, 2020; LIANG; LUO; LUESCH, 2019; RANGEL; FALKENBERG, 2015)

A costa brasileira possui uma fauna marinha extremamente vasta e esses produtos constituem um subcampo bem estabelecido de PNMs, que vêm ganhando cada vez mais atenção nas últimas décadas. Esta biodiversidade pode gerar benefícios econômicos, uma vez que pode ser fonte de matéria-prima para diversos setores da indústria, como farmacêutica, alimentícia, cosmética e química (JIMENEZ, 2020; RUMENGAN, 2021). A vista do exposto, dentre a diversidade de OMs da região amazônica, o teredo ou turu, como é conhecido popularmente, se destaca por apresentar relatos que o associam a atividades antituberculose, antineoplásica, fortificante e propriedades afrodisíacas (MÜLLER E LANA, 2004).

O turu pertence ao filo Mollusca, classe Bivalvia, ordem Myoida, família Teredinidae, gênero Neoteredo. Sobre esse animal, verifica-se que a literatura científica é rica em informações a respeito da importância ecológica do turu como acelerador na reciclagem de matéria orgânica, fragmentando e digerindo macrodetritos de madeira em ecossistemas marinhos

---

<sup>1</sup> Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos.

(FIGUEIREDO, 1994), dos quais existem vários estudos voltados para a taxonomia e distribuição geográfica do turu, no entanto possuem poucos trabalhos relacionados a pesquisa de seus constituintes químicos e sua atividade biológica, sendo que esses foram realizados em grande maioria, apenas com a bactéria endosimbionte do turu isolada, *Teredinibacter turnerae*, que apresenta atividade antimicrobiana (HAN et al., 2013).

Portanto, considerando a abundância desse molusco na região Amazônica, as características promissoras dos OMs, o aumento da qualidade de vida das comunidades que fazem uso do turu para fins medicinais e a escassez de estudos sobre suas propriedades com fins terapêuticos, o objetivo do estudo foi realizar a caracterização química e a avaliação da atividade biológica do extrato de turu, *Neoteredo reynei* (*N. reynei*), visto que o potencial farmacológico do turu, pode agregar valor a espécie, que sirva como alternativa para medicina tradicional e traga benefícios para sociedade além de contribuir para o conhecimento químico do gênero.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Realizar caracterização química e avaliar a atividade antioxidante e microbiológica do extrato metanólico de *N. reynei* e suas partições em ensaios *in vitro*.

### 2.2 Específico

- Realizar prospecção química, por CCDAE, CLAE e RMN, do extrato de *N. reynei*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato e frações de *N. reynei in vitro* frente bactérias gram-positivas e gram-negativas pelo método de microdiluição seriada para determinação da CIM e semeio em placa para determinação da CBM;
- Analisar a capacidade antioxidante por bioautografia e avaliar a atividade antioxidante com os radicais DPPH<sup>•</sup> (sequestro de radicais) e método TEAC (RADICAL ABTS<sup>+•</sup>) do extrato e frações *N. reynei*.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Produtos naturais

Produtos naturais são compostos produzidos por organismos vivos, que são divididos em duas classes: metabolismos primário e secundário (Fig. 1). Os produtos do metabolismo primário são considerados essenciais para a vida, comum a todos os seres vivos, sendo estes: carboidratos, aminoácidos, nucleotídeos, ácidos graxos, esteroides e lipídios. Já os produtos do metabolismo secundário não são considerados essenciais, porém podem garantir vantagens para a sobrevivência e perpetuação da espécie em seu ecossistema, entre eles estão: terpenoides, flavonoides, alcaloides, cumarinas, taninos, saponinas e ácidos fenólicos, que são considerados princípios ativos (SINGH, 2015).

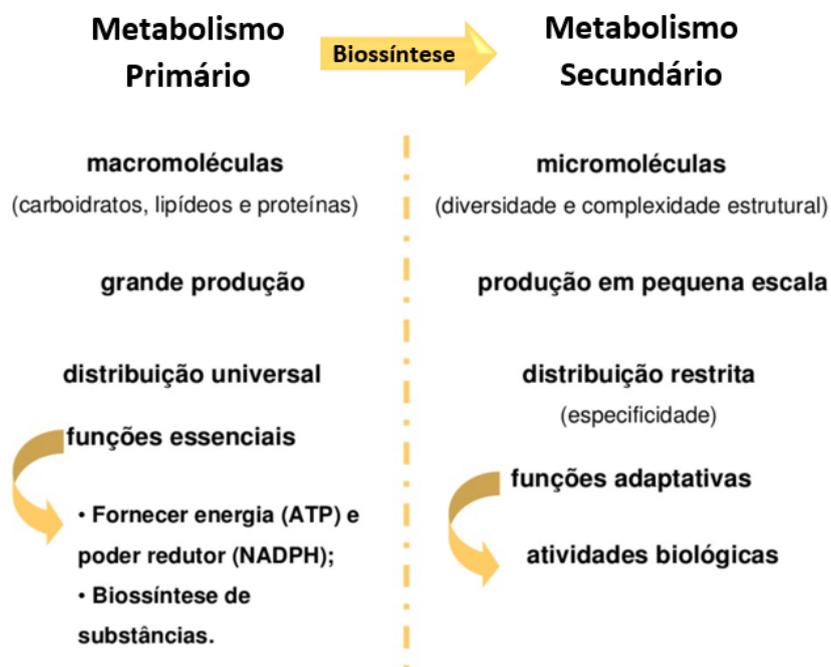


Figura 1 - Mecanismo simplificado dos metabolismos primário e secundário.  
Fonte: Autora.

Os seres humanos confiam nos recursos naturais para sua sobrevivência desde os primórdios, tanto para atender suas necessidades

básicas (obtenção de alimentos, abrigos e roupas), quanto para fins medicinais. Sendo esse último ponto exemplificado pela utilização de plantas terrestres, no todo ou em partes, na medicina tradicional de várias culturas, as quais formaram a base de um sistema sofisticado, com os primeiros registros datados de cerca de 2600 aC., documentando o uso de aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas na Mesopotâmia (CRAGG; NEWMAN, 2013; VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006). Já no Brasil, as plantas medicinais eram incorporadas nas práticas tradicionais dos indígenas, antes mesmo do período de colonização no século XVI, demonstrando sua importância terapêutica (DA ROCHA et al., 2015).

Através da investigação científica de produtos naturais foram descobertas as substâncias químicas, cujas algumas propriedades benéficas proporcionaram a base da indústria farmacêutica (RAMAWAT, 2008; ATANASOV et al. 2015). No entanto, o isolamento das primeiras substâncias puras do Reino vegetal ocorreram apenas no século XIX, quando se isolaram os alcaloides, como exemplo, a própria morfina (analgésico e narcótico) em 1805, a quinina (antimalárico) e estricnina (pesticida), em 1820, (VALLE, 1978; PINTO et al., 2002) como derivados de plantas terrestres, conforme Fig. 2.

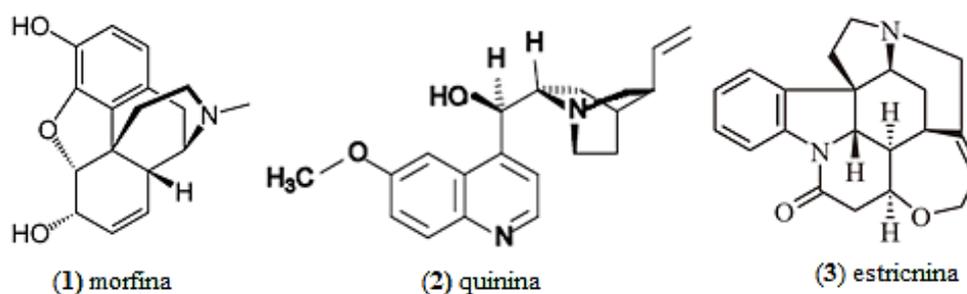


Figura 2 – Primeiras substâncias puras isoladas: (1) morfina, (2) quinina e (3) estricnina.  
Fonte: Autora.

Com o passar do tempo e os avanços tecnológicos, grandes conquistas foram alcançadas na área de pesquisa com produtos naturais, principalmente com a descoberta do  $^{14}\text{C}$  para estudos de biossíntese (até então era estudada por meio das vias biogenéticas apenas como natureza especulativa), com a introdução de métodos espectroscópicos (para análise estrutural) e técnicas cromatográficas (que permitem fracionar, purificar, isolar e identificar

compostos mais complexos em quantidades menores de massa e menos tempo), alterando gradualmente os objetivos e a filosofia dos trabalhos de isolamento e de determinação estrutural de PNs (PINTO et al., 2002).

Nesse sentido, pesquisas no mundo marinho proporcionaram novas estruturas químicas com potente eficácia, mas cujos mecanismos de ação e alvos moleculares permanecem desconhecidos na maioria dos casos. No entanto, mesmo inseridos neste cenário, os organismos marinhos forneceram componentes com atividade antioxidante importantes como exemplo: terpenoides, taninos, flavonoides, alcaloides e saponinas; que mostraram efeitos positivos na prevenção de diversas doenças. E podemos citar alguns medicamentos de OMs que já foram aprovados para uso clínico, como: citarabina (Cytosar-U®), vidarabina (Vira-A®; US descontinuado), trabectedina (Yondelis®), ziconotida (Prialt®), mesilato de eribulina (Halaven®), plitidepsina (Aplidin®), brentuximabe vedotina (Adcetris®) e ésteres etílicos de ácido ômega-3 (Lovaza®) (CABEZA et al., 2021; JIMENEZ et al. 2020)

Segundo pesquisas realizadas entre 1981 a 2019, nos últimos quase 39 anos foram inseridas no mercado 1881 novas entidades químicas (NEQ) que apresentaram as mais variadas atividades biológicas: antifúngica, antibacteriana, antiviral, anticancerígena, cicatrizantes entre outras, onde 37,7% desses novos fármacos são PNs ou tiveram origem de PNs, representado nos gráficos da Fig. 3 (p.20). Essas estatísticas demonstram o grande potencial e importância dos PNs para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos, mostrado na Figura 3 (a e b) (NEWMAN; CRAGG, 2020).

A identificação de NEQs seguras e eficazes para um determinado alvo terapêutico constitui o principal foco das indústrias farmacêuticas. Na qual os requisitos básicos para uma NEQ de uso oral incluem boa disponibilidade, potência intrínseca, ausência de toxicidade e vantagens significativas quando comparado à terapia usual, para o tratamento da doença alvo. E o potencial de ação completo de um NEQ só é conhecido até que seja testado nas diferentes etapas de ensaios clínicos. No entanto, a taxa de insucesso deste processo é alta, devido perda de eficácia clínica, propriedades farmacocinéticas inadequadas, toxicidade, reações adversas, razões

comerciais, limitações farmacotécnicas entre outros fatores (NEWMAN; CRAGG et al., 2016). Contudo, os dados só comprovam a importância e contribuição da pesquisa de PNs como fonte para o desenvolvimento de novos fármacos, pois, apesar do longo processo enfrentado para se inserir uma NEQ no mercado, muitas se originaram de PNs.

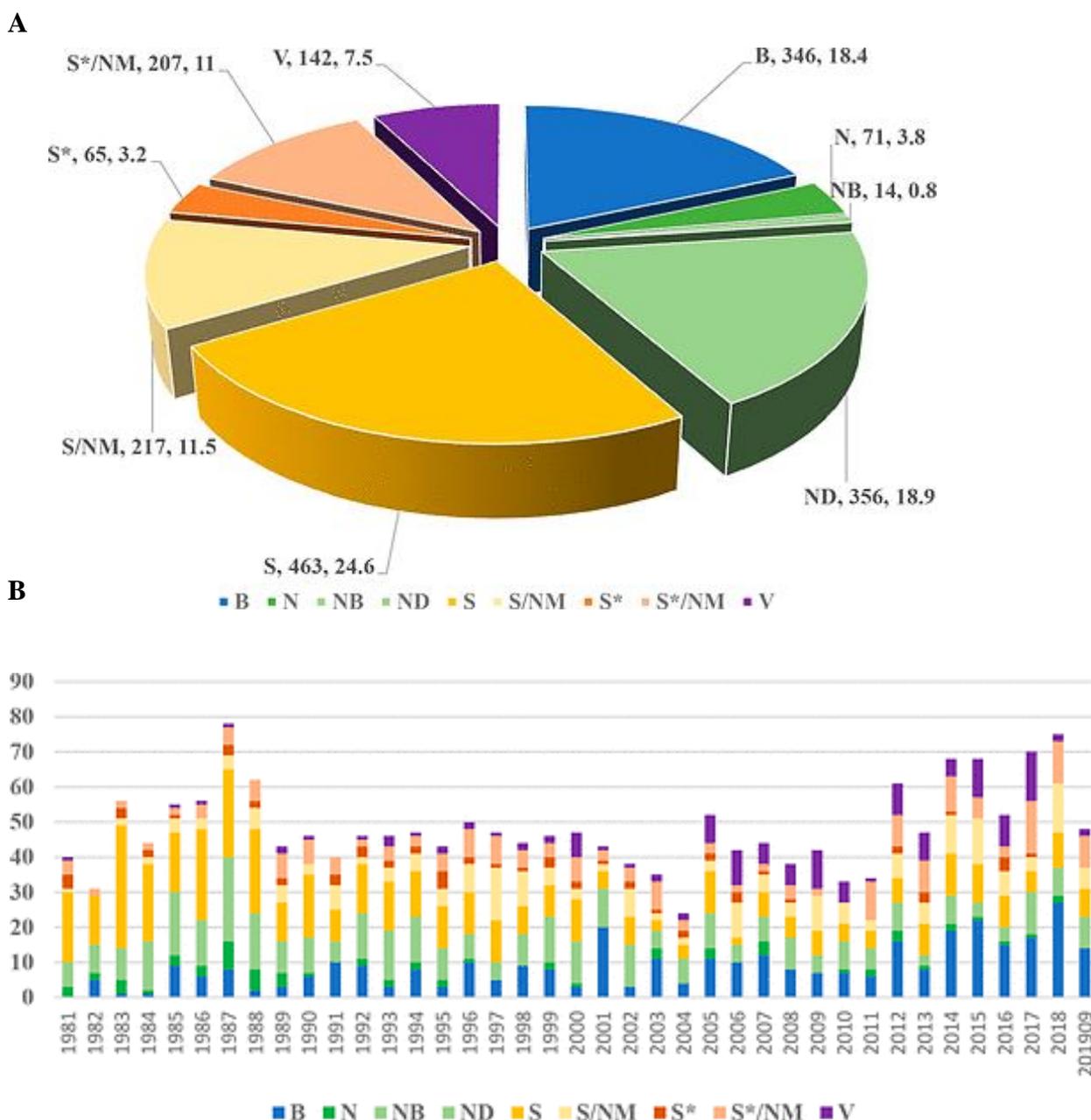


Figura 3 – (A) Todos os novos medicamentos aprovados 01JAN31 a 30SET19; n = 188; (B) Todos os novos medicamentos aprovados por fonte / ano; n = 1881.

