UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Produtos naturais marinhos: identificação de metabólitos fenólicos
halogenados na macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae,
Rhodophyta) e potencial biológico de micro-organismos
endofíticos associados**

Rafael de Felício

**Ribeirão Preto
2010**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Produtos naturais marinhos: identificação de metabólitos fenólicos
halogenados na macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae,
Rhodophyta) e potencial biológico de micro-organismos
endofíticos associados**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas para a obtenção do Título
de Mestre em Ciências

Área de concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientado: Rafael de Felício

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Hosana Maria
Deboni

**Ribeirão Preto
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA

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 Felício, Rafael

Produtos naturais marinhos: identificação de metabólitos fenólicos halogenados na macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) e potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados

207 p.: 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Debonisi, Hosana Maria

1. Produtos naturais halogenados. 2. Algas vermelhas marinhas. 3. Atividade biológica. 4. Micro-organismos endofíticos. 5. CG-EM 6. *Bostrychia tenella*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Rafael de Felício

Título: Produtos naturais marinhos: identificação de metabólitos fenólicos halogenados na macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) e potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas para a obtenção do Título
de Mestre em Ciências

Área de concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Hosana Maria
Deboni

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos meus queridos e amados pais,
Waldir e Vera,
que souberam priorizar o amor acima de tudo, sem o qual eu não suportaria realizar
este mestrado;*

*...e a todos os meus
“anjos”,
“os” e “as” quais não preciso dar nomes, mas que foram minhas pernas, mãos, razão
e coração, verdadeiros pilares para minha sustentação, ao longo dos meses que
transcorreram durante esta caminhada.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me proporcionou saúde, inteligência, força e paciência; me mostrando que também sou Seu filho e que posso contar com Sua ajuda quando a fé e a esperança se esvaírem do meu coração;

Aos meus pais, Waldir e Vera, irmãos e demais familiares pelo apoio, compreensão, incentivo, especialmente à minha amada sobrinha Camila, à minha querida prima Mari, ao Tio Nero e Patrícia, à Vânia e todos que torceram pelo sucesso do meu trabalho;

À Hosana, pela orientação, pelos ensinamentos profissionais e pessoais, pelo entusiasmo, aconselhamento, amizade, compreensão, paciência, dedicação, pelos chacolhões necessários e, principalmente, pela confiança depositada;

Às minhas queridas amigas e colegas de laboratório Ana Lígia, Denise, Cíntia, Débora e Fernanda que se transformaram em companheiras de desabafos e de partilha de bons e más momentos, cujas amizades levarei pelo resto da vida; aos demais colegas de laboratório, pelas reflexões científicas, ajuda e colaboração;

Às minhas essenciais amigas e parceiras de graduação Marcela, Thalita e Mariana, pela amizade incontestável, fidelidade, apoio e confiança;

À Dr^a. Nair Sumie Yokoya, pela colaboração, identificação taxonômica das algas e pelos auxílios nas coletas;

À Prof^a. Dr^a. Letícia Veras Costa-Lotufo e ao doutorando e amigo Elthon Góis Ferreira, pela colaboração nos ensaios de citotoxicidade;

À Prof^a. Dr^a. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal, à técnica Perpétua Del Lama e à doutoranda Marcela de Souza Santos pela colaboração nos ensaios de inibição da degranulação de mastócitos;

À Prof^a. Dr^a. Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado e à técnica Tatiane Cruz de Carvalho pela colaboração nos ensaios antibacterianos;

À Prof^a. Dr^a. Maria Cláudia Marx Young, pela colaboração nos ensaios antifúngicos;

Ao doutorando Raphael Conti e à Prof^a. Dr^a. Mônica Tallarico Pupo, pelo auxílio no estudo dos fungos endofíticos;

Ao Prof. Dr. João Luis Callegari Lopes por gentilmente ter aceitado orientar-me na ausência da Hosana;

A todos os funcionários do laboratório de Química Orgânica da FCFRP, especialmente aos técnicos José Carlos Tomaz e Izabel Cristina Casanova Turatti, pela enorme ajuda com as análises cromatográficas; e ao funcionário Vinícius da FFCLRP pelos espectros de RMN;

Aos professores e colegas dos laboratórios de Química Orgânica, Farmacognosia e Química Farmacêutica da FCFRP, por todo suporte, colaboração e ensinamentos, os quais foram essenciais ao fechamento deste trabalho;

Aos queridos alunos e amigos da 6ª. Turma de Farmácia-Bioquímica (Noturno) da FCFRP, que me proporcionaram uma experiência incrível e contribuíram diretamente para meu empenho na pós-graduação e para a escolha do meu futuro profissional;

Aos queridos colegas pós-graduandos que fizeram parte da organização do III SINPOSPq, por toda a luta, aprendizado, empenho e determinação;

A todos aqueles os quais não cito aqui, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho; amigos e colegas queridos que acrescentaram valores à minha vida, acolheram-me nos momentos de fraqueza e deram um tom alegre e doce à estes trinta meses de estudo e trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP pela oportunidade de realização deste mestrado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida;

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

“Se você pode sonhar, você pode fazer.”

(Walt Disney)

RESUMO

de FELÍCIO, R. **Produtos naturais marinhos: identificação de metabólitos fenólicos halogenados na macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) e potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados.** 2010. 207f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

O ambiente marinho desponta como uma fonte natural importante devido à sua fantástica diversidade orgânica, que permanece praticamente inexplorada. Abordagens químicas e biológicas de organismos marinhos, atualmente, representam uma área de pesquisa ampla e promissora, visto a constante descoberta de diversos metabólitos com propriedades medicinais variadas, além de um arsenal metabólico praticamente ilimitado. Algas vermelhas, com destaque para a família Rhodomelaceae, são exímias produtoras de metabólitos halogenados aos quais são atribuídos importantes atividades biológicas. Micro-organismos marinhos e/ou endofíticos são apontados como os alvos mais promissores para descoberta de novos fármacos. Neste contexto, o presente trabalho descreve a identificação de metabólitos secundários da macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta), a qual possui poucos relatos na literatura a respeito de seu metabolismo secundário, bem como o potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados a esta espécie. O estudo químico da espécie *B. tenella* coletada nos costões rochosos da Praia da Fortaleza (Ubatuba-SP) proporcionou a identificação, por meio de análises via CG-EM (fração acetato), de 63 metabólitos dos quais 39 são substâncias apolares de cadeias carbônicas longas (ex. ácidos graxos e ésteres, esteróides, dentre outros) e 24 são metabólitos fenólicos, incluindo 17 halofenóis clorados, bromados e iodados. Destas 24 substâncias, até o presente momento, três são inéditas, nove são inéditas como produtos naturais, quatro são inéditas em algas marinhas e seis são inéditas para o gênero *Bostrychia*. Adicionalmente, 45 linhagens de micro-organismos endofíticos foram isoladas da alga *Bostrychia tenella*, das quais 10 foram cultivadas em meio sólido arroz, proporcionando a obtenção de extratos brutos e frações orgânicas. Apesar das frações de *B. tenella* não terem exibido atividade biológica, extratos e frações dos micro-organismos endofíticos associados a esta espécie apresentaram-se ativos em todos os ensaios realizados: citotoxicidade utilizando células tumorais HL-60, HCT-8 e SF-295, antifúngico utilizando fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, antibacteriano utilizando *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, e inibição da degranulação mastocitária utilizando células RBL-2H3. O presente trabalho contribuiu para aumento do conhecimento sobre o metabolismo secundário da alga *Bostrychia tenella* e proporcionou a descoberta do potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados a esta alga, atribuindo a esta espécie relevância química e microbiológica para o estudo de produtos naturais marinhos.

Palavras-chave: Produtos naturais halogenados, algas vermelhas marinhas, atividade biológica, micro-organismos endofíticos, CG-EM, *Bostrychia tenella*.

ABSTRACT

de FELÍCIO, R. **Marine natural products: halophenolic metabolites identification in the seaweed *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) and biological potential of associated endophytic microorganisms** 2010. 207f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

The marine environment appears as an important natural source due to its fantastic organic diversity, which practically remains unexplored. Chemical and biological approaches concerning marine organism, currently, represent an ample and promising research area, since there are a constant metabolite discovery with a variety of medicinal properties, besides the limitless metabolic armory. Red seaweeds, with distinction for the Rhodomelaceae family, are exempt of halogenated metabolites producers which are attributed important biological activities. Marine and/or endophytic microorganisms are pointed as the most promising targets with respect to discovery of new pharmaceuticals. In this context, the present work describes the secondary metabolites identification from seaweed *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta), as well as the biological potential of associated endophytic microorganisms. The chemical study of *B. tenella* species collected in the rocky shore of Praia de Fortaleza (Ubatuba-SP) provided the identification, by means of GC-MS analyses (acetate fraction), of 63 metabolites, which 39 consisted of nonpolar substances containing a long carbonic chains (fatty acids, esters, steroids, amongst others) and 24 were phenolic compounds, including 17 chlorinated, bromated and iodized halophenols. Related to these 24 substances, until the present moment, three are unknown, nine are unknown as natural products, four are unknown in seaweeds and six are unknown in the *Bostrychia* genus. Additionally, 45 endophytic microorganism strains had been isolated from *B. tenella*, from which 10 were cultivated in solid rice medium, providing several crude extracts and fractions. Although the *B. tenella* fractions did not show biological potential, extracts and fractions from endophytic microorganism associates to this species presented biological activity in all of evaluated assays: cytotoxicity using tumor cells HL-60, HCT-8 and SF-295, antifungal in *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*, antibacterial using *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*, and mast cell degranulation inhibition using RBL-2H3 cells. The present work contributed for the secondary metabolism knowledge increase regarding *Bostrychia tenella* species, and demonstrated the endophytic microorganism biological potential, attributing to this species chemical and microbiological relevance for the marine natural products research.

Keywords: Halogenated natural products, marine red algae, biological activity, endophytic microorganism, GC-MS, *Bostrychia tenella*.

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1	Substâncias químicas naturais (incluindo suas fontes de origem) e derivados sintéticos que marcaram o histórico da pesquisa em produtos naturais desde o início do século XIX.....	3
Figura I.2	Fármacos originados de produtos naturais marinhos utilizados na terapêutica atual.....	7
Figura I.3	Protótipos de fármacos de origem marinha (com as respectivas fontes produtoras) em estudos clínicos e respectivas moléculas das quais foram originados.....	9
Figura II.1	A macroalga <i>Bostrychia tenella</i> . À esquerda, a espécie em seu habitat, a face não exposta ao sol das rochas dos costões litorâneos. À direita, exemplares da espécie catalogadas no website Algae Maris Brasilis.....	28
Figura II.2	Substâncias isoladas de <i>B. tenella</i> . À esquerda, o digeneasídeo α -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-D-glicerato; ao centro, 4-(hidroximetil)-benzenossulfonato de potássio; e a direita álcool 1-metoxifeniletílico.....	29
Figura II.3	Obtenção e fracionamento do extrato hidro-metanólico da alga <i>Bostrychia tenella</i>	33
Figura II.4	Estruturas químicas dos metabólitos identificados nas subfrações de BT-H.....	50-52
Figura II.5	Substâncias fenólicas e halogenadas identificadas das subfrações de BT-A da alga <i>Bostrychia tenella</i>	56-57
Figura II.6	Identificação do metabólito 42	60
Figura II.7	Proposta geral de fragmentação química por impacto de elétrons dos derivados monohalogenados do metabólito 42	61
Figura II.8	Derivados halogenados da substância 42 identificados nas subfrações de BT-A.....	62
Figura II.9	Derivados di-homo-halogenados da substância 42 identificados nas subfrações de BT-A.....	63

Figura II.10	Derivados di-hetero-halogenados da substância 42 identificados nas subfrações de BT-A.....	64
Figura II.11	Identificação do metabólito 46	66
Figura II.12	Proposta geral de fragmentação química por impacto de elétrons dos derivados halogenados a partir do metabólito 46	67
Figura II.13	Derivados halogenados do composto 46 identificados nas subfrações de BT-A.....	68
Figura II.14	Identificação do metabólito 43	70
Figura II.15	Proposta geral de fragmentação química por impacto de elétrons dos derivados halogenados do metabólito 43	71
Figura II.16	Proposta de fragmentação do metabólito 43 para a formação do pico base m/z 95.....	71
Figura II.17	Derivados halogenados do metabólito 43 identificados nas subfrações de BT-A.....	72
Figura II.18	Identificação do metabólito 44	74
Figura II.19	Proposta geral de fragmentação química por impacto de elétrons dos derivados halogenados do metabólito 44	75
Figura II.20	Derivados halogenados do metabólito 44 identificados nas subfrações de BT-A.....	76
Figura II.21	Identificação do metabólito 41	78
Figura II.22	Derivados halogenados do metabólito 41 identificados nas subfrações de BT-A.....	78
Figura II.23	Proposta geral de fragmentação química por impacto de elétrons dos derivados halogenados do metabólito 41	79
Figura II.24	Identificação do metabólito 40	80
Figura II.25	Identificação do metabólito 45	81
Figura II.26	Rota biossintética proposta para o metabólito lanosol.....	84

Figura II.27	Reação química empregando a substância MTT para verificação da viabilidade de células tumorais no ensaio de citotoxicidade.....	85
Figura II.28	Avaliação antifúngica das frações orgânicas da alga <i>Bostrychia tenella</i> pelo método de bioautografia: placas cromatográficas contendo amostras de <i>B. tenella</i> reveladas com irradiação UV $\lambda = 254$ nm e $\lambda = 365$ nm, e reveladas com solução de esporos dos fungos <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. Sphaerospermum</i>	89
Figura II.29	Repetição da avaliação antifúngica das frações orgânicas da alga <i>Bostrychia tenella</i> pelo método de bioautografia: placas cromatográficas contendo novas amostras de <i>B. tenella</i> reveladas com irradiação UV $\lambda = 254$ nm e $\lambda = 365$ nm, e reveladas com solução de esporos dos fungos <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. Sphaerospermum</i>	90
Figura II.30	Reação empregando a substância resazurina para verificação da viabilidade das células bacterianas.....	92
Figura II.31	Reação de degradação da substância MUG para obtenção do percentual de inibição da degranulação mastocitária através do ensaio direto utilizando células RBL-2H3.....	93
Figura II.32	Gráficos que estabelecem a relação entre a concentração de amostra avaliada (abscissas, [amostra] escala logarítmica) e a % de β -hexosaminidase liberada (ordenadas, %)......	94
Figura III.1	Substâncias químicas obtidas a partir de micro-organismos e produtos sintéticos derivados de importância histórica na pesquisa de produtos naturais microbianos.....	100
Figura III.2	À esquerda, fragmentos da alga <i>B. tenella</i> esterilizados e, ao redor de alguns destes, micro-organismos endofíticos em crescimento (meio BDA, 7 dias após incubação). À direita, exemplo de linhagem microbiana isolada (meio BDA, 21 dias após incubação).....	118
Figura III.3	As 10 linhagens de endófitos de <i>B. tenella</i> que foram selecionadas para cultivo em meio sólido.....	119

