UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**“Avaliação química e biológica de espécimens de *Bostrychia radicans*
(Rhodomelaceae)”**

Ana Lígia Leandrini de Oliveira

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**“Avaliação química e biológica de espécimens de *Bostrychia radicans*
(Rhodomelaceae)”**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.**

**Orientada: Ana Lígia Leandrini de Oliveira
Orientadora: Profa. Dra. Hosana Maria Deboni**

**Ribeirão Preto
2009**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

de Oliveira, Ana Lígia Leandrini

Avaliação química e biológica de espécimens de *Bostrychia radicans* (Rhodomelaceae). Ribeirão Preto, 2009.

88 p. : il ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Debonsi, Hosana Maria

1. *Bostrychia radicans* 2. Rhodomelaceae 3. Algas marinhas 4. SPME 5. CG-EM
6. Produtos naturais

Autora: Ana Lúcia Leandrini de Oliveira

Título: “Avaliação química e biológica de espécimens de *Bostrychia radicans* (Rhodomelaceae)”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Hosana Maria Deboni

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho defendido e aprovado pela banca examinadora em ____/____/____

Este trabalho é dedicado aos meus pais e meu
maior orgulho, Xandi e Lurdinha; e à minha irmã
Marina, meu anjinho...
Por todo amor, incentivo, apoio, confiança e
paciência.

Ao Vô Zé, Vó Zilda e Tia Mazinha,
Pelo amor, carinho e orações.

Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

À Hosana, pela acolhida, orientação e convivência nestes dois anos de trabalho.

À minha querida Denise, pela amizade, companheirismo e pelas valiosas discussões, imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Aos professores do Laboratório de Química Orgânica, pelo apoio, atenção e conselhos transmitidos; em especial ao Beto, pela prontidão em ajudar nos momentos finais deste trabalho.

A todos os funcionários do laboratório de Química Orgânica, sempre dispostos a ajudar.

Aos queridos amigos do laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho e do laboratório de Química Orgânica, pela constante presença, apoio e amizade.

À Dra. Nair Sumie Yokoya, pela colaboração, identificação botânica das algas e pelas prazerosas coletas.

A todos os meus amigos e minha família.

A todos que aqui não citei, mas que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

de Oliveira, A. L.; **Avaliação química e biológica de espécimens de *Bostrychia radicans* (Rhodomelaceae)**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2009.

Macroalgas vermelhas da espécie *Bostrychia radicans* (Rhodomelaceae) foram coletadas em diferentes ecossistemas de Ubatuba, litoral norte do Estado de São Paulo, mais especificamente nos costões rochosos da Praia Dura e no manguezal do Rio Escuro. Os extratos e frações obtidos dos espécimes, provenientes das duas regiões, expressaram diferentes respostas quando avaliadas as atividades tripanocida, leishmanicida, antitumoral, antifúngica e citotóxica. Estes resultados nos levaram a inferir que há uma possível relação entre as variações ambientais e a produção de metabólitos secundários biologicamente ativos nesta espécie. Concomitantemente ao estabelecimento do potencial biológico de extratos e/ou frações, foram realizadas avaliações comparativas do perfil químico da espécie *B. radicans*, coletada nos diferentes ecossistemas citados anteriormente. Através da comparação dos constituintes voláteis destas amostras, obtidos por microextração em fase sólida, foi possível observar diferenças significativas entre estas; sendo que a amostra proveniente dos costões apresentou uma maior diversidade de metabólitos. Em contrapartida, as análises comparativas dos constituintes apolares, realizadas por CG-EM, não revelaram diferenças significativas quanto à composição química da espécie. Com relação ao perfil cromatográfico das substâncias polares, obtido via CLAE, também foi observada semelhança quanto aos constituintes presentes em ambas as amostras. Ainda, a partir dos estudos químicos desta espécie foi possível o isolamento do colesterol e 4-hidroxi-*N*-(2'-hidroxietil)-benzamida, além de outras substâncias isoladas em mistura, tais como: heptadecano, esqualeno, ácidos tetradecanóico e hexadecanóico, ésteres 9-octadecenoato e hexadecanoato de metila, os diterpenos *trans*-fitol e neofitadieno; além das substâncias aromáticas: 4-metoximetilfenol, 4-hidroxibenzaldeído, 4-hidroxibenzenoacetato de metila, 4-hidroximandelato de metila, 4-diidroxibenzenopropanoato de metila, hidroquinona, 4-hidroxibenzoato de metila, ácido 4-hidroxibenzenoacético e 4-formilcarbonilfenol.

Palavras-chave: *Bostrychia radicans*, Rhodomelaceae, algas marinhas, SPME, CG-EM, produtos naturais.

ABSTRACT

de Oliveira, A. L.; **Chemical and biological evaluation of *Bostrychia radicans* specimens (Rhodomelaceae)**. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2009.

Red macroalgae from *Bostrychia radicans* (Rhodomelaceae) species were collected in different ecosystems in Ubatuba, north littoral of São Paulo state, more specifically in Praia Dura rocky shores and Rio Escuro mangrove. The extracts and fractions obtained from specimens, of the two regions, expressed different responses when the trypanocide, leishmanicide, antitumoral, antifungic and citotoxic activities were evaluated. Based on these results, we could infer that there is a possible relation between the environmental variations and the production of secondary metabolites with biological activity, in this specie. At the same time, comparative analyses of chemical profiles of *B. radicans* from the different ecosystems were done in order to stabilish the influence of the habitat. The chemical profile of volatile compounds of *B. radicans*, obtained by solid phase microextraction, diverged significantly according to their habitat (mangrove or rocky shore) and the rocky shore specimens showed more variability of compounds. On the other hand, the chemical profile of apolar constituents, performed by GC-MS, were not significantly different in their midst. Concerning the chromatographic profile of polar constituents, obtained by HPLC, it was observed that these compounds were very similar. Moreover the chemical study of this species led to the isolation of cholesterol, and 4-hydroxy-*N*-(2'-hydroxyethyl)-benzamide, and other constituents isolated together, like: heptadecane, squalene, tetradecanoic and hexadecanoic acids, methyl 9-octadecenoate and methyl hexadecanoate, *trans*-phytol e neophytadiene; behind the phenols: 4-metoxymethylphenol, 4-hydroxybenzaldehyde, methyl 4-hydroxybenzeneacetate, methyl 4-hydroxymandelate, methyl 4-dihydroxybenzenepropanoate, hydroquinone, methyl 4-hydroxybenzoate, 4-hydroxybenzeneacetic acid and 4-fomylcarbonyl-phenol.

Keywords: *Bostrychia radicans*, Rhodomelaceae, sea algae, SPME, GC-MS, natural products.

Substâncias isoladas e/ou identificadas

Substâncias isoladas e/ou identificadas **10. 4-metoximetilfenol** **11. 4-hidroxibenzaldeído** **12. 4-hidroxibenzenoacetato de metila** **13. 4-hidroximandelato de metila** **14. 4-diidroxibenzenopropanoato de metila** **15. Hidroquinona** **16. 4-hidroxibenzoato de metila** **17. Ácido 4-hidroxibenzenoacético** **18. Formilcarbonil-fenol** **19. 4-hidroxi-N-(2'-hidroxietil)-benzamida**

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
BRC	Espécie <i>Bostrychia radicans</i> coletada nos Costões Rochosos da Praia Dura, Ubatuba - SP
BRM	Espécie <i>Bostrychia radicans</i> coletada no Manguezal do Rio Escuro, Ubatuba - SP
CCC	Cromatografia em Coluna Clássica
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
δ	Deslocamento Químico
Dcm	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EI	Ionização por Impacto de Elétrons
ESI	Ionização por “Electrospray”
Hex	Hexano
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
J	Constante de Acoplamento (Hz)
m.	Massa
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
min	Minutos
ppm	Partes por Milhão
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio Um
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
TFA	Ácido Trifluoroacético
τ	Tesla
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	v
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	01
1.1. Produtos naturais marinhos	01
1.2. Algas marinhas	02
1.2.1. Família Rhodomelaceae	03
1.2.2. Gênero <i>Bostrychia</i>	07
1.2.3. A espécie <i>Bostrychia radicans</i>	08
1.2.3.1. Manguezais	09
1.2.3.2. Costões rochosos	11
1.2.3.3. Metabolismo secundário	12
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Especificação do material e instrumentos utilizados	14
3.2. Coleta das algas	15
3.3. Metodologia	16
3.3.1. Obtenção, fracionamento dos extratos e isolamento das substâncias	16
3.3.2. Análise dos ácidos graxos das frações hexânica e diclorometânica de BRM	21
3.3.3. Análise dos esteróides da fração hexânica de BRM	21
3.3.4. Comparação do perfil cromatográfico dos constituintes voláteis de espécimens de <i>B. radicans</i>	22
3.3.4.1. Otimização das condições de extração dos voláteis de BRM	22
3.3.4.2. Análise comparativa dos constituintes voláteis de espécies de <i>Bostrychia</i> coletadas no manguezal e nos costões rochosos	23

3.3.5. Comparação do perfil cromatográfico dos constituintes apolares de espécimens de <i>B. radicans</i>	24
3.3.6. Comparação do perfil cromatográfico dos constituintes polares de espécimens de <i>B. radicans</i>	24
3.3.7. Avaliação da atividade biológica	25
3.3.7.1. Avaliação da atividade antitumoral	25
3.3.7.2. Avaliação da atividade citotóxica	26
3.3.7.3. Avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida	27
3.3.7.4. Avaliação da atividade antifúngica	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Fracionamento do extrato e isolamento das substâncias	31
4.1.1. Fracionamento do extrato Dcm:MeOH e identificação da substância 1	31
4.1.2. Isolamento e identificação das substâncias 2 a 9	35
4.1.3. Isolamento e identificação das substâncias 10 a 18	43
4.1.4. Isolamento e identificação das substâncias 11 e 15	48
4.2. Identificação dos ácidos graxos e esteróis de <i>B. radicans</i>	51
4.3. Perfil cromatográfico dos constituintes voláteis de espécies de <i>Bostrychia</i>	53
4.4. Perfil cromatográfico dos constituintes apolares de espécimens de <i>B. radicans</i>	59
4.5. Perfil cromatográfico dos constituintes polares de espécimens de <i>B. radicans</i>	61
4.5.1. Isolamento e identificação da substância 19	62
4.6. Atividade biológica	70
5. CONCLUSÕES	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Produtos naturais marinhos

Os produtos naturais têm sido investigados e utilizados para o alívio e a cura de doenças desde os primórdios da história da humanidade. No início do século XX, 80% de todos os medicamentos eram obtidos a partir de raízes, cascas e folhas de plantas terrestres. Atualmente, os produtos naturais continuam sendo uma fonte significativa de fármacos e medicamentos; sendo que, aproximadamente 60% dos compostos utilizados no tratamento do câncer e 75% daqueles usados para doenças infecciosas são produtos de origem natural ou derivados (MCCHESENEY, 2007).

Os estudos nesta área não são realizados apenas visando o isolamento de substâncias biologicamente ativas, mas também são direcionados para a descoberta de produtos estruturalmente inéditos ou taxonomicamente relevantes (NEWMAN & CRAGG, 2007). Neste contexto, a diversidade de organismos existentes no ambiente marinho constitui uma excelente fonte de substâncias bioativas, muitas das quais diferem fundamentalmente dos metabólitos secundários terrestres (NEWMAN et al, 2000; TÜNEY et al, 2005).

A primeira descoberta notável de um produto natural de origem marinha data de mais de 50 anos. No início da década de 50, os nucleosídeos espongouridina e espongotimidina foram isolados da esponja *Cryptotethya crypta*, proveniente dos mares do Caribe (BERGMANN & BURKE, 1955). O estudo de análogos sintéticos destas substâncias levou ao desenvolvimento dos agentes antivirais ARA-A (Vidarabina) e anticâncer ARA-C (Citarabina) (NEWMAN et al., 2000, PALERMO, 2003).

Atualmente, estima-se que sejam conhecidos mais de 14500 produtos naturais marinhos, incluindo acetogeninas, policetídeos, terpenos, alcalóides, peptídeos e metabólitos de origem biossintética mista; dentre os quais, muitos estão associados a atividades biológicas promissoras (HILL, 2006). Aproximadamente 30 compostos derivados de organismos

marinhos encontram-se em fase clínica ou pré-clínica de avaliação para entrarem no mercado farmacêutico. Trata-se de metabólitos isolados principalmente de esponjas e tunicados; entre eles estão a Briostatina 1, Aplidina, Dolastatina 10, Extenaisdina, Discodermolide e Neovastat (NEWMAN & CRAGG, 2004; KIJOA & SAWANGWONG, 2004).

No Brasil, a pesquisa de produtos naturais marinhos teve início na década de 60, no Centro de Pesquisas de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A primeira publicação relatando o isolamento de compostos químicos a partir de um organismo marinho proveniente da costa brasileira foi em 1963 pelo Professor Bernard Tursch, da Université Libre de Bruxelles (Bélgica). No entanto, ainda existe uma relativa escassez de informações, documentadas em artigos científicos, acerca das substâncias isoladas e da atividade biológica dos organismos coletados ao longo dos mais de 8000 km de litoral brasileiro, indicando um grande potencial de pesquisa no país a ser explorado (PINTO et al., 2002, BERLINCK et al., 2004).

1.2. Algas marinhas

Os organismos englobados pela designação “alga” constituem um grupo muito diverso quanto às suas características morfológicas, estruturais e metabólicas (REVIERS, 2006). Atualmente, as algas são consideradas como integrantes de três reinos distintos: monera, protista e plantae. As algas azuis ou cianobactérias, organismos do reino monera, são unicelulares, procariontes e autótrofos. Os organismos do reino protista são unicelulares (embora existam formas pluricelulares de organização simples), autótrofos ou heterótrofos e suas células apresentam envoltório nuclear e organelas membranosas. No reino plantae são encontrados os organismos pluricelulares, eucariontes e autótrofos (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

As macroalgas, reino plantae, estão organizadas em três divisões: Chlorophyta (algas verdes, 13% marinhas), Rhodophyta (algas vermelhas, 98% marinhas) e Phaeophyta (algas pardas, 99% marinhas). As algas vermelhas são assim chamadas pela presença do pigmento ficoeritrina, a principal característica do filo Rhodophyta. Esta divisão, predominantemente marinha, possui aproximadamente 5000-5500 espécies, distribuídas em 500-600 gêneros (MCCLINTOCK & BAKER, 2001).

Nos sistemas aquáticos, as algas incorporam energia solar, produzem o oxigênio que é dissolvido na água e usado pelos demais organismos aquáticos, atuam no ciclo dos elementos químicos e ainda constituem fonte alimentar para animais herbívoros e onívoros; desempenhando funções ecológicas essenciais (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004). Ainda, estas são eficientes na produção de polissacarídeos sulfatados, como os carragenanos e o ágar, que possuem razoável valor comercial (CARVALHO & ROQUE, 2000).

Os produtos provenientes do metabolismo secundário das algas são predominantemente derivados de isoprenóides (46%) e acetogeninas (38%). As macroalgas vermelhas têm sido a principal fonte de compostos halogenados, sendo responsável pela produção de aproximadamente 93% dos compostos halogenados conhecidos; enquanto a porcentagem destes compostos produzidos pelas algas verdes e pardas é 7% e 0,8% respectivamente (MCCLINTOCK & BAKER, 2001).

1.2.1. Família Rhodomelaceae

Segundo a classificação botânica para as algas vermelhas, a família Rhodomelaceae pertence à seguinte divisão (JOLY, 1993; REVIERS, 2006):

Divisão: Rhodophyta

Classe: Florideophyceae

Ordem: Ceramiales

Famílias: Ceramiaceae, Delesseriaceae, Dasyaceae, Rhodomela, Rhodomelaceae

A Rhodomelaceae é uma das mais importantes famílias dentre as macroalgas vermelhas. Desta família destacam-se os seguintes gêneros: *Polysiphonia*, *Bostrychia*, *Acantophora*, *Laurencia*, *Bryothamnion*, *Herposiphonia*, *Odonthalia*, *Digenea*, *Chondria*, *Dasyclonium*, *Lenormandia*, *Osmundaria*, *Bryocladia*, *Halopytis*, *Vidalia*, *Rhodomela*, *Amansia* e *Alsidium* (DUARTE et al., 2002). Várias espécies da família Rhodomelaceae já foram objeto de investigação química (BLUNT et al., 2007), resultando em uma infinidade de estruturas inéditas isoladas, muitas biologicamente ativas, documentadas em artigos científicos (Tabela 1).