Fonte: NEWMAN E GRAGG, 2020.

### 3.1.1 PRODUTOS NATURAIS MARINHOS (PNMs)

Os oceanos cobrem 70% da superfície da Terra, compreendendo 90% da biosfera global em volume (SNELGROVE, 2016). Abrigando milhões de Organismos Marinhos (OMs) que produzem substâncias utilizadas na comunicação, defesa, inibição do desenvolvimento de competidores, reprodução, ou como subproduto do seu metabolismo. Os quais podem apresentar atividades biológicas diversas, sendo úteis no desenvolvimento de novas terapias contra vários tipos de doenças. As atividades biológicas mais comumente encontradas entre os OMs são: antibacteriana, imunomoduladora, antifúngica, propriedades anti-inflamatórias, anticâncer, antimicrobiana, neuroprotetora, analgésica e antimalárica. (MALVE, 2016). Por conseguinte, devido à grande variedade de espécies marinhas, o oceano é considerado um reservatório exclusivo de PNs bioativos, com características estruturais únicas, que geralmente não são encontradas em plantas terrestres (HUSSIEN; MOHAMED, 2015).

A primeira pessoa que decidiu investigar o ambiente marinho como fonte de medicamentos é desconhecida. Porém, a exploração dos PNs como fonte de compostos bioativos pela comunidade científica surgiu com a necessidade de se combater novas linhagens resistentes de microrganismos e produzir fármacos eficazes contra novas doenças (SNELGROVE, 2016). Historicamente, se considera que a química de PNs teve início com o isolamento dos nucleosídeos espongotimidina e espongouridina (*Spongothymidine* e *Sphongouridine*) (Figura 4) a partir da esponja *Cryptotethya crypta*, que a partir do estudo de análogos sintéticos desses nucleosídeos deu origem aos fármacos citarabina (*Cytosine Arabinoside* - Ara-C) (Figura 4), um anticancerígeno, e vidarabina (*Adenine Arabinoside* - Ara-A) (Figura 4), um antiviral, descritos por Bergmann, no século XX, sendo os primeiros compostos derivados de OMs a atingir o mercado para uso clínico (BERGMANN, 1949; BERGMANN et al., 1957).

O Ara-C é produzido sinteticamente e distribuído como Cytosar-U®, utilizado para o tratamento de leucemia aguda não-linfocítica, leucemia crônica mielocítica e leucemia da meninge. O Ara-A é obtido

biotecnologicamente, através da cultura de bactéria terrestre *Streptomyces antibioticus* e distribuído como Vira-A® e é indicado para o tratamento de viroses por Herpes simplex e Herpes zoster. Esses compostos deram origem a uma nova geração de agentes antivirais, dos quais os mais notáveis são, o aciclovir (*Acyclovir*) (Figura 4) e a azidotimidina (Azidothymidine - AZT) (Fig. 4), que foi o primeiro medicamento utilizado no tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – AIDS, como potentes agentes antivirais (BUTLER, 2008; NEWMAN; CRAGG, 2007; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; ZHANG; DEMAIN, 2007).

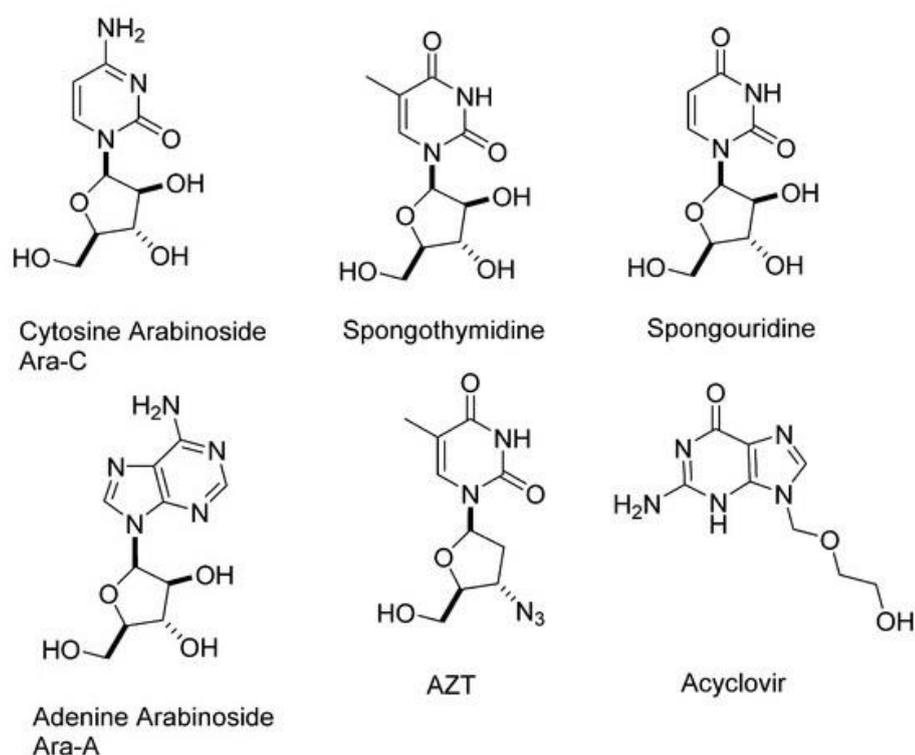


Figura 4 – Estruturas dos nucleosídeos Spongothymidine e Spongouridine isolados e seus análogos sintéticos.

Fonte: Autora.

Segundo Blunt et al., (2018) no período de 1957 a 2016, foram descritos cerca de 28.609 novos compostos de OMs, e apenas nos últimos 5 anos foram relatados mais de 5.000, sendo que o total no último ano desse período foram de 1.277 novos compostos. Demonstrando um aumento significativo do número de PNMs com atividades biológicas caracterizados nos últimos anos. À vista

do exposto, se acredita que a proporção de medicamentos de origem marinha tende a aumentar num futuro próximo.

### 3.2 Invertebrados marinhos e o filo Mollusca

Até o momento, invertebrados marinhos (Porifera, Echinodermata, Cnidarian, Mollusca, Arthropoda) forneceram uma diversidade de PNs, incluindo terpenos, alcaloides, hidrocarbonetos alifáticos, esteroides, carboidratos, aminoácidos e peptídeos (CABEZA et al. 2021; BLUNT et al., 2018). Esses compostos de origem marinha têm uma abundância de propriedades terapêuticas, incluindo anticoagulante, antimicrobiano, cicatrizante, imunomoduladora, antioxidante, anticâncer, anti-inflamatório, anti-hipertensivo e outras propriedades medicinais (JIMENEZ et al. 2020; AHMAD, 2018). Entre os OMs, o filo *Mollusca* é de particular interesse como fonte de novos potenciais medicamentos, pois apresentam uma diversa fonte de compostos que ainda são pouco exploradas.

Os moluscos representam 7% dos animais existentes no planeta Terra, se tornando o segundo maior filo animal com cerca de 100 a 200 mil espécies, das quais mais de 52 mil foram descritas e nomeadas (BENKENDORFF, 2010, BOUCHET; DUARTE, 2006). O filo *Mollusca* também inclui 8 classes diferentes: Gastropoda, Bivalvia, Scaphopoda, Cephalopoda, Polyplacophora, Monoplacophora, Caudofoveata e Solenogastres (BENKENDORFF, 2010, PONDER, LINDBERG, 2008). Nesse contexto, associada a essa vasta diversidade biológica, há uma profusão química, pois os moluscos usam metabólitos secundários para se comunicar e se defender contra predadores e invasores patogênicos. Para tanto, esses animais precisam de sua imunidade adquirida, dependem essencialmente de sua imunidade inata e dos compostos bioativos para se proteger contra patógenos microbianos e curar feridas no ambiente marinho rico em micróbios (BENKENDORFF, 2010; DANG et al., 2019).

O filo *Mollusca* têm sido um foco significativo na busca de metabólitos secundários biologicamente ativos, com mais de 1.145 PNs isolados dessas

espécies nas últimas três décadas (BENKENDORFF, 2010). Dois PNs derivados de moluscos foram clinicamente testados e aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA); ziconotida de cascas de um caracol de cone para o tratamento de dor intensa e Brentuximab vedotin para tratamento de linfoma e doença de Hodgkin (JIMENEZ et al. 2020; MAYER et al., 2010).

Existem pelo menos 18 outros compostos originalmente encontrados em moluscos e cianobactérias associadas que estão em ensaios clínicos (RASHMI et al. 2020; PRABHU; PATRAVALE, 2017). No entanto, 52% dos PNs de moluscos que foram isolados até o momento nunca foram testados para qualquer atividade biológica (WANG et al., 2020; BENKENDORFF, 2014). Além disso, <1% das espécies moluscas conhecidas foram estudadas por seus metabólitos secundários, embora um grande número de espécies tenha sido usado como fonte de medicamentos tradicionais, o que forneceu o estímulo para pesquisas adicionais do potencial terapêutico de PNs derivados deste filo (AHMAD et al., 2018).

### 3.2.1 TURU: BREVE HISTÓRICO

Os turus pertencem ao filo Mollusca, classe Bivalvia, ordem Myoida, subordem Pholadina, superfamília Pholadoidea, família Teredinidae, Gênero *Neoteredo*, espécie *Neoteredo reynei* (SCHOCH et al.,2020), organizados para melhor visualização, no quadro 1:

Quadro 1 – Classificação taxonômica do turu.

<b>Filo</b>	<b>Mollusca</b>
<b>Classe</b>	<b>Bivalvia</b>
<b>Ordem</b>	<b>Myoida</b>
<b>Subordem</b>	<b>Pholadina</b>
<b>Superfamília</b>	<b>Pholadoidea</b>
<b>Família</b>	<b>Teredinidae</b>
<b>Gênero</b>	<b>Neoteredo</b>
<b>Espécie</b>	<b><i>Neoteredo reynei</i></b>

Fonte: Adaptado de Müller e Lana, 2004.

Hoagland e Turner (1981) consideram os bivalves perfuradores de madeira como um grupo altamente especializado em utilizar a madeira como abrigo e alimento no ambiente marinho. O desenvolvimento adaptativo dos turus deve ter ocorrido após o surgimento das plantas lenhosas terrestres, que serviriam de substrato, inicialmente na forma de troncos carregados pelos rios e posteriormente com o aparecimento de plantas tolerantes à água salobra. Com o desenvolvimento dos ambientes de manguezais, os perfuradores de madeira teriam encontrado uma fonte permanente e abundante de substrato (LOPES; NARCHI 1997).

Estudos de fósseis e análises filogenéticas da superfamília Pholadoidea indicam que a família Teredinidae teria evoluído de um ancestral da família Pholadidae, já adaptado a furar madeira, mas utilizando-a apenas como abrigo. Posteriormente algumas espécies teriam se especializado na utilização da madeira como alimento (HOAGLAND; TURNER, 1981). Os registros fósseis mais antigos e confiáveis de palhetas de Teredinidae datam do Paleoceno (TURNER, 1966).

Mais recentemente foi revisado amplamente a taxonomia do grupo discutida por Turner (1966), que surgiu com um novo sistema de classificação para os Teredinidae, no entanto, apesar deste enorme esforço de ordenação taxonômica, a maioria das espécies validadas por Turner (1966) permanece sem uma adequada descrição das palhetas, descrição importante para classificação das espécies (MÜLLER; LANA, 2004). Onde podemos ver a representação estrutural de um turu a seguir na Fig. 5 p. A-25 e B-26:



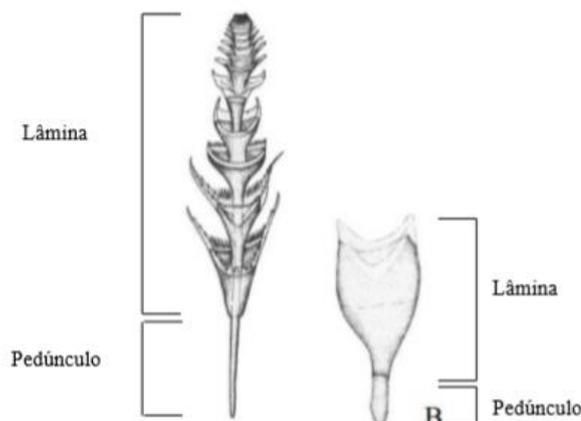


Figura 5 – (A) Representação do Teredo sp.: 1 – Capuz; 2 – Valva; 3 – Manto; 4 – Palheta; 5 – Sifão exalante; 6– Sifão inalante. (B) Palhetas de dois gêneros de Teredo sp.: Gênero Bankia e Teredo.

Fonte: Adaptado de Müller e Lana, 2004.

Apesar da dificuldade para a organização taxonômica, o turu se distribui amplamente sobre o globo terrestre, ocorrendo tanto em ambientes estuarinos como oceânicos. São preferencialmente perfuradores de madeira de água rasas, ocorrendo em abundância na região entre marés até a profundidade de 150 metros e excepcionalmente em profundidade de até 8.000 metros (TURNER; YAKOVLOV, 1983). Foram calculadas em 22 as espécies de turu na costa brasileira, sendo que na costa do Pará há potencial para ocorrer 19 dessas espécies, as quais foram analisadas quanto a sua distribuição geográfica por Rios (1994).