Figura III.4	Metodologia empregada para obtenção do extrato bruto e frações dos micro-organismos endofíticos da alga <i>Bostrychia tenella</i>	119
Figura III.5	Avaliação da prevalência do isolamento de micro-organismos endofíticos da macroalga <i>Bostrychia tenella</i> de acordo com: A) MES utilizada; B) meio de cultura utilizado.	123
Figura III.6	Distribuição do potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados à alga <i>Bostrychia tenella</i> : número de amostras ativas em cada ensaio biológico realizado e subdividido pela composição química.....	126
Figura III.7	Distribuição das atividades biológicas apresentadas pelos micro-organismos endofíticos associados à alga <i>Bostrychia tenella</i> de acordo com a composição química das amostras.....	127
Figura III.8	Distribuição das atividades biológicas dos micro-organismos endofíticos associados à alga <i>B. tenella</i> por linhagem microbiana.....	129
Figura III.9	Avaliação antifúngica dos extratos brutos e frações orgânicas de micro-organismos endofíticos associados a <i>B. tenella</i> pelo método de bioautografia: placas cromatográficas contendo amostras dos endófitos de <i>B. tenella</i> reveladas com irradiação UV $\lambda = 254$ nm e $\lambda = 365$ nm, e reveladas com solução de esporos dos fungos <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. Sphaerospermum</i>	133
Figura III.10	Gráficos que estabelecem a relação entre a concentração de amostra avaliada (abscissas, [amostra] escala logarítmica) e a % de β -hexosaminidase (ordenadas, %) para as amostras de micro-organismos endofíticos associados a <i>B. tenella</i> que se demonstraram ativas.....	137
Figura III.11	Micro-organismos desenvolvidos em placas com meio de cultivo BDA para identificação por taxonomia molecular. A) Linhagem T67; B) Linhagem T69.....	138
Figura III.12	Metabólitos isolados do fungo <i>Penicillium decaturense</i>	139
Figura VI.1	Cromatograma obtido a partir da análise da subfração BT-A.8act por CG-EM. A) Cromatograma apresentado de 0 a 25 min; B) Cromatograma apresentado de 5 a 13 min.....	165

Figura VI.17	Identificação e proposta de fragmentação da substância 2-cloro-4-(metoximetil)fenol.....	188
Figura VI.18	Identificação e proposta de fragmentação da substância 2-bromo-4-(metoximetil)fenol.....	189
Figura VI.19	Identificação e proposta de fragmentação da substância 2-iodo-4-(metoximetil)fenol.....	190
Figura VI.20	Identificação e proposta de fragmentação da substância 3-bromo-4-hidroxibenzaldeído.....	191
Figura VI.21	Propostas de síntese química para alguns metabólitos fenólicos halogenados identificados na alga <i>Bostrychia tenella</i>	193
Figura VI.22	Mecanismo reacional geral proposto para a SEA com halogênios na substância 4-hidroxibenzoato de metila.....	194
Figura VI.23	Síntese dos compostos 3-bromo-4-hidroxibenzoato de metila (B) e 3,5-dibromo-4-hidroxibenzoato de metila (C).....	194
Figura VI.24	Comparação dos EMs do metabólito 3-bromo-4-hidroxibenzoato de metila, identificado na alga <i>B. tenella</i> e sintetizado em laboratório.....	195
Figura VI.25	Comparação dos EMs do metabólito 3,5-dibromo-4-hidroxibenzoato de metila, identificado na alga <i>B. tenella</i> e sintetizado em laboratório.....	195
Figura VI.26	Espectro de RMN ^1H do metabólito sintetizado 3-bromo-4-hidroxibenzoato de metila, em CDCl_3 . Em destaque, expansão da região onde são observados os hidrogênios desblindados da molécula, evidenciando os sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos da substância	196
Figura VI.27	Síntese dos compostos 3-cloro-4-hidroxibenzoato de metila (D) e 3,5-dicloro-4-hidroxibenzoato de metila (E).....	199
Figura VI.28	Comparação dos EMs para o metabólito 3-cloro-4-hidroxibenzoato de metila identificado na alga <i>B. tenella</i> e sintetizado em laboratório.....	199
Figura VI.29	Comparação dos EMs para o metabólito 3,5-dicloro-4-hidroxibenzoato de metila identificado na alga <i>B. tenella</i> e sintetizado em laboratório.....	199

Figura VI.30	Síntese do composto 4-hidroxi-3-iodobenzoato de metila, e observação da produção do metabólito 4-hidroxi-3,5-iodobenzoato de metila, não identificado nas subfrações de BT-A.....	200
Figura VI.31	Comparação dos EMs para o metabólito 4-hidroxi-3-iodobenzoato de metila identificado na alga <i>B. tenella</i> e sintetizado em laboratório.....	200

LISTA DE TABELAS

Tabela II.1	Metabólitos isolados de algas vermelhas da família Rhodomelaceae (relatos publicados no período entre 2007 e 2009).....	16
Tabela II.2	Fracionamento cromatográfico de BT-H por CLV.....	34
Tabela II.3	Programação de temperatura do cromatógrafo a gás durante a análise das subfrações de BT-H.....	35
Tabela II.4	Fracionamento cromatográfico de BT-A por CCC.....	36
Tabela II.5	Separação das subfrações de BT-A de acordo com a solubilidade em acetona (act) e acetato de etila (ac).....	37
Tabela II.6	Programação de temperatura do cromatógrafo a gás durante a análise das subfrações de BT-A(act) e BT-A(ac).....	38
Tabela II.7	Composição química das subfrações de BT-H.....	47
Tabela II.8	Inibição do crescimento celular (IC%) ocasionada pelas amostras (100 µg/mL) avaliadas em três linhagens de células tumorais (média ± DPM).....	86
Tabela II.9	Valores de CI ₅₀ médios para a fração BT-H em diferentes linhagens tumorais, com intervalo de confiança estatística de 95%.....	86
Tabela II.10	Avaliação da atividade antifúngica de frações da alga <i>B. tenella</i>	89
Tabela II.11	Efeito inibidor das frações da alga <i>B. tenella</i> sobre a liberação da enzima β-hexosaminidase de mastócitos da linhagem RBL-2H3.....	93
Tabela III.1	Metabólitos inéditos obtidos a partir de micro-organismos endofíticos isolados de algas marinhas (ordem cronológica de publicação).....	105
Tabela III.2	Metodologias de esterilização da superfície (M.E.S.) de algas da espécie <i>B. tenella</i> de diferentes lotes.....	115

Tabela III.3	Frações orgânicas das linhagens de endófitos selecionadas.....	121
Tabela III.4	Inibição do crescimento celular (IC%) ocasionado pelas amostras (100 µg/mL) de endófitos associados à <i>B. tenella</i> , avaliadas em três linhagens de células tumorais (média ± DPM).....	130
Tabela III.5	Valores de CI ₅₀ médios para extratos e frações dos endófitos de <i>B. tenella</i> , em diferentes linhagens tumorais, com intervalo de confiança estatística de 95%.....	131
Tabela III.6	Avaliação da atividade antifúngica de extratos brutos e frações orgânicas obtidas de micro-organismos endofíticos associados a alga <i>B. tenella</i>	132
Tabela III.7	Valores das CIMs das frações ativas dos endófitos de <i>B. tenella</i>	134
Tabela III.8	Efeito inibidor dos extratos brutos e frações orgânicas de micro-organismos endofíticos associados a alga <i>B. tenella</i> sobre a liberação da enzima β-hexosaminidase de mastócitos utilizando a linhagem RBL-2H3.....	135
Tabela VI.1	Dados referentes ao espectro de RMN ¹ H da substância 3-bromo-4-hidroxibenzoato de metila.....	197
Tabela VI.2	Dados obtidos por HS-ESI-TOF-MS ¹ operando no modo negativo para as substâncias 3-bromo-4-hidroxibenzoato de metila e 3,5-dibromo-4-hidroxibenzoato de metila.....	198

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt ou Ac	Acetato de Etila
Act	Acetona
ATCC	“American Type Culture Collection”
BDA	Meio de cultura Batata-dextrose-ágar
BOD	“Biochemical oxygen demand”
BT	<i>Bostrychia tenella</i>
BTA	Meio de cultura Bostrychia-tenella-ágar
BT-A	Fração acetato da alga <i>B. tenella</i>
BT-B	Fração butanólica da alga <i>B. tenella</i>
BT-H	Fração hexânica da alga <i>B. tenella</i>
BT-M	Fração hidro-metanólica da alga <i>B. tenella</i>
CCC	Cromatografia em Coluna Clássica
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CI ₅₀	Concentração inibitória a 50% das células
CIM	Concentração inibitória mínima
CLV	Cromatografia líquida à vácuo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNP-BSA	Dinitro-fenil soro albumina bovina
DPM	Desvio padrão da média
EB(06, 65...73)	Extratos brutos hidro-metanólicos obtidos das linhagens de micro-organismos endofíticos isolados de <i>B. tenella</i>
EM	Espectro(s) de massas
eV	Elétron-Volt
FH(06, 65...73)	Frações hexânicas obtidas das linhagens de micro-organismos endofíticos isolados de <i>B. tenella</i>
FA(06, 65...73)	Frações acetato obtidas das linhagens de micro-organismos endofíticos isolados de <i>B. tenella</i>
FM(06, 65...73)	Frações hidro-metanólicas obtidas das linhagens de micro-organismos endofíticos isolados de <i>B. tenella</i>
δ	Deslocamento Químico
h	Horas
HCT-8	Linhagem celular tumoral (cólon)
Hex	Hexano

HL-60	Linhagem celular tumoral (leucemia)
HR-ESI-TOF-MS	“High resolution Electron Spray Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometer”
HS-SPME	“Headspace Solid phase microextraction”
Hz	Hertz
IC95%	Intervalo de confiança estatístico de 95%
IDM	Inibição da degranulação de mastócitos
IR	Índice de Retenção (Kovats)
<i>J</i>	Constante de Acoplamento (Hz)
<i>m/z</i>	Massa/carga
MeOH	Metanol
MES	Metodologia/método(s) de esterilização de superfície
MHz	Megahertz
min	Minutos
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio
ppm	Partes por Milhão
RBL-2H3	“rat basophilic leukemia cells”
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio Um
rpm	Rotações por minuto
SCF-295	Linhagem celular tumoral (sistema nervoso central)
T(06, 65...73)	Linhagens de micro-organismos endofíticos isolados da alga <i>B. tenella</i>
T _{amb}	Temperatura ambiente
TMS	Tetrametilsilano
<i>t_R</i>	Tempo de Retenção
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
I. INTRODUÇÃO.....	1
I. 1 Produtos Naturais.....	1
I. 2 Produtos naturais marinhos.....	4
II. CAPÍTULO I - Estudos químicos e avaliação do potencial biológico da macroalga marinha <i>Bostrychia tenella</i> (J.V. Lamoroux) J. Agardh (Rhodomelaceae, Rhodophyta).....	11
II. 1. INTRODUÇÃO.....	11
II. 1.1 Algas marinhas.....	11
II. 1.2 Divisão Rhodophyta.....	13
II. 1.3 Família Rhodomelaceae.....	15
II. 1.4 Gênero <i>Bostrychia</i> Montagne e a espécie <i>Bostrychia tenella</i>	27
II. 2. OBJETIVOS.....	30
II. 2.1 Objetivo geral.....	30
II. 2.2 Objetivos específicos.....	30
II. 3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
II. 3.1. Especificações do material e instrumentos utilizados para o estudo químico da alga <i>Bostrychia tenella</i>	31
II. 3.2. Análise química da alga <i>Bostrychia tenella</i>	32
II. 3.2.1 Coleta do material algal.....	32
II. 3.2.2 Obtenção e fracionamento do extrato metanólico de <i>B. tenella</i>	32
II. 3.2.3. Fracionamento e análise cromatográfica de BT-H.....	34
II. 3.2.3.1 Cálculo do Índice de Retenção (IR).....	35
II. 3.2.4. Fracionamento e análise cromatográfica de BT-A.....	36
II. 3.3. Análise da atividade biológica da alga <i>Bostrychia tenella</i>	38
II. 3.3.1 Avaliação da atividade citotóxica.....	38
II. 3.3.2 Avaliação da atividade antifúngica.....	39
II. 3.3.3. Avaliação da atividade antibacteriana.....	40
II. 3.3.3.1 Preparo das amostras e do inóculo.....	40

II. 3.3.3.2 Preparo dos antibióticos utilizados como controles positivos.....	41
II. 3.3.3.3 Determinação da atividade antibacteriana das amostras.....	41
II. 3.3.4. Avaliação da inibição da degranulação mastocitária.....	42
II. 3.3.4.1 Crescimento e manutenção da cultura de mastócitos da linhagem RBL-2H3.....	42
II. 3.3.4.2 Sensibilização das células RBL-2H3.....	43
II. 3.3.4.3 Quantificação da liberação da enzima β -hexosaminidase pelo ensaio direto.....	43
II. 3.3.4.4 Expressão dos resultados para a liberação de β -hexosaminidase.....	44
II. 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
II. 4.1. Substâncias identificadas na macroalga <i>Bostrychia tenella</i>	45
II. 4.1.1 Metabólitos identificados das subfrações de BT-H.....	46
II. 4.1.2 Ocorrência e relevância dos metabólitos identificados das subfrações de BT-H.....	53
II. 4.1.3. Metabólitos identificados nas subfrações de BT-A.....	55
II. 4.1.3.1. Identificação do 4-hidroxibenzoato de metila e derivados halogenados.....	59
II. 4.1.3.1.1 Ocorrência e relevância do 4-hidroxibenzoato de metila e derivados halogenados.....	64
II. 4.1.3.2. Identificação do 2-(4-hidroxifenil)acetato de metila e derivados halogenados.....	66
II. 4.1.3.2.1 Ocorrência e relevância do 2-(4-hidroxifenil)acetato de metila e derivados halogenados.....	68
II. 4.1.3.3. Identificação do 4-(hidroximetil)fenol e derivados halogenados....	69
II. 4.1.3.3.1 Ocorrência e relevância do 4-(hidroximetil)fenol e derivados halogenados.....	72
II. 4.1.3.4. Identificação do 4-(metoximetil)fenol e derivados halogenados....	73
II. 4.1.3.4.1 Ocorrência e relevância do 4-(metoximetil)fenol e derivados halogenados.....	76
II. 4.1.3.5. Identificação do 4-hidroxibenzaldeído e derivado bromado.....	77
II. 4.1.3.5.1 Ocorrência e relevância do 4-hidroxibenzaldeído e derivado bromado.....	79
II. 4.1.3.6. Identificação dos ácidos benzóico e 2(4-hidroxifenil)acético.....	80
II. 4.1.3.6.1 Ocorrência e relevância dos ácidos benzóico e 2(4-hidroxifenil)acético.....	81