Tabela 1 – Algumas das espécies pertencentes à família Rhodomelaceae estudadas nos últimos cinco anos e as principais classes de substâncias isoladas.

ESPÉCIE	CLASSE QUÍMICA	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
<i>Laurencia</i> sp.	diterpenos, sesquiterpenos	antibacteriana	FERNÁNDEZ, et al., 2005; SUZUKI et al., 2005; VAIRAPPAN et al., 2004
<i>Laurencia aldingensis</i>	sesquiterpenos	-	CARVALHO et al., 2006
<i>Laurencia brongniartii</i>	alcalóides indólicos	antitumoral	EL GAMAL et al., 2005; KUBOTA et al., 2005
<i>Laurencia caduciramulosa</i>	sesquiterpenos	-	CASSANO et al., 2008
<i>Laurencia composita</i>	sesquiterpenos, acetogeninas	-	JI et al., 2008
<i>Laurencia decumbens</i>	alcalóides indólicos, diterpenos	-	JI et al., 2007a
<i>Laurencia intricata</i>	diterpenos	inibidor angiogênico	MOHAMMED et al., 2004

<i>Laurencia filiformis</i>	sesquiterpenos	-	ANTUNES et al., 2008
<i>Laurencia glandulifera</i>	acetogeninas	-	KLADI et al., 2009
<i>Laurencia luzonensis</i>	diterpenos, sesquiterpenos	-	KUNIYOSHI et al., 2005; MAKHANU et al., 2006
<i>Laurencia mariannensis</i>	triterpenos	-	JI et al., 2008c
<i>Laurencia microcladia</i>	sesquiterpenos	citotóxica	KLADI et al., 2005; KLADI et al., 2007
<i>Laurencia nidifica</i>	sesquiterpenos	citotóxica	SUN et al., 2005
<i>Laurencia nipponica</i>	diterpenos, alenos sesquiterpenos	-	LYAKHOVA et al., 2004; LYAKHOVA et al., 2006
<i>Laurencia okamurai</i>	sesquiterpenos,	-	MAO & GUO, 2006; JI et al., 2007b
<i>Laurencia obtusa</i>	sesquiterpenos, acetogeninas	-	AYDOGMUS et al., 2004; DORTA et al., 2004
<i>Laurencia saitoi</i>	sesquiterpenos, acetogeninas	-	JI et al., 2008b
<i>Laurencia scorparia</i>	sesquiterpenos	antihelmíntica	DAVYT et al., 2006
<i>Laurencia simillis</i>	sesquiterpenos, indóis	-	JI et al., 2007c
<i>Laurencia tristicha</i>	sesquiterpenos	citotóxica	SUN et al., 2005
<i>Odonthalia corymbifera</i>	bromofenóis	antimicrobiana	OH et al., 2008
<i>Osmundaria obtusiloba</i>	bromofenóis	-	CARVALHO et al., 2006

<i>Polysiphonia urceolata</i>	bromofenóis	antioxidante	LI et al., 2008; LI et al., 2008
<i>Rhodomela confervoides</i>	bromofenóis	-	MA et al., 2006; MA et al., 2007; ZHAO et al., 2004

Os terpenos constituem a classe química predominante das substâncias isoladas e o gênero que mais contribui como fonte de pesquisa para substâncias inéditas é o gênero *Laurencia* (Lamouroux) (Rhodomelaceae, Ceramiales). Os trabalhos publicados envolvem não apenas o isolamento de metabólitos secundários, mas também: síntese, modificação molecular, proposição de vias biossintéticas e principalmente, avaliação do potencial biológico e terapêutico destes metabólitos (Figura 1).

Figura 1. Metabólitos secundários biologicamente ativos isolados de espécies de Rhodomelaceae.

Figura 1. Metabólitos secundários biologicamente ativos isolados de espécies de Rhodomelaceae (continuação).

1.2.2. Gênero *Bostrychia*

O gênero *Bostrychia* (Rhodomelaceae, Ceramiales) é amplamente distribuído nos ambientes de clima tropical e temperado ao redor do mundo todo. As espécies de *Bostrychia* são freqüentemente encontradas em sistemas estuários associados a manguezais ou vegetações pantanosas salinas (ZUCARELLO & WEST, 2006). Este gênero tem sido estudado extensivamente em termos de sua fisiologia, especialmente no que se refere a sua tolerância à variação de salinidade e à sua biogeografia (ZUCARELLO & WEST, 2006).

No entanto, os estudos químicos publicados relativos ao gênero limitam-se, em sua maioria, ao isolamento de carboidratos de baixo peso molecular e polissacarídeos. Os primeiros estudos da ocorrência de carboidratos em diferentes espécies de *Bostrychia* foram realizados por Kremer em 1976 (KREMER, 1976). Os carboidratos majoritários encontrados nestas espécies, sorbitol e dulcitol, constituem uma exceção bioquímica, uma vez que estes são raramente encontrados em algas vermelhas (KARSTEN, et al., 2007). Os polissacarídeos sulfatados da espécie *Bostrychia montagnei* foram isolados e posteriormente avaliados frente ao vírus do herpes (HSV-1), demonstrando atividade antiviral promissora (NOSEDA & DUARTE, 1999; DUARTE, et al. 2001; DUARTE et al., 2002).

Recentemente, em nosso grupo de pesquisa foram isoladas duas substâncias aromáticas, como parte da investigação química da espécie *Bostrychia tenella*. O fracionamento cromatográfico do extrato diclorometano:metanol (2:1) de *B. tenella* resultou no isolamento da substância inédita 4-(hidroximetil)-benzenossulfonato de potássio, bem como do álcool 1-metoxifeniletílico, descrito previamente como um produto de síntese (FELÍCIO et al., 2008).

1.2.3. A espécie *Bostrychia radicans*

A espécie *Bostrychia radicans* (Figura 2) é uma das espécies mais difundidas do gênero (ZUCARELLO & WEST, 2006).

Figura 2: Exemplos da espécie *Bostrychia radicans*

As algas vermelhas da espécie *B. radicans* integram a flora litorânea do Estado de São Paulo e habitam diferentes regiões com características peculiares, tais como costões rochosos e manguezais. Desta forma, estas macroalgas estão sujeitas a variações de salinidade, incidência de luz solar, temperatura, nível de nutrientes, diversidade de espécies, períodos de emersão/dessecação e intensidade do embate das ondas.

1.2.3.1. Manguezais

Os manguezais constituem um ecossistema especial que se desenvolve em zonas litorâneas tropicais, associado a terrenos baixos, planos e regiões estuarinas; ocorre às margens de lagunas ou ao longo de rios e canais naturais, em áreas encharcadas, salobras e calmas (Figura 3). Nessas regiões a força das marés é branda, não há o embate das ondas, e a velocidade das correntes é baixa, favorecendo intensa deposição de sedimentos finos e matéria orgânica.

Figura 3. Manguezal do Rio Escuro, Ubatuba-SP.

Este ecossistema torna-se elo de ligação entre os ambientes marinho, terrestre e de água doce, caracterizando-se por uma constante conquista de novas áreas pelo acúmulo de sedimentos e detritos trazidos pelos rios e pelo mar. O substrato assim originado tem consistência pastosa; é pouco compactado, alagadiço, rico em matéria orgânica, pouco oxigenado e sujeito a períodos alternados de emersão e dessecação, conforme variação das marés (ROSSI, 2002).

Os manguezais são bem conhecidos por abrigarem uma associação pouco diversificada, mas bem característica, de algas adaptadas à baixa salinidade e a atenuação da luz pela copa das árvores. Nestes ambientes predominam espécies representantes da comunidade algal “*Bostrychietum*”, aderidas em pneumatóforos e ramos de árvores. Dentre as espécies mais frequentes pode-se destacar *Bostrychia* sp., *Caloglossa leuprieurii*, *Catenella caespitosa*, *Boodleopsis pusilla* e *Rhizoclonium* sp. (PEREIRA & SOARES-GOMES, 2002).

1.2.3.2. Costões rochosos

Os costões rochosos constituem um ambiente litorâneo formado por rochas, situado no limite entre o oceano e o continente. Este ambiente sofre influência das marés, dos embates das ondas e dos raios solares; obrigando assim, os organismos a se adaptarem a essas condições peculiares (Figura 4).

Figura 4. Costões rochosos da Praia Dura, Ubatuba-SP.

Dentre os ecossistemas presentes na região entre - marés e habitats da zona costeira, os costões rochosos são considerados um dos mais importantes por conter uma imensa biodiversidade com importância ecológica e econômica. Por receber grande quantidade de nutrientes proveniente dos sistemas terrestres, apresenta uma grande biomassa e produção de microfitobentos e macroalgas; tornando-se um local de alimentação, crescimento e reprodução de um grande número de espécies (PEREIRA & SOARES-GOMES, 2002).

A grande variedade de organismos e o fácil acesso tornaram os costões rochosos um dos mais populares e bem estudados ecossistemas marinhos. A grande diversidade de espécies presentes neste ambiente faz com que ocorram fortes interações biológicas como consequência da limitação de substrato e espaço entre os habitats terrestre e marinho (PEREIRA & SOARES-GOMES, 2002).

2.2.3.3. Metabolismo secundário

A adaptação a este conjunto de variáveis ambientais pode resultar em alterações nos padrões de produção dos metabólitos secundários e de crescimento das algas. As condições adversas, tais como, baixo nível de nutrientes e pouca incidência de luz, podem resultar em baixas taxas fotossintéticas causando uma diminuição na produção de metabólitos primários e secundários. Por outro lado, a presença de herbívoros e demais espécies associadas, competindo por espaço e alimento, pode estimular a produção de diferentes metabólitos secundários, como mecanismo de defesa química (MCCLINTOCK & BAKER, 2001).

Neste contexto, torna-se interessante o estudo químico de *Bostrychia radicans*, uma vez que esta espécie é encontrada condições ambientais tão distintas e não há dados na literatura acerca do seu metabolismo secundário.

2. OBJETIVOS

- Estudo químico da espécie *Bostrychia radicans* (Rhodomelaceae) coletada no manguezal do Rio Escuro - Ubatuba, litoral norte do Estado de São Paulo.
- Comparação do perfil cromatográfico da espécie *B. radicans* coletada nos diferentes ecossistemas (manguezal e costões rochosos).
- Avaliação das atividades antifúngica (*Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*), citotóxica (*Artemia salina*), tripanocida (*Trypanosoma cruzi*) e leishmanicida (*Leishmania amazonensis*) de extratos, frações e substâncias isoladas da espécie *B. radicans*.
- Estudo do potencial antitumoral através da citotoxicidade em diferentes linhagens tumorais: HL-60 e CEM (leucemias), HCT-8 (cólon), MCF-7 (mama) e B-16 (melanoma).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Especificação do material e instrumentos utilizados

Os solventes orgânicos empregados nos processos de fracionamento e purificação dos extratos e frações foram de grau técnico (purificados por destilação fracionada antes de serem utilizados) e de grau PA. Para a preparação de amostras analisadas por ressonância magnética nuclear foram utilizados solventes deuterados da marca Aldrich.

As placas cromatográficas comparativas (CCDC) e preparativas (CCDP) foram preparadas aplicando-se uma suspensão de gel de sílica 60 (GF₂₅₄ – Merck) em água destilada na proporção de 1:2 (p/v), sobre placas de vidro de 5x20, 10x20 ou 20x20 cm, obtendo-se camadas de 0,25 mm de espessura de adsorvente para as placas comparativas e 1 mm de espessura para as placas preparativas.

Os reveladores utilizados nas análises por cromatografia em camada delgada foram: irradiação UV nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, nebulização com sulfato cérico, seguida de aquecimento da cromatoplaça a 100°C por cinco minutos; e câmara saturada com iodo ressublimado.

As colunas cromatográficas clássicas (CCC) foram preparadas utilizando como fase estacionária sílica gel (230 – 280 Mesh – 0,060 – 0,200 mm, diâmetro de poro: 6 mm) e Sephadex LH-20. Os eluentes utilizados foram hexano, acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de polaridade.

Para a cromatografia líquida a vácuo (CLV) foi utilizada uma coluna com placa sinterizada na parte inferior, com capacidade para 4 litros. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60H (relação 1:30 entre amostra e adsorvente) e como eluentes foram utilizados hexano, acetato de etila e metanol. Na extremidade inferior da coluna promoveu-se a redução da pressão com o uso de bomba de vácuo.

As análises em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu, modelo SCL-10AVP, equipado com detector de arranjo de diodos UV-Vis DAD Shimadzu, modelo SPD-M10AVP, injetores manual e automático e sistema de integração computadorizada com software CLASS-VP. Foram utilizadas coluna analítica C18 (4,6 x 250 mm; 5µm) e coluna semipreparativa C18 (20 x 250 mm; 15µm) modelo SHIMPACK ODS(H) KIT, Shimadzu.

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos através dos espectrofotômetros BRUKER DPX 300; BRUKER DRX 400 e BRUKER DRX 500.

As análises em cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) foram realizadas no aparelho da marca Shimadzu, modelo QP 2010, em um sistema operando via impacto eletrônico (70 eV) equipado com injetor split (250 °C). Foi utilizada uma coluna DB-5 MS para a análise dos ácidos graxos e uma coluna de DB-17 para a análise dos esteróides, empregando hélio como gás carreador, o fluxo na coluna de 1,41 mL/min e pressão de 87,1 kPa.

3.2. Coleta das algas

Algas vermelhas da espécie *Bostrychia radicans* foram coletadas no Manguezal do Rio Escuro (BRM) e nos Costões Rochosos da Praia Dura (BRC), em Ubatuba – São Paulo. As coletas foram realizadas nos meses de maio, agosto e dezembro de 2007; sendo que as datas foram escolhidas após a observação da tábua de marés. As algas foram lavadas em água do mar para remoção de detritos e contaminantes, colocadas em frascos plásticos contendo água do mar e transportadas em caixas com isolamento térmico contendo bolsas de gelo até o Laboratório de Cultura de Algas da Seção de Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo.

As algas coletadas em maio de 2007 foram limpas e secas à temperatura ambiente, enquanto aquelas coletadas em agosto e dezembro de 2007 foram congeladas, ou conservadas

em metanol, para que os extratos fossem feitos com o material fresco. É importante ressaltar que durante o processo de limpeza das algas, fez-se necessária uma minuciosa triagem das algas, com o auxílio de pinças e espátulas, uma vez que o material trazido de campo continha uma mistura de espécies. Foram separadas as espécies *Bostrychia radicans* e *Bostrychia calliptera*, do material proveniente do manguezal do Rio Escuro; bem como as espécies *Bostrychia radicans* e *Bostrychia tenella*, provenientes dos costões rochosos da Praia Dura. A bióloga Dra. Nair Sumie Yokoya, do Instituto de Botânica de São Paulo, responsável pela identificação das espécies orientou este processo de triagem.

3.3. Metodologia

3.3.1. Obtenção, fracionamento dos extratos e isolamento das substâncias

O material proveniente da coleta de maio de 2007 foi submetido à extração por maceração até o esgotamento, utilizando a mistura de solventes orgânicos diclorometano:metanol (Dcm:MeOH) 2:1, com volume 3 vezes superior ao peso do mesmo. O extrato obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo, sob pressão reduzida (temperatura máxima de 50°C).

- BRC: 16 g de alga seca – 700 mg de extrato Dcm:MeOH (2:1) – rendimento 4,38%
- BRM: 75 g de alga seca – 1,7 g de extrato Dcm:MeOH (2:1) – rendimento 2,27%

Uma amostra de 500 mg do extrato Dcm:MeOH (2:1) de BRM foi suspensa em metanol e centrifugada. Não foi observada a formação de precipitado, assim a amostra foi fracionada por CCC, utilizando-se como fase estacionária Sephadex-LH20 (cromatografia por exclusão). As dimensões da coluna eram: 500 mm de comprimento por 45 mm de diâmetro interno, sendo 420 mm a altura da fase estacionária. Foram obtidas 28 frações, de aproximadamente 10 mL cada, utilizando-se metanol como fase móvel.

Outra amostra (100 mg) deste mesmo extrato, após análises por CCDC, foi fracionada por CCDP. O fracionamento foi realizado em placas de fase normal, utilizando-se como fase móvel hexano:diclorometano:metanol (7:2:1), resultando no isolamento da substância **1**, identificada como colesterol.

Parte dos extratos (800 mg de BRM e 500 mg de BRC) foi suspensa em uma solução de metanol/água e submetida à partição com os solventes hexano e diclorometano (extração líquido-líquido, Fluxogramas 1 e 2).