Assim como as esponjas e outros animais marinhos, os turus abrigam um grupo de bactérias endossimbiontes, sendo a principal delas a *Teredinibacter turnerae*, que se encontram em bacteriócitos, chamados de glândulas de Deshayes, uma região das brânquias. A qual, demonstrou através de estudos, a capacidade dessa bactéria gram-negativa de digerir a celulose (produzindo enzimas proteolíticas, xilanolíticas e celulolíticas) e de fixar o nitrogênio, apontando para uma relação de simbiose (WATERBURY et al., 1983).

A *Teredinibacter turnerae* dispõe aproximadamente de 7% do seu genoma para síntese de metabolitos secundários policetílicos e peptídicos não ribossômicos, representando uma taxa extremamente expressiva e maior do que a encontrada em bactérias *Streptomyces sp.*, conhecidas como grandes produtoras de antibióticos (HAN et al., 2013). Além disso, mostrou-

se que *T. turnerae* é filogeneticamente relacionada ao simbiote de briozoários Candidatus *Endobugula sertula* produtor de Briostatina (LIM; HAYGOOD, 2004). A bactéria *T. turnerae* apresenta atividade antibiótica sobre os organismos procariontes, podendo, tais organismos procariontes serem bactérias Gram positivas ou Gram negativas. Testes in vitro realizados comprovam que a atividade proliferativa do extrato bruto de bactérias *T. turnerae* apresenta um amplo espectro de ação, inibindo o crescimento de bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Sphigomonas*, *Sthenotrophomonas*, mas não limitadas a estes gêneros. (ELSHAHAWI et al., 2012; HAN et al., 2013; TRINDADE-SILVA et al., 2009).

### 3.3 Antioxidante e métodos de avaliação

Os antioxidantes são substâncias capazes de atrasar ou inibir a oxidação de um substrato oxidável. Com a finalidade de proteger as células sadias do organismo contra a ação oxidante dos radicais livres. Eles são essenciais na redução da atividade desses radicais nos organismos, mantendo o bom funcionamento das funções celulares (NEHA et al., 2019), para tanto, são introduzidos na dieta principalmente por frutas e vegetais, como o ácido ascórbico encontrado em frutas cítricas e  $\beta$ -caroteno em cenoura, abóbora e batata-doce (RASHEED; AZEEZ, 2019).

Os radicais livres são moléculas, átomos ou íons com um ou mais elétrons desemparelhados, altamente instáveis e reativos encontrados especialmente na forma de ânions de superóxidos ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroperóxidos ( $HO_2^{\bullet}$ ) e peróxidos de hidrogênio ( $H_2O_2^{\bullet}$ ) nos organismos vivos (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Esses radicais são continuamente produzidos pelo metabolismo humano e atacam principalmente amidos, gorduras, proteínas e ácidos nucleicos (NEHA et al., 2019), podendo ocasionar mutações no DNA, influenciar a atividade enzimática, peroxidação lipídica da parede celular e diversas doenças que podem ser letais (BIRANGANE et al., 2011).

Diversos antioxidantes naturais como flavonoides, vitaminas, ácidos fenólicos, carotenoides e sintéticos como hidroxitolueno butilado (BTH) são de

grande interesse para a indústria alimentícia tendo em vista o uso na conservação de alimentos, cor e sabor e na indústria farmacêutica e cosmética pelo efeito protetor nos sistemas biológicos que permitem o uso na prevenção e tratamento de Alzheimer, câncer, desaceleração do envelhecimento, diabetes, hepatite, inflamações em geral e doenças cardiovasculares (NEHA et al., 2019). Entre estes, os naturais são uma alternativa promissora aos sintéticos pelo baixo custo, além de serem compatíveis com a dieta e não apresentarem efeitos nocivos no corpo humano (SINDHI et al., 2013).

Atualmente, no mercado, os antioxidantes são conhecidos por sua relativa toxicidade, podendo ser prejudicial à saúde do homem (MISHARINA et al., 2009; AMORATI et al., 2013; VITALE et al., 2020). Dessa forma, a indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética tem intensificado as buscas por antioxidantes de origem natural menos nocivo à saúde humana, que possam trazer benefícios para a melhoria da qualidade da vida, protegendo o organismo de danos causados pelos radicais livres, prevenindo ou adiando o início de várias doenças (MISHARINA et al., 2009; AMORATI et al., 2013; VITALE et al., 2020).

Existem várias metodologias de análise qualitativa e quantitativa da atividade de antioxidantes isolados ou em extratos de plantas e animais, como espectrofotométrica, eletroquímicas e cromatográficas, cada uma diferindo em relação ao mecanismo de geração desses radicais e/ou reação com as moléculas alvo, assim como a detecção/quantificação dos produtos da reação (PISOSCHI; NEGULESCU, 2011). Em geral, as técnicas espectrofotométricas são amplamente utilizadas para avaliação da atividade antioxidante por serem mais simples, rápidas e baratas, sendo mais comuns os ensaios *in vitro* de inibição do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) e 2,2'-azino-bis-(3-ácido etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS<sup>•+</sup>) (BECKER et al., 2019).

Os radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> são radicais orgânicos sintéticos de coloração roxa e azul-esverdeado, respectivamente, que são reduzidos pela presença de substâncias antioxidantes promovendo a descoloração (Fig. 6, p. 29), assim a atividade pode ser mensurada a partir do decréscimo da absorção em um determinado comprimento de onda (BECKER et al., 2019). Ambos os ensaios são bem aceitos para avaliação da atividade antioxidante, no entanto, eles são limitados por usarem radicais não fisiológicos e, dentre as duas

metodologias, o ensaio do  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  se apresenta mais amplo por englobar uma grande variedade de moléculas antioxidantes hidrofílicas e lipofílicas do que o ensaio com do  $\text{DPPH}^{\bullet}$  (FLOEGEL et al., 2011).

Outro método que também pode ser empregado para avaliação da atividade antioxidante, principalmente em extratos e frações, é a bioautografia com  $\text{DPPH}^{\bullet}$ . Neste método, a amostra passa inicialmente pela separação dos componentes da mistura por cromatografia em camada delgada e, então, é realizada a adição dos radicais  $\text{DPPH}^{\bullet}$  na cromatoplaça desenvolvida, seja por contato, imersão ou pulverização de uma solução contendo os radicais livres. Dessa forma, as bandas que reduzirem o radical  $\text{DPPH}^{\bullet}$  apresentarão coloração amarela indicando atividade (CHOMA; JESIONEK, 2015).

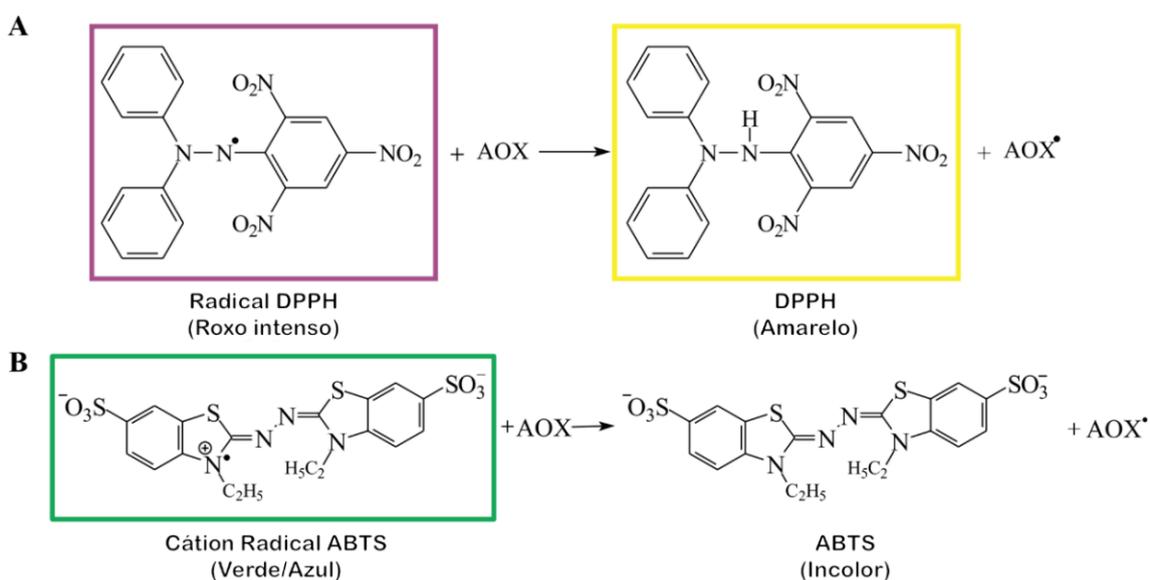


Figura 6 – Reações de neutralização do ensaio do  $\text{DPPH}^{\bullet}$  (A) e  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  (B).

Fonte: Adaptado de Becker et al. (2019).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta e processamento do material orgânico (MO)

Foram coletados 814 gramas (g) de turu, em troncos de *Rhizophora mangle* (Fig. 7), em estado inicial de decomposição, em área de mangue no município de São Caetano de Odivelas, Pará, Brasil (0°40'48.5"S 48°00'27.6"W). Os moluscos foram lavados com água do rio no momento da coleta, armazenados em frascos autoclavados e guardados em caixa térmica com gelo para ser transportada ao Laboratório de Cromatografia Líquida (LABCROL-UFGA), onde as amostras foram congeladas em *freezer* à temperatura de -25 graus Celsius (°C) e secas em liofilizador. Posteriormente, os organismos foram cominuídos e homogeneizados com auxílio de almofariz, pistilo e peneira até a obtenção de grânulos uniformes, do qual foram obtidos 221g de MO (ver APÊNDICE A).



Figura 7 – Turu coletado em tronco de *Rhizophora mangle*.

Fonte: Autora.

## 4.2 Identificação da espécie

As amostras foram identificadas como da espécie *N. Reynei* a partir do livro de Müller e Lana: “*Manual de identificação de moluscos bivalves da família dos tereidinídeos encontrados no litoral brasileiro*”, por meio de chaves de identificação e depositados no Instituto Socioambiental dos Recursos Hídricos (ISARH), na Universidade Rural da Amazônia, com auxílio do especialista em biologia marinha Prof. Dr. Marko Herrmann. (ver APÊNDICE B)

## 4.3 Obtenção de extrato bruto de *N. reynei*

A extração dos compostos bioativos presentes no turu foi realizada no LABCROL e ocorreu por meio da maceração de 221g do MO liofilizado e cominuído. Foi utilizado acetona (AcO), a fim de desnaturar as proteínas celulares e liberar os metabólitos secundários das células, e metanol (MeOH) absoluto como solventes extratores (TEDIA® COMPANY – Fairfield, USA), ambos com tempo de extração de 24 horas (h). Após cada batelada as soluções foram filtradas e os solventes renovados por mais duas vezes, totalizando três bateladas seguidas com cada solvente respectivamente, no final as soluções de acetona e metanol foram misturadas. Na extração foi adotada uma relação massa de amostra por volume de solvente de aproximadamente 1:10 (1 g de amostra para 10 mL de solvente). A solução obtida foi concentrada em evaporador rotativo – modelo R-3 (BÜCHI – Flawil, Switzerland) a temperatura de média de 40°C e pressão de 120mBar, em seguida levada a estufa de circulação de ar à temperatura de 45°C, até atingir peso constante para obtenção do extrato bruto seco.

#### 4.4 Caracterização química do extrato

Para a caracterização do extrato obtido foram utilizadas diferentes técnicas para análise e detecção de compostos orgânicos, como Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

##### 4.4.1 PERFIL QUÍMICO E CROMATOGRÁFICO POR CCDAE

O perfil químico e cromatográfico foi obtido por CCDAE, desenvolvido em sistema robotizado HPTLC (CAMAG – Muttenz, Switzerland) usando os módulos de aplicação (*Automatic TLC Sample 4*) e fotodocumentação (*TLC Visualizer*). Foram utilizadas cuba de vidro CAMAG (Muttenz, Switzerland), cromatoplasmas de sílica gel F-254 60 Å, com suporte de alumínio (SILICYCLE– Quebec, Canadá) como fase estacionária e solventes grau HPLC (TEDIA® COMPANY – Fairfield, USA) como fase móvel.

Inicialmente, foi realizado teste de solubilidade da amostra com solventes orgânicos puros: diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), acetona (AcO), etanol (EtOH), metanol (MeOH), água (H<sub>2</sub>O), e mistura de solventes. Posteriormente, massas de 15, 30 e 45 µg do extrato foram aplicadas (Módulo ATS 4 – CAMAG, Muttenz, Switzerland) sobre as placas cromatográficas para avaliar a seletividade destes solventes orgânicos frente ao analito. Nesta etapa, as placas foram eluídas em cubas de eluição contendo 100% de solvente orgânico (ordem crescente de polaridade), e então selecionadas as fases móveis que apresentaram melhor seletividade.

Na segunda etapa, as placas cromatográficas foram eluídas em cubas, onde foram feitos os ajustes de força entre os solventes selecionados. Na terceira etapa, foi realizada a adição de ácido e base no eluente, a fim de avaliar a influência desses nos parâmetros de resolução e seletividade e

definir os sistemas isocráticos de eluentes para metabolitos de baixa polaridade, alta polaridade e alcaloides.

Definidos os sistemas, foram aplicadas sobre cromatoplasmas (4x10 cm) alíquotas de 100 µg/inóculo do extrato de *N. reynei* e 1 µg/inóculo do padrão. As cromatoplasmas foram eluidas em cuba de vidro com percurso cromatográfico de 70 mm, para avaliar a presença de flavonoides, compostos fenólicos, cumarinas, terpenos, esteroides e alcaloides.

As cromatoplasmas eluidas foram fotodocumentadas nos comprimentos de onda 254 e 366 nm e luz visível antes e depois de serem derivatizadas com soluções de reveladores seletivos para avaliação das classes de metabólitos secundários presentes. A identificação das classes foi realizada de acordo com proposto por Wagner e Bladt (2001) e/ou por comparação com a coloração dos padrões frente aos reveladores. Para o tratamento das imagens utilizou-se o software WinCats 1.4.6. Dados sobre padrões, massa aplicada, solução de reveladores, classes de metabólitos avaliadas e forma de identificação estão apresentados no quadro 2, p. 34.