II. 4.1.4. Biossíntese de metabólitos fenólicos halogenados em algas vermelhas.....	82
II. 4.2. Potencial biológico da alga <i>Bostrychia tenella</i>	85
II. 4.2.1 Avaliação da atividade citotóxica.....	85
II. 4.2.2 Avaliação da atividade antifúngica.....	88
II. 4.2.3 Avaliação da atividade antibacteriana.....	91
II. 4.2.4 Avaliação da inibição da degranulação de mastócitos.....	92
III. CAPÍTULO II - Avaliação do potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados à alga <i>Bostrychia tenella</i>.....	97
III. 1. INTRODUÇÃO.....	97
III. 1.1 Produtos naturais microbianos.....	97
III. 1.2 Micro-organismos marinhos.....	101
III. 1.3 Micro-organismos endofíticos.....	102
III. 2. OBJETIVOS.....	113
III. 2.1 OBJETIVO GERAL.....	113
III. 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	113
III. 3. MATERIAL E MÉTODOS.....	114
III. 3.1 Especificações do material e instrumentos utilizados no estudo químico dos fungos endofíticos associados à alga <i>Bostrychia tenella</i>	114
III. 3.2. Análise do potencial biológico dos micro-organismos endofíticos associados à alga <i>Bostrychia tenella</i>	114
III. 3.2.1. Isolamento de endofíticos associados à <i>B. tenella</i>	115
III. 3.2.1.1. Coleta das algas.....	115
III. 3.2.1.2. Esterilização da superfície das amostras.....	115
III. 3.2.1.3. Meios de cultura utilizados.....	116
III. 3.2.1.4. Isolamento e preservação das linhagens microbianas.....	117
III. 3.2.2. Obtenção dos extratos brutos e frações orgânicas dos micro-organismos obtidos de <i>B. tenella</i>	118
III. 3.2.2.1 Seleção das linhagens.....	118
III. 3.2.2.2 Cultivo em meio sólido das linhagens microbianas selecionadas.	119
III. 3.3 Identificação dos micro-organismos endofíticos obtidos de <i>B. tenella</i>	121
III. 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	123
III. 4.1. Isolamento de micro-organismos endofíticos associados à alga <i>Bostrychia tenella</i>	123
III. 4.2. Análise biológica de micro-organismos endofíticos associados à alga <i>Bostrychia tenella</i>	125

III. 4.2.1 Considerações gerais sobre o potencial biológico dos fungos endofíticos associados à alga <i>Bostrychia tenella</i>	125
III. 4.2.2 Atividade citotóxica.....	130
III. 4.2.3 Atividade antifúngica.....	132
III. 4.2.4 Atividade antibacteriana.....	134
III. 4.2.4 Atividade antialérgica.....	135
III. 4.3 Identificação das linhagens microbianas mais promissoras.....	137
IV. CONCLUSÕES.....	140
V. REFERÊNCIAS.....	142
VI. APÊNDICES.....	164
VI. APÊNDICE A - Propostas de fragmentação química dos metabólitos halogenados identificados por CG-EM, na macroalga <i>Bostrychia tenella</i>	164
VI. APÊNDICE B – Síntese das substâncias fenólicas halogenadas identificadas na macroalga <i>Bostrychia tenella</i>	192
VII. ANEXO – Artigo publicado: Trypanocidal, leishmanidal and antifungal potential from marine red alga <i>Bostrychia tenella</i> J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales).....	201

I. INTRODUÇÃO

I. 1 Produtos naturais

Diante do cenário científico da procura por novas substâncias para atuarem na terapêutica de diversas doenças, produtos naturais representam a fonte mais importante de diversidade química para a investigação e descoberta de candidatos a fármacos (BARREIRO; FRAGA, 2008; BAKER et al., 2007; BUTLER, 2008; DREWS, 2000, HARVEY, 2008; KINGHORN, 2008; LI; VEDERAS, 2009; NEUMEYER, 2008, NEWMAN; CRAGG, 2007; NEWMAN, 2008; NEWMAN; CRAGG, 2010). Esta afirmação é alicerçada pelo histórico da pesquisa envolvendo produtos naturais e confirmada por diversos estudos referentes à origem dos medicamentos em uso na atualidade.

A partir das primeiras observações científicas datadas do início do século XIX até o presente momento, os estudos envolvendo a investigação de potencial farmacológico, o isolamento e a identificação de compostos ativos a partir de recursos de origem natural passaram por um processo de evolução. Este processo é direcionado, cada vez mais, com o objetivo de contribuir para o aumento do número de medicamentos potentes, eficientes e economicamente viáveis disponíveis no mercado farmacêutico (BARREIRO; FRAGA, 2008).

No período compreendido entre 1981 e 2008, de todas as substâncias químicas aprovadas para comercialização no mercado farmacêutico, 73% destas eram relacionadas direta ou indiretamente a metabólitos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007; NEWMAN, 2008; NEWMAN; CRAGG, 2010). Ainda, entre 2005 e 2007, trinta fármacos relacionados a produtos naturais foram aprovados para uso terapêutico, sendo que cinco deles representam os primeiros membros de novas classes de agentes terapêuticos, ou seja, atuando através de um mecanismo de ação farmacológica previamente não descrito (BUTLER, 2008; HARVEY, 2008).

Evidenciando a contribuição da natureza como fonte de novos fármacos, podemos citar fatos históricos importantes que solidificaram a relevância da pesquisa em produtos naturais para a medicina. Os próximos cinco parágrafos abordam um breve resumo sobre a origem da pesquisa em produtos naturais e sua evolução, baseado nas publicações de BARREIRO e BOLZANI (2009), BARREIRO

e FRAGA (2008), DREWS (2000), NEUMEYER (2008), NEWMAN e CRAGG (2010) e VIEGAS-JR, BOLZANI e BARREIRO (2006).

O conhecimento dos povos primitivos foi base para a descoberta da morfina (1), em 1804, uma vez que o ópio, obtido a partir da planta *Papaver somniferum*, era usado devido às suas propriedades soníferas e analgésicas. Cascas de espécies do gênero *Chincona* eram utilizadas para combater a febre, e esta importante observação determinou o isolamento da quinina (2), em 1820, a qual foi protótipo para diversos antimaláricos.

O desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais tem como principal marco a descoberta dos salicilatos, derivados da salicina (3), a qual foi a base de inspiração para a síntese do ácido acetil-salicílico (4), em 1898. A princípio, este composto foi empregado como analgésico, mas atualmente é utilizado também na terapêutica como anti-inflamatório, antitérmico, inibidor de agregação plaquetária e no tratamento de artrite reumatóide.

O descobrimento do ácido acetilsalicílico e sua comercialização como medicamento determinaram o fim da busca por substâncias naturais terapeuticamente úteis ao acaso, dando força à síntese química de compostos ativos. Neste período, o uso desta ferramenta para obtenção de medicamentos foi próspero, levando à descoberta de inúmeras substâncias com potencial farmacológico.

Produtos naturais voltaram a ser notados somente em 1932, com a comprovação da eficiência da penicilina-G (5) como antibiótico. Desde então, metabólitos naturais ocupam posto de importância secundária em relação aos grandes laboratórios farmacêuticos, visto que a síntese química pressupõe um modo economicamente mais viável para a obtenção de fármacos.

Atualmente, produtos naturais podem ser apontados como alicerce para o descobrimento de novos agentes químicos terapêuticos. Isto se deve à capacidade impressionante dos organismos vivos em biossintetizar substâncias estruturalmente peculiares e ativas, as quais ainda não são economicamente viáveis de serem totalmente produzidas por meio de síntese. Exemplo clássico é o grande número de produtos naturais ou derivados empregados atualmente na terapia do câncer, dos quais podemos citar a vincristina (6), a vimblastina (7) e o taxol (8), antineoplásicos cujas estruturas químicas são bastante complexas, o que desafia os pesquisadores

"Produtos naturais marinhos: identificação de metabólitos fenólicos halogenados na macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) e potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados"

a planejarem rotas sintéticas viáveis para produção em larga escala destes fármacos.

Figura I.1 - Substâncias químicas naturais (incluindo suas fontes de origem) e derivados sintéticos que marcaram o histórico da pesquisa em produtos naturais desde o início do século XIX.

Vale destacar que em meados da década de 90, a pesquisa de produtos naturais sofreu uma nova queda no reconhecimento comercial, devido ao advento da química combinatória, ferramenta esta que atraiu predominantemente o foco das grandes indústrias farmacêuticas (BAKER et al., 2007). Entretanto, no período de 1981 a 2006, somente uma substância originada a partir desta técnica foi aprovada para uso medicinal: o inibidor enzimático sorafenibe, em 2005, para o tratamento de carcinoma renal (NEWMAN, 2008). Este fracasso provocou um notável desconforto no mercado farmacêutico, resgatando as tentativas de investimentos em pesquisas voltadas a substâncias naturais (DEMAIN; ZHANG, 2005).

Logo, foi comprovado que a química feita pela natureza é muito mais sofisticada do que a realizada nos laboratórios, ao gerar estruturas exóticas e ricas

em características estereoquímicas (DEMAIN; ZHANG, 2005) e, conseqüentemente, com maior potencial farmacêutico.

I. 2. Produtos naturais marinhos

A pesquisa em produtos naturais marinhos apresenta-se como uma vertente promissora na pesquisa de produtos naturais, uma vez que seres marinhos apresentam potencial biológico, bioquímico e biossintético extraordinário. Além disso, o oceano é apontado como uma fonte expressiva de substâncias ativas e conseqüentemente, de possíveis candidatos a fármacos (BARREIRO; FRAGA, 2008; BHAKUNI; RAWAT, 2005; COSTA-LOTUFO et al., 2009; KINGHORN, 2008; MAYER; GUSTFSON, 2008; MAYER et al., 2009 e 2010; McCLINTOCK; BAKER, 2001; MOLINSKI et al., 2009; VIEGAS-JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Esta versatilidade é conferida graças à vastidão oceânica caracterizada por uma dinâmica particular e acentuadamente diferente, em comparação ao macroambiente terrestre.

A infindável diversidade biológica e química dos mares e oceanos deve ser compreendida de modo global. Fatores físicos, químicos e geológicos delineiam tanto a dinâmica dos ecossistemas marinhos quanto adaptação dos seres (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002). Dentre estes fatores destacam-se intensas variações quanto à temperatura, densidade, pressão, marés e movimento de massas de água, bem como aos fatores químicos como salinidade, oxigênio dissolvido, dióxido de carbono, pH, sais inorgânicos e não menos importante os geológicos (substratos, sedimentos não-consolidados) (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002). Soma-se a isto a mistura complexa de sais e de metabólitos expelidos por incontáveis espécies vivas, em um volume gigantesco de água (HESTER; HARRISON, 2000), o que resulta em um grande meio reacional para a produção de uma riqueza medicinal ainda desconhecida e relativamente pouco explorada.

Seguindo o raciocínio, neste ambiente repleto de substratos orgânicos, o que vai direcionar a biossíntese de substâncias é a relação entre os organismos, através da ecologia química (McCLINTOCK; BAKER, 2001; PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002). Os organismos marinhos representam aproximadamente metade do total da biodiversidade, apresentando representantes de 34 dentre os 36 filos descritos. Sob

este aspecto, o oceano pode ser considerado como detentor da maior diversidade de filo, possuindo um potencial biotecnológico associado praticamente ilimitado, e intitulado o ecossistema marinho como a fonte mais ampla para a descoberta de agentes terapêuticos (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

Invertebrados sésseis marinhos, como esponjas, briozoários e tunicados, não possuem mecanismos morfológicos de defesa e, como estratégia para sanar esta deficiência, desenvolveram um grande número de derivados metabólicos, muitos dos quais podem ser considerados interessantes candidatos a fármacos (THAKUR et al., 2008). Bhakuni e Rawat (2005) sugerem que a comunicação química entre organismos marinhos dependa da solubilidade das substâncias em água, ou seja, os compostos produzidos para esse fim poderão ter estruturas complexas e pesos moleculares elevados conforme a função ecológica. Uma vez que todas as formas de vida são passíveis à competição perpétua através de relações ecológicas estreitas, é previsível que tais organismos, ao viverem pressionados pelo meio, produzam metabólitos com uma alta variedade de atividades biológicas (BHAKUNI; RAWAT, 2005; McCLINTOCK; BAKER, 2001).

A diversidade química característica de organismos marinhos, sua ação em alvos moleculares peculiares e seletividade marcante se destacam em comparação às estruturas provindas de seres do ambiente terrestre, aumentando consideravelmente seu potencial farmacológico e terapêutico (COSTA-LOTUFO et al., 2009; McCLINTOCK; BAKER, 2001; MOLINSKI et al., 2009). Embora já tenham sido isolados e identificados aproximadamente 18.500 metabólitos, no período compreendido entre 1965 a 2006, estima-se que somente 3% do total de organismos marinhos já tenham sido estudados (BLUNT et al., 2008). Além disso, a pesquisa em produtos naturais marinhos também colabora com a compreensão das complexas relações ecológicas marinhas, que normalmente são a causa para a produção de metabólitos diferenciados, bem como da determinação de vias biossintéticas correlacionadas à substâncias ímpares isoladas do macroambiente oceânico (McCLINTOCK; BAKER, 2001).

No entanto, a pesquisa de produtos naturais marinhos apresenta limitações. A coleta do material orgânico marinho geralmente demanda infra-estrutura especial e investimento financeiro relativamente elevado. Ainda, muitos organismos de interesse não se adaptam ao cultivo sustentável em laboratório e, devido ao baixo

rendimento de substâncias isoladas, os avanços nos testes pré-clínicos e clínicos são constantemente comprometidos, desacelerando a descoberta de fármacos de origem marinha (BHAKUNI; RAWAT, 2005; MOLINSKI et al., 2009). Contudo, o desenvolvimento do campo da biologia molecular e o recente progresso de novas tecnologias, como engenharia genética e triagem de bioatividade, oferecem uma oportunidade única de estabelecer os produtos naturais marinhos como referenciais farmacêuticos (THAKUR et al., 2008).

O breve histórico sobre a pesquisa em produtos naturais marinhos, descrito a seguir em quatro parágrafos, foi baseado nas revisões de Costa-Lotufo e colaboradores (2009), Mayer e colaboradores (2010), Molinski e colaboradores (2009) e Newman e Cragg (2004). Adicionalmente, foram citados relatos específicos sobre o mecanismo de ação da trabectedina e ziconotídeo.