Fluxograma 1. Fracionamento do extrato Dcm:MeOH (2:1) de BRM

Fluxograma 2. Fracionamento do extrato Dcm:MeOH (2:1) de BRC

O rendimento da extração, bem como das partições, realizadas com o material proveniente da primeira coleta deve ser observado com cautela. Durante o fracionamento do extrato foi possível observar a presença de cristais, que foram separados e analisados por RMN ^1H , IV e EM; sendo identificados como NaCl. Estes cristais foram observados em quantidades significativas nos extratos brutos e nas frações de maior polaridade.

O material proveniente da coleta de agosto de 2007 foi submetido à extração por maceração até o esgotamento, utilizando MeOH como solvente, com volume 3 vezes superior ao peso do mesmo. O extrato obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo, sob pressão reduzida (temperatura máxima de 50°C).

- BRM: 500 g de alga fresca – 4,850 g de extrato metanólico – rendimento 0,97%.

O extrato obtido a partir do material coletado no manguezal foi suspenso em uma solução de metanol/água e submetido à partição com os solventes hexano e acetato de etila (extração líquido-líquido, Fluxograma 3).

Fluxograma 3. Fracionamento do extrato metanólico de BRM

- Fração hexânica

O fracionamento foi realizado em CCC (especificações item 3.1). Foi utilizada uma coluna de vidro com 700 mm de comprimento e 35 mm de diâmetro interno, sendo que a altura do adsorvente foi de 350 mm. Aproximadamente 2 g de amostra foram adsorvidos em sílica gel 60 e aplicados no topo da coluna. Foram obtidas 162 frações de 13 mL cada, concentradas a vácuo.

- Fração acetato de etila

A amostra (270 mg) foi fracionada em coluna clássica utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20. As dimensões da coluna foram: 500 mm de comprimento, 15 mm de diâmetro interno, sendo a altura da fase estacionária de 35 mm. A fração aplicada no topo da coluna foi previamente solubilizada em MeOH:AcOEt (7:3) e centrifugada, não tendo sido observada formação de precipitado. Foram coletadas 14 subfrações de 15 mL cada, eluídas em MeOH:AcOEt (7:3).

Com relação ao material proveniente da coleta de dezembro de 2007, também foi realizada extração por maceração até o esgotamento, desta vez utilizando a mistura de solventes orgânicos Dcm:MeOH (1:1), com volume 3 vezes superior ao peso do mesmo. O extrato obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo, sob pressão reduzida (temperatura máxima de 50°C).

- BRM: 1000 g de alga fresca – 8 g de extrato Dcm:MeOH (1:1).

Parte deste extrato (7,78g) foi fracionada através de CLV (especificações item 3.1), tendo sido obtidas 10 frações de 2,5 litros (BR-1 a BR-10), concentradas a vácuo em evaporador rotativo. Todas as frações foram analisadas por CCDC e RMN ¹H. A massa de cada fração, a complexidade das amostras, bem como a presença de sinais de deslocamento químico indicando substâncias de interesse, foram utilizadas como critério de prioridade para os posteriores fracionamentos.

- Fração BR-4

Parte desta fração (1 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico por CCC utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20. As dimensões da coluna foram: 970 mm de comprimento, 25 mm de diâmetro interno, sendo a altura da fase estacionária de 700 mm. A fração aplicada no topo da coluna foi previamente solubilizada em Dcm:MeOH (1:2) e

centrifugada, não tendo sido observada formação de precipitado. Foram coletadas 30 subfrações de 15 mL cada, eluídas em Dcm:MeOH (1:2).

3.3.2. Análise dos ácidos graxos das frações hexânica e diclorometânica de BRM

Para a realização destas análises, houve a necessidade de transesterificar a amostra a ser analisada, para a formação de ésteres metílicos dos ácidos graxos. Assim, as frações hexânica (50 mg) e diclorometânica (50 mg) da espécie BRM, foram solubilizadas em 2 mL de solução de metóxido de sódio 1 M (reagente de metilação). A solução foi agitada ocasionalmente por 5 minutos (min) em banho-maria a 65°C. Após o resfriamento, foram adicionados 1 mL de água destilada e três alíquotas de 1 mL de clorofórmio, uma de cada vez, para extração dos ésteres metílicos. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). A programação de temperatura utilizada no cromatógrafo a gás durante as análises está representada na Tabela 2.

Tabela 2 - Programação de temperatura do cromatógrafo a gás durante as análises dos ésteres metílicos dos ácidos graxos (CG-EM)

Taxa de aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
-	50,0	0
20,0	200,0	5,0
5,0	230,0	20,0
10,0	250,0	8,0

3.3.3. Análise dos esteróides da fração hexânica de BRM

Para a realização desta análise, a fração hexânica (50 mg) da espécie BRM foi submetida à extração em fase sólida com cartuchos de sílica, utilizando-se hexano e diclorometano como solventes. As amostras obtidas foram analisadas por cromatografia

gasosa acoplada à espectrometria de massas. A programação de temperatura utilizada no cromatógrafo durante as análises está representada na Tabela 3.

Tabela 3 - Programação de temperatura do cromatógrafo a gás durante as análises dos esteróides (CG-EM)

Taxa de aquecimento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
-	250,0	12,0
5,0	280,0	25,0

3.3.4. Comparação do perfil cromatográfico dos constituintes voláteis de espécimens de *B. radicans*

3.3.4.1. Otimização das condições de extração dos voláteis de BRM

A obtenção das substâncias voláteis de *B. radicans* foi realizada por meio de microextração em fase sólida (SPME). A SPME é uma técnica bastante difundida nas análises de substâncias voláteis (STASHENKO e MARTÍNEZ, 2007; DAMASCENO et al., 2008; PAOLINE et al., 2008). O processo de SPME baseia-se na absorção ou adsorção de analitos em uma fibra de sílica fundida revestida por um polímero absorvente, que pode ser introduzida no equipamento de cromatografia gasosa. A consolidação desta técnica de preparo de amostra, desenvolvida por Pawliszyn e colaboradores (1990), pode ser atribuída a diversos fatores tais como: a não utilização de solventes, o alto poder de concentração da amostra e a facilidade de transporte do material extraído para o equipamento analítico (VALENTE e AUGUSTO, 1999; STASHENKO e MARTÍNEZ, 2007).

Apesar das vantagens apresentadas por esta técnica de análise, inicialmente fez-se necessário à otimização das condições de extração, como o tipo de fibra a ser utilizada e o tempo de extração. Para este fim, foram realizados experimentos com a espécie BRM, *in*

natura (300 mg) e fibras de polidimetilsiloxano (PDMS), polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB) e polidimetilsiloxano-carbowax (PDMS-CW) como descrito na Tabela 4.

Tabela 4 - Extração dos constituintes voláteis de BRM realizadas a 60°C

Tipo de Fibra	Tempo de exposição (min)					
PDMS	10	20	30	40	50	60
PDMS-DVB	10	20	30	40	50	60
PDMS-CW	10	20	30	40	50	60

Todas as análises foram realizadas em CG-EM equipado com injetor split (250 °C) e com proporção split 1/20, a coluna utilizada foi do tipo sílica fundida com fase estacionária DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm), utilizando hélio como gás carreador, o fluxo na coluna de 1,41 mL/min, pressão de 87,1 kPa, aquecimento com programação de temperatura de 60-240 °C a 3 °C/min e a fibra foi mantida exposta na câmara de injeção por 3 min.

3.3.4.2. Análise comparativa dos constituintes voláteis de espécies de *Bostrychia* coletadas no manguezal e nos costões rochosos

Após a otimização das condições, foram feitas as extrações das duas diferentes populações da espécie *B. radicans*, bem como das espécies *Bostrychia calliptera* e *Bostrychia tenella*, coletadas respectivamente no manguezal do Rio Escuro e nos costões rochosos da Praia Dura. A obtenção dos constituintes foi realizada com a fibra PDMS-DVB, a uma temperatura de 60°C e tempo de extração de 40 min. Todas as extrações foram realizadas em vial de 4 mL com 300 mg de alga *in natura*, como também foram empregadas as mesmas condições experimentais do CG-EM.

3.3.5. Comparação do perfil cromatográfico dos constituintes apolares de espécimens de *B. radicans*

Para a análise comparativa dos constituintes apolares da espécie *B. radicans*, extratos de BRC e BRM foram obtidos por duas metodologias distintas:

- a) extração com solvente polar, seguido de partição com solventes de polaridade crescente: as frações (obtenção descrita no item 3.3.1) foram submetidas a um “clean up”, em colunas Sepack – sílica de fase normal. As amostras foram adsorvidas em sílica gel 60 e eluídas sequencialmente com hexano, diclorometano e metanol.
- b) extração sequencial, com solventes de polaridade crescente: aproximadamente 30 g de alga fresca foram extraídas sequencialmente por maceração utilizando-se os solventes hexano e diclorometano.

As amostras foram analisadas por CG-EM (especificações: item 3.1).

3.3.6. Comparação do perfil cromatográfico dos constituintes polares de espécimens de *B. radicans*

O estabelecimento do perfil cromatográfico dos constituintes polares da espécie *B. radicans* foi realizado utilizando-se extratos metanólicos obtidos a partir de 40 g de BRC e BRM suspensos em MeOH:H₂O (1:1), submetidos à sonicação (30 segundos) e posteriormente centrifugados. O sobrenadante foi concentrado a vácuo e adsorvido em sílica de fase reversa C18. As amostras foram aplicadas em colunas Backerbond – sílica de fase reversa C18 e eluídas com água destilada (100%), metanol e água (1:1) e metanol (100%). As duas primeiras frações foram reunidas e analisadas por CLAE (especificações: item 3.1).

O método otimizado utilizado para as análises comparativas foi:

- Fase móvel: de 0,1 a 5 min: 3% de ACN; de 5 a 20 min: de 3% a 25% de ACN; de 20 a 30 min: de 25% a 50% de ACN; 30 a 40 min: de 50% a 100% de ACN; 40 a 43 min: 100% de

ACN; de 43 a 46 min: de 100% a 3% de ACN; de 46 a 50 min: 3% de ACN. Fluxo: 1 mL/min.

Após a realização das análises comparativas buscou-se o isolamento das substâncias majoritárias presentes no cromatograma por CLAE preparativa (especificações: item 3.1), utilizando-se o método:

- Fase móvel: de 0,1 a 15 min: 3% a 5% de ACN; de 15 a 20 min: de 5% a 13% de ACN; de 20 a 60 min: de 13% a 25% de ACN; 60 a 68 min: de 25% a 45% de ACN; 68 a 70 min: 45% a 100% de ACN; de 70 a 75 min: 100% de ACN; de 75 a 77 min: de 100% a 3% de ACN; de 77 a 85 min: 3% de ACN. Fluxo: 9 mL/min.

3.3.7. Avaliação da atividade biológica

Os extratos e frações foram submetidos a ensaios biológicos para avaliação das atividades antitumoral, antifúngica, tripanocida, leishmanicida e citotóxica.

3.3.7.1. Avaliação da atividade antitumoral

Os ensaios para a detecção de atividade antitumoral foram realizados sob a responsabilidade da Profa. Letícia Veras Costa-Lotufo em colaboração com o Prof. Manoel Odorico de Moraes e Profa. Cláudia do Ó Pessoa no Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os pesquisadores vêm atuando no desenvolvimento de novas drogas anticâncer e vacinas, bem como em ensaios de imunomodulação e hipertermia. Inicialmente foi realizado um teste através do método do MTT, utilizando células tumorais das linhagens HL-60 (leucemia), HCT-8 (cólon) e SF-295 (SNC) em concentração única 100 µg/mL, para seleção dos extratos mais ativos. Os extratos selecionados serão testados em diferentes linhagens celulares para

quantificação da citotoxicidade e verificação da seletividade em células de diversas origens (leucemia, mama, pulmão, cérebro, próstata, cólon) novamente através do teste do MTT.

Todas as linhagens celulares utilizadas foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI-EUA). Todas as células foram cultivadas em meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do National Cancer Institute (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano. É um método rápido, sensível e barato. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.

3.3.7.2. Avaliação da atividade citotóxica

O ensaio de toxicidade foi realizado no próprio laboratório de pesquisa do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP de acordo com a metodologia proposta por Meyer et al. (1982) adaptada (SVENSSON et al., 2005). Os cistos de alta eclosão de *Artemia salina* foram colocados em um aquário com água do mar artificial (solução aquosa de sal marinho na concentração de 38 g/L, pH = 8,0) sob aeração constante, iluminação com lâmpada fria e controle da temperatura (25-27 °C). Após 48 horas de incubação, os náupios foram retirados do aquário para a realização do ensaio.

Foram realizadas diluições seriadas dos extratos metanólicos de BRM e BRC. As concentrações finais obtidas foram: 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 10 µg/mL; sendo que cada solução continha no máximo 3% de DMSO. As soluções utilizadas como controle negativo também foram preparadas por diluições seriadas a partir de uma solução de água do mar artificial contendo 3% de DMSO; para o controle positivo foram

preparadas soluções de dicromato de potássio nas concentrações: 9 µg/mL, 45 µg/mL e 90 µg/mL.

Aos frascos de vidro foram adicionadas as soluções dos extratos até completar um volume de 5mL. Foram transferidos, com o auxílio de uma micropipeta, 10 náupilos em cada frasco. Após 24 horas de contato com os extratos realizou-se a contagem do número de náupilos sobreviventes; sendo considerados mortos aqueles que permaneceram imóveis por mais de 10 segundos de observação, após agitação suave dos tubos. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.3.7.3. Avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida

A avaliação de extratos e frações provenientes da alga *B. radicans* frente à *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* foi realizada sob a supervisão do Prof. Dr. Sergio de Albuquerque, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, o qual é responsável pela realização da avaliação tóxica de compostos frente a estes parasitas (GRAEL et al., 2005).

- *Trypanosoma cruzi*

As formas tripomastigotas foram obtidas do cultivo do parasito em células da linhagem LLCMK₂. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 2mM de *L*-glutamina, 10mM de NaHCO₃, 100U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 5% de soro bovino fetal inativado, em garrafas de cultura a 37 °C em ambiente a 5% de CO₂, com umidade de 95%. Sangue infectado contendo as formas tripomastigotas foi adicionado à cultura, onde o conjunto foi incubado por um período de 24 horas.

Após esse período, as células foram lavadas com meio de cultura, restando somente células infectadas pelo parasita. Após cerca de 5 dias cultivo (quando se inicia o processo de lise celular e se observam as formas tripomastigotas no meio) o sobrenadante contendo as formas tripomastigotas foi removido. Em uma microplaca de 96 poços, esse sobrenadante contendo as formas tripomastigotas do parasita foi aliquoteado (1×10^6 parasitas/mL), e adicionaram-se as misturas das amostras em análise, nas concentrações de 0,5; 2,0; 8,0 e 32,0 μ M onde, após 24 horas de incubação, foi realizada a verificação da atividade biológica utilizando a técnica colorimétrica pelo brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Foram adicionados 10 μ L de MTT na concentração de 5 mg/mL/poço, com incubação a 37 °C, por 4 horas. Após esse período, adicionou-se isopropanol ácido (100 μ L de HCl 0,04N em isopropanol) e foi realizada a leitura da microplaca em leitor Sunrise –Tecan, em filtro de 570 nm e referência 630 nm, com valores processados pelo programa Magelan 3 (TECAN).

Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de atividade (%AE) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%AE = [(AE-AEB)/(AC-ACB)] \times 100 \text{ onde:}$$

AE = absorbância dos poços tratados;

AEB= absorbância dos poços contendo meio e amostra;

AC=absorbância dos poços contendo controle negativo;

ACB= absorbância dos poços contendo meio de cultura.

Como controle negativo foi utilizado solução de DMSO na mesma concentração da utilizada para a diluição das amostras avaliadas. A avaliação do controle positivo (violeta de genciana, na concentração de 250 μ g/mL) foi verificada quantitativamente.

- *Leishmania amazonensis*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas a 22 °C, em meio 199 (LGC) suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina. As formas promastigotas (1×10^5 /mL), obtidas do cultivo em fase estacionária foram colocadas em placas de 24 poços a 22 °C, onde as várias concentrações das amostras (0,5, 2, 8, 32 e 128 µM) foram adicionadas, sendo as amostras avaliadas após 24 horas. Após este período, 100 µL do material incubado foram retirados e a avaliação da atividade foi realizada pela técnica colorimétrica de oxidação de MTT. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de atividade (%AE) de acordo com a fórmula descrita anteriormente. Como controle negativo foi utilizado solução de DMSO na mesma concentração da utilizada para a diluição das amostras avaliadas.