#### 4.4.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE

O perfil cromatográfico da amostra por CLAE foi adaptado da metodologia de Snyder et al., (1997). A análise foi realizada em cromatógrafo líquido modelo Prominence LC-20AT (Shimadzu -Tokyo, Japão) com detector de arranjo de diodo (DAD) e coluna Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µm) (PHENOMENEX – Torrance, USA). O extrato foi previamente submetido ao *clean up* em cartucho de extração em fase sólida (SPE) Strata C18-E (PHENOMENEX – Torrance, EUA) com H<sub>2</sub>O:ACN (2:8). A partir da amostra tratada, foi preparada uma solução de 1000 ppm e analisado em gradiente amplo de H<sub>2</sub>O e ACN com fluxo de 1 mL/min e modificador orgânico variando linearmente de 5 a 100%, em 60 minutos (min). Para o tratamento de dados foi utilizado o software LC/solution 1.20.

Quadro 2 – Dados sobre padrões, massa aplicada, solução de reveladores, classes de metabólitos avaliadas e forma de identificação.

Classes	Padrão	Massa (µg)	Revelador	Visualização	Coloração
Terpenos / Esteroides	β-amirina	0,50	Solução etanólica de Vanilina 1% (m/v) e ácido sulfúrico 10% (v/v) (VAS)	Visível	Violeta
Flavonoides	Rutina	0,25	Solução metanólica de 2-aminoetil-difenilborinato 1% (NP) seguido de solução etanólica de polietileno glicol 400 1% (PEG)	366 nm	Amarelo / Verde / Alaranjado
Alcaloides	Brucina	2,00	Soluções aquosas de nitrato de bismuto 2% (m/v) e ácido tartárico 25% (m/v) (Solução A), iodeto de potássio 40% (m/v) (Solução B) e ácido tartárico 20% (m/v) (Solução C). O reagente foi preparado misturando-se as soluções A, B e C nas proporções de 1:1:10, respectivamente (Dragendorff)	Visível	Alaranjado-marrom
Cumarinas	Esculina	0,05	Solução etanólica de hidróxido de potássio 5% (m/v)	366 nm	Azul cintilante
Compostos fenólicos	Rutina	0,50	Solução aquosa de <i>Fast Blue Salt</i> 0,5% (m/v) (FBS) seguido de solução etanólica de hidróxido de sódio 10% (m/v)	Visível	Vermelho-marrom

Fonte: Autora.

#### 4.4.3 PERFIL ESPECTROSCÓPICO POR RMN DE <sup>1</sup>H

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H foi obtido em espectrômetro Bruker modelo Ascend™ (Rheinstetten, Germany), operando a 400 MHz. Foi diluído 30 mg de extrato em 600 µL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>) e transferidas para tubos de ressonância. Para controle e tratamento de dados utilizou-se o software TopSpin 3.6.0 e os deslocamentos foram registrados em valores adimensionais δ (ppm), tendo como referência interna o sinal do solvente DMSO-d<sub>6</sub>.

#### 4.5 Extração pelo método Stas-Otto e partição líquido-líquido

A extração pelo método Stas-Otto (ácido/base), foi realizada para pesquisa de alcaloides. O extrato metanólico (MeOH) bruto seco foi solubilizado em solução de MeOH acidificado (HCl 0,1 mol/L, pH 1), e ultrassom. Após a solubilização, a solução foi submetida à partição líquido-líquido com hexano por três vezes, em seguida as partes hexânicas foram secas em evaporador rotativo dando origem a fração hexânica (Fr. HEX). O resíduo aquoso ácido foi alcalinizado até pH 10 com hidróxido de amônio e submetido a uma nova partição com AcOEt por três vezes, dando origem a fração Acetato de etila (Fr.AcOEt). Novamente o resíduo aquoso foi submetido a uma partição, no entanto, com butanol por três vezes, dando origem a fração butanólica (Fr. ButOH) e a fração concentrada de alcaloides totais (Fr. Aq.), em seguida as frações foram secas em evaporador rotativo. A cada partição, foi utilizado uma quantidade de solvente, duas vezes o volume da solução particionada e deixadas por um período de 12h entre cada renovação de solvente.

A extração e fracionamento foram realizados pela metodologia clássica sugerida por Stas-Otto (ácido/base) de extração de alcaloides totais, como sugere a Fig. 8.

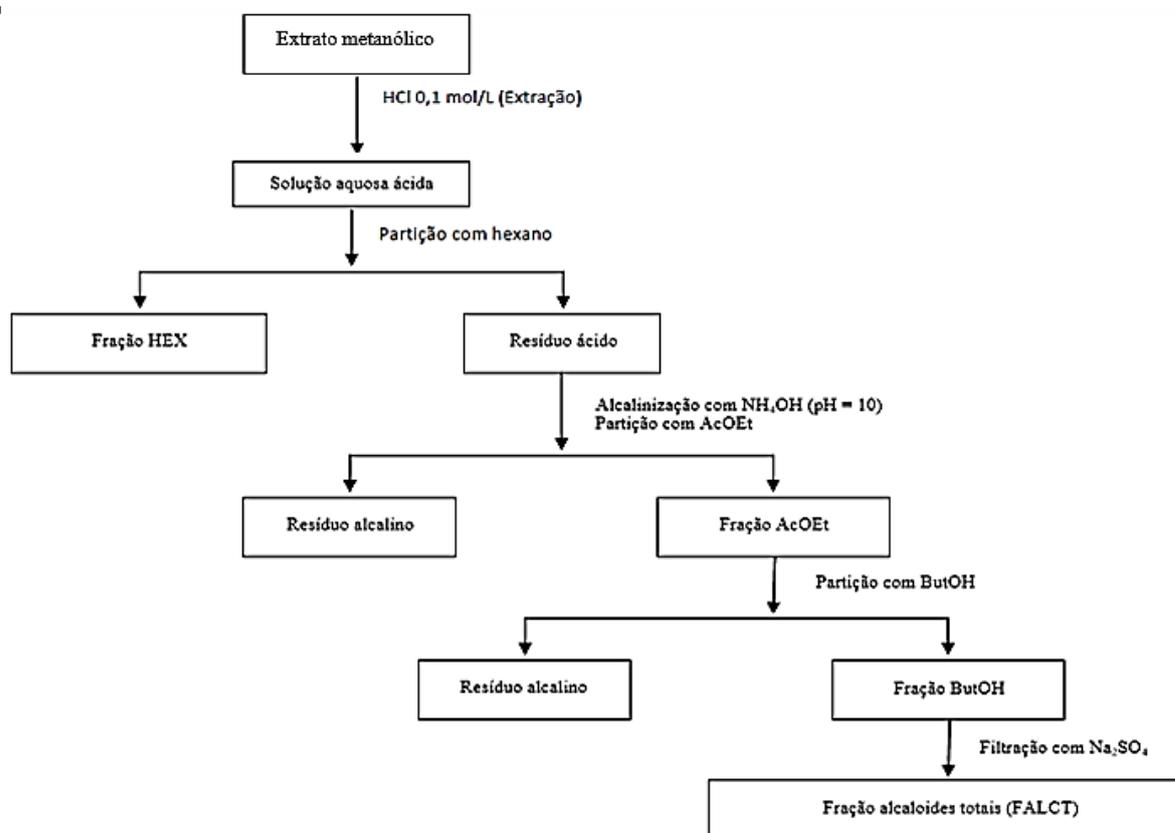


Figura 8 – Fluxograma do processo de extração de alcaloides em sistema ácido/base (Stas-Otto) e obtenção das frações HEX, AcOEt e ButOH.

Fonte: Autora.

#### 4.6 Avaliação *in vitro* do extrato bruto e das partições de *N. Reynei*

##### 4.6.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO FRAÇÕES DE *N. Reynei* POR MICRODILUIÇÃO

O método utilizado para realização da atividade antimicrobiana por microdiluição foi desenvolvido de acordo com a *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, utilizando microplaca com 96 poços.

Foi adicionada uma alíquota da amostra (100 µL) em cada poço da microplaca em conjunto com o inóculo bacteriano (100 µL) ( $1 \times 10^3$  UFC/ml). Para controle negativo, foi utilizado o mesmo solvente do extrato e para controle positivo, o antimicrobiano comercial cloranfenicol, contra bactérias

gram-positivas (50 µg/mL) e a gentamicina (10 µg/mL) para bactérias gram-negativas. Em seguida a microplaca foi incubada a 37 °C por 24h (CLSI M7-A9, 2012). Como representado no esquema da Fig. 9 a seguir:

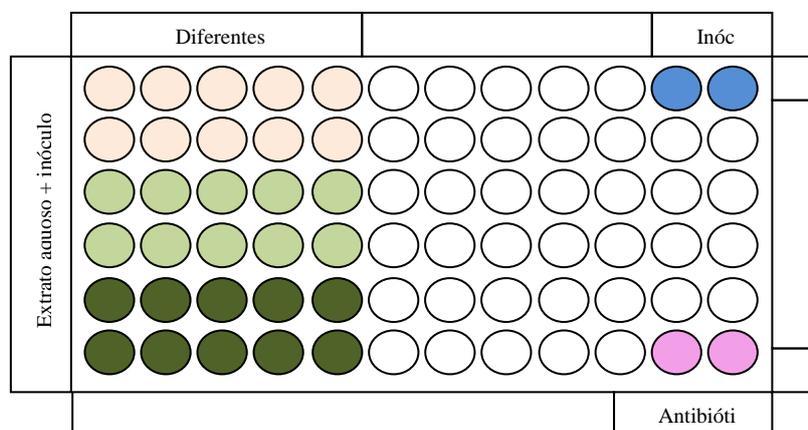


Figura 9 – Esquema de distribuição das concentrações dos extratos na microplaca.  
Fonte: NAVEGANTES, 2016.

#### 4.6.1.1 Obtenção da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM é a menor concentração de um agente antimicrobiano que impedirá o crescimento visível de um micro-organismo em testes de sensibilidade ou de pelo menos 50 % do micro-organismo avaliado (efeito bacteriostático). Para a obtenção da CIM foi utilizado o parâmetro da mudança de coloração obtida no teste colorimétrico por meio da resazurina (MONTEIRO et al. 2012), sendo esse um parâmetro que avalia a potência *in vitro* da amostra testada (CLSI M7-A9, 2012).

A resazurina é um corante de viabilidade que possui coloração azul, é utilizada como referência em testes de viabilidade celular, quando em contato com as células viáveis sofre uma redução e é transformada em resofurina, adquirindo então coloração rosa (Fig. 10) (CLSI M7-A9, 2012).

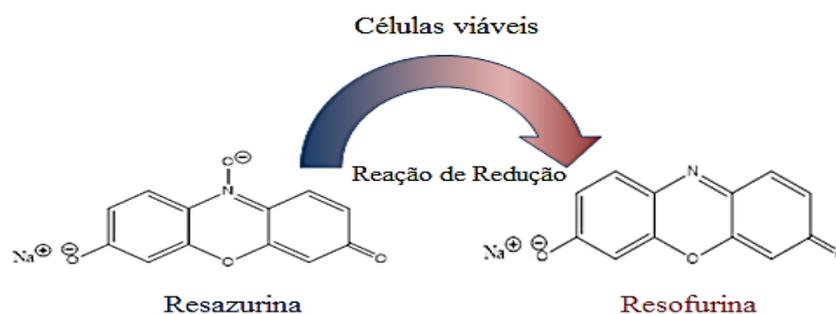


Figura 10 – Mudança na estrutura química da resazurina após reação de redução ao entrar em contato com células viáveis.

Fonte: PAMPLONA, 2018.

#### 4.6.1.2 Obtenção da concentração bactericida mínima (CBM)

A CBM é a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de matar 99 a 100 % dos micro-organismos testados. A CBM foi obtida a partir da técnica de contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Para a obtenção da CBM, 10  $\mu$ L de cada poço são semeados em placas de petri contendo Ágar Müeller Hinton em seguida incubadas por mais 24h à 37 °C para posterior leitura das UFC. Todos os ensaios são realizados com o controle positivo, o antimicrobiano comercial cloranfenicol contra bactérias gram-positivas (50  $\mu$ g/mL) e a gentamicina (10  $\mu$ g/mL) para bactérias gram-negativas, em seguida as placas são incubadas a 37 °C por 24 h (QUADROS et al, 2011). Como representado no esquema da Fig. 11.

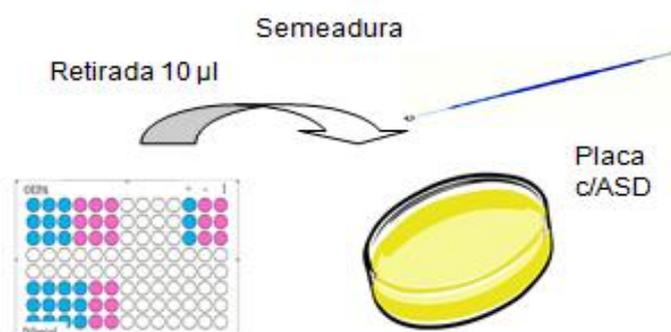


Figura 11 – Esquema de distribuição das concentrações dos extratos na microplaca para ensaio da CBM.

Fonte: PAMPLONA, 2018.

## 4.6.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

### 4.6.2.1 Bioautografia com radical DPPH•

O teste foi realizado por CCDAE nos mesmos parâmetros pontuados no tópico 4.4.1. A alíquota do extrato foi aplicada sobre a cromatoplaca em modo *spray band*, a concentração de 25µg/banda precedidas de aplicação do padrão ácido ascórbico (0,5µg/banda). A cromatoplaca foi desenvolvida em cuba no sistema isocrático de AcOEt:MeOH:AcO:H<sub>2</sub>O:Hfo (50:15:20:10:5) com percurso cromatográfico de 70mm. Após eluída, a cromatoplaca foi pulverizada com solução radicalar de DPPH• 40 mM (2,2-difenil-1-picril hidrazil) em metanol, armazenada por 60 minutos ao abrigo de luz e oxigênio, em seguida, fotodocumentada sob a luz visível (Fig. 12).