Na década de 50, o isolamento dos nucleosídeos espongouridina (**9**) e espongotimidina (**10**), a partir da esponja *Tethya crypta*, representou um marco na história dos produtos naturais marinhos. Análogos sintéticos destes compostos, a adenina-arabinosídeo (ara-A) (**11**) e a citosina-arabinosídeo (ara-C) (**12**) tornaram-se fármacos com ações anticâncer e antiviral, respectivamente. Ara-A é usada principalmente na terapia da leucemia aguda não linfoblástica, enquanto que ara-C é utilizada na forma de colírio para tratamento de infecções oftalmológicas pelo vírus *Herpes simplex*. Após a “crise” dos anos 90, o renascimento da pesquisa de produtos naturais marinhos se solidifica com a aprovação para uso clínico dos produtos naturais marinhos trabectedina (Yondelis®) (**13**) e ziconotídeo (Prialt®) (**14**).

Figura I.2 - Fármacos originados de produtos naturais marinhos utilizados na terapêutica atual.

A trabectedina (**13**) é um alcalóide tetraidroquinolínico isolado da ascídia caribenha *Ecteinascidia turbinata*, cujo mecanismo de alquilação de DNA difere da grande maioria dos agentes alquilantes. Este fármaco liga-se à guanina em sequências específicas, causando mudanças conformacionais nas fitas de DNA (CHRISTINAT; LEYVRAZ, 2009), o que gera consequências celulares fundamentais à sua propriedade, dentre elas, a inibição da produção de uma glicoproteína-P responsável pela resistência a múltiplas drogas em células tumorais (BLAY et al., 2009). Este foi o primeiro fármaco aprovado para uso clínico no tratamento de

sarcoma de tecidos moles, e atualmente está sendo avaliado em outros protocolos de ensaios clínicos.

O ziconotídeo ou ω -conotoxina MVIIA é um peptídeo analgésico composto por 25 aminoácidos, o qual foi isolado do molusco *Conus magnus* na década de 80. Este fármaco apresenta analgesia em vários modelos de nocicepção, em concentrações picomolares, sendo mil vezes mais potente do que a morfina. O ziconotídeo bloqueia o canal de cálcio do tipo N das fibras nociceptivas tipo A- δ e tipo C nas lâminas I e II da raiz dorsal do cordão nervoso de mamíferos, conferindo ineditismo quanto ao seu mecanismo de ação, por ser diferente dos analgésicos opióides (BINGHAM; MITSUNAGA; BERGERON, 2009; McGIVERN, 2007).

Devido às suas ações peculiares, trabectedina e ziconotídeo são descritos como novas classes de fármacos para seres humanos (BUTLER, 2008; HARVEY, 2008). Existe uma série de moléculas marinhas que estão em fases avançadas de estudos clínicos para lançamento no mercado farmacêutico: aplidina (15) - derivado da didemnina (16), kahalalido F (17), salinosporamida A (18), derivados da dolastatina (19) - soblidotina (20), cemadotina (21) e sintadotina (22), mesilato de eribulina (23), KRN 7000 (24), espisulosina (25), briostatina 1 (26), discodermolido (27), NPI-2358 (28) - derivado da halimida (29), e PM 00104 (Zalypsis®) (30). Todos apresentam ação antitumoral e podem ser considerados como os mais promissores candidatos a fármaco de origem marinha para os próximos anos.

Figura I.3 - Protótipos de fármacos de origem marinha (com as respectivas fontes produtoras) em estudos clínicos e respectivas moléculas das quais foram originados.

Atualmente, a pesquisa em produtos naturais marinhos tem seu reconhecimento através de extensas revisões científicas, geralmente anuais ou bienais, apresentadas por grupos de pesquisas e/ou pesquisadores renomados e

reconhecidos mundialmente, em veículos científicos de alto impacto. Estas revisões abordam, de modo competente, as publicações relativas a diversos temas como isolamento/elucidação estrutural de substâncias (BLUNT et al., 2010; HILL, 2009), potencial farmacológico (MAYER; GUSTFSON, 2008; MAYER et al., 2009), questões relacionadas à ecologia química (PAUL; RITSON-WILLIAMS, 2008), e também à síntese química (MORRIS; PHILLIPS, 2009). Estas publicações tem sido de suma importância, pois demonstram o grande esforço da comunidade científica mundial para o crescimento do conhecimento relativo aos potenciais químico, biológico e farmacêutico, exclusivos do ambiente marinho.

Em relação ao Brasil, os estudos referentes aos produtos naturais marinhos iniciaram-se na década de 1960, a partir de invertebrados marinhos. Durante algumas décadas, a pesquisa foi apenas direcionada ao estudo químico de esponjas e ascídias (BERLINCK et al. 2004). A pesquisa química de metabólitos oriundos de micro-organismos marinhos é mais recente, tendo sido iniciada em 1999 com o isolamento de uma lactona derivada do aminoácido *N*-acetil- γ -hidroxivalina, de uma espécie inédita de actinomiceto, *Streptomyces cebimarensis* (BERLINCK et al. 2004; PUPO; GALLO; VIEIRA, 2007).

Os trabalhos publicados nos periódicos brasileiros têm se concentrado nas áreas de identificação estrutural das substâncias isoladas e suas atividades principalmente em ensaios citotóxicos e antibióticos (PUPO; GALLO; VIEIRA, 2007), além de um esforço em investigar ativos para as doenças negligenciadas nacionais, como, por exemplo, a doença de chagas e a leishmaniose (BERLINCK et al. 2004). Vale ressaltar que o Brasil possui a segunda maior costa marinha em extensão, ao longo de 8000 quilômetros (BERLINCK et al. 2004; PUPO; GALLO; VIEIRA, 2007), e, no entanto, existem apenas 17 grupos nacionais que trabalham com produtos naturais marinhos registrados no diretório de grupos de pesquisa do CNPq (DIRETÓRIO DOS GRUPOS DE PESQUISA, 2010), evidenciando um incrível potencial a ser explorado (BERLINCK et al. 2004).

Diante de todo o contexto exposto, este trabalho teve como foco principal a investigação química e biológica a partir de organismos dos costões rochosos da cidade de Ubatuba (São Paulo, Brasil), utilizando: **a)** a macroalga vermelha *Bostrychia tenella* (L.V. Lamouroux) J. Agardh; e **b)** micro-organismos endofíticos associados a esta alga.

II. CAPÍTULO I

**Estudos químicos e avaliação do potencial biológico da
macroalga marinha *Bostrychia tenella* (J.V. Lamoroux) J. Agardh
(Rhodomelaceae, Rhodophyta)**

Cap. I – Introdução

II. 1. INTRODUÇÃO

II. 1.1 Algas marinhas

O termo “alga” não deve ser relacionado a um grupo taxonômico, mas compreendido como um conjunto de organismos com grande variabilidade morfológica, estrutural e metabólica (FRANCESCHINI et al., 2010; REVIERS, 2006). Sendo assim, refere-se a um grupo bastante heterogêneo de seres vivos, distribuídos em grupos taxonômicos distintos, muitas vezes sem laços de parentesco entre si. Essa heterogeneidade traduz-se numa ampla variedade de vias biossintéticas, tipos de reprodução e habitats (REVIERS, 2006).

Atualmente, espécies de algas estão taxonomicamente distribuídas em três reinos distintos: Monera, Protista e Plantae. As algas azuis ou cianobactérias, organismos do reino Monera, são unicelulares, procariontes e autótrofas. 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; FRANCESCHINI et al., 2010).

As algas têm importância relacionada à produção primária que inicia inúmeras cadeias alimentares, produção de substâncias com emprego em diversos setores da atividade humana, até mesmo na produção de efeitos indesejáveis, e inclusive, para a compreensão da origem e evolução dos seres vivos (REVIERS, 2006). O papel das algas nos sistemas aquáticos baseia-se principalmente em incorporar energia solar, produzir oxigênio o qual está dissolvido na água e é usado por outros organismos aquáticos, atuar no ciclo dos elementos químicos e ainda constituir fonte alimentar para animais herbívoros e onívoros, o que caracteriza o desempenho de funções ecológicas essenciais (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As macroalgas apresentam um nível de complexidade estrutural maior do que as algas unicelulares, sendo que algumas espécies podem apresentar uma relativa diferenciação de tecidos, porém não constituindo uma formação de órgãos verdadeiros. A condição multicelular e altamente diversificada das macroalgas proporciona formas muito distintas de explorar o ambiente, mas também gera alguns

problemas comuns: competição por espaço, luz e nutrientes, adaptações aos movimentos da água e estratégias de defesa contra a herbivoria (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002).

A ecologia química das macroalgas marinhas é notadamente alvo de estudos e revisões, destacando a herbivoria exercida por consumidores primários e a competição interespecies por espaço, luz e nutrientes (BHAKUNI; RAWAT, 2005; IANORA et al., 2006; McCLINTOCK; BAKER, 2001; PAUL; PUGLISI; RITSON-WILLIAMS, 2006). Uma vez que são majoritariamente sésseis e não desfrutam da propriedade da locomoção, algas marinhas estão vulneráveis ao ataque de diversos seres (McCLINTOCK; BAKER, 2001).

O ambiente competitivo proporcionado por estas e outras interações ecológicas determinaram o desenvolvimento de habilidades biossintéticas das mais diversas substâncias químicas (CARDOZO et al., 2007), tornando as algas uma das classes de organismos marinhos mais ricas em termos de metabolismo secundário (BHAKUNI; RAWAT, 2005). São diversas classes de estruturas químicas, como terpenóides e fenóis halogenados, compostos heterocíclicos oxigenados e nitrogenados, policetídeos, esteróis, ácidos graxos, carotenóides, polissacarídeos, aminoácidos, peptídeos e proteínas, sendo que alguns compostos inseridos nestas classes apresentam atividade biológica e/ou importância em diversos segmentos industriais (BHAKUNI; RAWAT, 2005; CARDOZO et al., 2007; McCLINTOCK; BAKER, 2001). Ressalta-se ainda que muitos destes metabólitos, principalmente os halogenados, são bastante raros em plantas e animais terrestres, evidenciando a peculiaridade química das algas marinhas (BHAKUNI; RAWAT, 2005; CARVALHO; ROQUE, 2000).

Embora as macroalgas marinhas tenham sido negligenciadas quanto ao seu potencial farmacêutico, o metabólito halomona, um monoterpeno pentahalogenado isolado da alga vermelha *Portieria hornemaniai*, demonstrou citotoxicidade em linhagens tumorais de células nervosas, renais e do cólon, em estudos de triagem no renomado National Cancer Institute (NCI), EUA (JHA; ZI-RONG, 2004). Este metabólito chegou a ser selecionado para estudos pré-clínicos para o desenvolvimento de fármacos (JHA; ZI-RONG, 2004), porém, problemas na obtenção desta substância a partir de fontes naturais confiáveis e a falta de atividade em avaliações biológicas *in vivo*, desestimularam a continuidade dos estudos

(ANDRIANASOLO et al., 2006). Em contrapartida, uma série de lectinas de origens algal com propriedades antivirais vem mostrando resultados animadores em estudos preventivos para a transmissão de vírus como HIV e EBOLA (BAKER et al., 2007).

As algas marinhas sintetizam metabólitos com um amplo espectro de atividades biológicas, principalmente os representantes de mares tropicais e subtropicais, como é o caso da costa brasileira, sendo, portanto, muito relevante o seu estudo químico. Ainda, os produtos naturais de algas apresentam uma grande diversidade estrutural, porém exibem uma relativa homogeneidade entre os componentes de um determinado táxon, tornando possível o seu uso também como marcadores taxonômicos, filogenéticos e biogeográficos (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002).

II. 1.2 Divisão Rhodophyta

As macroalgas estão compreendidas em três divisões: Chlorophyta (algas verdes, 13% marinhas), Rhodophyta (algas vermelhas, 98% marinhas) e Phaeophyta (algas pardas, 99% marinhas) (MCCLINTOCK; BAKER, 2001). Dentre estas três divisões de macroalgas, as algas vermelhas (denominação recebida em função da presença do pigmento ficoeritrina) destacam-se por apresentarem grande diversidade química - principalmente devido à eficiente capacidade de produzir metabólitos halogenados – e, conseqüentemente, com alto potencial biológico e farmacêutico agregados (BHAKUNI; RAWAT, 2005; CARVALHO; ROQUE, 2000; MCCLINTOCK; BAKER, 2001; PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002).

As rodófitas são algas predominantemente marinhas, num número de aproximadamente 5000-5500 espécies, inseridas em 500-600 gêneros (MCCLINTOCK; BAKER, 2001; REVIERS, 2006); são quase todas bentônicas, ocorrendo geralmente fixas sobre rochas, podendo também ser epífitas, endófitas, parasitas ou hemiparasitas. Possuem tamanho médio, são raramente unicelulares e quase sempre filamentosas (REVIERS, 2006).

Quanto à pigmentação, em geral, rodófitas possuem apenas clorofila a, sendo sua cor verde mascarada pela presença dos pigmentos acessórios ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina (REVIERS, 2006). Outros compostos como α - e β -carotenos estão presentes, bem como dois heterosídeos - o floridosídeo e o

isofloridosídeo -, os quais contribuem para a osmorregulação celular, exceto na ordem Ceramiales, na qual são substituídos pelo digeneasídeo (REVIERS, 2006; KARSTEN et al., 2007). Vale destacar que a presença de determinado heterosídeo pode estar relacionada com o metabolismo secundário halogenado em algas vermelhas da ordem Ceramiales, uma vez que, segundo levantamento de dados, a produção de terpenóides estaria intimamente relacionada com o acúmulo de florosídeo, do mesmo modo que a produção de fenóis estaria para o acúmulo de digeneasídeo (CARVALHO; ROQUE, 2004).

A importância econômica das algas vermelhas encontra-se na extração dos polissacarídeos sulfatados, presentes nas paredes celulares, denominados carrageninas e ágaros. Dentre outras funcionalidades, são utilizados como espessantes ou geleificantes nas indústrias agrícola e alimentícia, e como adjuvantes de medicamentos na indústria farmacêutica (BHAKUNI; RAWAT, 2005; CARVALHO; ROQUE, 2000; REVIERS, 2006; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

O metabolismo secundário das algas vermelhas é majoritariamente constituído por derivados de isoprenóides (46%) e acetogeninas (38%). A biossíntese de compostos halogenados se destaca dentre as rodófitas, uma vez que 93% de substâncias isoladas de algas vermelhas contêm halogênios (McCLINTOCK; BAKER, 2001). A evidência da eficiência da biossíntese de compostos halogenados sustenta a hipótese da presença de haloperoxidases bastante ativas em rodófitas (BHAKUNI; RAWAT, 2005; CARDOZO et al, 2007, CARVALHO; ROQUE, 2000, McCLINTOCK; BAKER, 2001). Ainda, dados da literatura indicam que os talos das algas vermelhas podem apresentar células especializadas na secreção de metabólitos bromados ou secretoras de metabólitos iodados (REVIERS, 2006). Além disso, acredita-se que bromoperoxidases são capazes de oxidar os íons brometo e iodeto e não reagem com o íon cloro, justificando a maior frequência de substâncias bromadas (BHAKUNI; RAWAT, 2005).