3.3.7.4. Avaliação da atividade antifúngica

Os experimentos para avaliação da atividade antifúngica estão sendo realizados sob a supervisão da Dra. Maria Cláudia Marx Young do Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Botânica, São Paulo. Os ensaios são realizados por meio de bioautografia utilizando os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (HOMANS & FUCKS, 1970, HOWARD 1983).

Para a atividade antifúngica, os extratos e frações foram aplicados em placa de sílica gel, em diferentes concentrações a fim de estabelecer os limites de detecção de cada amostra. A fase móvel foi completamente evaporada e a cromatoplaça aspergida com uma solução salina de esporos de *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides* em glicose e incubado durante 72 horas em uma câmara úmida e escura a 25 °C. Para a avaliação desta atividade foi realizado um ensaio para visualização do efeito inibitório das substâncias sobre o crescimento

dos fungos, usando como padrão a nistatina, nas concentrações utilizadas para as substâncias puras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Fracionamento dos extratos e isolamento das substâncias

4.1.1. Fracionamento do extrato Dcm:MeOH e identificação da substância 1

A partir do fracionamento do extrato Dcm:MeOH (2:1) através de CCC foram obtidas 28 frações, descritas na Tabela 5. Na verificação inicial das frações, estas foram aplicadas em CCDC. Após essa primeira avaliação, foi observado que as amostras constituíam-se de misturas complexas de massa reduzida, sendo que muitas frações apresentaram cristais que após análises de IV e EM, foram atribuídos à presença de NaCl.

Tabela 5 - Frações obtidas do fracionamento do extrato Dcm:MeOH (2:1) de BRM em coluna de Sephadex-LH20

Frações reunidas	Aspecto	Massa (mg)
BR-SH01	Incolor	1,5
BR-SH02 a SH04	Amarelo claro	17,8
BR-SH05 a SH07	Amarelo claro	76,6
BR-SH08	Amarelo	8,3
BR-SH09	Amarelo forte	8,1
BR-SH10 e SH11	Amarelo esverdeado	25,0
BR-SH12 a SH14	Verde	63,7
BR-SH15	Verde amarelado	6,6
BR-SH16	Amarelo forte	2,3
BR-SH17	Amarelo esverdeado	4,8
BR-SH18	Verde claro	123,7
BR-SH19 a SH-23	Verde claro	123,7
BR-SH24	Verde	2,5
BR-SH25 e SH-26	Verde	9,1
BR-SH27	Verde escuro	1,7
BR-SH28	Incolor	1,1
Total		345,0

Este fracionamento não resultou na identificação de nenhuma substância. Entretanto, a partir do fracionamento deste mesmo extrato por CCDC (especificações item 3.3.1), foi possível o isolamento da substância **1**, identificada como colesterol (Figura 5). Este estudo foi realizado em virtude do potencial biológico demonstrado por vários derivados do colesterol, os quais apresentaram interessantes propriedades antimicrobianas (BRUNEL, 2005). Ainda, como parte do trabalho experimental, esta estrutura foi determinada em um primeiro momento por meio de análises de espectro de RMN de ^1H sendo posteriormente confirmada por CG-EM.

Analisando-se o espectro de RMN ^1H da substância **1**, nota-se inicialmente dois sinais de hidrogênio bastante desblindados (δ 4,51 e 5,35), que podem corresponder respectivamente ao hidrogênio da hidroxila e ao hidrogênio ligado ao carbono sp^2 . O H-3 apresenta deslocamento característico de hidrogênio oximetínico em δ 3,73 e ainda são observados os deslocamentos químicos referentes aos cinco substituintes metílicos presentes na molécula, H-18 (δ 0,68 *s*), H-21 (δ 0,91 *d*), H-26 (δ 0,87 *d*), H-27 (δ 0,86 *d*) e H-19 (δ 1,01 *s*), Figuras 6a e 6b. Os dados foram confirmados por comparação com aqueles apresentados na literatura para o colesterol (SAWAN et al, 1979).

Figura 5. Estrutura química do colesterol.

Figura 6a. Espectro de RMN ^1H da substância **1**, 400 MHz, CDCl_3 .

Figura 6b. Espectro de RMN ^1H da substância **1**; expansão da região de deslocamento químico dos hidrogênios metílicos.

O espectro de massas obtido através da análise por CG-EM da amostra apresentou uma alta similaridade (93%) com o espectro de massas do padrão de colesterol da biblioteca do equipamento (NIST); sendo possível observar o pico do íon molecular (M^+ 386), Figuras 7 e 8. Ainda, foi realizada a injeção do padrão de colesterol presente no laboratório, para comparação dos tempos de retenção. O tempo de retenção obtido da amostra (19,248 min) foi compatível com o tempo de retenção do padrão (19,269 min).

Figura 7. Cromatograma da amostra identificada como colesterol, obtido por CG-EM.

Figura 8. a) Espectro de massas da amostra identificada como colesterol, obtido por CG-EM (impacto eletrônico), **b)** Espectro de massas obtido da biblioteca NIST (colesterol).

A presença de esteróis em algas foi estabelecida pela primeira vez por Heilbron e colaboradores em 1935 (HEILBRON et al, 1935). Dados mais recentes da literatura demonstram que o perfil de esteróis tem sido considerado uma importante característica para o estabelecimento de relações quimiotaxônomicas entre diferentes classes de algas (AKNIN et al., 1992; YIN et al., 2005). As algas vermelhas produzem principalmente o colesterol, sendo que apenas algumas espécies contêm esteróis C_{28} e C_{29} . O demosterol e o 22-deidrocolesterol, também são comumente encontrados em Rhodophytas (BAKUNI & RAWAT, 2005). O fucosterol é o esterol predominante nas algas pardas e as algas verdes apresentam um padrão mais variado de esteróis como o condilasterol, poriferasterol, ergosterol e o colesterol (BAKUNI & RAWAT, 2005).

Recentemente, alguns derivados do colesterol, tais como derivados halogenados e sulfatados, foram avaliados frente às enzimas DNA polimerase e DNA topoisomerase em células cancerígenas, demonstrando atividade inibitória promissora (ISHIMARU, 2008). Outros derivados oxigenados foram avaliados, *in vitro*, frente a microrganismos patogênicos humanos, demonstrando atividade inclusive em cepas resistentes (BRUNEL, 2005). Estes resultados reforçam a importância da busca de novas estruturas, também derivadas deste esterol, que possam apresentar potencial biológico.

4.1.2. Isolamento e identificação das substâncias 2 a 9

Através da análise do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 – 400MHz) da fração hexânica pode-se observar a presença de sinais característicos de hidrogênios ligados a carbono sp^3 , cujo deslocamento químico encontra-se na região de 0 a 2 ppm, evidenciando-se assim a presença de grupos metílicos (δ 0,9 ppm) e grupos metilênicos (δ 1,25 ppm). Além disso, pode-se observar sinais na região de hidrogênios ligados a carbono sp^2 na região entre 5 a 7

ppm (Figura 9). Desta forma, foi possível inferir que os compostos de cadeia alifática longa, como ácidos graxos, seriam majoritários nesta fração.

Ainda que estas substâncias fossem esperadas como majoritárias, optou-se pelo fracionamento deste extrato por métodos clássicos de química de Produtos Naturais; uma vez que esta fração representava uma porcentagem de massa significativa do extrato bruto e havia demonstrado potencial biológico, como descrito nos resultados de avaliação biológica. Além disso, não há um banco de dados (no equipamento CG-EM) contendo apenas estruturas provenientes do ambiente marinho, o que dificulta muitas vezes a identificação completa dos constituintes de um determinado extrato, nos levando, portanto, a escolha pelo isolamento químico tradicional.

Figura 9. Espectro de RMN de ^1H da fração hexânica, 400 MHz, CDCl_3 .

Sendo assim, através do fracionamento cromatográfico da fração hexânica (item 3.3.1) foram obtidas 162 frações de 13 mL, concentradas a vácuo (Tabelas 6 e 7). As subfrações semelhantes foram reunidas mediante análise por CCDC, utilizando-se diferentes misturas de solventes como fase móvel.

Tabela 6 - Fracionamento da fração hexânica de *B. radicans*

Frações	Eluente
01-10	Hexano
11-20	Hexano: Acetato de Etila (9:1)
21-30	Hexano: Acetato de Etila (8:2)
31-40	Hexano: Acetato de Etila (7:3)
41-60	Hexano: Acetato de Etila (6:4)
61-80	Hexano: Acetato de Etila (1:1)
81-100	Acetato de Etila: Hexano (6:4)
101-110	Acetato de Etila: Hexano (8:2)
111-130	Acetato de Etila (100%)
131-140	Acetato de Etila: Metanol (1:1)
141-150	Metanol (100%)
151-162	Metanol: Água (1:1)

Tabela 7 - Subfrações reunidas e respectivas massas obtidas a partir da fração hexânica

Frações reunidas	Frações coletadas	Massa (mg)
BRM-H01	1-18	8,0
BRM-H02	19-26	14,0
BRM-H03	27-40	197,0
BRM-H04	42-51	115,0
BRM-H05	52-61	148,0
BRM-H06	62-78	152,0
BRM-H07	79-90	61,0
BRM-H08	91	6,0
BRM-H09	92-116	155,0
BRM-H10	117-129	171,0
BRM-H11	130-143	178,0
BRM-H12	144-148	163,0
BRM-H13	149-162	85,0

TOTAL	1453,0
-------	--------

Após a análise das subfrações por CCDC foi observado que a fração BRM-H01 constituía-se de apenas duas substâncias, sendo estas identificadas como o hidrocarboneto heptadecano (substância **2**) e um provável contaminante do solvente, o ftalato. Este hidrocarboneto também foi encontrado na subfração BRM-H02 em mistura com a substância **3**, identificada como esqualeno (Figuras 10 e 11). As demais subfrações reunidas foram fracionadas por CCDP, resultando no isolamento de algumas substâncias em mistura.

Figura 10. a) Espectro de massas da amostra BRM-H01 identificada como heptadecano, obtido por CG-EM (impacto eletrônico), b) Espectro de massas obtido da biblioteca WILEY (heptadecano).

Figura 11. a) Espectro de massas da substância identificada como esqualeno, obtido por CG-EM (impacto eletrônico), **b)** Espectro de massas obtido da biblioteca WILEY (esqualeno).

Deve ser destacado que o hidrocarboneto esqualeno é um precursor biossintético de triterpenos e esteróis (DEWICK, 2000). Este hidrocarboneto está envolvido na síntese de triterpenos via mevalonato, o que nos dá subsídios para futuros estudos químicos visando o isolamento destas classes de metabólitos e ainda, futuramente, propormos estudos a partir desta via utilizando o esqualeno como precursor biossintético.

As subfrações BRM-H03, BRM-H04 e BRM-H05, mesmo após o fracionamento por CCDC, apresentaram amostras de constituição muito semelhantes contendo quase sempre como constituinte majoritário o ácido hexadecanóico. Foram isoladas amostras contendo os ácidos tetradecanóico (**4**) e hexadecanóico (**5**) em mistura (Figuras 12 e 13), bem como outras contendo os ésteres hexadecanoato de metila (**6**) e 9-octadecenoato de metila (**7**) em mistura (Figuras 14 e 15).

Figura 12. a) Espectro de massas da substância identificada como ácido tetradecanóico, obtido por CG-EM (impacto eletrônico), **b)** Espectro de massas obtido da biblioteca WILEY (ácido tetradecanóico).

Figura 13. a) Espectro de massas da substância identificada como ácido hexadecanóico, obtido por CG-EM (impacto eletrônico), **b)** Espectro de massas obtido da biblioteca WILEY (ácido hexadecanóico).

Figura 14. a) Espectro de massas da substância identificada como hexadecanoato de metila, obtido por CG-EM (impacto eletrônico), **b)** Espectro de massas obtido da biblioteca WILEY (hexadecanoato de metila).

Figura 15. **a)** Espectro de massas da substância identificada como 9-octadecenoato de metila, obtido por CG-EM (impacto eletrônico), **b)** Espectro de massas obtido da biblioteca WILEY (9-octadecenoato de metila).

A presença de ácidos graxos livres, assim como de ácidos graxos metilados, vem sendo freqüentemente evidenciada em algas marinhas. O ácido palmítico e/ou o palmitato de metila já haviam sido identificados nas espécies de macroalgas *Polysiphonia denudata*, *Corallina mediterranea*, *Corallina granifera*, *Dictyopteris membranacea* e *Botryococcus braunii* (DE ROSA et al., 2001; DE ROSA et al., 2003; NECHEV et al., 2004; DAYNANDA et al., 2007; EL HATTAB et al., 2007). O interesse de químicos e bioquímicos nos lipídeos e ácidos graxos de origem marinha é estimulado principalmente pela produção de ácidos graxos poliinsaturados, que possuem pronunciado potencial biológico, além do valor nutricional (LE GAL e ULBER, 2005).

Nas subfrações de BRM-H06 e BRM-H07 foram identificados os terpenos, neofitadieno (**8**) e *trans*-fitol (**9**) isolados ou em mistura com o colesterol (Figuras 16 e 17).

Figura 16. a) Espectro de massas da substância identificada como *trans*-fitol, obtido por CG-EM (impacto eletrônico), **b)** Espectro de massas obtido da biblioteca WILLEY (*trans*-fitol); similaridade: 98%.

Figura 17. a) Espectro de massas da substância identificada como neofitadieno, obtido por CG-EM (impacto eletrônico), **b)** Espectro de massas obtido da biblioteca WILLEY (neofitadieno); similaridade: 94%.

O diterpeno linear *trans*-fitol foi relatado na literatura pela primeira vez em algas verdes pertencentes à família Cordiaceae, divisão Chlorophyceae (YIN et al., 2005). Entretanto, este diterpeno possui ampla distribuição entre outras espécies de algas verdes (GHAZALA e SHAMEEL, 2005). Lyakhova e colaboradores isolaram o fitol da espécie *Laurencia nipponica*, Rhodomelaceae (2004). Por outro lado, a ocorrência do diterpenóide neofitadieno não é comum em organismos de origem marinha, sendo assim de grande importância para o estudo de espécies da família Rhodomelaceae, podendo ser um valioso precursor biossintético e até considerado futuramente como um possível marcador taxonômico para o gênero *Bostrychia*. Esta substância foi identificada em óleos voláteis de plantas terrestres das espécies *Echinophora tenuifolia* subsp. *sibthorpiana*, *Ailanthus excelsa*

e *Capsicum annum* (TZAKOU et al., 2006; CHALCHAT et al., 2007; CONFORT et al., 2007).

4.1.3. Isolamento e identificação das substâncias 10 a 18

O espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 – 400MHz) da fração acetato de etila apresentou uma grande diversidade de deslocamentos químicos em diferentes regiões (Figura 18). Assim como na fração hexânica, foi possível observar a presença de sinais característicos de hidrogênios ligados a carbono sp^3 , cujo deslocamento químico encontra-se na região de 0 a 2 ppm; além dos sinais na região de hidrogênios ligados a carbono sp^2 na região entre 5 a 7 ppm. Além disso, pode-se observar sinais na região de deslocamento químico entre 6,5 e 8 ppm, indicando a presença de hidrogênios aromáticos; e sinais característicos de açúcares, δ 3 a 4 ppm, referentes aos hidrogênios oximetínicos. Ainda, pode-se observar um sinal próximo a 10 ppm, o que pode nos sugerir a presença de aldeído.

Figura 18. Espectro de RMN de ^1H da fração acetato de etila, 400 MHz, CDCl_3

- *Fracionamento cromatográfico*

Através do fracionamento cromatográfico desta fração (item 3.3.1) foram obtidas 14 subfrações (Tabela 8) concentradas a vácuo e analisadas por CCDC.

Tabela 8 - Subfrações coletadas e respectivas massas obtidas a partir da fração acetato de etila

Frações	Aspecto	Massa (mg)
BRM-S01	Incolor	1,5
BRM-S02	Verde claro	72,0
BRM-S03	Verde claro	44,8
BRM-S04	Verde claro	28,6
BRM-S05	Amarelo claro	33,5
BRM-S06	Amarelo claro	14,9
BRM-S07	Amarelo claro	34,0
BRM-S08	Amarelo	8,8
BRM-S09	Amarelo forte	3,5
BRM-S10	Amarelo esverdeado	1,6
BRM-S11	Amarelo esverdeado	1,0
BRM-S12	Verde	3,8
BRM-S13	Verde	3,0
BRM-S14	Verde	1,6
TOTAL		252,6

A complexidade das amostras observada nas placas cromatográficas, associada à massa reduzida de cada subfração, nos levou a optar pela obtenção dos espectros de RMN ^1H das misturas de substâncias, além da análise das subfrações de menor polaridade (solúveis em acetato de etila ou diclorometano) por CG-EM.