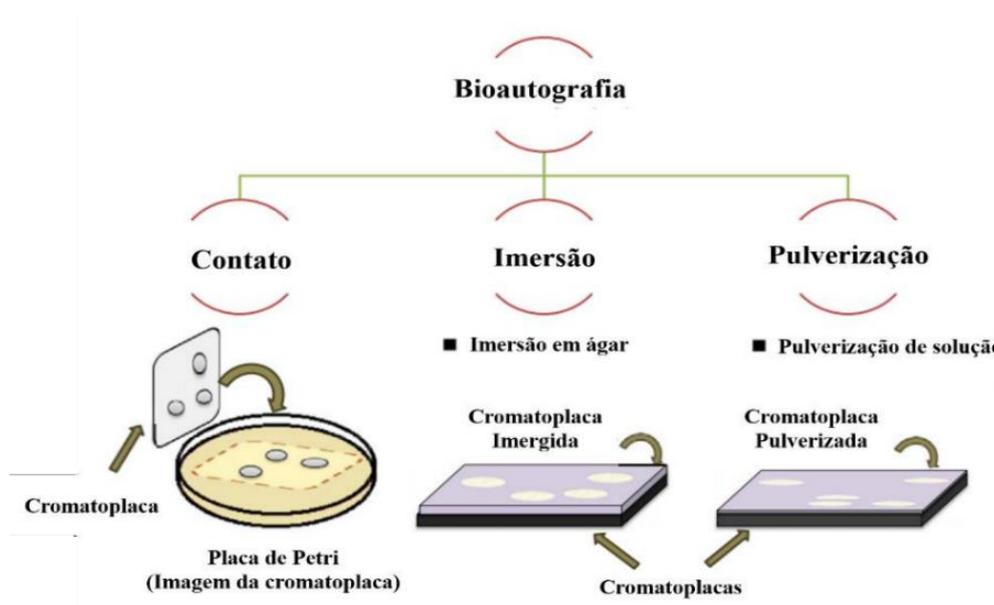


Figura 12 – Esquema dos tipos de adição de DPPH• por bioautografia.  
Fonte: Adaptado de Choma e Jesionek (2015).

#### 4.6.2.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH•

Este ensaio foi realizado de acordo com metodologia descrita por Brand-Williams et al. (1995), com algumas modificações. O radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um composto estável que apresenta coloração violácea e que, na presença de compostos antioxidantes, sofre redução ao aceitar um elétron ou hidrogênio destes compostos o que ocasiona diminuição da sua coloração. A diminuição desta coloração é diretamente proporcional à concentração de antioxidantes no meio e pode ser mensurada espectrofotometricamente.

Em um tubo de ensaio foram transferidos 3900 µL de solução de DPPH• ( $6 \times 10^{-5}$  mol/L) e 100 µL das amostras testadas em diferentes concentrações (1mg, 0,5mg, 0,25mg, 0,125 e 0,0625mg), seguida de homogeneização em vórtex e repouso no escuro a temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, realizou-se a leitura da absorbância da coloração da mistura resultante em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 515 nm. O percentual de inibição do radical foi calculado de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Inibição do DPPH}\bullet (\%) = [(\text{Abs. branco.} - \text{Abs. amostra}) / \text{Abs. branco}] \times 100$$

Onde:

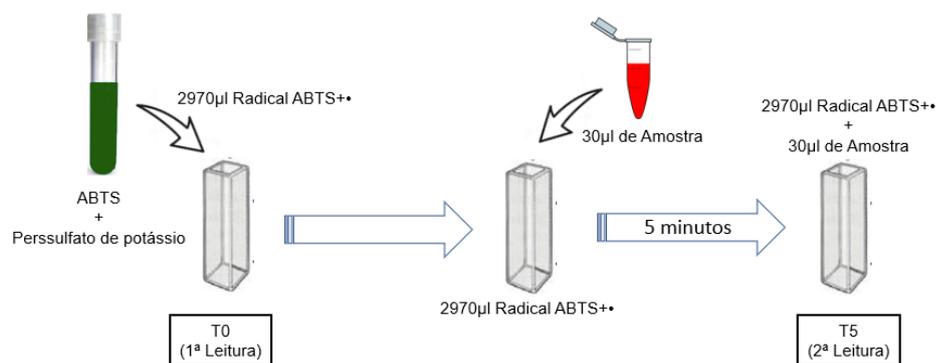
Abs.branco: absorbância do branco

Abs.amostra: absorbância de cada amostra

#### 4.6.2.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical ABTS<sup>•+</sup> (TEAC)

O método de avaliação da atividade antioxidante foi baseado no sequestro do radical livre ABTS<sup>•+</sup> (Re et al, 1999). Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (Sigma Aldrich A1888) com persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ; Sigma-Aldrich 60490), produzindo diretamente o radical cátion ABTS<sup>•+</sup>, cromóforo de coloração verde/azul (Fig.

13). A adição de antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, em escala dependente da capacidade antioxidante. Isto pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorbância lida a 734nm durante cinco minutos (Re et al., 1999).



RE *et al.* Free Rad Biol Med., v. 26, n. 9, p.1231-1237, 1999.

**Leitura em 734nm**

Figura 13 : Esquema da técnica de inibição de ABTS+ pelo método TEAC.

Em um tubo de ensaio foram adicionados 2970 µL da solução de trabalho ABTS<sup>•+</sup> e 30 µL das amostras testadas em diferentes concentrações (1mg, 0,5mg, 0,25mg, 0,125 e 0,0625mg), seguido de agitador em aparelho vórtex, vedação do sistema em ambiente escuro por 5 minutos a temperatura ambiente. Após este período, realizou-se a leitura da absorbância da coloração da mistura resultante em espectrofotômetro UV-Vis (SHIMATZU UV-160 1PC), no comprimento de onda de 734 nm (Re et al, 1999). Os resultados foram expressos em mmol/L.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Rendimento do extrato

A partir de 221 g de turu liofilizado foi possível obter 23 g de extrato bruto, o que corresponde a um rendimento de 10,7 %. O mesmo apresentou aspecto oleoso, formando duas fases distintas: primeira fase oleosa escura, segunda fase, com coloração marrom-alaranjada. Como mostra a Fig. 14, a seguir:



Figura 14 – Extrato MeOH de *N. reynei*.

Fonte: Autora.

### 5.2 Caracterização química do extrato

#### 5.2.1 TESTES DE SOLUBILIDADE E SELETIVIDADE

Inicialmente foi realizado o teste de solubilidade da amostra, no qual a mesma apresentou melhor solubilidade em MeOH:DCM:H<sub>2</sub>O (6:2:2), devido a sua característica tanto apolar, quanto polar. Posteriormente, foi realizado o teste de seletividade que apresentou como solventes mais seletivos o AcOEt e a AcO, para os compostos de baixa e média polaridade, e MeOH para os de alta polaridade.

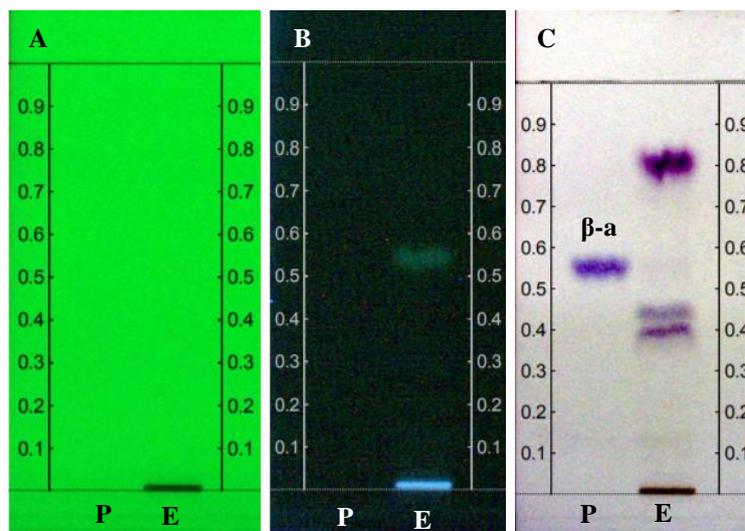
### 5.2.2 PERFIL QUÍMICO E CROMATOGRÁFICO POR CCDAE

As análises realizadas por CCDAE permitiram caracterizar o extrato MeOH de *N. reynei* quanto a sua complexidade e composição química a partir de três sistemas de eluição utilizados: sistema fraco, CHCl<sub>3</sub>:MeOH:CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (97:2:1), para compostos de baixa polaridade, sistema forte, AcOEt:MeOH:AcO:H<sub>2</sub>O:CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50:15:20:10:5), para compostos de alta polaridade e um sistema específico para alcaloides, AcOEt:MeOH:H<sub>2</sub>O:DMA (60:14:14:12).

Na Fig. 15A e 15B (p.44), estão apresentadas as cromatoplas desenvolvidas no sistema fraco, foto documentada nos comprimentos de ondas 254nm e 366nm, respectivamente. O extrato apresentou boa seletividade no sistema, constatado pela formação de bandas definidas e respectiva distribuição ao longo da placa, além de mostrar baixa complexidade dos constituintes de baixa polaridade caracterizada pela baixa presença de bandas de absorção, como a esverdeada observada no comprimento de onda em 366nm com Rf 0,53 e das bandas de coloração violetas relevandas ao pulverizar a cromatoplasca com solução VAS (Fig. 15C, p.44), nos Rfs 0,40, 0,43 e 0,81 sendo esta última um indicativo da presença de substâncias da classe dos terpenos/esteroides no extrato, tal como o observado no padrão de  $\beta$ -amirina.

O sistema forte apresentou boa seletividade, entretanto foi observada maior complexidade referente aos compostos mais polares, com fortes bandas de absorção visualizadas em 254 nm nos Rfs 0,10, 0,22, 0,42, 0,58 e 0,70 (Fig. 16A, p.44) e em 366 nm nos Rfs 0,09, 0,17, 0,22, 0,57 e 0,68 referente aos compostos de alta polaridade (Fig. 16B, p.44).

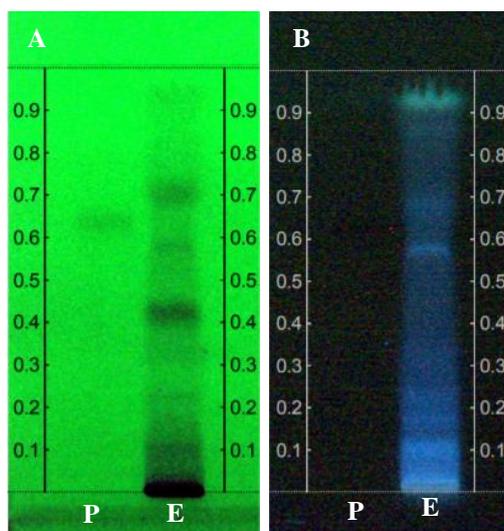
O sistema para alcaloides também apresentou boa seletividade, podendo observar sua complexidade referente aos compostos polares uma banda de absorção visualizada em 254 nm no Rf 0,17 (Fig. 17A, p. 45) e em 366 nm nos Rfs 0,29, 0,42 e 0,52, referente aos compostos de alta polaridade (Fig. 17B, p.45).



Legenda: Padrão (P); Extrato (E) e  $\beta$ -amirina ( $\beta$ -a).

Figura 15 – Cromatoplas desenvolvidas no sistema fraco e visualizadas sob radiação 254nm (A), 366 nm (B), com solução VAS.

Fonte: Autora.



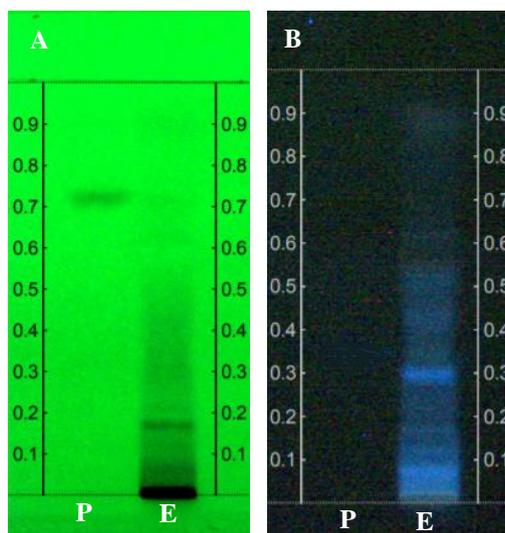
Legenda: Padrão (P); Extrato (E).

Figura 16 – Cromatoplas desenvolvidas no sistema forte e visualizadas sob radiação 254nm (A) e 366 nm (B).

Fonte: Autora.

O perfil químico dos constituintes de alta polaridade e específico para alcaloides foi avaliado quanto a presença de substâncias da classe dos flavonoides, fenólicos, cumarinas, alcaloides e potencial antioxidantes, por meio de pulverização sobre a cromatoplasca com soluções de reveladores seletivos para cada classe a ser avaliada, como proposto por Wagner e Bladt.

(2001). Para o sistema de alta polaridade se utilizou solução de FBS (Fig. 18A, p.46), foi observado a formação de três intensas bandas de coloração marrom-amarelado nos Rfs 0,18, 0,25 e 0,57, característica de compostos fenólicos. Não foi constatada no extrato a presença de flavonoides, devido à ausência de bandas verdes, amarelas ou alaranjadas na cromatoplaça quando derivatizada com NP/PEG e de cumarinas pela ausência de banda azul cintilante ao derivatizar a cromatoplaça com KOH 5% (Fig.18B e 18C, p.46), respectivamente. Já para o sistema específico para alcaloides ao pulverizar o Dragendorff, apareceram bandas laranjadas bem definidas nos Rfs 0,32 e 0,41 que são características da presença de alcaloides no extrato.