Sendo as propriedades biológicas das substâncias produzidas por algas vermelhas inspiradas nas relações ecológicas que servem de estímulo para esse tipo de metabolismo, logo é possível compreender porque as rodófitas produzem compostos com as atividades antibacteriana, antifúngica, anti-helmíntica, inseticida, citotóxica e antitumoral, algicida, anti-incrustante, dentre outras (BHAKUNI; RAWAT,

2005; CARDOZO et al, 2007; McCLINTOCK, BAKER, 2001; PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002).

II. 1.3 Família Rhodomelaceae

Dentre as rodofíceas, a família Rhodomelaceae (classe: Florideophyceae, ordem: Ceramiales), é considerada com sendo uma das mais importantes do filo, evidenciando-se por agrupar gêneros detentores de uma diversidade química impressionante, com potencial biológico e farmacológico agregado (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002). Esta família contribui sobremaneira para o sucesso biossintético das algas vermelhas, uma vez que produzem mono-, sesqui-, di- e triterpenos, acetogeninas, halocetonas alifáticas e fenóis contendo halogênios (McCLINTOCK; BAKER, 2001; PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002)

Rhodomelaceae é estimada como sendo a maior família no filo Rhodophyta, com 125 gêneros e 700 espécies distribuídas ao redor do mundo (TREE OF LIFE, 2010). Nesta família se destacam os seguintes gêneros: *Polysiphonia*, *Bostrychia*, *Acantophora*, *Laurencia*, *Bryothamnion*, *Herposiphonia*, *Odonthalia*, *Digenea*, *Chondria*, *Dasyclonium*, *Lenormandia*, *Osmundaria*, *Bryocladia*, *Halopytis*, *Vidalia*, *Rhodomela*, *Amansia* e *Alsidium* (JOLY, 1967).

Para evidenciar a diversidade química e o potencial biológico de espécies da família Rhodomelaceae, foi realizado um levantamento de publicações científicas contemplando o isolamento, identificação e atividade biológica de metabólitos secundários, no período entre 2007 e 2009, tendo como referências as revisões de Blunt e colaboradores (2009 e 2010) e Hill (2009) (Tabela II.1).

Tabela II.1 - Metabólitos isolados de algas vermelhas da família Rhodomelaceae (relatos publicados no período entre 2007 e 2009).

Sesquiterpenos	
<i>Laurencia spp.</i>	<p># atividade antibacteriana VAIRAPPAN et al., 2008</p>
<i>L. majuscula</i>	<p>R = H R = COMe</p> <p>DÍAZ-MARRERO et al., 2008; DÍAZ-MARRERO et al., 2009</p>
<i>L. microcladia</i>	<p># atividade antitumoral KLADI et al., 2007</p>
<i>L. majuscula</i> , <i>L. decumbens</i> , <i>L. composita</i> , <i>L. marianensis</i> , <i>L. microcladia</i> , <i>L. okamura</i>	<p>JI et al., 2007a; JI et al., 2007b; JI et al., 2007c; JI et al., 2009a; DÍAZ-MARRERO et al., 2009; LHULLIER et al., 2009</p>

Continua

Continuação	
<i>Laurencia</i> spp., <i>L. caduciramulosa</i> , <i>L. composita</i>	<p>CASSANO et al., 2008; VAIRAPPAN et al., 2008; JI et al., 2009a</p>
<i>L. decumbens</i> , <i>L. marianensis</i> , <i>L. composita</i>	<p>JI et al., 2007b; JI et al., 2007c; JI et al., 2009a</p>
<i>L. okamurai</i> , <i>L. composita</i>	<p>JI et al., 2007d; JI et al., 2009a</p>
<i>L. marianensis</i> , <i>L. composita</i>	<p>JI et al., 2007c; JI et al., 2009a</p>
<i>L. okamurai</i> , <i>L. saitoi</i>	<p>JI et al., 2007d; JI et al., 2009b.</p>

Continua

Continuação			
<i>L. saitoi</i> , <i>L. similis</i>	<p>SU et al., 2009a; SU et al., 2009b.</p>		
<i>Laurencia spp.</i>	<p>VAIRAPPAN et al., 2008</p>		
<i>L. majuscula</i>	<p>DÍAZ-MARRERO et al., 2009</p>		
<i>L. similis</i>	<p>Jl et al., 2007e; Jl et al., 2007f; SU et al., 2009a</p>	<i>L. decumbens</i>	<p>Jl et al., 2007b</p>

Continua

Continuação	
<i>L. okamurai</i>	<p style="text-align: right;">JI et al., 2007d</p>
<i>L. majuscula</i>	<p style="text-align: right;">JI et al., 2007c</p>
<i>L. composita</i>	<p style="text-align: right;">JI et al., 2009a</p>
<i>L. okamurai</i>	<p style="text-align: right;">LIANG et al., 2009</p>
<i>L. similis</i>	<p style="text-align: right;">SU et al., 2009a</p>
Continua	

Continuação

L. saitoi

SU et al., 2009b; JI et al, 2009b.

L. caduciramulosa

CASSANO et al., 2008

C₁₅-Acetogeninas*L. glandulifera*

KLADI et al., 2009

Continua

Continuação			
<i>L. composita</i>	<p>JI et al., 2009a</p>	<i>L. okamurai</i>	<p>JI et al., 2007d</p>
<i>L. marianensis</i>	<p>JI et al., 2007c</p>		
<i>L. decumbens</i>	<p>JI et al., 2007b; JI et al., 2007g</p>		
<i>L. saitoi, L. decumbens</i>	<p>JI et al., 2008a, JI et al., 2007g</p>	<i>Laurencia spp.</i>	<p>VAIRAPPAN et al., 2008</p>

Continua

Continuação

Diterpenos

L. saitoi

$R_1=R_2=R_3= \text{OAc}, R_4=\text{OH}$
 $R_1=R_2=R_3=R_4=\text{OAc}$
 $R_1=R_2=\text{OAc}, R_3=R_4=\text{OH}$
 $R_1=R_2=R_4=\text{OAc}, R_3=\text{OH}$
 $R_1=R_4= \text{OAc}, R_2=\text{H}, R_3=\text{OH}$
 $R_1=R_2=R_3=\text{H}, R_4= \text{OH}$

JI et al., 2008a

L. mariannensis

JI et al., 2007c

L. decumbens

JI et al., 2007b

L. glandulifera

atividade analgésica
CHATTER et al., 2009

Continua

Continuação

Triterpenos*L. saitoi*

JI et al., 2008a

L. omaesakiana

MATSUO et al., 2008

L. marianensis

JI et al., 2008b

Continua

Continuação

Bromoindóis*L. similis*

JI et al., 2007a; SU et al., 2009a

L. decumbens

JI et al., 2007b

L. decumbens;
L. similis

JI et al., 2007a; JI et al., 2007b

Bromofénóis*Odonthalia corymbifera* # atividade antibacteriana
OH et al., 2008

Continua

Continuação

Osmundaria colensoi

R = H
R = CH₃ #

e * atividade antibacteriana
*atividade citotóxica
POPPLEWELL; NORTHCOTE, 2009

Polysiphonia urceolata

LI et al., 2008a; LI et al., 2008b; LI et al., 2008c; LIU et al., 2009.

Continua

Conclusão

Rhodomela confervoides

MA et al., 2007

Symphyocladia latiuscula

Todos exceto # e * - atividade antioxidante
 # e + - atividade inibidor enzimático (*Taq* DNA polimerase)

e * - atividade antimicrobiana

DUAN; LI; WANG, 2009; JIN et al., 2009; XU et al., 2009

Tetraidroisoquinolinas

R. confervoides

MA et al., 2007

Macrolídeos

Neurymenia fraxinifolia

atividade antibacteriana
 STOUT et al., 2009

II. 1.4 Gênero *Bostrychia* Montagne e a espécie *Bostrychia tenella*

O gênero *Bostrychia* Montagne (Rhodomelaceae, Ceramiales) tem ampla distribuição nos ambientes de clima tropical e temperado em diversas áreas ao redor do globo terrestre. A ocorrência de espécies de *Bostrychia* está frequentemente relacionada a sistemas estuários associados a manguezais ou vegetações pantanosas salinas (ZUCARELLO; WEST, 2003). Este gênero teve sua taxonomia revisada por King e Puttock (1989), e sua filogenia esclarecida por dados moleculares (WEST et al., 2006; ZUCARELLO; WEST, 2003). Adicionalmente, o gênero *Bostrychia* também tem sido estudado extensivamente em termos de sua fisiologia, principalmente no que se refere a sua tolerância à variação de salinidade e à sua biogeografia (ZUCARELLO; WEST, 2003).

Até o ano de 2007, os estudos químicos publicados relativos ao gênero estavam praticamente restritos a abordagens ao metabolismo primário. Os carboidratos majoritários encontrados em espécies do gênero *Bostrychia*, sorbitol, dulcitol e manitol, apresentam-se como uma exceção bioquímica, uma vez que estes são raramente ocorrentes em algas vermelhas (KARSTEN et al., 2007). Karsten e colaboradores (2000) realizaram estudos com várias espécies do gênero *Bostrychia* a cerca da acumulação de aminoácidos tipo micosporinas – os quais são protetores naturais da radiação solar em algas – e comprovaram que o padrão de distribuição destas substâncias no gênero não é homogêneo. Ainda, polissacarídeos sulfatados da espécie *Bostrychia montagnei* foram ativos frente ao vírus do herpes (HSV-1), contribuindo para o aumento do interesse na pesquisa química envolvendo espécies deste gênero (NOSEDA; TÚLIO; DUARTE, 1999; DUARTE et al., 2001; DUARTE et al., 2002).

Recentemente, o grupo de pesquisas coordenado pela Prof^a. Dr^a. Hosana Maria Deboni, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, têm contribuído ativamente no aumento de informações científicas sobre o metabolismo secundário de espécies do gênero *Bostrychia*. Oliveira e colaboradores (2009) realizaram a identificação de compostos voláteis de espécimes do gênero *Bostrychia* coletadas de costões rochosos e manguezais do litoral do estado de São Paulo (SP,

Brasil), relatando a ocorrência de aldeídos, alcoóis, hidrocarbonetos e derivados de ácidos graxos, e relacionando-os com funções ecológicas e com a prevalência de acordo com o ecossistema.

A espécie *Bostrychia tenella* (J.V. Lamouroux) J. Agardh (Figura II.1) – sinônimas: *Bostrychia calamistrata*, *Bostrychia binderi*, *Bostrychia muscoides*, *Bostrychia elegans*, *Fucus tenellus*, *Plocamium tenellum*, *Rhodomela calamistrata*, dentre outras – é uma das espécies mais encontradas neste gênero em águas tropicais e temperadas, incluindo os mares do Caribe, sudoeste asiático, sudeste do Japão e Austrália (TANAKA, 1989). No Brasil, esta espécie ocorre em quase todos os estados da costa, confirmando sua alta incidência em estuários climáticos diversos (ALGAE MARIS BRASILIS, 2010a).

Figura II.1 - A macroalga *Bostrychia tenella*. À esquerda, a espécie em seu habitat, a face não exposta ao sol das rochas dos costões litorâneos. À direita, exemplares da espécie catalogadas no website Algae Maris Brasilis.

Quanto aos estudos químicos, Renaud e Luong-Van (2006) determinaram a composição química centesimal de várias espécies de algas de uma baía australiana, e *Bostrychia tenella* apresentou, em porcentagem de peso seco, 24,2% de cinzas, 31,2% de carboidratos solúveis, 4,5% de lipídeos e 10,8% de proteínas. Ainda, um estudo realizado com a espécie *Bostrychia tenella* (= *Bostrychia binderii*) revelou a ocorrência do digeneasídeo α -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-D-glicerato (Figura II.2), heterosídeo ocorrente em espécies da ordem Ceramiales (ASCÊNCIO et al., 2006).

¹créditos das fotografias: à esquerda: fotografia obtida pelo grupo de pesquisa coordenado pela Prof^a. Dr^a. Hosana Maria Deboni; à direita: imagem obtida do site Algae Maris Brasilis (ALGAE MARIS BRASILIS, 2010b).

Em nosso grupo de pesquisa, Oliveira e colaboradores (2009) evidenciaram a composição volátil de *Bostrychia tenella* através da técnica de microextração em fase sólida, indicando a ocorrência majoritária da substância pentadecanal, dentre uma série de outras classes de substâncias. Em outro trabalho, foi estabelecido, através de análises por CG-EM, a constituição química de frações apolares de *B. tenella* que se mostraram atividade frente aos parasitas *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* e frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (de FELÍCIO et al., 2010) – Anexo I, p 201.

Ainda, foram isoladas duas substâncias aromáticas de *B. tenella*, a substância inédita 4-(hidroximetil)-benzenossulfonato de potássio, e o álcool 1-metoxifeniletílico, descrito previamente como um produto de síntese (de FELÍCIO; DEBONSI; YOKOYA, 2008).

Figura II.2 - Substâncias isoladas de *B. tenella*. À esquerda, o digeneasídeo α -D-manopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-D-glicerato; ao centro, 4-(hidroximetil)-benzenossulfonato de potássio; e a direita álcool 1-metoxifeniletílico.

II. 2. OBJETIVOS

II. 2.1 OBJETIVO GERAL

Levando em consideração o potencial farmacêutico do ambiente marinho e de algas marinhas, o principal objetivo deste projeto de mestrado foi realizar estudos da constituição química e avaliação do potencial biológico da macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta).

II. 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificação de metabólitos da espécie *Bostrychia tenella* coletada na Praia da Fortaleza, Ubatuba, litoral de São Paulo;
- Avaliação das atividades biológicas *in vitro* de extratos e frações da espécie *B. tenella*:
 - Utilizando os fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, para investigação da atividade antifúngica;
 - Utilizando as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, para investigação da antibacteriana;
 - Utilizando linhagens tumorais HL-60 (leucemia), HCT-8 (cólon) e SCF-295 (sistema nervoso central), para investigação da citotoxicidade;
 - Utilizando células RBL-2H3, para investigação da inibição da degranulação mastocitária.

Cap. I – Material e Métodos

II. 3. MATERIAL E MÉTODOS

II. 3.1. Especificações do material e instrumentos utilizados para o estudo químico da alga *Bostrychia tenella*

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 analítico da marca JT Baker.

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

Os reveladores utilizados nas análises por CCDC foram: irradiação UV $\lambda = 254$ nm; iodo ressublimado em câmara saturada, nebulização com solução comercial de iodoplatinado (0,15% de sal cloroplatinado de potássio e 3% de iodeto de potássio, em ácido clorídrico hidratado) da marca Sigma e *p*-anisaldeído em solução hidroalcoólica ácida comercial (90% (v/v) metanol, 5% (v/v) ácido sulfúrico e 5% (v/v) ácido acético) da marca Sigma, seguida de aquecimento da cromatoplaça a 100°C por cinco minutos.