Através destas análises, foram identificadas nas subfrações BRM-S07 e BRM-S08 diferentes substâncias aromáticas de interesse biológico, taxonômico e biossintético. Ainda, visando à obtenção dos espectros de RMN ^1H das substâncias purificadas, as subfrações BRM-S07 e BRM-S08 foram submetidas ao fracionamento cromatográfico por CCDC.

Entretanto, a quantidade de amostra obtida após este procedimento não foi suficiente para a obtenção destes dados espectroscópicos.

- Identificação das substâncias isoladas em mistura

A confirmação da presença dos compostos aromáticos em BRM-7 e BRM-8 baseou-se na comparação dos espectros de massa (EM) dos picos obtidos, com EM de compostos das bibliotecas Willey e NIST, sendo que todas estas apresentaram similaridade igual ou superior a 90% (Tabela 9).

A identificação destas estruturas aromáticas é de suma importância para a taxonomia da espécie estudada. Na literatura são relatadas algas produtoras de substâncias de caráter terpenoídico ou de caráter aromático. Entretanto, poucos relatos evidenciam a presença de ambas as classes sendo sintetizadas pela mesma espécie, como é o caso de espécies do gênero *Laurencia*, que metabolizam principalmente diterpenos e sesquiterpenos. Em contrapartida, são observados vários exemplos de algas vermelhas que sintetizam substâncias fenólicas, mas, com relação à síntese de derivados terpenoídicos, nada consta na literatura (CARVALHO & ROQUE, 2000; KUNIYOSHI et al, 2005).

Tabela 9 - Substâncias aromáticas identificadas na espécie *B. radicans*

Substância	Espectro de Massas da Substância
10. 4-metoximetilfenol

11. 4-hidroxibenzaldeído

12. 4-hidroxibenzoacetato de metila

13. 4-hidroximandelato de metila

14. 4-diidroxibenzenopropanoato de metila

15. hidroquinona

16. 4-hidroxibenzoato de metila

17. ácido 4-hidroxibenzoacético

18. formilcarbonil-fenol

Os espectros de massas das substâncias identificadas apresentam padrões de fragmentação comuns aos grupos funcionais presentes em cada uma delas (PAVIA et al., 2001). Os espectros das substâncias **10**, **12**, **14** e **17** apresentam como pico base o íon m/z 107, que corresponde à formação do íon tropílio (resultante da formação do íon benzílico) apresentando uma hidroxila como substituinte. A perda de determinados fragmentos, para a formação deste íon m/z 107, ajudam a caracterizar alguns esqueletos; como, por exemplo, a perda de COOH^+ na substância **17**, característica de ácidos carboxílicos.

O pico base das substâncias **16** e **18** corresponde ao íon de m/z 121, resultante da clivagem α , para a formação do fragmento $\text{C}_7\text{H}_6\text{CO}^+$ (íon acílio). Na substância **16** a formação deste fragmento decorre da perda de OCH_3^+ resultando no fragmento mais estável característico de ésteres aromáticos, não observado nos demais ésteres (**12**, **13** e **14**). No espectro da substância **11** o pico de maior intensidade também corresponde ao íon m/z 121, todavia neste caso a formação deste íon resulta da perda de um hidrogênio, formando o íon acílio. Além disso, nos espectros de **11** e **18**, observou-se a formação do íon resultante da perda de COH^+ (m/z 29), caracterizando o grupamento aldeído.

Nos espectros de massas dos ésteres **12** e **13** é possível verificar que o pico base é referente à perda do fragmento CH_3OCO^+ (m/z 59); sendo que esta perda também é observada no espectro dos ésteres **14** (m/z 137) e **16** (m/z 93). Com relação ao espectro da substância **15**, o pico base corresponde ao pico do íon molecular (m/z 110). Ainda, neste espectro observa-se a perda de uma molécula de água para a formação do fragmento (m/z 92), além da perda do radical formil ($\text{HCO}^\bullet$) característica de fenóis.

- Atividades biológicas relacionadas às estruturas identificadas

O ácido 4-hidroxibenzenoacético (**17**) e o éster 4-hidroxibenzenoacetato de metila (**12**) já haviam sido isolados anteriormente a partir da fração acetato de etila acidificada de

Burkholderia sp.. Neste estudo, Mao e colaboradores (2006) ainda demonstraram a atividade antifúngica destas substâncias frente a diferentes linhagens de fungos, como exemplo *Colletotrichum gloeosporioides* e *Chaetomium globosum*.

Diversos compostos fenólicos, entre eles 4-metoximetilfenol (**10**) e 4-hidroxibenzaldeído (**11**), foram isolados dos rizomas de *Gastrodia elata* Blume (Orchidaceae) e apresentaram atividade farmacológica relaxante (HAYASHI et al., 2002). A substância **11** também foi encontrada em outras fontes marinhas tais como a esponja *Anchinoe paupertas* (BOUAICHA et al., 1994) e a alga vermelha *Nitophyllum marginata* (SRIDEV et al., 2003).

O éster 4-hidroxibenzoato de metila (**16**), amplamente utilizado como conservante antimicrobiano nas indústrias cosméticas e farmacêuticas, foi isolado recentemente como produto natural das folhas de *Palicourea coriacea* (Rubiaceae) (SILVA et al., 2008) e identificado na fração volátil de *Securidaca longepedunculata* Fers (Polygalaceae) (JAYASEKARA et al., 2002).

4.1.4. Isolamento e identificação das substâncias 11 e 15

A partir do fracionamento cromatográfico do extrato Dcm:MeOH (1:1) por CLV, foram obtidas 10 frações (Tabela 10), concentradas a vácuo e analisadas por CCDC.

Tabela 10 - Frações obtidas da CLV do extrato Dcm:MeOH (1:1)

Fração	Solvente	Massa (mg)	Volume (L)
BR-1	Hex (100%)	0,043	2,5
BR-2	Hex/AcOEt (95:05)	1,248	2,5
BR-3	Hex/AcOEt (9:1)	1,022	2,5
BR-4	Hex/AcOEt (7:3)	1,405	2,5
BR-5	Hex/AcOEt (1:1)	0,287	2,5
BR-6	Hex/AcOEt (3:7)	0,042	2,5
BR-7	AcOEt (100%)	0,149	2,5
BR-8	AcOEt/MeOH (9:1)	0,365	2,5

BR-9	AcOEt/MeOH (1:1)	1,680	2,5
BR-10	MeOH (100%)	0,485	2,5
TOTAL		6,726	

Através da análise das placas de CCDC, pode-se observar um perfil cromatográfico bastante distinto entre as frações; sendo assim, estas não foram reunidas. Todas as frações foram submetidas à análise de RMN ^1H .

O espectro de RMN ^1H da fração BR-4 (Figura 19) apresentou sinais de deslocamento químico indicativos da presença de uma grande diversidade química; dentre os quais destacam-se os sinais na região de δ 6 a 8 ppm, referente aos hidrogênios aromáticos.

Figura 19. Espectro de RMN de ^1H da fração BR-4, 400 MHz, CDCl_3 .

Desta forma, esta fração foi posteriormente fracionada por CCC (especificações item 4.3.1), tendo sido obtidas 30 frações reunidas por CCDC e fracionadas por CCDP. A partir

deste fracionamento foram obtidas as substâncias **11** e **15** (isoladas em mistura) analisadas por RMN ^1H e CG-EM.

No espectro de RMN ^1H destas substâncias (Figura 20) observou-se a presença, na região de hidrogênios aromáticos, de dois dubletos (δ 7,79 e 6,93) com J característico de acoplamento de hidrogênios em *orto* (8,6 Hz); integrando para dois hidrogênios (Tabela 11). Estes dados comprovam a presença de um anel aromático *para* substituído. Ainda, pode-se observar um singlete bastante desprotegido em δ 9,78; que mesmo após a adição de D_2O não sofreu alteração, confirmando a presença do grupamento aldeído. Através da análise do espectro de massas de **11** (Figura 21) pode-se observar o pico do íon molecular m/z 122, condizente com a estrutura proposta.

Além dos sinais descritos anteriormente, observou-se a presença de um singlete em δ 6,63 (Figura 20), que caracteriza uma molécula aromática simétrica com substituintes, que além de serem doadores de elétrons e iguais, estão em posição *para*. A partir destes dados, associados àqueles obtidos no espectro de massas (Figura 22), foi proposto que a substância **15** trata-se da hidroquinona.

Portanto, através da análise dos dados espectroscópicos e espectrométricos de **11** e **15**, bem como a comparação com os dados encontrados na literatura (SCHMITT e SCHNEIDER, 1999; PALLAGI et al., 1999), confirmou-se tratar das substâncias 4-hidroxibenzaldeído e hidroquinona.

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H da substância **11** e comparação com dados obtidos da literatura.

Posição	Amostra ^1H δ (ppm); mult; J (Hz)	*Literatura ^1H δ (ppm); mult; J (Hz)
2	7,79; d; (8,6)	7,82; d; (8,1)
3	6,93; d; (8,6)	6,98; d; (8,1)
5	9,78; s	9,70; s

* SCHMITT e SCHNEIDER, 1999.

Figura 20. Espectro de RMN de ^1H da fração BRS-22, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 21. Espectro de massas da substância **11** (EI; 70eV).

Figura 22. Espectro de massas da substância **15** (EI; 70eV).

5.2. Identificação dos ácidos graxos e esteróis de *B. radicans*

Os resultados obtidos na análise dos ácidos graxos de BRM permitiram a identificação dos compostos descritos nas Tabelas 12 e 13, através da comparação dos

espectros de massas com o banco de dados do aparelho cromatográfico. Foram descritos apenas os constituintes que apresentavam um índice de similaridade superior a 90%.

Tabela 12. Ésteres metílicos dos ácidos graxos do extrato hexânico de BRM

Compostos	Índice de similaridade (%)
Miristato de metila	94
Palmitato de metila	97
Palmitoleato de metila	92
Estearato de metila	94
9-Octadecenoato de metila	96
Octadec-11-enoato de metila	96
Eicosanoato de metila	98
Docosanoato de metila	94
Tetracosanoato de metila	93

Tabela 13. Ésteres metílicos dos ácidos graxos do extrato diclorometânico de BRM

Compostos	Índice de similaridade (%)
Laurato de metila	93
Miristato de metila	97
Palmitato de metila	98
Palmitoleato de metila	97
Estearato de metila	94
Tricosanoato de metila	91
Octacosanoato de metila	92
Docosanoato de metila	94
Tetracosanoato de metila	92
Heptadecanoato de metila	94
Nonadecanoato de metila	91
Oleato de metila	96
14-Metilexadecanoato de metila	92
Octadec-11-enoato de metila	96

Como já havia sido mencionado no item 4.1.2, os ácidos graxos poliinsaturados, encontrados em grande proporção em extratos apolares de algas marinhas, possuem potencial biológico e despertam interesse neste tipo de estudo. Entre estes os mais representativos são os ácidos eicosapentanóico e aracdónico, ambos com atividade biológica. O ácido eicosapentanóico é utilizado para a profilaxia e o tratamento de doenças cardiovasculares, além de ser efetivo para o tratamento de alguns carcinomas e inibir o crescimento de outros tumores (KHOTIMCHENKO & GUSAROVA, 2004).

É importante destacar também, que as algas possuem uma variedade excepcional no padrão de lipídeos, produzindo substâncias incomuns tais como ácidos graxos halogenados. Dentre estes, três ácidos graxos clorados com esqueleto epóxi ciclopentil foram isolados da alga parda *Egregia menziesii*. Ainda, clorossulfolipídeos foram encontrados na alga vermelha *Ochromonas danica*, representando aproximadamente 15% do total de lipídeos para esta espécie (GUSCHINA & HAWOOD, 2006).

Os principais esteróides identificados em BRM foram o colesterol, α -colestano e o γ -sitosterol, o que indica que não há um padrão de variação de esteróides na espécie estudada.

4.3. Perfil cromatográfico dos constituintes voláteis de espécies de *Bostrychia*

Após as análises dos resultados obtidos na extração da espécie *B. radicans* coletada no manguezal do Rio Escuro, foi observada uma maior extração, referente aos constituintes majoritários, quando utilizada a fibra PDMS–DVB (Gráfico 1). Esta fibra foi selecionada de acordo com experimentos preliminares utilizando as fibras de polidimetilsiloxano (PDMS), polidimetilsiloxano-divinilbenzeno (PDMS-DVB) e polidimetilsiloxano-carbowax (PDMS-CW).

Gráfico 1. Área dos picos correspondentes aos constituintes majoritários; tempo de extração: 40 min e temperatura: 60°C

Outro aspecto investigado foi o tempo de exposição da amostra com cada uma das fibras. Através dos resultados representados nos Gráficos 2, 3 e 4; pode-se observar que a 60°C, após 40 min de exposição há um equilíbrio entre os constituintes voláteis e a fibra. A temperatura de 60°C foi estabelecida por entender-se que um aquecimento moderado favorece a extração dos constituintes voláteis e temperaturas mais altas como 100°C podem levar a degradação destes constituintes bem como a formação de artefatos.

Gráfico 2. Área total dos picos dos constituintes voláteis obtidos com a fibra de PDMS e variação no tempo de extração (10, 20, 30, 40, 50 e 60 min)

Gráfico 3. Área total dos picos dos constituintes voláteis obtidos com a fibra de PDMS-DVB e variação no tempo de extração (10, 20, 30, 40, 50 e 60 min)

Gráfico 4. Área total dos picos dos constituintes voláteis obtidos com a fibra de PDMS-CAR e variação no tempo de extração (10, 20, 30, 40, 50 e 60 min)

A análise comparativa dos constituintes voláteis das espécies *B. radicans* e *B. calliptera*, coletadas no manguezal; e das espécies *B. radicans* e *B. tenella*, coletadas nos costões rochosos, foi realizada em condições de extração otimizadas como descrito anteriormente, Tabela 14 (ANSORENA et al., 2001; BEAULIEU & LEA, 2006; GLISIC et al., 2007; GOMEZ et al., 1993; JARUNRATTANASRI et al., 2007; MIYAZAWA & KAWATA, 2006; MOHAMMED et al., 2004; PINO et al., 2005; VARLET et al., 2007; WU et al., 2005). A identificação destes compostos foi realizada através da comparação de seus espectros de massas com o banco de dados do aparelho cromatográfico e dos índices de

retenção (IR), sendo que para a determinação dos IR foi necessária a injeção de padrões de hidrocarbonetos *n*-alcanos (C₉-C₂₂) conforme descrito por Adams (1995).

Tabela 14. Constituintes voláteis das espécies *B. radicans* (BRC e BRM), *B. calliptera* e *B. tenella*.