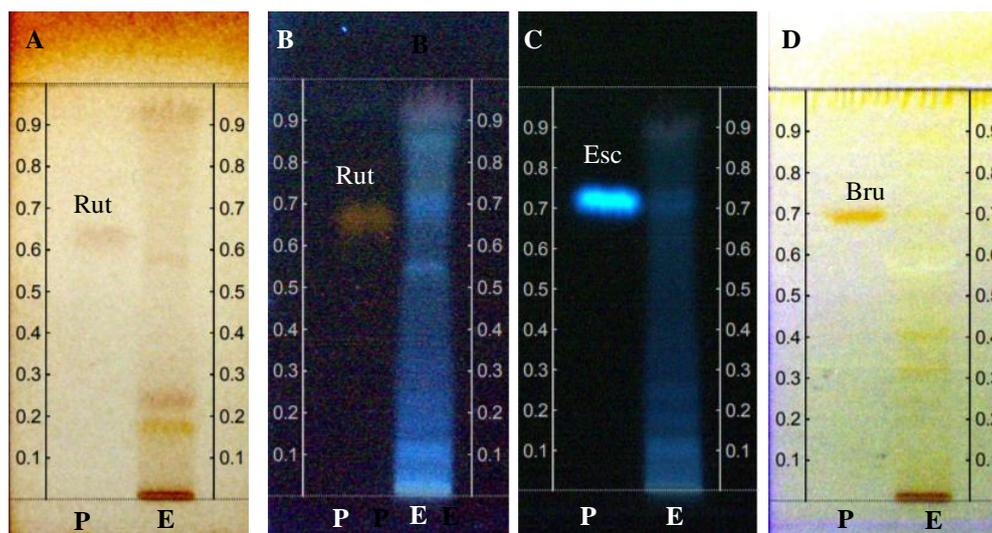


Legenda: Padrão (P) e Extrato (E).

Figura 17 – Cromatoplaças desenvolvidas no sistema para alcaloides e visualizadas sob radiação 254nm (A) e 366 nm (B).

Fonte: Autora.

Assim, os resultados obtidos por CCDAE revelam a forte presença de terpenos/esteroides no extrato, além de compostos fenólicos e alcaloides, ampliando os dados científicos a respeito da espécie de *N. reynei*. Também mostrou que o mesmo apresenta baixa complexidade e alto teor no que se refere a compostos de média-alta polaridade, caracterizado pelo número pequeno de bandas apresentadas e pela grande intensidade das bandas observadas nas cromatoplaças.



Legenda: Padrão (P); Extrato (E); Rutina (Rut); Esculina (Esc) e Brucina (Bru)  
 Figura 18 – Cromatoplas reveladas com solução de FBS (A), NP/PEG (B), KOH (C) e Dragendorff (D), respectivamente.

Fonte: Autora.

### 5.2.3 PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE

O perfil cromatográfico do extrato MeOH de *N. reynei* está apresentado na Fig. 19, p.47. No qual se observam os picos referentes aos componentes do extrato que são visíveis nos comprimentos de onda 210, 254, 280 e 310nm no cromatograma. Esses picos se concentram entre os tempos de retenção 2 e 10 minutos do tempo de análise e alguns poucos picos de absorção entre 43 e 64min, com bandas de maior intensidade concentradas entre os tempos de retenção de 4 e 6min. A vista do exposto, se verifica que o extrato apresenta caráter mais hidrofílico já que a maior parte das bandas se encontram em menos de 10min do tempo de análise, onde o teor de água na fase móvel é majoritário.

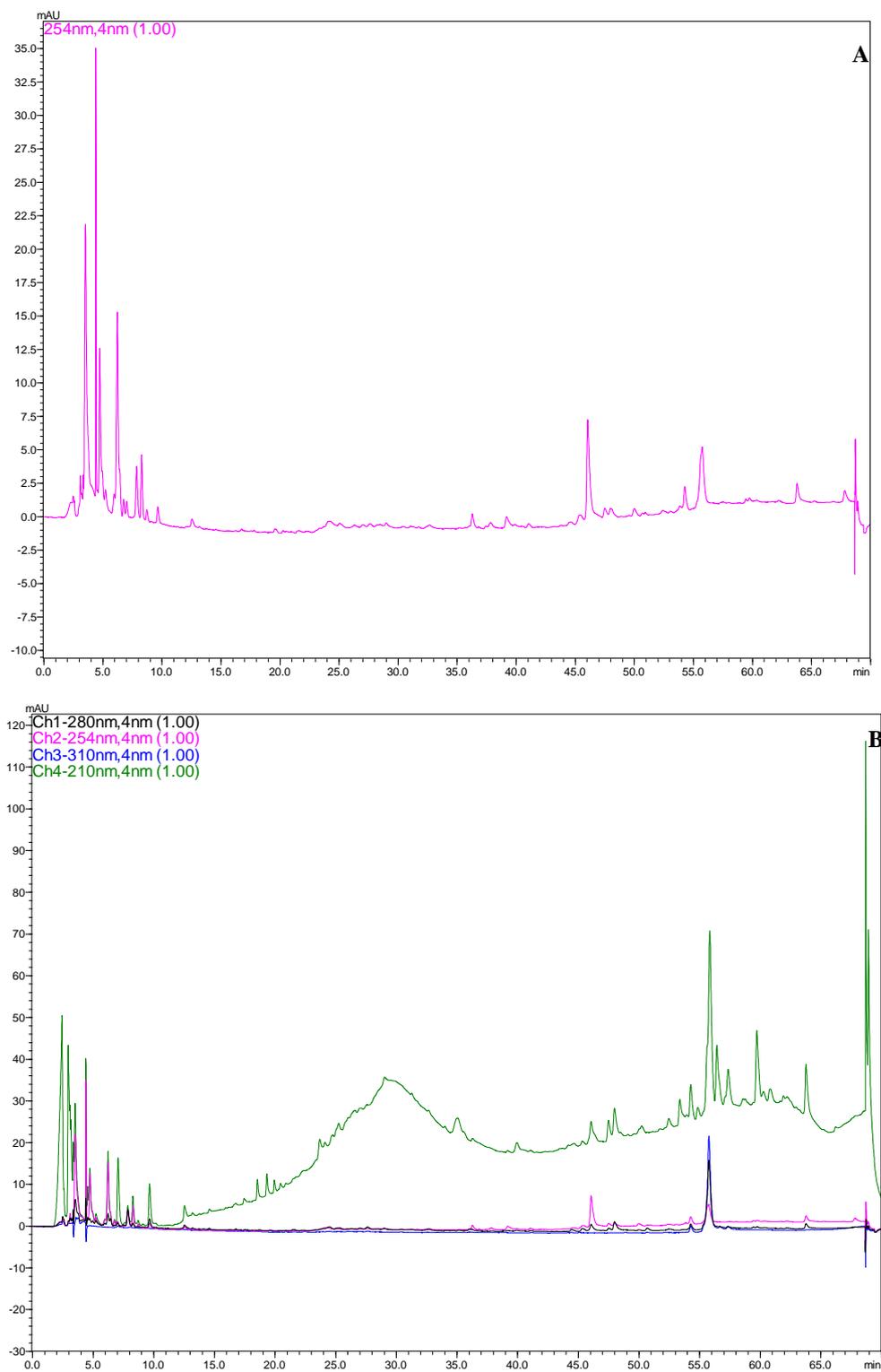


Figura 19 – Perfil cromatográfico (A e B).

Fonte: Autor.

### 5.2.3 PERFIL ESPECTROSCÓPICO POR RMN DE $^1\text{H}$

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato MeOH do turu está apresentado na Fig. 20. É possível observar que o extrato apresenta sinais de  $^1\text{H}$  distribuídos ao longo do espectro na faixa de 0,8 a 8,4 ppm, mostrando a diversidade dos tipos de hidrogênios presentes no mesmo.

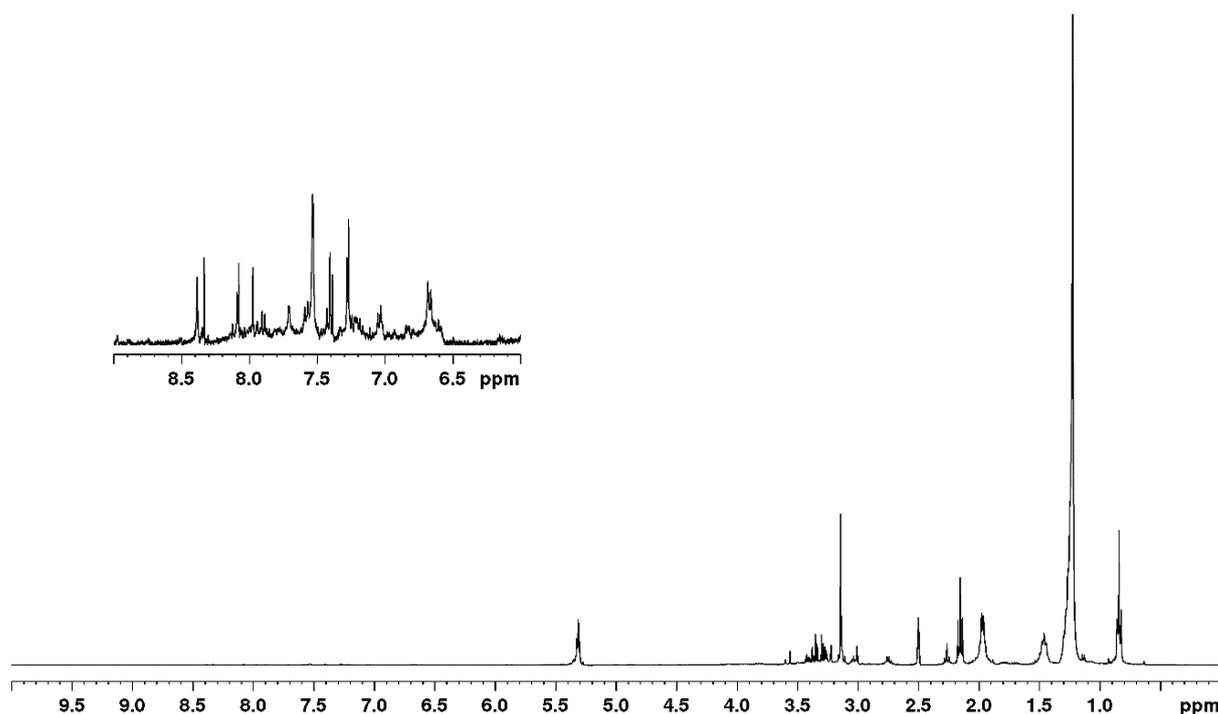


Figura 20 – Espectro RMN  $^1\text{H}$  do extrato MeOH de *N. reynei*.  
Fonte: Autor.

As percentagens de abundância dos sinais de  $^1\text{H}$  de diferentes grupos funcionais obtidas por análise quantitativa através da integração da área de determinados intervalos de deslocamento químico característicos de tipos de hidrogênios (SILVERSTEIN et al., 2019) estão apresentadas na Tabela 1. O sinal do solvente DMSO- $d_6$  em 2,5 ppm não foi considerado na integração. A região de 0,5 a 1,5 ppm, correspondente a hidrogênios metílicos ( $-\text{CH}_3$ ), metilênicos ( $-\text{CH}_2$ ) e metínicos ( $-\text{CH}$ ), foi a que apresentou maior abundância relativa com 63,80% da área do espectro, apontando, isso pode dar devido a presença de classes como terpenos, esteroides e ácidos graxos no extrato. Já a região de 1,5 a 3,0 ppm, característica de hidrogênios alifáticos de

carbonos vicinais a carbonos  $sp^2$ , oxidados ou nitrogenados, apresentou 18,89% da área do espectro e a região de 3,0 a 4,5 ppm, correspondente a hidrogênios de carbonos ligados a heteroátomo, apresentou área de 13,39% do espectro, representando a terceira e segunda maior abundância, respectivamente. Estes sinais indicam a forte presença de heteroátomo nas estruturas dos componentes do extrato, como oxigênio presente em açúcares alcaloides e macrólidos policetídeos. A região de 4,5 a 6,0 ppm apresentou área de 3,69% referente a abundância de hidrogênios ligados a carbono olefínico como insaturações presentes em ácidos graxos insaturados. A região de 6,0 a 9,0 ppm, correspondente a hidrogênios ligados a anel aromático, apresentou abundância relativa de 0,65%, que pode estar ligado a presença de compostos fenólicos como os peptídeos não ribossômicos. A região de 9,0 a 10,0 ppm não apresentou abundância relativa mensurável. Os sinais observados relativos a hidrogênios presentes em terpenos/esteroides, ácidos graxos, alcaloides e compostos fenólicos estão em concordância com o observado no perfil químico por CCDAE.

Tabela 1 – Abundância relativa dos sinais de  $^1H$  no extrato MeOH de *N. reynei*

Deslocamento químico (ppm)*	Próton Característico	Área (%)
0,5 – 1,5	-CH <sub>3</sub> ; -CH <sub>2</sub> ; -CH	63,80
1,5 – 3,0	CH <sub>3</sub> -C-O; CH <sub>3</sub> -N; Ar-CH <sub>3</sub> ; Ar-CH <sub>2</sub> -	17,89
3,0 – 4,5	CH <sub>3</sub> -C=O; -CH <sub>2</sub> -O-; -CH <sub>2</sub> -N-	13,39
4,5 – 6,0	HC=C-	3,69
6,0 – 9,0	Ar-H; -CH=O	0,65
9,0 – 10,0	-COH	0,00

\*Silverstein et al. (2019).

### 5.3 Atividade antimicrobiana

Vários estudos com a bactéria simbiote do turu, *Teredinibacter turnerae*, isolada de uma região das brânquias, mostraram sua atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram positivas ou Gram negativas. Além

disso, testes in vitro comprovaram que o extrato bruto de bactérias *T. Turnerae* apresentou um amplo espectro de ação, inibindo o crescimento de bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Sphigomonas*, *Sthenotrophomonas*, mas não limitadas a estes gêneros. (ELSHAHAWI et al., 2012; HAN et al., 2013; AMARO et al., 2009)

Mediante a possível atividade farmacológica do extrato de turu, realizou-se a atividade antimicrobiana do extrato MeOH e frações do turu por microdiluição para obtenção de CIM e CBM. Para avaliação da determinação da CIM foi utilizado o critério estabelecido por Aligiannis et al. (2001), em que um extrato é considerado forte inibidor quando seu CIM é de até  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ , inibidor moderado se seu CIM estiver acima de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  e abaixo de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  e inibidor fraco se seu CIM for acima de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ .

No entanto, os dados expressos na Tabela 2, mostraram que o extrato MeOH da *N. reynei* e suas frações não apresentaram ação antimicrobiana para nenhuma das espécies de bactérias testadas (*S. aureus*, *E. Coli*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*).

Tabela 2 – Dados da atividade antimicrobiana CIM e CBM.

CEPAS	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CIM E CBM $\text{mg.mL}^{-1}$									
	Fr. Hex		Fr. AcOEt		Fr. ButOH		Fr. Aq.		E. turu	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>S. aureus</i>	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
<i>E. fecalis</i>	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
<i>E. coli</i>	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
<i>P. aeruginosa</i>	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1

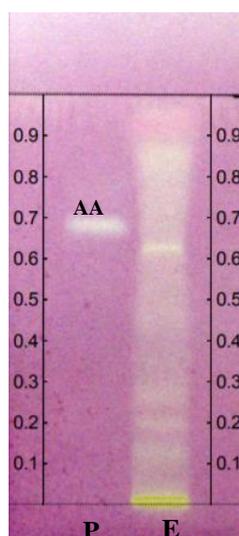
Fonte: Autora.

## 5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 5.4.1 BIOAUTOGRAFIA

A análise qualitativa do potencial antioxidante do extrato metanoico de *N. reynei* por bioautografia com o radical DPPH• permitiu identificar a presença de compostos antioxidantes, caracterizada pela formação de bandas amarelas sobre a cromatoplaça em Rf 0,10, Rf 0,18, Rf 0,25, Rf 0,62

e Rf 0,84, referentes à neutralização do radical (Fig. 21), como observado para o padrão ácido ascórbico. Estas bandas estão situadas nos mesmos Rfs observados para os compostos fenólicos identificados durante o perfil químico (Fig. 18, p. 46), podendo-se atribuir tal atividade à presença desta classe, já que estas são muito conhecidas pela capacidade de sequestrar radicais livres (KRISHNAMOORTHY et al., 2019; ZHONG, KHAN, SHAHIDI, 2007; PACHAIYAPPAN et al., 2014).



Legenda: Ácido ascórbico (AA)

Figura 21 – Ensaio antioxidante por bioautografia com DPPH•.  
Fonte: Autora.

#### 5.4.2 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE COM OS RADICAIS DPPH• (SEQUESTRO DE RADICAIS) E METODO TEAC (RADICAL ABTS•+)

Nas figuras 22 e 23 (p. 52-53) mostram a atividade antioxidante entre o controle positivo, ácido gálico e o extrato bruto e frações de *N. reynei* em diferentes concentrações pelos métodos de sequestro dos radicais DPPH• e Método TEAC (radical ABTS•+), respectivamente.

O ensaio DPPH• foi realizado utilizando o controle positivo o ácido gálico (0,1; 0,05; 0,02; 0,01 e 0,005mg/mL), que mostrou um percentual de inibição do radical DPPH• de 100% na concentração de 0,1mg/mL. As figuras

22A-E mostraram que o extrato bruto e todas as frações apresentaram boa atividade antioxidante em relação ao ácido gálico, sendo que o extrato bruto e hexano e acetato inibiram uma média de 57,6%, as frações butanol, aquoso e extrato bruto inibiram uma média de 65% do radical DPPH<sup>•</sup>.

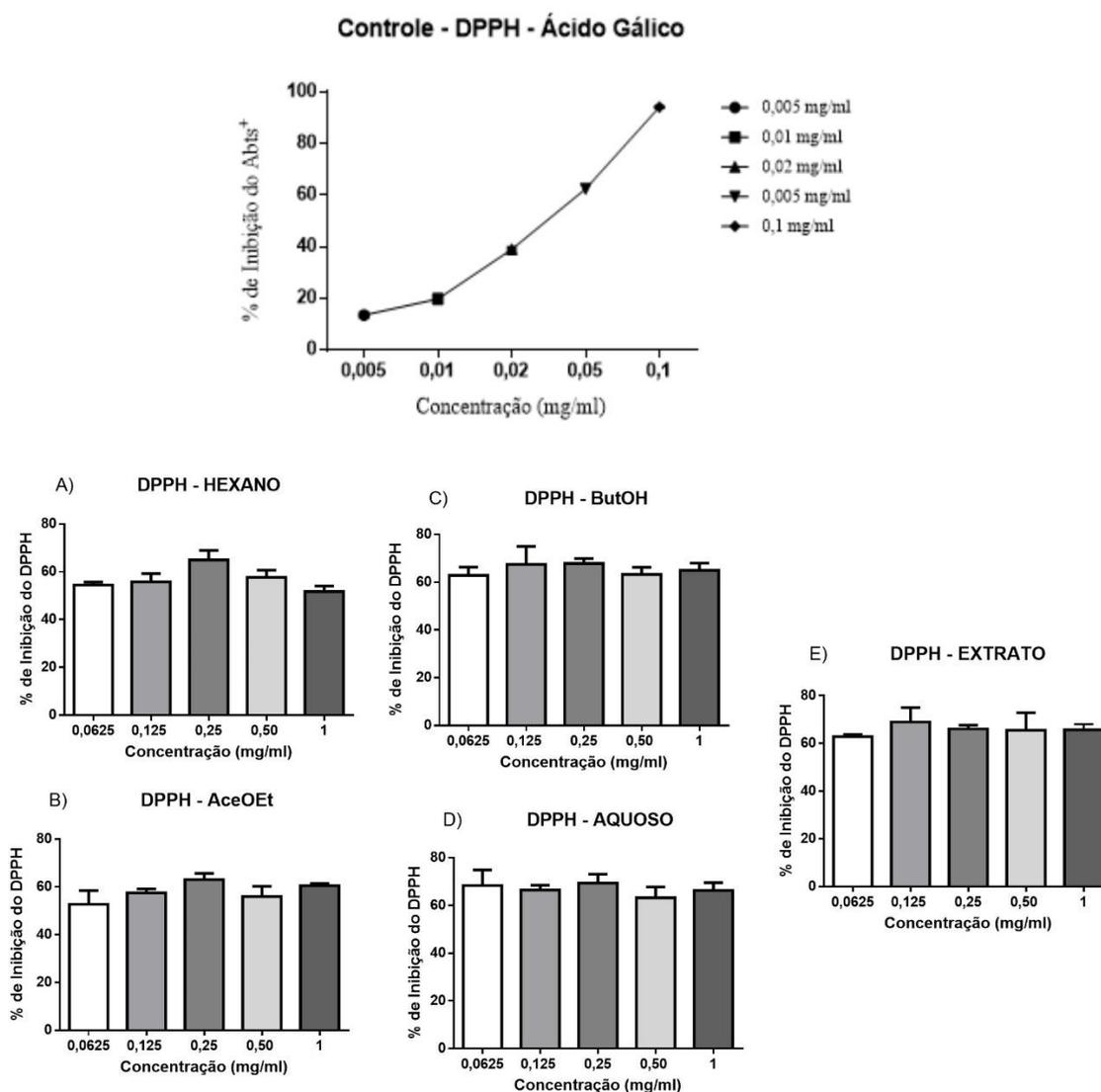


Figura 22 – Curva padrão do ácido gálico e atividade antioxidante pelo método do sequestro de radical DPPH<sup>•</sup> para as frações e extrato bruto de *N. reynei* em diferentes concentrações.

Fonte: Autora

Em relação ao ensaio da capacidade antioxidante pelo método TEAC, os dados expressos nas figuras 23A-E mostram que o extrato bruto e a fração

aquosa apresentam melhor capacidade antioxidante total em relação aos demais extratos, visto que quanto maior a concentração testada do extrato, maior foram os níveis detectados de antioxidantes totais encontradas nas amostras. Nesse sentido, diferentes concentrações do extrato bruto e da fração aquosa apresentaram níveis de antioxidantes totais que variaram de 2,0 a 5,5 mmol/L, valores que foram superiores aos encontrados nas frações Hexano, acetato e butanol.

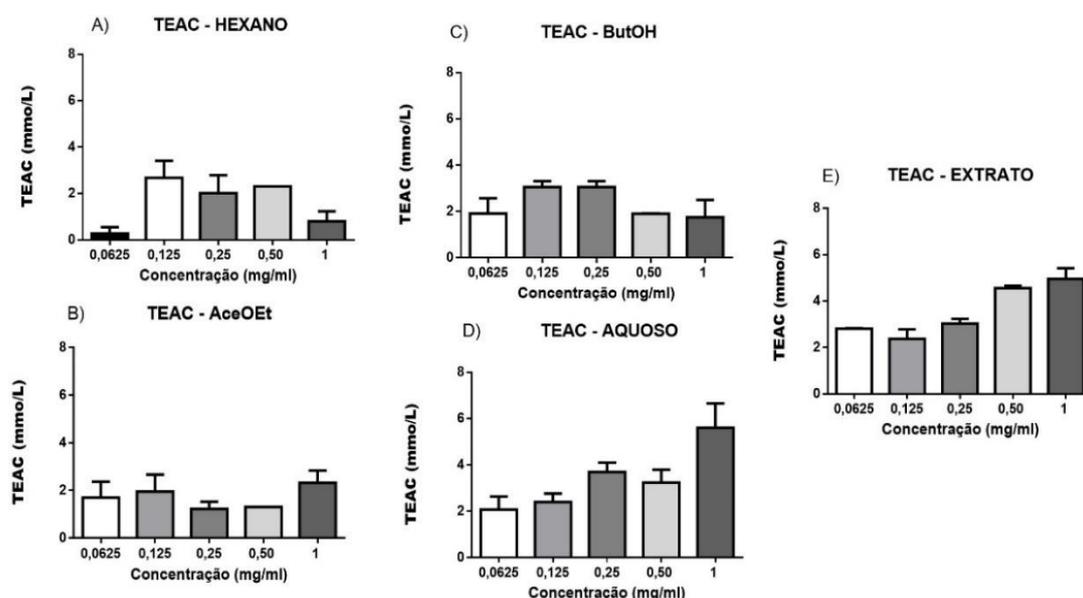


Figura 23 – Atividade antioxidante pelo método do sequestro de radical ABTS\*\* das frações e extrato bruto de *N. reynei* em diferentes concentrações.

Fonte: autora

A busca por antioxidantes naturais de outras fontes além das plantas está ganhando força e o foco tem sido colocado nos OMS, visto que alimentos de várias fontes marinhas são consumidos em grande proporção em todo o mundo. A exploração de OMS para potenciais antioxidantes ainda não foi amplamente estudada, no entanto o ambiente marinho oferece uma plataforma diversificada para tais iniciativas. (ERCOLANO, DE CICCIO, 2019; MALVE, 2016)

O método DPPH<sup>•</sup> é amplamente utilizado para testar a capacidade de extratos ou compostos de agirem marinha como eliminadores de radicais livres ou doadores de hidrogênio. A atividade antioxidante é medida pelo

branqueamento da solução DPPH<sup>•</sup> de cor roxa e o grau de mudança de cor depende da concentração e da potência dos antioxidantes. Quanto maior for a diminuição da absorbância, maior será a atividade de eliminação de radicais (FLOEGEL et al., 2011).

No presente estudo, o extrato metanólico de *N. reynei* apresentou percentual significativo de inibição radical em comparação com o padrão ácido gálico, portanto, sugere-se que o extrato contém constituintes químicos que são capazes de doar hidrogênio a um radical livre e eliminá-lo e prevenir seu dano potencial. Essa capacidade pode estar relacionada aos relatos sobre a atividade sequestradora de radicais DPPH<sup>•</sup> de outros moluscos bivalves (KRISHNAMOORTHY et al., 2019; PACHAIYAPPAN et al., 2014).

No método TEAC, o cromóforo ABTS<sup>•+</sup> foi gerado (tratando ABTS com persulfato de potássio) é reduzido na presença de constituintes antioxidantes doadores de hidrogênio presentes nos extratos. Este processo induz uma mudança de cor nos radicais ABTS<sup>•+</sup> e é medido espectrofotometricamente a 730 nm. A capacidade de antioxidante total por redução de radicais ABTS dos extratos pode estar ligada a vários mecanismos de inibição do radical, tais como à capacidade de doação de elétrons por grupos fenólicos, peptídeos bioativos, alcaloides e açúcares redutores das amostras para radicais livres ABTS<sup>•+</sup>, resultando em sua inibição (KRISHNAMOORTHY et al., 2019; ZHONG, KHAN, SHAHIDI, 2007; PACHAIYAPPAN et al., 2014). Resultados semelhantes foram representados para a atividade antioxidante *in vitro* de extratos metanólicos preparados a partir de moluscos bivalves e lulas do mar: *Meretrix meretrix*, *Meretrix casta*, *Perna viridis*, *Crassostrea madrasensis*, *Loligo duvauceli*, *Donax cuneatus*, (NAZEER, NAQASH, 2011; PACHAIYAPPAN et al., 2014).

## 6 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos nesse estudo, conclui-se que:

- O extrato bruto de *N. reynei* possui alta complexidade e apresenta classes de metabólitos secundários de interesse farmacológico, como terpenos/esteroides, alcaloides e compostos fenólicos.
- O extrato possui concentrações de ácidos graxos saturados e insaturados, hidrogênios ligados a carbonos vicinais e a heteroátomo como N e O, sugerindo a presença de açúcares e/ou alcaloides e peptídeos, o que sugere sua característica energética.
- O extrato possui caráter predominantemente hidrofílico dos compostos, característica que indica a presença de classes de metabólitos secundários mais polares.
- O extrato e frações de *N. reynei* nas condições testadas, apresentaram boa atividade antioxidante, mas não apresentaram ação antibacteriana frente as bactérias gram-positivas e negativas.
- As descobertas do presente estudo sugerem que o extrato do molusco bivalve *N. reynei* pode ser uma fonte potencial de antioxidante natural que pode ter grande importância como agente terapêutico na prevenção ou desaceleração do envelhecimento e doenças degenerativas relacionadas ao estresse oxidativo associadas à idade, como câncer e várias outras doenças humanas.
- A presença de peptídeos bioativos, compostos fenólicos, alcaloides, açúcares redutores e oligoelementos nos extratos pode ter contribuído para sua atividade antioxidante.
- Este estudo contribuiu para ampliar o conhecimento sobre as características químicas e biológicas do extrato de *N. reynei*.
- Além disso, conclui-se razoavelmente que o isolamento e a caracterização dos componentes antioxidantes por meio de estudos in vivo ajudarão a compreender seu mecanismo de ação como um melhor antioxidante.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, Tarek et al. Review of anti-inflammatory, immune-modulatory and wound healing properties of molluscs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 156-178, 10 jan 2018.