Para a análise por CLV, foi utilizada sílica gel 60 H, da marca Merck, como fase estacionária, e sílica gel 60 G, marca Merck, para incorporação da amostra. Para o procedimento de CCC por exclusão foi utilizada uma coluna empacotada com Sephadex LH-20.

As análises por CG-EM foram realizadas em aparelho Shimadzu, modelo QP 2010, em um sistema operando via impacto eletrônico (70 eV) acoplado com injetor split (250°C). Foi utilizada coluna DB-5MS (30 metros, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 μ m de espessura do filme) da marca Agilent J&W GC columns, para a análise das amostras, e gás carreador Hélio com fluxo e pressão variáveis de acordo com a análise. Para tratamento das amostras para análise em CG-EM, foram utilizadas colunas comerciais Sepak de 1g contendo a fase estacionária sílica-gel 60.

II. 3.2. Análise química da alga *Bostrychia tenella*

II. 3.2.1 Coleta do material algal

Indivíduos da macroalga *Bostrychia tenella* (L. V. Lamouroux) J. Agardh foram coletados nos Costões Rochosos da Praia da Fortaleza, em Ubatuba – São Paulo (23°31'30''S, 45°10'09''O). A coleta foi realizada no mês de dezembro de 2007, levando em consideração as datas e períodos de maré baixa. As amostras frescas foram lavadas em água do mar para remoção de detritos e contaminantes, colocadas em recipientes plásticos e transportadas em caixas com isolamento térmico a baixas temperaturas (~4°C).

O material coletado foi limpo em água doce, sendo, em seguida, congelado até o momento da extração. Antes, porém, foi realizada uma triagem com o propósito de separar outras espécies de algas associadas, que porventura foram coletadas juntas.

Ainda, exemplares da espécie foram devidamente limpos e mantidos em frascos plásticos contendo solução de formol (4%), os quais foram utilizados para preparação de exsicata (SP 371456) depositada no herbário SP, Instituto de Botânica de São Paulo.

Os processos de identificação, limpeza e triagem das amostras de algas coletadas foram supervisionados pela bióloga com experiência em taxonomia de algas Dr^a. Nair Sumie Yokoya, pesquisadora vinculada à Seção de Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo.

II. 3.2.2 Obtenção e fracionamento do extrato metanólico de *B. tenella*

O material coletado foi reunido e submetido à extração em solvente orgânico a frio. Cerca de 2.750 g de algas congeladas foram trituradas com o auxílio de liquidificador doméstico e submetidas à extração por maceração utilizando-se metanol, numa proporção massa de alga/volume de solvente igual a 1:1. O extrato obtido foi filtrado em gaze e papel de filtro, e concentrado em evaporador rotativo, sob pressão reduzida a uma temperatura máxima de 40°C.

Devido à grande quantidade de água presente no extrato concentrado, à possibilidade da degradação e formação de artefatos caso a temperatura do evaporador rotativo fosse elevada, aos problemas de congelamento (alta concentração de polissacarídeos) e lentidão caso este fosse liofilizado, optou-se por submeter o extrato concentrado a partições líquido-líquido utilizando-se solventes orgânicos imiscíveis. Para este processo, foram utilizados os solventes destilados n-hexano, acetato de etila e butanol, resultando em 4 frações, de acordo com a Figura II.3.

Figura II.3 - Obtenção e fracionamento do extrato hidro-metanólico da alga *Bostrychia tenella*.

II. 3.2.3 Fracionamento e análise cromatográfica de BT-H

O fracionamento cromatográfico da fração hexânica BT-H foi realizado por CLV. Utilizou-se uma coluna clássica com sistema de vácuo, placa porosa (sinterizada) com diâmetro de 10 cm e um erlenmeyer de volume igual a 1L como sistema coletor. Como suporte cromatográfico, foram utilizados 500 g de sílica gel 60 H. A quantidade de 11,0132 g de BT-H foi incorporada em 50,0 g de sílica gel 60 G e a mistura foi colocada sobre o suporte de sílica gel 60 H na coluna. A eluição foi realizada de acordo com gradiente crescente de polaridade, utilizando os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol (Tabela II.1).

Foram coletadas 6 frações de volume variável (Tabela II.2), concentradas sob pressão reduzida, em rotoevaporador e dessecador.

Tabela II.2 - Fracionamento cromatográfico de BT-H por CLV.

<i>Frações</i>	<i>Sistema de Eluição</i>	<i>Volume de solvente utilizado na eluição (L)</i>	<i>Massa da subfração seca (g)</i>
BT-H.H	Hex	0,5	0,0690
BT-H.HD	Hex: Dcm (1:1)	0,5	0,9652
BT-H.D	Dcm	0,5	0,2420
BT-H.A	AcOEt	1	3,1408
BT-H.AM	AcOEt: MeOH (1:1)	1	4,9480
BT-H.M	MeOH	2	1,2939

Após secagem, as subfrações resultantes foram pesadas e submetidas a análises cromatográficas por CCDC, utilizando sistemas de solventes e reveladores variados (item II. 3.1). Adicionalmente, estas subfrações foram submetidas a análises por CG-EM, seguindo a sequência de aquecimento descrita na Tabela II.3.

Tabela II.3 - Programação de temperatura do cromatógrafo a gás durante a análise das subfrações de BT-H.

Velocidade de Aquecimento (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tempo de espera ¹ (min)
-	80	5
10	200	5
5	250	5
15	280	10

II. 3.2.3.1 Cálculo do Índice de Retenção (IR)

A fim de obter um parâmetro adicional para auxiliar na identificação de compostos apolares, principalmente com relação às substâncias com cadeias carbônicas longas (hidrocarbonetos, ácidos graxos e derivados), para cada metabólito detectado nos cromatogramas, foi calculado o Índice de Retenção (Kovats).

O índice de retenção de Kovats é uma ferramenta utilizada para viabilizar a comparação de dados de retenção cromatográficos obtidos por diversos autores, em diferentes condições. Este índice independe de muitos parâmetros e condições da análise por cromatografia gasosa, tornando possível a comparação de valores e identidades (CASTELLO, 1999). Para análises realizadas com gradiente de temperatura, a fórmula para o índice de retenção de Kovats (IR) é dada a seguir:

$$IR = 100a + 100 \times \frac{[t_R(b) - t_R(a)]}{[t_R(z) - t_R(b)]}$$

Na qual **a** é o alcano com número de carbonos igual ao da substância (**b**) que se deseja obter o índice; **z** é o alcano com número de carbonos igual ao **a** + 1. Segue o exemplo de aplicação:

$$IR = 100 \times 16 + 100 \times \frac{[t_R(b) - t_R(C_{16})]}{[t_R(C_{17}) - t_R(C_{16})]}$$

¹ Tempo no qual a temperatura final atingida permanece constante até o próximo aquecimento. Outros parâmetros: Temperatura inicial 80°C; Gás carreador: pressão – 73,2 kPa, fluxo na coluna: 1,1 mL/min.

II. 3.2.4. Fracionamento e análise cromatográfica de BT-A

O fracionamento cromatográfico da fração BT-A foi realizado por CCC utilizando-se Sephadex LH-20 como fase estacionária, e eluição isocrática com MeOH. As dimensões da coluna foram: 80 cm de comprimento, 4 cm de diâmetro interno, sendo a altura da fase estacionária de 63 cm.

As amostras aplicadas no topo da coluna foram previamente solubilizadas em metanol e centrifugadas (3000 rpm/5 min/ T_{amb}) com separação do precipitado, quando formado. Foram aplicados 1,2534 g da fração BT-A na coluna.

Foram coletadas 58 subfrações de 15 mL cada. As frações foram analisadas por CCDC em fase normal, em diferentes sistemas de solventes e reveladas de acordo com item II. 3.1. Através dos perfis cromatográficos obtidos por esta análise, as 58 subfrações foram reunidas e submetidas à secagem em dessecador (Tabela II.4).

Tabela II.4 - Fracionamento cromatográfico de BT-A por CCC.

Frações	Frações Reunidas	Massa da subfração seca (g)
BT-A.1	01-06	0,0721
BT- A.2	07-08	0,0670
BT- A.3	09-11	0,1156
BT- A.4	12-16	0,1814
BT- A.5	17-21	0,2516
BT- A.6	22	0,0440
BT- A.7	23-26	0,1329
BT- A.8	27-28	0,0268
BT- A.9	29-34	0,1645
BT- A.10	35	0,0135
BT- A.11	36-39	0,0552
BT- A.12	40-44	0,0158
BT- A.13	45-48	0,0087
BT- A.14	49-53	0,0067
BT- A.15	54-56	0,0040
BT- A.16	57	0,0106
BT- A.17	58	0,0043

As subfrações resultantes do fracionamento cromatográfico de BT-A foram analisadas por CCDC novamente, para verificação da reunião das subfrações. Devido a problemas de solubilização das amostras durante os processos cromatográficos, as subfrações de BT-A foram solubilizadas em solventes mais apropriados, submetidas a centrifugação (3000 rpm/5 min/ T_{amb}) e separadas dos precipitados. As subfrações BT-A foram solubilizadas em acetona e acetato de etila, e o resultado deste procedimento é observado na Tabela II.5.

Tabela II.5 - Separação das subfrações de BT-A de acordo com a solubilidade em acetona (act) e acetato de etila (ac).

Frações	Massa das subfrações secas (g)	Frações	Massa das subfrações secas (g)
BT-A.1act	0,0381	BT-A.1ac	0,0122
BT- A.2act	0,0007	BT- A.2ac	0,0196
BT- A.3act	0,0376	BT- A.3ac	0,0385
BT- A.4act	0,0927	BT- A.4ac	0,0591
BT- A.5act	0,0683	BT- A.5ac	0,0247
BT- A.6act	0,0212	BT- A.6ac	0,0131
BT- A.7act	0,0124	BT- A.7ac	0,0006
BT- A.8act	0,0074	BT- A.8ac	0,0144
BT- A.9act	0,0167	BT- A.9ac	0,0008
BT- A.10act	0,0045	BT- A.10ac	0,0077
BT- A.11act	0,0081	BT- A.11ac	0,0386
BT- A.12act	0,0031	BT- A.12ac	0,0124
BT- A.13act	0,0013	BT- A.13ac	0,0081
BT- A.14act	0,0021	BT- A.14ac	0,0054
BT- A.15act	0,0015	BT- A.15ac	0,0031
BT- A.16act	0,0015	BT- A.16ac	0,0089
BT- A.17act	0,0004	BT- A.17ac	0,0044

Assim como no item II. 3.2.3, as subfrações resultantes foram submetidas a análises por CG-EM, seguindo a sequência de aquecimento descrita na Tabela II.6.

Tabela II.6 - Programação de temperatura do cromatógrafo a gás durante a análise das subfrações de BT-A(act) e BT-A(ac).

Velocidade de Aquecimento (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tempo de espera ¹ (min)
-	100	2
15	200	0
6	230	2
15	290	25

II. 3.3. Análise da atividade biológica da alga *Bostrychia tenella*

II. 3.3.1 Avaliação da atividade citotóxica

Os ensaios para a detecção de atividade antitumoral foram realizados pelo aluno de doutorado Élthon Góis Ferreira, sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Letícia Veras Costa-Lotufo em colaboração com o Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes e Prof^a. Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa no Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Inicialmente foi realizado um teste de atividade dos extratos através do método do MTT - denominação empregada devido à utilização do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio. Para esta avaliação foram utilizadas células tumorais das linhagens HL-60 (leucemia), HCT-8 (cólon) e SF-295 (sistema nervoso central) em concentração única de 100 µg/mL - para seleção dos extratos mais ativos -, utilizando DMSO estéril como solvente para as amostras. Para as amostras selecionadas, foram feitas repetições dos ensaios em diferentes linhagens celulares para quantificação da citotoxicidade (CI₅₀) e verificação da seletividade em células de diversas origens, através do mesmo método.

Todas as linhagens celulares utilizadas foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI-EUA). O método empregado foi inicialmente estabelecido por Mosmann (1983), sendo considerado rápido, sensível e barato.

¹ Tempo no qual a temperatura final atingida permanece constante até o próximo aquecimento. Outros parâmetros: Temperatura inicial 100°C; Gás carreador: pressão – 89,4 kPa, fluxo na coluna: 1,2 mL/min.

A análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de triagem realizado no NCI, que avalia mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). Trata-se de uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais viáveis, presentes somente nas células metabolicamente ativas.

As células são regularmente mantidas em meio de cultura RPMI 1640, contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As células foram plaqueadas na concentração de 0,3 x 10⁶ células/mL para a linhagem de HL-60, 0,1 x 10⁶ células/mL para a linhagem de SF-295 e 0,7 x 10⁵ células/mL para a linhagem HCT-8. As placas foram incubadas por 72 h, nas mesmas condições que são mantidas (5% de CO₂, 37°C). Ao término deste período, as células foram centrifugadas (5000 rpm/ 3 min/ T_{amb}), e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT, e as placas foram incubadas por 3 h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. Como controle positivo foi utilizado a substância doxorubicina, na concentração de 0,3 µg/mL.

Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

II. 3.3.2 Avaliação da atividade antifúngica

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

Para a atividade antifúngica, os extratos e frações diluídos em solventes compatíveis, na concentração de 20 µg/mL, foram analisados por CCDC utilizando como fases móveis misturas de solventes orgânicos adequados previamente

"Produtos naturais marinhos: identificação de metabólitos fenólicos halogenados na macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) e potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados"

estabelecidos. Após a eluição, 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 incubada durante 72 h 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, na concentração de 1 µg/µL.

II. 3.3.3 Avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada através da determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em microplaca. Esta atividade foi desenvolvida no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP, pela técnica Tatiane Cruz de Carvalho, sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Niege Araçari Jacometti Cardoso Furtado.

II. 3.3.3.1 Preparo das amostras e do inóculo

Foram preparadas soluções das frações contendo 1 mg/100 µL em DMSO. Após completa solubilização, foram adicionados 1900 µL de caldo Mueller Hinton. Utilizaram-se as cepas padrão provenientes da American Type Culture Collection da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), e da bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883).

Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, culturas de 24 h dos micro-organismos indicadores, desenvolvidas no ágar Mueller Hinton, foram transferidas para tubos contendo 10 mL de solução salina esterilizada. Estas suspensões foram padronizadas comparando-as com o tubo 0,5 da escala de McFarland (0,1 mL de cloreto de bário a 1,0 % + 9,9 mL de ácido sulfúrico a 1,0 %) por meio da verificação das absorbâncias em 625 nm (NCCLS, 2003). Em seguida, foi feita diluição no caldo Mueller Hinton, de modo a fornecer o inóculo de 5×10^5 UFC/mL.