Substâncias	IR	BRC (%)	BRM (%)	<i>B. calliptera</i> (%)	<i>B. tenella</i> (%)
1,3,5-Octatrieno*	-	10,21	5,03	-	-
Benzaldeído	962	0,26	-	-	1,59
3-Octenol	975	0,99	29,48	4,25	0,25
NI	983	-	-	5,02	-
(<i>E</i>)-2-Octenal	1057	0,49	8,92	3,56	0,85
(<i>E</i>)-2-Octenol	1065	0,24	4,33	1,73	0,09
1-Octanol	1069	0,83	-	-	-
NI	1070	-	-	3,63	-
Nonanal	1105	0,54	1,02	2,27	0,24
3,4-Dimetilcicloexanol	1109	-	1,13	1,10	0,10
(<i>E,Z</i>)-2,6-Nonadienal	1152	0,48	4,09	0,74	-
2,3-Diidrocitral	1156	0,20	-	0,83	-
(<i>E</i>)-2-Nonenal	1159	0,33	8,87	2,96	0,35
1-Nonanol	1172	0,19	0,61	1,94	0,03
NI	1176	0,53	-	-	-
2-Decanona	1192	-	-	0,44	0,29
Decanal	1206	0,64	0,99	2,70	0,40
β-Ciclocitral	1218	0,96	2,03	2,20	0,57
β-Cicloomocitral	1253	0,21	0,52	0,38	0,09
(<i>E</i>)-2-Decenal	1261	-	0,13	0,26	0,06
NI	1267	1,46	0,89	0,97	0,37
1-Decanol	1272	-	-	1,05	-
Ácido nonanóico	1274	-	1,43	-	-
Trideceno	1292	-	-	-	0,09
(<i>E,Z</i>)-2,4-Decadienal	1294	0,11	0,52	0,69	0,29
Tridecano	1300	-	-	-	0,03
Undecanal	1308	0,22	0,34	0,60	0,27
(<i>E,E</i>)-Decadienal	1318	0,38	0,76	0,77	0,51
NI	1363	-	-	0,89	1,75
Undecanol	1373	-	-	0,40	0,20
Tetradeceno	1392	0,13	0,20	0,39	0,66
Tetradecano	1400	0,18	0,27	-	0,69
Dodecanal	1409	0,61	0,60	1,25	0,83
α-ionona	1418	1,16	1,21	1,86	1,51
(<i>E</i>)-Geranilacetona	1449	1,32	1,57	2,50	0,72
β-ionona	1476	2,90	5,54	6,89	2,24
β-ionona epóxido	1478	0,54	1,08	1,64	0,40
Dodecanol	1481	-	-	-	0,05
Pentadeceno	1491	0,28	0,35	0,63	2,98
Pentadecano	1499	0,28	0,22	-	0,55
Tridecanal	1511	6,93	5,09	-	0,33
2,4-Di-terc-butilfenol	1512	-	-	10,34	6,48
Diidroactinidiolida	1520	0,10	-	0,32	0,09
Dodecanoate de metila	1523	0,25	-	-	-

Tridecanol	1575	0,24	-	1,22	0,63
NI	1585	-	-	0,68	0,10
Dodecanoato de etila	1593	0,04	-	-	-
Hexadecano	1599	-	0,14	0,11	0,10
Tetradecanal	1618	2,00	1,15	2,96	6,37
Tridecanoato de metila	1623	2,00	-	-	-
NI	1671	-	-	-	0,37
Tetradecanol	1676	1,15	-	1,23	1,36
8-Heptadeceno	1680	0,12	-	-	0,25
1-Heptadeceno	1686	0,60	0,51	0,22	1,87
NI	1692	2,40	1,41	3,75	7,20
NI	1698	-	-	-	1,11
Heptadecano	1699	1,28	1,74	1,55	2,13
Pentadecanal	1715	11,81	5,97	9,71	42,35
Tetradecanoato de metila	1724	4,15	-	0,62	-
NI	1753	-	-	-	0,96
NI	1773	-	-	-	1,83
Pentadecanol	1777	0,21	0,10	0,20	0,56
NI	1787	-	-	-	0,19
Tetradecanoato de etila	1793	0,96	-	0,62	-
Octadecano	1799	-	-	-	0,05
Hexadecanal	1815	0,03	-	0,20	0,19
Pentadecanoato de metila	1824	0,37	-	0,18	0,10
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	1839	0,17	0,10	0,70	0,36
Hexadecanol	1880	0,15	-	0,51	0,21
NI	1883	0,32	0,24	1,30	0,62
Linolenato de metila	1886	0,60	-	-	-
NI	1891	0,49	0,36	1,16	2,77
NI	1895	-	-	0,43	0,61
(Z)-9-Hexadecenoato de metila	1901	3,28	-	1,23	-
NI	1914	-	0,87	-	0,22
Hexadecanoato de metila	1926	19,78	0,10	2,70	0,42
Ácido (Z)-9-hexadecenóico	1969	1,46	-	0,46	-
9-Hexadecenoato de etila	1985	0,07	-	-	-
NI	1990	-	-	-	0,65
Hexadecanoato de etila	1993	7,29	-	1,13	-
Eicosano	1999	0,18	-	0,22	0,11
NI	2048	-	-	0,83	-
(Z,Z)-9,12-Octadecadienoato de metila	2087	0,45	-	-	-
(Z)-9-Octadecenoato de metila	2094	1,94	-	-	-
NI	2102	0,44	-	0,14	-
(Z,Z)-9,12-Octadecadienoato de etila	2156	0,16	-	-	0,01
(Z)-9-Octadecenoato de etila	2164	0,65	-	0,22	-
Docosano	2200	-	-	0,47	0,06
NI	2248	0,52	-	-	-
NI	2254	0,74	-	-	-
Tricosano	2299	-	-	-	0,10
Tetracosano	2399	-	-	-	0,06

*Substância identificada apenas por comparação dos espectros de massas da amostra e do banco de dados do equipamento

A análise obtida das substâncias voláteis das espécies do gênero *Bostrychia* permitiu a identificação de uma grande porcentagem de moléculas simples, desde hidrocarbonetos simples ou ramificados e ésteres de ácidos graxos até outras moléculas como aldeídos, cetonas e ésteres. Parte das substâncias encontradas não pôde ser identificada; sendo que este fato deve-se principalmente à escassez de informações quanto aos constituintes voláteis de algas marinhas (HATTAB et al., 2007) e à inexistência de bancos de dados, em espectrometria de massas, específico para algas e/ou organismos marinhos. Entre estas substâncias estão alguns dos constituintes majoritários da espécie *B. tenella*, fato este que pode estar relacionado com a produção de uma maior proporção de substâncias incomuns, quando comparada às demais espécies deste estudo.

Através destes resultados, pode-se observar também que os constituintes majoritários das espécies coletadas no Manguezal (*B. radicans* e *B. calliptera*) são semelhantes entre si e distintos daqueles observados para as espécies coletadas nos Costões Rochosos (*B. radicans* e *B. tenella*). Além disso, a espécie *B. radicans* apresentou diferentes perfis químicos, de acordo com o ecossistema em que foi coletada, evidenciando uma possível relação entre as variações ambientais e o perfil químico dos constituintes voláteis das espécies estudadas.

Ainda, é relevante destacar que alguns dos compostos identificados apresentam potencial farmacológico e/ou importância ecológica já descrita na literatura. O isoprenóide β -ionona, encontrado em todas as espécies estudadas, possui atividade quimiopreventiva contra hepatocarcinogênese por inibição da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA), além de prevenir a proliferação de células do câncer de mama e melanomas (ESPÍNDOLA et al., 2005). O álcool octen-3-ol, substância presente na espécie *B. radicans*, majoritária (29,48%) na espécie do Manguezal e em pequena quantidade (0,99%) proveniente de algas dos Costões, é conhecido como um potente atrativo olfatório para insetos, incluindo os vetores *Anopheles* (*Plasmodium*) e *Glossina* (*Trypanossoma*) (RAMONI et al., 2001).

Além disso, este álcool apresentou potencial antifúngico quando avaliado frente à espécie *Penicillium expansum*, exibindo atividade inibitória em baixas concentrações (OKULL, 2003).

Os aldeídos α,β -insaturados, tais como (*E*)-2-Octen-1-al e (*E*)-2-Nonenal, presentes em maiores proporções nas populações provenientes do Manguezal, são possíveis agentes antibacterianos, uma vez que estes causam alterações nas propriedades de permeabilidade da membrana plasmática das células bacterianas (TROMBETTA et al., 2002).

4.4. Comparação do perfil cromatográfico dos constituintes apolares de espécimens de *B. radicans*

Os extratos apolares da espécie *B. radicans*, analisados por CG-EM, não apresentaram diferenças significativas em sua constituição química, sendo que os constituintes majoritários de ambas as populações (BRC e BRM) foram os mesmos. Os extratos obtidos por extração sequencial apresentaram como constituintes majoritários ácidos graxos livres e ácidos graxos esterificados já descritos anteriormente: ácido tetradecanóico (96% de similaridade), ácido hexadecanóico (94%), hexadecanoato de etila (95%) e hexadecanoato de metila (95%) (Figuras 23 e 24).

Figura 23: Cromatogramas comparativos dos constituintes apolares de BRC e BRM, obtidos por extração sequencial; **a)** extrato hexânico, **b)** extrato diclorometânico

Nos extratos hexânicos de BRC e BRM, submetidos à extração em fase sólida, foram encontrados além das substâncias citadas anteriormente: heptadecanoato de metila (96%),

tetradecanal (96%), neofitadieno (94%), linoleato de metila (95%), 9-octadecenoato de metila (95%), octadec-12-enoato de metila (94%), ácido octadecanóico (96%), ácido tetracosanóico (95%), *trans*-fitol (96%), colesterol (93%), heptadecano (97%), 3-eicoseno (96%), heptadec-8-eno (95%), nonanal (96%), 2-decenal (95%) e olealdeído (94%).

Figura 24: Cromatogramas comparativos dos constituintes apolares de BRC e BRM, obtidos a partir do “clean up” da fração hexânica; **a)** subfração hexânica, **b)** subfração diclorometânica, **c)** subfração metanólica.

O perfil aparentemente distinto da subfração hexânica de BRC e BRM não foi confirmado quando realizada uma análise total da fração hexânica. Sendo assim, apesar de ter sido utilizada a mesma metodologia no preparo das amostras, pode-se observar que essas substâncias não eluíram da mesma forma. Os ácidos graxos hexadecanoato de metila, heptadecanoato de metila e 9-octadecenoato de metila, presentes somente na subfração hexânica de BRM, foram observados na subfração diclorometânica de BRC.

Ainda, na subfração metanólica uma quantidade maior de substâncias não pôde ser identificada através da comparação dos espectros de massas das amostras com a biblioteca do

equipamento, indicando assim que as frações menos apolares da espécie apresentaram maior potencial para serem trabalhadas.

4.5. Perfil cromatográfico dos constituintes polares de espécimens de *B. radicans*

Por meio da observação e comparação dos cromatogramas obtidos (Figuras 25 e 26), bem como dos tempos de retenção de cada amostra, foi possível inferir que não há uma variação significativa quanto à composição dos componentes polares acumulados na espécie proveniente dos diferentes ecossistemas.

Figura 25: a) Perfil cromatográfico dos constituintes polares de BRM; b) Cromatograma expandido.

Figura 26: a) Perfil cromatográfico dos constituintes polares de BRC; b) Cromatograma expandido.

4.5.1. Isolamento e identificação da substância 19

Posteriormente à realização das análises comparativas buscou-se o isolamento das substâncias majoritárias presentes no cromatograma por CLAE preparativa (especificações item 3.3.1), com o intuito de se obter dados espectroscópicos e identificar estas substâncias. Para tanto foi utilizado o extrato MeOH de BRC, uma vez que este apresentou um maior rendimento. Foram coletadas 18 subfrações descritas na Tabela 15.

Tabela 15. Subfrações coletadas de BRC e seus respectivos tempos de retenção

Subfração	Tempo de retenção	Massa (mg)
BRC-p01	5,88	1,6
BRC-p02	6,60	0,8
BRC-p03	6,94	2,4
BRC-p04	8,17	3,8
BRC-p05	16,41	1,5
BRC-p06	28,57	0,9
BRC-p07	29,66	1,2
BRC-p08	31,77	1,2
BRC-p09	33,29	2,1
BRC-p10	34,90	0,9
BRC-p11	36,24	3,0
BRC-p12	41,82	1,5
BRC-p13	48,11	0,9
BRC-p14	57,00	1,2
BRC-p15	58,90	1,4
BRC-p16	62,00	1,1
BRC-p17	64,05	1,3
BRC-p18	69,35	4,8
	Total	31,6

Este fracionamento resultou no isolamento da substância **19** (BRC-p10), identificada como 4-hidroxi-*N*-(2'-hidroxietil)-benzamida. No espectro de RMN ^1H desta substância (Figura 29) foi possível observar a presença de dois dubletos, na região de hidrogênios aromáticos (δ 7,89 e 6,83; relativos à H-2 e H-3, respectivamente) com *J* característico de acoplamento entre hidrogênios em posição *orto* (8,6 Hz); integrando para dois hidrogênios. Estes dados comprovam a presença de um anel aromático *para* substituído (Tabela 16). Além disso, observou-se a presença de dois tripletos em δ 3,20 e 3,84 (*J* = 4,9 Hz), também integrando para dois hidrogênios cada, referentes aos hidrogênios da cadeia lateral H-1' e H-2', respectivamente. Os valores destes deslocamentos químicos são condizentes com os

efeitos causados pelos grupamentos amida e álcool, descartando assim a possibilidade de serem de éster e amina (Figura 27).

Figura 27. Valores de deslocamentos químicos de RMN ¹H estimados pelo programa ChemBioDraw Ultra 11.0

No espectro de RMN ¹³C de **19** (Figura 30) observou-se a presença de três sinais na região de carbonos aromáticos correspondentes a C-2 (δ 132,9), C-3 (δ 115,9) e C-4 (δ 163,0); além de dois sinais próximos a 60 ppm, relativos à C-1' (δ 57,2) e C-2' (δ 57,9) Tabela 17. Após a análise do mapa de contornos HMBC (Figura 31) pode-se verificar a presença de outros sinais de carbono em δ 170,9 e δ 123,7. O deslocamento químico em δ 170,9 (C-5) sugere a presença de uma carbonila aromática, que sofre efeito de ressonância causado pelo substituinte hidroxila em posição *para*. A presença deste substituinte (sugerida pelo deslocamento químico do carbono ipso em δ 163,0), também é responsável pela blindagem dos carbonos em *orto* (C-3) e desblindagem dos carbonos em *meta* (C-2).

No mapa de contornos HMQC (Figura 33) foi possível observar a correlação dos hidrogênios da cadeia lateral H-1' (δ 3,20) e H-2' (δ 3,84) com os carbonos C-1' (δ 57,2) e C-2' (δ 57,9), respectivamente. Com relação ao mapa de contornos HMBC (Figuras 31 e 32, Tabela 18) observou-se a correlação entre H-1' (δ 3,20) e C-2' (δ 57,9); bem como entre H-2 (δ 7,89) e C-5 (δ 170,9).

Figura 28. Correlações observadas no mapa de contornos HMBC.

O espectro de massas (ionização por ESI), obtido em modo positivo, apresentou um pico em m/z 221,1 u.m.a. referente ao íon $[M+K+H]^+$ de **19**, condizente com a estrutura proposta. Portanto, a partir da análise dos dados espectroscópicos e espectrométricos propôs-se que a substância **19** trata da 4-hidroxi-*N*-(2'-hidroxietyl)-benzamida.

Tabela 16. Dados de RMN ^1H (δ) da substância **19**

Posição	^1H (δ); mult; $J(\text{Hz})$
2	7,89; d; 8,6
3	6,83; d; 8,6
1'	3,20; t; 4,9
2'	3,84; t; 4,9

Tabela 17. Dados de RMN ^{13}C (δ) da substância **19**

Posição	^{13}C (δ)
1	123,7*
2	132,9
3	115,9
4	163,0
5	170,9*
1'	57,2
2'	57,9

*Dados obtidos a partir do mapa de contorno HMBC

Tabela 18. Correlações entre hidrogênios e carbonos obtidos através do mapa de contorno HMQC e HMBC da substância **19** (500 MHz, CD₃OD)

¹ H (δ)	¹³ C (δ)	¹³ C (δ)
	HMQC	HMBC
H2 - 7,89	132,9	C-2 (132,9); C-4 (163,0); C-5 (170,9)
H3 - 6,83	115,9	C-1 (123,7); C-3 (115,9); C-4 (163,0)
H1' - 3,20	57,2	C-2' (57,9)
H2' - 3,84	57,9	C-1' (57,2)

Figura 29. Espectro de RMN de ¹H da substância **19**, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **19**, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 31. Mapa de contornos HMBC da substância **19**, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 32. Expansões do mapa de contornos HMBC da substância **19**, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 33. Mapa de contornos HMQC da substância **19**, 500 MHz, CD₃OD.

Deve ser mencionado que até o presente momento, esta substância foi descrita na literatura apenas como intermediário sintético, não sendo possível comparar os dados espectroscópicos obtidos com os dados da literatura devido à ausência dos mesmos. Consequentemente, podemos inferir que esta substância está sendo descrita pela primeira vez como um produto natural.

5.6. Atividade Biológica

Atividade Antitumoral

Os extratos avaliados quanto à atividade antitumoral foram: BRC, BRC-H, BRM e BRM-H. As amostras foram diluídas na concentração de 20mg/mL e testadas em concentração única de 100 µg/mL nas seguintes linhagens HCT-8 (cólon); HL-60 (leucemia) e SF-295 (Sistema Nervoso Central) utilizando-se o método: MTT. O efeito dos extratos sobre a proliferação de células tumorais das linhagens HL-60, HCT-8 e SF-295 encontra-se na Tabela 19. Os dados são apresentados como a média de inibição da proliferação (%GI) $\pm$ o desvio-padrão. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Tabela 19. Potencial de inibição da proliferação de células tumorais das linhagens HL-60, HCT-8 e SF-295 dos extratos da espécie *B. radicans*

	HL-60		SF-295		HCT-8	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
BRM	15,23	0,71	0	-	32,74	0,46
BRC	0	-	0	-	14,6	0,28
BRM – H	20,79	3,70	0	-	8,98	0,88
BRC – H	104,5	0,15	0	-	36,14	4,97
DOX	104,54	0,22	102,34	0,14	95,60	0,28

Coleta manguezal: **BRM** (extrato Dcm:MeOH (2:1)) e **BRM-H** (BRM particionado com hexano)

Coleta costões: **BRC** (extrato Dcm:MeOH (2:1)) e **BRC-H** (BRC particionado com hexano)

DOX: doxicilina (controle positivo)

Neste experimento são selecionadas as frações com percentual de inibição do crescimento tumoral maior que 90% em todas as linhagens utilizadas (GI%>90%). Estas amostras são reavaliadas para determinação da IC₅₀ (concentração mínima que causa 50% de inibição). Ainda que nenhuma amostra tenha inibido as três linhagens, o extrato BRC-H será avaliado novamente para determinação da IC₅₀.