AMORATI, R.; FOTI, M.C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant Activity of Essential Oils. **Agricultural Food Chemistry**.V.61, 10835–10847, 2013. Disponível em: <https://pubs.acs.org>. Acesso: 11/11/2021

ATANASOV, Atanas et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 15 ago. 2015.

BECKER, Magda; NUNES, Gilvanda; RIBEIRO, Danilo; SILVA, Francisco; CATANANTE, Gaëlle; MARTY, Jean-Louis. Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 5, p. 1108-1114, mai. 2019.

BENKENDORFF, Kirsten. Molluscan biological and chemical diversity: Secondary metabolites and medicinal resources produced by marine molluscs. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 85, n. 4, p. 757-775, 2010.

BENKENDORFF, Kirsten. **Chemical diversity in molluscan communities: From natural products to chemical ecology**. ePublications, 2014.

BERGMANN, W.; SCHEDL, H.; LOW, E.. Contributions to the study of marine products; microciconasterol and other sterols of sponges. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 580-586, no. 1945.

BERGMANN, Werner; WATKINS, Jeffrey; STEMPIEN JR, Martin. Contributions to the Study of Marine Products. XLV. Sponge Nucleic Acids. **Journal of organic Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 1308-1313, 11 1957.

BIRANGANE, R. S.; CHOLE, D. G.; REDDY, K. Sathya Prakash; SHIVAJI. A Review of Antioxidants. **Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology**, v. 23, p. 351- 353, jul. 2011.

BLUNT, John et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 16, n. 35, p. 8-53, 16 jan. 2018.

BOUCHET, Philippe. The magnitude of marine biodiversity. In: BOUCHET, Philippe. **The Exploration of Marine Biodiversity: Scientific and Technological Challenges**. Fundación BBVA, 2006. cap. 2, p. 31-64.

BUTLER, Mark. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 3, p. 475-516, 7 mai. 2008.

CABEZA, Laura et al. Anemonia sulcata and Its Symbiont Symbiodinium as a Source of Anti-Tumor and Anti-Oxidant Compounds for Colon Cancer Therapy: A Preliminary in Vitro Study. **Biology (Basel)**, v. 10, n. 2. 134 p, 8 fev. 2021.

CAROCHO, Márcio; FERREIRA, Isabel C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, jan. 2013.

CARROLL, Anthony et al. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, v. 37, p. 175-223, 6 fev. 2020.

CHOMA, Irena; JESIONEK, Wioleta. Effects-Directed Biological Detection: bioautography. In: POOLE, Colin F. **Instrumental Thin-Layer Chromatography**. Detroit, Mi, Usa: Elsevier, 2014. Cap. 11. p. 279-312.

CRAGG, Gordon; NEWMAN, David. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 18 fev. 2013.

DA ROCHA, Francisco et al. O uso terapêutico da flora na história mundial. **HOLOS**, v. 1, mar. 2015.

DANG, Hongyue et al. Editorial: The Responses of Marine Microorganisms, Communities and Ecofunctions to Environmental Gradients. **Frontiers in Microbiology**, 8 fev. 2019.

DISTEL, Daniel et al. *Teredinibacter turnerae* gen. nov., sp. nov., a dinitrogen-fixing, cellulolytic, endosymbiotic gamma-proteobacterium isolated from the gills of wood-boring molluscs (*Bivalvia*: *Teredinidae*). **Microbiology Society**, v. 52, n. 6, 1 nov. 2002.

ELSHAHAWI, Sherif et al. Boronated tartrolon antibiotic produced by symbiotic cellulose-degrading bacteria in shipworm gills. **PNAS**, v. 110, n. 4, p. E295-E304, 22 ja. 2013.

ERCOLANO G, De CICCIO P, IANARO A. Novas drogas do mar: Atividade pró-apoptótica de esponjas e compostos derivados de algas. **Mar Drugs** 2019; 17: e31. Voltar ao texto citado no. 4

FIGUEIREDO, Napoleão. Os 'bichos' que curam: os animais e a medicina de 'folk' em Belém do Pará. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi: série antropologia**, Belém, v. 10, n. 1, p. 75-91, jul. 1994.

FLOEGEL, Anna; KIM, Dae-Ok; CHUNG, Sang-Jin; KOO, Sung I.; CHUN, Ock K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043-1048, nov. 2011.

GRABLEY, Susanne; THIERICKE, Ralf. The impact of natural products on drug discovery. In: GRABLEY, Susanne; THIERICKE, Ralf. **Drug Discovery from Nature**. Springer Science & Business Media, v. 3, f. 174, 1998. 347 p. cap. 1, p. 3-37.

HAN, Andrew et al. Turnerbactin, a Novel Triscatecholate Siderophore from the Shipworm Endosymbiont *Teredinibacter turnerae* T7901. **PLOS ONE**, v. 8, n. 10, 11 out. 2013.

HOAGLAND, K. Elaine; TURNER, Ruth Dixon. **Evolution and Adaptive Radiation of Wood-boring Bivalves (Pholadacea)**, f. 19. 1981. 38 p.

HUSSIEN, Taha; MOHAMED, Tarik. The bioactive natural products and biological activities of the red sea soft coral sarcophyton: A review. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 6, n. 4. 1301 p, ago. 2015.

JIMENEZ, Paula et al. Enriching cancer pharmacology with drugs of marine origin. **Br J Pharmacol**, v. 177, n. 1, p. 3-27, Jan 2020.

KRISHNAMOORTHY, Venkateskumar et al. Exploration of antioxidant capacity of extracts of *Perna viridis*, a marine bivalve. **Pharmacognosy Magazine**, v. 15, n. 66, p. 402-409, 2019.

LIANG, Xiao; LUO, Danmeng ; LUESCH, Hendrik. Advances in exploring the therapeutic potential of marine natural products. **Pharmacological Research**. 147 p, 25 jul. 2019.

LIM, Grace; HAYGOOD, Margo. "Candidatus *Endobugula glebosa*," a Specific Bacterial Symbiont of the Marine Bryozoan *Bugula simplex*. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4921-4929, ago 2004.

LOPES, Sônia; NARCHI, Walter. Recrutamento larval e crescimento de teredinidae (mollusca-bivalvia) na região entremarés de manguezais. **Revista Brasileira de Oceanografia**, v. 45, n. 1-2, 1997.

MALVE, Harshad. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. **Journal of Pharmacology & Bioallied Scinces**, v. 8, n. 2, p. 83-91, jun. 2016.

MAYER, Alejandro et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, n. 6, p. 255-265, jun. 2010.

MAYER, Alejandro et al. Marine Pharmacology in 2012–2013: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and Other Miscellaneous Mechanisms of Action. **Marine Drugs**, v. 15, n. 9. 273 p, 29 ago. 2017.

MISHARINA, T.A.; TERENINA, M.B.; N. I KRIKUNOVA, N.I. Antioxidant Properties of Essential Oils. **Applied Biochemistry and Microbiology**. V. 45, N. 6, p. 642–647, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso: 09/10/2021.

MÜLLER, Ana Cláudia de Paula; LANA, Paulo da Cunha. **Manual de identificação de moluscos bivalves da família dos teredinídeos encontrados no litoral brasileiro**, f. 73. 2004. 146 p.

NAZEER, R.A; NQAHSH, Shabeena. In vitro antioxidant activity of two molluscs, *Loligo duvauceli* Orbigny and *Donax cuneatus* Linnaeus, by solvent extraction methods. **Mediterr J Nutr Metab**, v. 6, p. 17-21, 2013.

NEHA, Kumari; HAIDER, Md Rafi; PATHAK, Ankita; YAR, M. Shahar. Medicinal prospects of antioxidants: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 178, p. 687-704, set. 2019.

NEWMAN, David; CRAGG, Gordon; SNADER, Kenneth. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, jul. 2003.

NEWMAN, David; CRAGG, Gordon. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 20 fev. 2007.

NEWMAN, David; CRAGG, Gordon. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 7 fev. 2016.

NWEZE, Justus et al. Antibiotics Development and the Potentials of Marine-Derived Compounds to Stem the Tide of Multidrug-Resistant Pathogenic Bacteria, Fungi, and Protozoa. **Marine Drugs**, v. 18. 145 p, 28 fev. 2020.

PACHAIYAPPAN, Abirami *et al.* In vitro antioxidant activity of different gastropods, bivalves and echinoderm by solvent extraction method. **International journal of pharmaceutical sciences and research**, p. 2539-2545, 1 mai. 2014.

PESANTE, Giovanna *et al.* Characterisation of the enzyme transport path between shipworms and their bacterial symbionts. **BMC Biology**, v. 19, n. 233, 2021.

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

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; NEGULESCU, Gheorghe Petre. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: a review. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 01, n. 01, p. 1-10, out. 2011.

PONDER, Winston E.; PONDER, Winston; LINDBERG, David R.. **Phylogeny and Evolution of the Mollusca**. Univ of California Press, v. 1, f. 235, 2008. 469 p.

PRABHU, Rashmi; PATRAVALE, Vandana. Marine-derived Pharmaceuticals for Oncotherapy: Clinical Trial and FDA-approved Compounds. In: KIM, Se-Kwon. **Encyclopedia of Marine Biotechnology**. John Wiley & Sons, v. 1, f. 1816, 2020. 3632 p. cap. 117, p. 2607-2618.

RAMAWAT, Kishan Gopal. **Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine**. Springer Science & Business Media, v. 1, f. 201, 2008. 402 p.

RANGEL, Marisa; FALKENBERG, Mirian. An overview of the marine natural products in clinical trials and on the market. **Journal of coastal life medicine**, v. 3, n. 6, p. 421-428, 2015.

RASHEED, Arun; AZEEZ, Rinshana Fathima Abdul. A Review on Natural Antioxidants. **Traditional and Complementary Medicine**, 2019. Cap. 5. p. 1-24.

RIOS, Eliézer de Carvalho. **Seashells of Brazil**, f. 164. 1984. 328 p.

RUGGIERI, George. Drugs from the Sea: Marine organisms with novel chemical constituents are excellent sources of new drugs. **Science**, v. 194, n. 4264, 29 out. 1976. 491-497.

RUMENGAN, Inneke et al. Ascidian-associated photosymbionts from Manado, Indonesia: secondary metabolites, bioactivity simulation, and biosynthetic insight. **Symbiosis**, v. 84, p. 71-82, 22 abr. 2021.

SCHOCH, Conrad et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. **The Journal of Biological Databases and Curation**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>. Acesso em: 7 set. 2021.

SHIN, Hee. Natural Products from Marine Fungi. **Marine Drugs**, v. 18. 230 p, 27 abr. 2020.

SINDHI, Vinita; GUPTA, Vartika; SHARMA, Kameshwar; BHATNAGAR, Sonal; KUMARI, Reeta; DHAKA, Neeti. Potential applications of antioxidants – A review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 828-835, set. 2013.

SINHG, R.. Medicinal plants: A review. **Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 1-1, p. 50-55, jan. 2015.

SNELGROVE, Paul. An Ocean of Discovery: Biodiversity Beyond the Census of Marine Life. **Planta Medica**, v. 82, n. 9-10, p. 790-799, 19 abr. 2016.

SOUZA, Cássio; BEZERRA, Wallace; SOUTO, Janeusa. Marine Alkaloids with Anti-Inflammatory Activity: Current Knowledge and Future Perspectives. **Marine Drugs**, v. 18, n. 3. 147 p, 2 mar. 2020.

STIEN, Didier. Marine Microbial Diversity as a Source of Bioactive Natural Products. **Marine Drugs**, v. 18, n. 4. 215 p, 16 abr. 2020.

TRINDADE-SILVA, Amaro et al. Physiological traits of the symbiotic bacterium *Teredinibacter turnerae* isolated from the mangrove shipworm *Neoteredo reynei*. **Genetics Molecular Biology**, v. 32, n. 3, 2009.

TURNER, Ruth Dixon. **A Survey and Illustrated Catalogue of the Teredinidae**: (Mollusca: Bivalvia), f. 133. 1966. 265 p.

TURNER, R.; YAKOVLEV, Y.. Dwarf males in the teredinidae (bivalvia, pholadacea). **Science**, v. 219, n. 4588, p. 1077-1078, 4 mar. 1983.

VALLE, José. **A farmacologia no Brasil**: antecedentes e perspectivas. São Paulo: São Paulo, v. 13, 1978. 230 p.

VIEGAS JR, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan; BARREIRO, Eliezer. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 226-337, 20 jan 2006.

VITALE, S.; SANTORI, E. A.; WAJNBERG, P.; CASTAGNONE-SERENO, L.; BELISARIO, A. Morphological and Molecular Analysis of *Fusarium lateritium*, the Cause of Gray Necrosis of Hazelnut Fruit in Italy. **The American Phytopathological Society**. V. 101, n. 6, 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net>. Acesso: 09/10/2021.

WATERBURY, John et al. A Cellulolytic Nitrogen-Fixing Bacterium Cultured from the Gland of *Deshayes* in Shipworms (Bivalvia: Teredinidae). **Science**, v. 221, n. 4618, p. 1401-14-03, 30 set. 1983.

ZHANG, Lixin; DEMAIN, Arnold L.. **Natural Products**: Drug Discovery and Therapeutic Medicine. Springer Science & Business Media, v. 1, f. 193, 2007. 386 p.

ZHONG, Ying; KHAN, Muhammad; SHAHIDI, Fereidoon. Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1188-1192, 23 ja. 2007.

**APÊNDICE**

APÊNDICE A – Turu liofilizado (1); turu cominuído e homogeneizado, após liofilização (2).



APÊNDICE B – Palhetas usadas para identificação da espécie *N. reynei*.