II. 3.3.3.2 Preparo dos antibióticos utilizados como controles positivos

Após diluições sucessivas do antibiótico penicilina G (Marca Sigma) (controle positivo para a bactéria gram-positiva *S. aureus*) em tampão fosfato de potássio a 1%, pH=6,0 (2,00 g de fosfato de potássio dibásico, 8,00 g de fosfato de potássio monobásico, em 1000 mL de água destilada) e do antibiótico estreptomicina (Marca Sigma) (controle positivo para a bactéria gram-negativa *K. pneumoniae*) em tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L, pH=7,9 (16,73 g de fosfato de potássio dibásico, 0,52 g de fosfato de potássio monobásico, 1000 mL em água destilada), alíquotas foram transferidas para o caldo Mueller Hinton de forma a avaliar a atividade em uma faixa de concentrações de 5,900 µg/mL a 0,010 µg/mL.

II. 3.3.3.3 Determinação da atividade antibacteriana das amostras

Em microplacas esterilizadas de 96 poços foi depositado um total de 100 µL da mistura do caldo Mueller Hinton, das soluções das amostras e das suspensões dos microrganismos. As amostras foram avaliadas nas seguintes concentrações finais: 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL de caldo Mueller Hinton. Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas utilizando-se o método de microdiluição em microplaca (NCCLS, 2003).

Em um dos poços de cada placa foi realizado o controle da cultura, o qual deve apresentar crescimento bacteriano devido à ausência do agente antimicrobiano. Em outro poço foi feito o controle de esterilidade do caldo Mueller Hinton e em outro o controle do sistema de solvente utilizado na solubilização dos extratos e das substâncias isoladas. Penicilina G e estreptomicina foram utilizadas como controles positivos nos ensaios realizados com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. As microplacas foram tampadas e incubadas a 37 °C por 24 h. A concentração máxima de DMSO foi de 5% no primeiro poço (correspondente à concentração de 400 µg/mL).

Posteriormente, foram adicionados, em cada poço, 30 µL de solução aquosa de sal sódio de resazurina (7-hidroxi--10-oxido-3H-fenoxazin-3-ona) da marca Sigma-Aldrich. A coloração azulada nos poços foi interpretada como presença de células microbianas viáveis, ou seja, microrganismo resistente à amostra avaliada,

constituindo em ausência de atividade antibacteriana. A ausência de coloração indicou células bacterianas inviáveis e, conseqüentemente, ação antibacteriana da amostra.

II. 3.3.4 Avaliação da inibição da degranulação mastocitária

A avaliação da inibição da degranulação mastocitária foi realizada pela aluna de doutorado Marcela de Souza Santos e pela técnica Maria Perpétua Freire de Moraes Del Lama, no laboratório de Biossensores e Sistemas Microheterogêneos, do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP, sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Rose Mary Zumstein Georgetto Naal.

II. 3.3.4.1 Crescimento e manutenção da cultura de mastócitos da linhagem RBL-2H3

As células RBL-2H3 (BARSUMIAN et al., 1981) foram cultivadas em frascos de cultura de células, com capacidade para 250 mL, em meio mínimo essencial (MEM) contendo sais de Eagle e glutamina, suplementado com 20% de soro fetal bovino e 50,0 µg/mL de gentamicina. O frasco de cultura celular foi colocado em uma incubadora, por um período mínimo de 48 h, a 37 °C, com 5 % de CO₂. Após este período, foi realizado o sub-cultivo celular de RBL-2H3 como descrito abaixo.

Foram adicionados 5 mL de tripsina/EDTA no frasco de cultura de células, o qual foi colocado na incubadora de CO₂, por 5 min, a 37 °C, para inativar as proteínas de adesão e suspender as células no meio de cultura. A suspensão de células foi transferida para um tubo Falcon, de 50,0 mL, contendo 10,0 mL de meio de cultura e centrifugada (1000 rpm/5 min/ 10 °C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 5,0 mL de meio de cultura (aproximadamente 3,50 x 10⁶ células/mL). Esse volume foi ajustado de modo a obter uma suspensão de células igual a 1,00 x 10⁶ células/mL. A partir desta suspensão, foram preparadas novas sub-culturas celulares ou as mesmas foram congeladas para conservar a linhagem celular.

II. 3.3.4.2 Sensibilização das células RBL-2H3

As células RBL-2H3 ($1,50 \times 10^5$ células/mL), foram sensibilizadas pela adição de anti-DNP-IgE (0,85 mg/mL) com um excesso de 5 vezes em relação à concentração de receptores FcεRI. Em seguida, 250 µL da suspensão celular foram colocados em uma placa de cultura de células com 96 poços e estas células foram incubadas durante toda a noite, a 37 °C, e 5 % de CO₂.

II. 3.3.4.3 Quantificação da liberação da enzima β-hexosaminidase pelo ensaio direto

A metodologia deste ensaio direto foi desenvolvida pela própria docente responsável pelo ensaio em colaboração, Prof^a. Dr^a. Rose Mary Z. G. Naal, em seu pós-doutorado nos Estados Unidos, e devidamente publicado em periódico científico, descrito abaixo.

De acordo com Naal e colaboradores (2004), após a sensibilização, as células foram lavadas duas vezes com 200 µL de tampão Tyrodes e pré-tratadas com 100 µL de diferentes concentrações das frações de *B. tenella*, em uma faixa de concentração, que variou entre 0-100 µg/mL, seguido da adição de 100 µL do antígeno DNP-BSA (concentração final 0,1 µg/mL). Em seguida, as células foram incubadas por 60 minutos em uma incubadora de CO₂, a 37 °C. A degranulação mastocitária foi finalizada colocando-se a placa em banho de gelo. A seguir, foram adicionados 100 µL do substrato fluorogênico MUG (4-metil-umbeliferil-*N*-acetil-β-D-glucosaminida) para posterior incubação por 30 min, à temperatura de 37 °C.

O preparo das soluções controle, bem como as medidas de fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}} = 360$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 450$ nm, realizadas em leitor de fluorescência para microplacas Biotek, modelo Synergy-HT), foram conduzidos conforme o ensaio direto na ausência de amostras. As soluções estoque das frações foram preparadas em DMSO na concentração de 1,0 mg/mL e armazenadas em freezer. As soluções estoque de antígeno, substrato e amostra foram diluídas em tampão de Tyrodes.

II. 3.3.4.4 Expressão dos resultados para a liberação de β -hexosaminidase

Os valores para a liberação da β -hexosaminidase foram expressos como a porcentagem da β -hexosaminidase total liberada, de acordo com a fórmula abaixo, determinada pelas células rompidas pelo Triton-X-100:

$$\% \beta\text{-hexosaminidase} = 100 \times \frac{(S - N)}{(T - N)}$$

No qual: (S) Amostra (DNP-BSA (+); ausência ou presença de amostras, células (+)); (N) Normal (DNP-BSA (-); amostra teste (-), células (-)); e (T) Total (DNP-BSA (-); amostra teste (-); Triton-X-100 (+), células (+)).

A liberação espontânea de β -hexosaminidase (controle = ausência da amostra teste e presença de células) foi medida para eliminar componentes não-específicos da degranulação. A reação enzimática foi realizada, também, na presença da solução Tyrodes/BSA (**N**-Normal) para eliminar as interferências causadas pela fluorescência da mesma. Os valores de CI_{50} (concentração da amostra teste necessária para inibir 50% da degranulação mastocitária) foram determinados, graficamente, usando o software Origin® versão 8.0, em curvas de % de β -hexosaminidase liberada versus concentração em escala logarítmica da amostra testada. Cada ensaio biológico foi conduzido em quadruplicata.

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão da média de experimentos conduzidos em quadruplicata. A análise de variância (One-way ANOVA), seguida pelo teste de Dunnett foram usados para a análise estatística. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

Cap. I – Resultados e Discussão

II. 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

II. 4.1. Substâncias identificadas na macroalga *Bostrychia tenella*

De acordo com o exposto na introdução deste capítulo, o interesse em investigar as propriedades químicas e biológicas das algas do gênero *Bostrychia* Montagne se embasa na esplêndida propriedade que as macroalgas vermelhas da família Rhodomelaceae possuem em biossintetizar compostos com grande variedade estrutural. Exemplos são apresentados na Tabela II.1 (p. 16), como pelo gênero *Laurencia*, produtor de terpenos e indóis halogenados, e pelos gêneros *Polysiphonia* e *Rhodomela*, responsáveis pela produção de fenólicos altamente oxigenados e halogenados.

Ancorado na proposta de identificar substâncias halogenadas na alga *Bostrychia tenella* (L. V. Lamouroux) J. Agardh, o direcionamento da exploração química das frações orgânicas obtidas foi norteado pelas análises via CCDC realizadas utilizando as frações BT-H, BT-A, BT-B e BT-M.

Uma vez que as frações apolares da alga *B. tenella* já haviam sido estudadas, inclusive com a publicação de um artigo científico (de FELÍCIO et al., 2010 – Anexo I, p. 201), optou-se pela realização de um estudo da fração BT-H por CG-EM. Inicialmente foi realizado o fracionamento cromatográfico simples (por CLV), pois o material algal nesta etapa do trabalho era proveniente de uma localidade (Praia da Fortaleza, Ubatuba-SP) diferente daquela explorada anteriormente (Ilha das Couves, Ubatuba-SP).

As frações BT-A, BT-B e BT-M foram submetidas à pré-tratamentos para análises em CG-EM, pois esta técnica permitiria uma breve visão sobre a ocorrência de metabólitos halogenados na alga. Logo, a fração BT-A mostrou-se a única contendo halogenados, e por isso foi escolhida como foco principal para o estudo químico de *B. tenella*.

II. 4.1.1 Metabólitos identificados das subfrações de BT-H

O fracionamento cromatográfico de BT-H resultou em 6 subfrações (item II.3.2.3, p. 34), as quais foram submetidas a análises por CG-EM. A seguir, a Tabela II.7 apresenta dados referentes à constituição química das amostras. Para a construção desta tabela, foram considerados somente os compostos com no mínimo 1% de área do pico, em relação ao cromatograma total obtido da análise de cada subfração.

As estruturas químicas dos metabólitos identificados na fração de BT-H estão apresentadas na Figura II.4 (p. 50). Foram identificados compostos de diversas classes químicas: alcanos (**4, 7**), alcenos (**5, 6, 10, 11, 17**), aldeídos (**3, 8, 12, 33-35**), ácidos graxos e seus ésteres metilados (**1, 9, 19-25, 27, 29-31**), diterpenos e derivados (**13-16**), esteróides (**37-39**), um álcool (**36**), uma cetona (**18**), uma lactona (**32**), e metabólitos contendo nitrogênio (**2, 32**).

Alguns compostos não tiveram seus valores de Índice de Retenção (IR) encontrados na literatura consultada, e foram identificados através da similaridade de seus perfis de fragmentação química com os padrões das bibliotecas Wiley7 e Nist. Ainda, alguns metabólitos (NI) não puderam ser identificados nem mesmo através da comparação com os padrões destas bibliotecas. Entretanto, estes últimos apresentam-se como substâncias minoritárias nas subfrações, e consequentemente, na fração BT-H.

Tabela II.7 - Composição química das subfrações de BT-H.

t_R	IR	MI	Substância	H.1	H.2	H.3	H.4	H.5	H.6
4,776	-	EM	Ácido hexanóico				1,16		
10,55	1241,3	EM, IR ^{a*}	3-etil-4-metil-1H-Pirrol- 2,5-diona				2,69		
11,005	1267,3	EM, IR ^b	(E)-Dec-2-enal				3,47		
14,421	1496,0		NI			1,23			
14,477	1500,4	EM, IR ^c	Pentadecano	1,03					
16,699	1680,5	EM, IR ^b	(E)-Heptadec-8-eno	3,48					
16,804	1689,4	EM, IR ^b	Heptadec-1-eno	8,38					
16,875	1695,4		NI	14,69					
16,953	1701,9	EM, IR ^c	Heptadecano	15,28					
17,148	1717,5	EM, IR ^b	Pentadecanal			1,63		2,25	7,03
17,150	1717,7		NI	19,43					
17,221	1723,4	EM, IR ^b	Tetradecanoato de metila		4,21	1,73			
17,529	1748,1		NI	1,38					
17,955	1782,2	EM	(E)-Octadec-9-eno	1,68					
18,059	1790,6	EM, IR ^d	Octadec-1-eno	2,02					
18,479	1819,2	EM, IR ^b	Hexadecanal					1,93	3,64
18,722	1834,4	EM, IR ^{a*}	2,6,10-trimetil-14-etileno-14-pentadeceno (neofitadieno)				13,9	3,25	5,16
18,813	1840,3	EM, IR ^{a*}	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (hexaidrofarnesil acetona)		1,06	5,05	3,25	5,04	2,78
19,100	1858,4	EM, IR ^a	2,6,10,14-tetrametil-hexadec-2-eno (fit-2-eno)				2,9	4,59	
19,419	1878,6	EM, IR ^a	2,6,10,14-tetrametil-hexadecadieno (fitadieno)				4,37	6,98	1,71
19,667	1894,3	EM, IR ^e	Nonadec-1-eno	1,54					

Continua

"Produtos naturais marinhos: identificação de metabólitos fenólicos halogenados na macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) e potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados"

Continuação

t_R	IR	MI	Substância	H.1	H.2	H.3	H.4	H.5	H.6
19,835	1903,2	EM, IR ^f	Heptadecan-2-ona					1,54	
19,903	1906,9	EM, IR ^b	(Z)-Hexadecen-9-ato de metila		9,09				
20,152	1918,7		NI			3,74	3,51		
20,322	1926,6	EM, IR ^b	Hexadecanoato de metila	2,57	1,67	22,13			2,75
21,220	1969,1	EM, IR ^e	Ácido hexadecanóico				2,58	2,6	
21,827	1997,7	EM	2-oxo-Hexadecanoato de metila					2,24	4,5
23,849	2082,1		NI			2,42	1,17		
24,144	2094,4	EM, IR ^b	(Z,Z)-Octadeca-9,12-dienoato de metila		1,02				1,56
24,285	2100,7		NI						2,43
24,307	2101,2		NI					1,15	
24,307	2101,3		NI			6,8	2,23		
24,416	2106,1		NI				1,03		
24,437	2107,1	EM, IR ^g	(Z)-Octadec-9-enoato de metila		31,14	1,73			
24,553	2112,3	EM	(Z)-Octadec-11-enoato de metila		12,38				
24,926	2129	EM, IR ^h	(E)-(7R,11R)-3,7,11,5-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol (fitol)				2,51	12,58	8,68
24,960	2130,5	EM	Octadecanoato de metila		4,68				
25,217	2142,1		NI			1,13	1,67	1,09	
25,551	2157,1		NI					2,55	
26,020	2178,1		NI					2,46	4,68
26,166	2184,7	EM, IR ^{a*}	Hexadecanamida						4,29
26,254	2188,6		NI						4,24
26,797	2213,9		NI						1,62

Continua

Conclusão

t_R	IR	MI	Substância	H.1	H.2	H.3	H.4	H.5	H.6
26,787	2213,4	EM	Nonadec-10- enoato de metila		11,14	2,81			
28,192	2281,2	EM	9,10-epoxi-Octadecanoato de metila		1,4				
28,504	2296,2		NI						2,37
28,827	2312,7	EM	Eicos-11-enoato de metila		4,13				
28,939	2318,6		NI			1,91			
29,500	2347,9	EM, IR ^{a*}	4,8,12,16-tetrametil-heptadecan-4-olideo			1,49			
29,664	2356,5		NI			3,73			
29,815	2364,4		NI						1,26
31,818	2473,7		NI					2,14	1,27
32,586		EM	(Z)-Octadec-9-enal					2,03	1,73
32,912		EM	Octadecanal					1,61	2,61
34,701		EM	(Z)-Octadec-13-enal					3,26	6,92
39,599			NI			3,84	5,25		
39,889		EM	Eicosanol	1,6					
40,261			NI	1,44					
43,962			NI						2,53
43,977			NI				6,48		
44,389		EM	3 β -colest-5-en-3-ol (Colesterol)			10,5	13,53		
44,401			NI						2,8
45,944		EM	3,5-Colestadien-7-ona			1,4	2,07		
46,929		EM	Colest-4-en-3-ona				1,09		
47,795			NI					1,15	2,1

Legenda: t_R - tempo de retenção; IR – Índice de Retenção; MI – Modo de identificação; EM – espectrometria de massas; NI - não identificado. Referências: a. de FELÍCIO et al., 2010; b. OLIVEIRA, et al., 2009; c. ADAMS, 1995; d. UTSONOMIYA et al., 2005; e. RADULOVIC et al., 2007; f. MIYAZAWA; HORIUCHI; KAWATA, 2007; g. ANSORENA et al., 2001; SKALTZA et al., 2003. *considerado identificado, mesmo não apresentando IR próximo, pois ocorreu em *B. tenella* em trabalho já publicado.