Através destes resultados pode-se observar que os extratos provenientes dos diferentes ecossistemas apresentam também potencial antitumoral distinto.

Atividade citotóxica

O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* foi realizado apenas com os extratos Dcm:MeOH, 2:1 de BRC e BRM, uma vez que foram necessários 50 mg de cada extrato para a realização deste. Os resultados, expressos em números de sobreviventes estão descritos nas Tabelas 20-23.

Tabela 20: Número de sobreviventes de espécimes de *Artemia salina* após experimentos utilizando diferentes concentrações do extrato BRC.

Concentração (µg/mL)	Sobreviventes 1	Sobreviventes 2	Sobreviventes 3	Média Aritmética
10	10	10	10	10
50	10	10	10	10
100	9	10	10	9,67
500	9	10	9	9,33
1000	5	8	4	5,57

Tabela 21: Número de sobreviventes de espécimes de *Artemia salina* após experimentos utilizando diferentes concentrações do extrato BRM.

Concentração (µg/mL)	Sobreviventes 1	Sobreviventes 2	Sobreviventes 3	Média Aritmética
10	10	10	10	10
50	10	10	10	10
100	10	10	10	10
500	10	10	9	9,67
1000	9	9	10	9,33

Tabela 22: Número de sobreviventes de *Artemia salina* encontrados no controle negativo.

Concentração de DMSO (%)	Sobreviventes 1	Sobreviventes 2	Sobreviventes 3	Média Aritmética
0,03	10	10	10	10
0,15	10	10	10	10
0,3	10	10	10	10
1,5	10	10	10	10
3	10	9	10	9,67

Tabela 23: Número de sobreviventes de *Artemia salina* encontrados no controle positivo (dicromato de potássio).

Concentração (µg/mL)	Sobreviventes 1	Sobreviventes 2	Sobreviventes 3	Média Aritmética
9	0	0	0	0
45	0	0	0	0
90	0	0	0	0

Baseado nos dados apresentados acima foi concluído que nenhuma das populações apresentou potencial expressivo para esta avaliação de atividade biológica. Ainda, pode ser observado que na concentração máxima permitida de DMSO não houve uma solubilização completa dos extratos, o que pode ter levado a um resultado negativo para este experimento.

Atividade tripanocida e Leishmanicida

As atividades tripanocida e leishmanicida da espécie *B. radicans* coletada no manguezal, foram avaliadas frente às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. O potencial dos extratos está representado na Tabela 24 através dos valores de IC₅₀.

Tabela 24. Potencial tripanocida e leishmanicida expresso por meio de IC₅₀ de extratos da alga marinha BRM.

Extrato	Tripanocida ^a IC ₅₀ (µg/mL)	Leishmanicida ^b IC ₅₀ (µg/mL)
Diclorometânico	8,7	0,6
Hexânico	60,7	7,9
Metanólico	12,0	568,3

Controle Positivo: ^avioleta genciana (IC₅₀ = 31 µg/mL); ^banfotericina B (IC₅₀ = 304 µg/mL)

Os resultados obtidos foram bastante significativos, uma vez que foram avaliados apenas extratos. Os extratos metanólico e diclorometânico apresentaram valores de IC₅₀ superiores ao controle positivo, ou seja, maior atividade no que se refere à atividade

tripanocida. Por outro lado, os extratos hexânico e diclorometânico apresentaram valores de IC_{50} superiores ao controle positivo utilizado no ensaio leishmanicida.

Desta forma, a partir destes resultados, foram realizados experimentos visando obter dados comparativos com relação a alga proveniente dos dois ambientes, manguezal e costão. Os resultados apresentados quanto à atividade tripanocida mostram nitidamente a influência ambiental do ecossistema no metabolismo da alga, uma vez que foi observado um potencial expressivo para a espécie proveniente do manguezal, principalmente para o extrato Dcm:MeOH (2:1) e fração hexânica, Tabela 25. Entretanto, com relação à espécie coletada nos costões (fração diclorometânica), foi constatada uma atividade seis vezes superior aquela exibida pelo próprio controle positivo.

Tabela 25: Potencial tripanocida expresso por meio de IC_{50} de extratos de algas marinhas da espécie *B. radicans*.

Amostra	BRC IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	BRM IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato Dcm:MeOH (2:1)	140,0	12,71
Fração Hexânica	36,63	9,73
Fração Diclorometânica	5,75	31,72
Controle Positivo: violeta genciana ($IC_{50} = 31 \mu\text{g/mL}$)		

Portanto, devido ao potencial biológico demonstrado por esta espécie, independente do ecossistema onde vive, justifica-se a continuidade de experimentos futuros empregando *B. radicans*.

Atividade antifúngica

O potencial antifúngico da espécie *B. radicans* coletada no manguezal foi avaliado por meio de bioautografia, utilizando os extratos hexânico, diclorometânico e metanólico (Tabela 26) frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Tabela 26. Potencial antifúngico dos extratos da espécie *B. radicans*

Extrato	<i>C. cladosporioides</i>		<i>C. sphaerospermum</i>	
	Rf	Potencial	Rf	Potencial
Metanólico	-	0	-	0
Hexânico	origem a 0,77	3	origem a 0,71	3
Diclorometânico	0,57 a 0,91	3	0,60 a 0,91	3

Atividade: 0=inativo 1= fraco 2= moderado 3= forte

Os extratos hexânico e diclorometânico apresentaram atividade forte frente às linhagens de fungos analisadas, representada pelo halo de inibição da Figura 34. O halo contínuo indica a presença não de apenas uma substância ativa, mas sim o potencial antifúngico de diversas substâncias contidas nestes extratos, principalmente no extrato hexânico.

C. cladosporioides **Hex****Dcm***C. sphaerospermum* **Hex****Dcm****Figura 34.** Halos de inibição apresentados pelos extratos diclorometânico (Dcm) e hexânico (Hex).

5. CONCLUSÕES

O estudo químico da espécie *B. radicans* conduziu ao isolamento do colesterol, além de outras substâncias isoladas em mistura, tais como: hidrocarboneto heptadecano e o precursor biossintético esqualeno, os ácidos tetradecanóico e hexadecanóico, os ésteres tetradecanoato e hexadecanoato de metila, os diterpenos *trans*-fitol e neofitadieno; além dos fenóis 4-metoximetilfenol, 4-hidroxibenzaldeído, 4-hidroxibenzenoacetato de metila, 4-hidroximandelato de metila, 4-diidroxibenzenopropanoato de metila, hidroquinona, 4-hidroxibenzoato de metila, ácido 4-hidroxibenzenoacético e 4-formilcarbonilfenol. A substância 4-hidroxi-*N*-(2'-hidroxietil)-benzamida também foi isolada nesta espécie, sendo que, até o presente momento, tem sido relatada na literatura apenas como produto de síntese, sendo então apresentada pela primeira vez como produto natural.

O estabelecimento do perfil químico dos constituintes voláteis, obtidos por microextração em fase sólida, realizado via CG-EM permitiu a identificação de aproximadamente setenta substâncias em espécies do gênero *Bostrychia*. Este estudo também demonstrou que a produção de metabólitos pode ser influenciada por variações ambientais, no caso da espécie *B. radicans*. Em contrapartida, as análises comparativas dos constituintes apolares (CG-EM) e polares (CLAE) dos extratos obtidos de espécimes provenientes de costões rochosos e manguezal, não revelaram diferenças significativas quanto à composição química destes constituintes na espécie em estudo.

Ainda, por meio da avaliação das atividades biológicas de extratos e frações da alga marinha *B. radicans* foi possível observar que esta espécie possui substâncias com potencial antitumoral, tripanocida e antifúngico; embora existam variações nas atividades observadas de acordo com o ecossistema em que habitam. A fração hexânica do extrato Dcm:MeOH (2:1) de *B. radicans* apresentou potencial de inibição de células tumorais da linhagem HL-60

(leucemia, $104,5 \pm 0,15$ %) semelhante ao do controle positivo, a doxicilina ($104,54 \pm 0,22$ %). As frações apolares provenientes das algas coletadas no manguezal apresentaram forte atividade de inibição do crescimento dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Os extratos obtidos das algas provenientes dos diferentes ecossistemas exibiram uma potente atividade tripanocida e leishmanicida, com valores superiores aqueles demonstrados pelos próprios controles positivos (*Trypanosoma cruzi*: violeta genciana $IC_{50} = 31$ $\mu\text{g/mL}$, BRC fração diclorometânica $IC_{50} = 5,7$ $\mu\text{g/mL}$ e *Leishmania amazonensis*: anfotericina B ($IC_{50} = 304$ $\mu\text{g/mL}$), BRM – fração diclorometânica $IC_{50} = 0,6$ $\mu\text{g/mL}$ e BRM – fração hexânica $IC_{50} = 7,9$ $\mu\text{g/mL}$). Portanto, esta espécie configura-se em uma matriz promissora na busca por novas drogas tripanocidas, leishmancidas e antitumorais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, USA, 1995.

ANSORENA, D.; GIMENO, O.; ASTIASARAAN, I.; BELLO, J. Analysis of volatile compounds by GC-MS of a dry fermented sausage: chorizo de Pamplona. **Food Research International**, v.34, p.67-75, 2001.

ANTUNES, B. L.; FLEURY, B.G; FUJII, M. T.; TEIXEIRA, V. L. Sesquiterpenes of the Brazilian marine red alga *Laurencia filiformis* (Rhodophyta, Ceramiales). **Natural Product Communications**, v.3, p.1653-1654, 2008.

AYDOGMUS, Z.; IMRE, S.; ERSOY, L.; WRAY, V. Halogenated secondary metabolites from *Laurencia obtusa*. **Natural Product Research**, v.18, p. 43-47, 2004.

BEAULIEU, J. C.; LEA, J. M. Characterization and Semiquantitative Analysis of Volatiles in Seedless Watermelon Varieties Using Solid-Phase Microextraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.7789-7793, 2006.

BERGMANN, W.; BURKE, D. C. Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothyidine and spongouridine. **Journal of Organic Chemistry**, v.20, p.1501-1507, 1955.

BERLINCK, R. G. S.; HAJDU, E.; ROCHA, R. M.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; HERNANDEZ, I. L. C.; SELEGHIM, M. H. R.; GRANATO, A. C.; ALMEIDA, E. V. R.; NUNEZ, C. V.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; THIEMANN, O.; SILVA, O. M.; SOUZA, A. O.; SILVA, C. L. ; MINARINI, P. R. R. Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, v.67, p.510-522, 2004.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W-P.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 24, p. 31-86, 2007.

BOUAICHA, N. ; AMADE, P. ; PUEL, D. Zarzissine, a new citotoxic guanidine alkaloid from the mediterranean sponge *Anchinoe paupertas*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n.10, p. 1455-1457, 1994.

BRUNEL, J. M., LONCLE, C., VIDAL, N., DHERBOMEZ, M., LETOURNEUX, Y. **Steroids**, v.70, p.907-912, 2005.

CARVALHO, L. R., ROQUE, N. F. Fenóis Halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 757-64, 2000.

CARVALHO, L. R., FUJII, M. T.; ROQUE, N. F.; LAGO, J. H. G. Aldingenin derivatives from the red alga *Laurencia aldingensis*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 757-764, 2006.

CASSANO, V.; DE-PAULA, J.C.; FUJII, M. T.; DA GAMA, B. A. P.; TEIXEIRA, V. L. Sesquiterpenes from the introduced red seaweed *Laurencia caduciramulosa* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Biochemical, Systematics and Ecology**, v.36, p. 223-226, 2008.

CHALCHAT, J. C.; OZCAN, M. M.; DAGDELEN, A.; AKGUL, A. Variability of essential oil composition of *Echinophora tenuifolia* subsp. *sibthorpiana* tutin by Harvest location and year and oil storage. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, p. 225-227, 2007.

COLLADO-VIDES, L.; GÓMEZ-ALCARAZ, G.; RIVAS-LECHUGA, G.; GÓMEZ-GUTIERREZ, V. Simulation of the clonal growth of *Bostrychia radicans* (Ceramiales-Rhodophyta) using Lindenmayer systems. **BioSystems**, v.42, p.19-27, 1997.

CONFORTI, F.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F. Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. **Food Chemistry**, v.102, p.1096-104, 2007.

DAMASCENO, F. C; NICOLLI, K. P.; SOARES, G. L. G.; ZINI, C. A. Analysis of Volatile Compounds of Leaves and Galls of *Schinus polygamus* and *Baccharis spicata* by Headspace Solid-Phase Microextraction. **Analytical Letters**. v.41, p.1658-1673, 2008.

DAYANANDA, C.; SARADA, R.; KUMAR, V.; RAVISHANKAR, G. A. Isolation and characterization of hydrocarbon producing green alga *Botryococcus braunii* from Indian freshwater bodies. **Electronic Journal of Biotechnology**, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso – Chile, v. 10, p. 78-91, 2007.

DAVYT, D.; FERNANDEZ, F.; SUESCUN, S.; MOMBRÚ, A. V.; SALDAÑA, J.; DOMÍNGUEZ, L.; FUJII, M. T.; MANTA, E. Bisabolanos from the Red Alga *Laurencia scorparia*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p.1113-1116, 2006.

DORTA, E.; DIAZ-MARRERO, A. R.; CUETO, M.; D'CROZ, L.; MATE, J. L.; DARIAS, J. Chamigrenelactone, a polyoxygenated sesquiterpene with a novel structural type and devoid of halogen from *Laurencia obtusa*. **Tetrahedron Letters**, v.45, p.7065-7068, 2004.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; TULIO, S.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro. **Phytomedicine**, v. 8, p. 53-58, 2001.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; CARDOSO, M. A.; TULIO, S.; CEREZO, A. S. The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1137-44, 2002.

EL GAMAL, A. A.; WANG, W. W.; DUH, C. H. Sulfur-containing polybromindoles from the formosan red alga *Laurencia brongniartii*. **Journal of Natural Products**. v.68, p. 815-817, 2004.

EL HATTAB, M.; CULIOLI, G.; PIOVETTI, L.; CHITOUR, S. E.; VALLS, R. Comparison of various extraction methods for identification and determination of volatile metabolites from the brown alga *Dictyopteris membranacea*. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, p. 1-7, 2007.

ESPÍNDOLA, R. M.; MAZZANTINI, R. P.; ONG, T. P.; CONTI, A.; HEIDOR, R. E MORENO, F. S. Geranylgeraniol and beta-ionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cell proliferation, total plasma cholesterol and DNA damage during the initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF-kappaB activation. **Carcinogenesis**, v.26, p.1091-1099, 2005.

FELÍCIO, R.; DEBONSI, H. M.; YOKOYA, N. S. 4-(Hidroximetil)-benzenossulfato de potássio: metabólito inédito isolado da alga marinha *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Química Nova**, v.31, p.837-839, 2008.

FERNANDEZ, J. J.; SOUTO, M. L.; GIL, L. V.; E NORTE, M. Isolation of naturally occurring dactylomelane metabolites as *Laurencia* constituents. **Tetrahedron**, v.61, p.8910-8915, 2005.

GLISIC, S. B.; MISIC, D. R.; STAMENIC, M. D.; ZIZOVIC, I. T.; ASANIN, R. M.; SKALA, D. U. Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil. Chemical composition and antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 105, p. 346-56, 2007.

GOMEZ, E.; LEDBETTER, C. A.; HARSTELL, P. L. Volatile Compounds in Apricot, Plum, and Their Interspecific Hybrids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.41, p.1669-1676, 1993.

GRAEL, C. F. F.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J. L. C. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. **Fitoterapia**, v.76, p.73-82, 2005.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, v.45, p.160-168, 2006.

HATTAB, M. E.; CULIOLI, G.; PIOVETTI, L.; CHITOUR, S. E.; VALLS, R. Comparison of various extraction methods for identification and determination of volatile metabolites from the brown alga *Dictyopteris membranacea*. **Journal of Chromatography A**, v.1143, p.1-7, 2007.

HAYASHI, J.; SEKINE, T.; DEGUCHI, S.; LIN, Q.; HORIE, S.; TSUCHIYA, S.; YANO, S.; WATANABE, K.; IKEGAMI, F. Phenolic compounds from *Gastrodia* rhizome and relaxant effects of related compounds on isolated smooth muscle preparation. **Phytochemistry**, v.59, p.513-519, 2002.

HILL, R. A. Marine natural products. **Annul Reports on the Progress of Chemistry, Section B**, v. 102, p. 123-37, 2006.

HILL, R. A. Marine natural products. **Annul Reports on the Progress of Chemistry, Section B**, v.103, p.125-139, 2007.

HOMANS, A. L.; FUCKS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v.51, p. 327-9, 1970.

HOWARD, D.H. **Fungi pathogenic for humans and animals**. New York: Marcel Dekker, USA, 1983.

ISHIMARU, C., YONEZAWA, Y., KURIYAMA, I., NISHIDA, M., YOSHIDA, H., MIZUSHINA, Y. **Lipids**, v.43, p.373-382, 2008.

JARUNRATTANASRI, A.; THEERAKULKAIT, C. E CADWALLADER, K. R. Aroma components of acid-hydrolyzed vegetable protein made by partial hydrolysis of rice bran protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p.3044-3050, 2007.

JAYASEKARA, T. K. ; STEVENSON, P. C.; BELMAIN, S. R.; FARMAN, D. I.; HALL, D. R. Identification of methyl salicylate as the principal volatile component in the methanol extract of root bark of *Securidaca longepedunculata* Fers. **Journal of Mass Spectroscopy**, v. 37, p.577-580, 2002.

Jl, N-Y.; LI, X-M.; DING, L-P.; WANG, B-G. Aristolane sesquiterpenes and highly brominated indoles from the marine red alga *Laurencia similes* (Rhodomelaceae). **Helvetica Chimica Acta**. v. 90, p. 385-91, 2007.

Jl, N-Y.; LI, X-M.; DING, L-P.; WANG, B-G. Laurendecumallenes A–B and Laurendecumenynes A–B, Halogenated Nonterpenoid C15-Acetogenins from the Marine Red Alga *Laurencia decumbens*. **Journal of Natural Products**. v.70, p. 1499-1502, 2007.

Jl, N-Y.; LI, X-M.; LI, K.; GLOER, J. B.; WANG, B-G. Halogenated sesquiterpenes and non-halogenated linear C15-acetogenins from the marine red alga *Laurencia composita* and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.36, p.938-941, 2008a.

Jl, N-Y.; LI, X-M.; LI, K.; WANG, B-G. Halogenated terpenes and a C15-acetogenin from the marine red alga *Laurencia saitoi*. **Molecules**, v.13, p.2894-2899, 2008b.

Jl, N-Y.; LI, X-.; XIE, H.; DING, J.; LI, K.; DING, L-P.; WANG, B-G. Highly oxygenated triterpenoids from the marine red alga *Laurencia mariannensis* (Rhodomelaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v.91, p.1940-1946, 2008c.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Editora Nacional, 11^a Edição, 1993, 777p.

KAMENARSKA, Z.; IVANOVA, A.; STANCHEVA, R.; STOYNEVA, M.; STEFANOV, K.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.; POPOV, S. Volatile compounds from some Black Sea red algae and their chemotaxonomic application. **Botanica Marina**, v. 49, p. 47-56, 2006.

KARSTEN, U.; BOCK, C.; WEST, J. A. Low molecular weight carbohydrate patterns in geographically different isolates of the eulittoral red alga *Bostrychia tenuissima* from Australia. **Botanica Acta**, v. 108, p. 321-6, 1995.

KARSTEN, U.; GORS, S.; EGGERT, A.; WEST, J. A. Trehalose, digeneaside, and floridoside in the Florideophyceae (Rhodophyta) – a reevaluation of its chemotaxonomic value. **Phycologia**, v.46, p.143-50, 2007.

KHOTIMCHENKO, S. V. & GUSAROVA, I. S. Red Algae of Peter the Great Bay as a Source of Arachidonic and Eicosapentaenoic Acids. **Russian Journal of Marine Biology**, v.30, p.183-187, 2004.

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

KLADI, M.; VAGIAS, C.; FURNARI, G.; MOREAU, D.; ROUSSAKIS, C. ; ROUSSIS, V. Cytotoxic cuparene sesquiterpenes from *Laurencia microcladia*. **Tetrahedron Letters**, v.46, p.5723-5726, 2005.

KLADI, M.; VAGIAS, C.; PAPAFAFIRI, P. ; FURNARI, G.; SERIO, D. ; ROUSSIS, V. New sesquiterpenes from the red algae *Laurencia microcladia*. **Tetrahedron Letters**, v.63, p.7606-7611, 2007.

KLADI, M.; VAGIAS, C.; PAPAFAFIRI, P. ; SIMONI, B.; ANDREA, T. ; ROUSSIS, V. Tetrahydrofuran acetogenins from *Laurencia glandulifera*. **Journal of Natural Products**, v.X, 2009.

KLADI, M.; VAGIAS, C.; PAPAFAFIRI, P. ; FURNARI, G.; SERIO, D. ; ROUSSIS, V. KREMER, B. P. Distribution of Alditols in the Genus *Bostrychia*. **Biochemical, Systematics and Ecology**, v.4, p.139-141, 1976.

KUBOTA, T.; TAKAHASHI, A.; TSUDA, M. E KOBAYASHI, J. Luteophanol D, New Polyhydroxyl Metabolite from Marine Dinoflagellate *Amphidinium* sp. **Marine Drugs**, v.3,113-118, 2005.

KUNIYOSHI, M.; WAHOME, T. M.; HASHIMOTO, T.; YOKOYAMA, M.; SHRESTHA, K. L.; HIGA, T. Terpenoids from *Laurencia luzonensis*. **Journal of Natural Products**, v.68, p.1314-1317, 2005.

LI, K.; LI, X-M.; JI, N-Y.; GLOER, J. B.; WANG, B-G. Urceolatin, a structurally unique bromophenol from *Polysiphonia urceolata*. **Organic Letters**, v.10, p.1429-1432, 2008.

LI, K.; LI, X-M.; JI, N-Y.; GLOER, J. B.; WANG, B-G. Bromophenols from the marine red alga *Polysiphonia urceolata* with DPPH radical scavenging activity. **Journal of Natural Products**, v.71, p.28-30, 2008.

LYAKHOVA, E. G.; KALINOVSKY, A. I.; KOLESNIKOVA, S. A.; BASKOVSKY, V. E.; STONIK, V. A. Halogenated diterpenoids from the red alga *Laurencia nipponica*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2527-32, 2004.

MA, M.; ZHAO, J.; WANG, S.; LI, S.; YANG, S.; SHI, J.; FAN, X.; HE, L. Bromophenols coupled with nucleoside bases and brominated tetrahydroisoquinolines from the red alga *Rhodomela confervoides*. **Journal of Natural Products**, v.70, p.337-341, 2007.

MAKHANU, D. S.; YOKOYAMA, M.; MIONO, T.; MAESATO, T.; MAEDOMARI, M.; WISESPONGPAND, P.; KUNIYOSHI, N. New sesquiterpenes from the Okinawan red alga *Laurencia luzonensis*. **Bulletin of the College of Science, University of the Ryukyus**. No.81 2006.

MAO, S-C.; GUO, Y-W. A laurane sesquiterpene and rearranged derivatives from the Chinese red alga *Laurencia okamurai* Yamada. **Journal of Natural Products**, v.69, p.1209-11, 2006.

MAO, S.; LEE, S.; HWANGBO, H.; KIM, Y.; PARK, K.; CHA, G.; PARK, R.; KIM, K. Isolation and Characterization of Antifungal Substances from *Burkholderia* sp. Culture Broth. **Current Microbiology**, v.53, p.358-364, 2006.

MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v.68, p.2015-2022, 2007.

MCCLINTOCK, J. B.; BAKER, B. J. **Marine Chemical Ecology**. CRC Press, USA, 2001.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIYAZAWA, M. & KAWATA, J. Identification of the key aroma compounds in dried roots of *Isatis tinctoria*. **Journal of Essential Oil Research**, v.18, p.508-510, 2006.

MOHAMMED, K. A.; HOSSAIN, C. F.; ZHANG, L.; BRUICK, R. K.; ZHOU, Y. D.; NAGLE, D. G. Laurenditerpenol, a New Diterpene from the Tropical Marine Alga *Laurencia intricata* that Potently Inhibits HIF-1 Mediated Hypoxic Signaling in Breast Tumor Cells. **Journal of Natural Products**, v.67, p.2002-2007, 2004.

MU, R.; WANG, X.; LIU, S.; YUAN, X.; WANG, S. E FAN, Z. Rapid determination of volatile compounds in *Toona sinensis* (A. Juss.) Roem by MAE-HS-SPME followed by GC-MS. **Chromatographia**, v.65, p.463-467, 2007.

NECHEV., J.; CHRISTIE, W.W.; ROBAINA, R.; DIEGO, F.; POPOV, S.; STEFANOV, K. Chemical composition of the sponge *Hymeniacidon sanguinea* from the Canarian Islands. **Comparative Biochemical Physiology**, v.137, p.365-374, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Marine Natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **Journal of Natural Products**, v.67, p.1216-1238, 2004.

NEWMAN, D. J. E CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products Reviews**. Published on Web, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Report**, v.17, p.215-234, 2000.

NOSEDA, M.D.; TÚLIO, S.; DUARTE, M.E.R. Polysaccharides from the red seaweed *Bostrychia montagnei*: chemical characterization. **Journal of Applied Phycology**, v.11, p.35-40, 1999.

OKULL, D. O.; BEELMAN, R. B.; GOURAMA, H. Antifungal activity of 10-Oxo-*trans*-8-decenoic acid and 1-Octen-3-ol against *Penicillium expansum* in potato dextrose agar medium. **Journal of Food Protection**, v.66, p.1503-1505, 2003.

PALERMO, J.A. Produtos naturais de origem marinha. In: **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org) Editoras UFRGS/ UFSC, 2003, 821.

PALLAGI, I.; TOR, A.; HORVTH, G.; Mechanism of the Gibbs Reaction. Part 4.1 Indophenol Formation via *N*-Chlorobenzoquinone Imine Radical Anions. The Aza-SRN2 Chain Reaction Mechanism. Chain Initiation with 1,4-Benzoquinones and Cyanide Ion. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 64, p. 6530-6540, 1999.

PAOLINI, J.; NASCICA, E.; DESJOBERT, J.; MUSELLI, A.; BERBADINI, A.; COSTA, J. Analysis of volatile constituents isolated by hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction from *Adenostyles briquetii* Gamisans. **Phytochemical Analysis**, v.19, p.266-276, 2008.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy**, Thomson Learning, USA, 2001.

PAWLISZYN, J.; ARTHUR, C. L. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p.2145-2148, 1990.

PEREIRA, R.C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2002, 382p.

PINO, J. A.; MESA, J.; MUNOZ, Y.; MARTIA, M. P. E MARBOT, R. Volatile Components from Mango (*Mangifera indica* L.) Cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.2213-2223, 2005.

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

RAMONI, R.; VINCENT, F.; GROLLI, S.; CONTI, V.; MALOSSEI, C.; BOYERI, F.; MEILLOURI, P. N.; SPINELLI, S.; CAMBILLAU, C. E TEGONI, M. The insect attractant 1-Octen-3-ol is the natural ligand of bovine odorant-binding protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.7150-7155, 2001.

Reviers, B. de. **Biologia e Filogenia das Algas**, ARTMED: Porto Alegre, 2006.

De ROSA, S.; KAMENARSKA, Z.; BANKOVA, V.; STEFANOV, K.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.; NAJDENSKI, H.; TZVETKOVA, I.; POPOV, S. Chemical composition and biological activities of the Black Sea Algae *Polysiphonia denudata* (Dillw.) Kutz and *Polysiphonia denudata* f. *fragilis* (Sperk) Woronich. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.56, p.1008-1014, 2003.

De ROSA, S.; KAMENARSKA, Z.; STEFANOV, K.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.; NAJDENSKI, H.; TZVETKOVA, I.; NINOVA, V.; POPOV, S. Chemical composition of *Corallina mediterranea* Areschoug and *Corallina granifera*. Ell. Et. Soland. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.58, p.325-323, 2003.

ROSSI, M.; MATTOS, I. F. A. Solos de mangue do estado de São Paulo: caracterização química e física. **Revista do Departamento de Geografia, USP** v.15, p.101-113, 2002.

SAWAN, S. P., JAMES, T. L., GRUENKE, L. D., CRAIG, J. C. Proton NMR assignments for cholesterol. Use of deuterium NMR as an assignment aid. **Journal of Magnetic Resonance**, v.35, p.409-413, 1979.

SCHMITT, B.; SCHNEIDER, B. Dihydrocinnamic acids are involved in the biosynthesis of phenylphenalenones in *Anigozanthos preissii*. **Phytochemistry**, v.52, p.45-53, 1999.

SILVA, V. C.; CARVALHO, M. G.; ALVES, A. N. Chemical constituents from leaves of *Palicourea coriacea* (Rubiaceae). **Natural Medicine Note**, v. 62, p. 356-357.

SRIDEVI, K. V.; VENKATESHAM, U.; REDDY, A. V.; VENKATESWARLU, Y. Chemical constituents of the red alga *Nitophyllum marginata*. **Biochemical, Systematics and Ecology**, v. 31, p.335-337, 2003.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. **Journal of Biochemical and Biophysical methods**, v.70, p.235-242, 2007.

SVENSSON, B. M.; MATHIASSEN, L.; MARTENSSON, L.; BERGSTROM, S. *Artemia salina* as a test organism for assessment of acute toxicity of leachate water from landfills. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.102, p.309-321, 2005.

SUN, J.; SHI D.; MA, M.; LI, S.; WANG, S.; HAN, L.; YANG, Y.; FAN, X.; SHI, J.; HE, L. Sesquiterpenes from the red algae *Laurencia tristicha*. **Journal of Natural Products**, v.68, 915-919, 2005.

SUZUKI, M.; TAKAHASHI, Y.; MITOME, Y.; ITOH, T.; ABE, T.; MASUDA, M. Brominated metabolites from an Okinawan *Laurencia intricata*. **Phytochemistry**, v.60, p.861-7, 2002.

TROMBETTA, D.; SAIJA, A.; BISIGNANO, G.; ARENA, S.; CARUSO, S.; MAZZANTI, G.; UCCELLA, N.; CASTELLI, F. Study on the mechanisms of the antibacterial action of some plant α,β -unsaturated aldehydes. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, p.285-290, 2002.

TÜNEY, I.; ÇADIRCI, B. H.; ÜNAL, D.; SUKATAR, A. Antimicrobial Activities of the Extracts of Marine Algae from the Coast of Urla (Izmir, Turkey). **Turk Journal of Biology**, v.30, 171-175, 2006.

TZACOU, O.; SAID, A.; FARAG, A.; RASHED, K. Volatile constituents of *Ailanthus excelsa* Roxb. **Flavour Fragrance Journal**. v. 21, p. 899-901, 2006.

VAIRAPPAN, C. S.; KAWAMOTO, T.; MIWA, H. SUZUKI, M.; Potent antibacterial activity of halogenated compounds against antibiotic-resistant bacteria. **Planta Medica**, v.70, p.1087-1090, 2004.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química nova**, v.23, p.523-530, 2000.

VARLET, V.; SEROT, T.; CARDINAL, M.; KNOCKAERT, C. E PROST, C. Olfactometric determination of the most potent odor-active compounds in salmon muscle (*Salmo salar*) smoked by using four smoke generation techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.4518-4525, 2008.

VIDOTTI, E. C. & ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química nova**, v.27, p.139-145, 2004.

WU, S.; ZORN, H.; KRINGS, U. E BERGER, R. G. Characteristic volatiles from young and aged fruiting bodies of wild *Polyporus sulfureus* (Bull.:Fr.) Fr. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, 4524-4528, 2005.

ZHAO J.; FAN, X.; WANG, S.; LI, S.; SHANG, S.; YANG, Y.; XU, N.; LÜ, Y.; SHI, J. Bromophenol derivates from the red alga *Rhodomela confervoides*. **Journal of Natural Products**, v.67, p.1032-35, 2004.

ZUCARELLO, G. C.; WEST, J. A. Multiple cryptic species: molecular diversity and reproductive isolation in the *Bostrychia radicans*/*Bostrychia moritziana* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) with focus on north american isolates. **Journal of Phycology**, v.39, p.948-959, 2003.