Ácido hexanóico (1)

(E)-Dec-2-enal (3)

(E)-Heptadec-8-eno (5)

Heptadecano (7)

Tetradecanoato de metila (9)

Octadec-1-eno (11)

2,6,10-trimetil-14-etileno-14-pentadeceno (neofitadieno) (13)

2,6,10,14-tetrametil-hexadec-2-eno (fit-2-eno) (15)

Nonadec-1-eno (17)

3-etil-4-metil-1H-Pirrol-2,5-diona (2)

Pentadecano (4)

Heptadec-1-eno (6)

Pentadecanal (8)

(E)-Octadec-9-eno (10)

Hexadecanal (12)

6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (hexaidrofarnesil acetona) (14)

2,6,10,14-tetrametil-hexadecadieno (fitadieno) (16)

Heptadecan-2-ona (18)

(Z)-Hexadecen-9-ato de metila (19)

Hexadecanoato de metila (20)

Ácido hexadecanóico (21)

2-oxo-Hexadecanoato de metila (22)

(Z,Z)-Octadeca-9,12-dienoato de metila (23)

(Z)-Octadec-9-enoato de metila (24)

(Z)-Octadec-11-enoato de metila (25)

(E)-(7R,11R)-3,5,7,11-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol (fitol) (26)

Octadecanoato de metila (27)

Hexadecanamida (28)

Nonadec-10-enoato de metila (29)

9,10-epoxi-Octadecanoato de metila (30)

Eicos-11-enoato de metila (31)

4,8,12,16-tetrametil-heptadecan-4-olideo (32)

Figura II.4 - Estruturas químicas dos metabólitos identificados nas subfrações de BT-H.

No total, foram identificadas 39 substâncias nas subfrações de BT-H, sendo que destas, 24 foram identificadas tanto por comparação de EM com bancos de dados (bibliotecas WILEY 7.0 e Nist), quanto pelo IR compatível com a literatura consultada (referências apresentadas no rodapé da Tabela II.7), considerando uma faixa de variação de até ± 10 .

Ainda foram detectados 26 picos que não puderam ser identificados devido às características químicas peculiares dos compostos marinhos. Esta dificuldade evidencia a escassez de informações metabólicas sobre os organismos marinhos,

incentivando pesquisadores a utilizarem bancos de dados específicos para obterem mais respostas sobre a química dos seres oceânicos.

Vale destacar que o emprego da técnica hifenada CG-EM implica em algumas limitações que comprometem a detecção de alguns metabólitos. Este tipo de análise se limita às substâncias que possam ser volatilizadas no gradiente de temperatura empregado (BONATO, 2006; CROTTI et al., 2008; NIESSEN, 2001). Adicionalmente, existem as limitações do modo de detecção – espectrometria de massas com analisador quadrupolo – que, apesar de ser um detector universal e amplamente empregado, apresenta restrições relacionadas à sensibilidade e às características químicas de determinados metabólitos (SANTOS; GALCERAN, 2003).

Em resposta à estas limitações, outra técnica hifenada, como por exemplo CL-EM, poderia ter sido usada. Entretanto, devido à baixa polaridade das subfrações, o uso desta alternativa foi descartado em nosso laboratório, já que a rotina de análises dos cromatógrafos líquidos do Laboratório de Química Orgânica da FCFRP se restringe à utilização em fase reversa. Além disso, como já explicado, este esforço não seria o foco do trabalho em questão.

II. 4.1.2 Ocorrência e relevância dos metabólitos identificados das subfrações de BT-H

A importância do estudo de componentes voláteis de matrizes naturais, a priori, está na investigação de relações ecológicas entre os seres, devido à comunicação química estabelecida pelas diversas espécies (D’ALESSANDRO; TURLINGS, 2006; DICKE, 2009; KEGGE, PIERIK, 2010). Ademais, esta exploração da produção de substâncias que volatilizam à temperatura ambiente em seres vivos se estende à aplicações para a economia humana, como por exemplo, a obtenção de aromas naturais relevantes para a indústria de perfumes e fragrâncias, indústria alimentícia, farmacêutica, agrícola, dentre outras (NIESSEN, 2001).

Macroalgas marinhas são profícuas produtoras de gases biogênicos, os quais geralmente estão correlacionados com respostas químicas de defesa à herbivoria (FINK, 2006; KLADI; VAGIAS; ROUSSIS, 2005; WIESEMEIER; HAY; POHNERT, 2007). Entretanto, estudos de metabólitos voláteis marinhos e suas funções

“Produtos naturais marinhos: identificação de metabólitos fenólicos halogenados na macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) e potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados”

ecológicas permanecem potencialmente desconhecidos (KLADI; VAGIAS; ROUSSIS, 2005). A espécie *Bostrychia tenella* foi estudada neste intento, já que habita a face escura de costões rochosos, sendo este lugar preterido por insetos e outros animais marinhos para proteção e alimentação (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002). Logo, a necessidade de proteção da alga em relação a estes parasitas e predadores poderia vir de compostos voláteis com funções ecológicas.

No estudo realizado com espécies do gênero *Bostrychia*, *Bostrychia radicans* do manguezal apresentou quantidade considerável de aldeídos α,β -insaturados (41%), os quais possuem função de defesa ao causarem efeitos prejudiciais no processo de reprodução de seus predadores, e também apresentam atividade antibiótica (OLIVEIRA et al., 2009). Em *B. tenella*, a análise dos voláteis por HS-SPME demonstrou apenas traços destes aldeídos (OLIVEIRA et al., 2009), e os metabólitos **3** e **34** reforçam a ocorrência deste tipo de metabólito na alga.

O composto 3β -colest-5-en-3-ol (colesterol) e derivados esteróides apresentam larga ocorrência em diversos organismos marinhos, inclusive em algas (BHAKUNI; KAWAT, 2005; GINER, 1993; KERR; BAKER, 1991; SARMA; KRISHNA; PASHA, 2006; STONIK, 2001). Análises envolvendo diferentes classes de algas demonstraram que o perfil de esteróides vem sendo considerado um importante parâmetro para o estabelecimento de relações quimiotaxonômicas (YIN et al., 2005). Rodofíceas são conhecidas pela produção do colesterol, além do demosterol e o 22-deidrocolesterol; feofíceas apresentam predominantemente o fucosterol; e clorofíceas possuem um padrão mais variado de esteróis como o condilasterol, poriferasterol, ergosterol e o próprio colesterol (BHAKUNI; RAWAT, 2005).

Os ácidos graxos e derivados esterificados identificados (**1**, **9**, **19-25**, **27**, **29-31**) também são relatados com frequência em espécies de algas marinhas (BARNATHAN, 2009; BERGÉ; BARNATHAN, 2005). Esta semelhança evidencia o papel das algas como base da complexa cadeia alimentar marinha, já que ácidos graxos são essenciais aos organismos vivos e precisam ser obtidos de fontes alimentares primárias (BERGÉ; BARNATHAN, 2005).

Existem dezenas de publicações a respeito da ocorrência do ácido hexadecanóico (**21**) e derivados em espécies de algas da família Rhodomelaceae, como *Acanthophora nayadiformis* (POLAT; OZOGUL, 2008), *Chondria armata*

(GOVENKAR; WAHIDULLA, 1999); *Laurencia aldingenses* (CARVALHO et al., 2006); *Polysiphonia denudata*, *Laurencia papilosa*, *Laurencia coronopus* (KAMENARSKA et al., 2006), *Laurencia okamurai*, *Polysiphonia urceolata*, *Rhodomela confervoides* (LI et al., 2002), dentre outras.

O fitol (**26**) é um diterpeno alifático de cadeia carbônica longa e ramificada encontrado em abundância na natureza devido à sua participação na biossíntese da clorofila (GLOERICH et al., 2007). É caracterizado pela ampla distribuição em espécies de algas verdes, e também já foi isolado da espécie de alga vermelha *Laurencia nipponica* (LYAKHOVA et al., 2004). Quanto a informações farmacológicas deste diterpeno, o fitol foi responsável pela inibição do crescimento do microrganismo patogênico *Staphylococcus aureus* (INOUE et al., 2005), e também foi ativo em ensaios com as linhagens celulares tumorais HT-29 (cólon), MG-63 (osteosarcoma) e AZ-521 (células gástricas) (LEE et al., 1999).

Por outro lado, a ocorrência do diterpeno neofitadieno (**13**) não é comum em organismos de origem marinha. Relatos científicos reportam a identificação deste composto na combustão de cigarros (RODGMAN, 1959) devido à sua ocorrência frequente em folhas de tabaco. Ainda, o neofitadieno foi relatado como componente majoritário do óleo essencial do produto tabaco semi-oriental (Otja), e esta amostra apresentou forte atividade antibacteriana frente *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (STOJANOVIC et al., 2000).

Sendo assim, o presente estudo sobre os voláteis de *Bostrychia tenella* contribuiu para o aumento do conhecimento da diversidade química volátil desta alga, permitindo reflexões sobre a ecologia química de algas marinhas e seu papel como fonte de substâncias voláteis.

II. 4.1.3. Metabólitos identificados nas subfrações de BT-A

O fracionamento cromatográfico da fração BT-A resultou, inicialmente em 17 subfrações (Cap. I, item II.3.2.4, p. 36), as quais foram posteriormente subdivididas (p. 37). Deste modo, as 34 subfrações de BT-A foram analisadas por CG-EM, e algumas subfrações apresentaram substâncias fenólicas simples e derivados halogenados em sua composição. Os metabólitos identificados nas subfrações BT-

A.8act, BT-A.10act e BT-A.12act (Apêndice A, Figuras VI.1-VI.3, p 165-167) estão apresentados sequencialmente, na Figura II.5.

Ácido benzóico (40)

4-hidroxibenzaldeído (41)

4-hidroxibenzoato de metila (42)

4-(hidroximetil)fenol (43)

4-(metoximetil)fenol (44)

Ácido 2-(4-hidroxifenil)acético (45)

2-(4-hidroxifenil)acetato de metila (46)

3-bromo-4-hidroxibenzaldeído (47)

3-cloro-4-hidroxibenzoato de metila (48)

3-bromo-4-hidroxibenzoato de metila (49)

4-hidroxi-3-iodobenzoato de metila (50)

3,5-dicloro-4-hidroxibenzoato de metila
(51)

3,5-dibromo-4-hidroxibenzoato de metila
(52)

3-bromo-5-cloro-4-
hidroxibenzoato de metila
(53)

3-cloro-4-hidroxi-5-
iodobenzoato de metila
(54)

3-bromo-4-hidroxi-5-
iodobenzoato de metila
(55)

3-cloro-4-(hidroximetil)fenol (56)

3-bromo-4-(hidroximetil)fenol (57)

2-cloro-4-
(metoximetil)fenol (58)

2-bromo-4-
(metoximetil)fenol (59)

2-iodo-4-
(metoximetil)fenol (60)

2-(3-cloro-4-
hidroxifenil)acetato de
metila (61)

2-(3-bromo-4-
hidroxifenil)acetato de
metila (62)

2-(4-hidroxi-3-
iodofenil)acetato de metila
(63)

Figura II.5. Substâncias fenólicas e halogenadas identificadas das subfrações de BT-A da alga *Bostrychia tenella*.

Como estratégia para identificação dos compostos fenólicos, além da ferramenta de comparação de espectros contidos em bancos de dados (WILEY 7.0 e Nist), padrões comerciais foram analisados nas mesmas condições que as subfrações de BT-A. Os tempos de retenção (t_R) também foram considerados como fatores comparativos a fim de aumentar a credibilidade das identificações.

Para os compostos halogenados derivados dos respectivos compostos fenólicos, serão apresentadas propostas estruturais baseadas nos perfis de fragmentação química de seus “precursores”.

A fim de delinear o raciocínio que nos levou a proposição destas estruturas, inicialmente devemos destacar que devido às substâncias fenólicas terem sido identificadas antes das halogenadas (explicação em subitens a seguir), os perfis de fragmentação destes compostos indicaram eliminações que se repetiam em outras substâncias, no caso, halogenadas. Além disto, o fato de estarmos identificando fenóis simples nos permitiu confiar nos picos dos íons moleculares detectados. O sistema aromático consegue acomodar consideravelmente o cátion-radical gerado na molécula, atribuindo a este pico uma intensidade notável (PAVIA et al., 2009).

A observação da presença de metabólitos halogenados nas amostras de BT-A surgiu, essencialmente, da observação da propriedade isotópica dos átomos cloro e bromo. Ambos possuem isótopos com duas unidades de massa atômicas a mais ($M+2$), numa proporcionalidade relevante que permite suas identificações em espectrometria de massas. O elemento cloro é constituído pela proporção 3:1 de ^{35}Cl e ^{37}Cl , enquanto que o bromo apresenta-se na natureza em proporção equivalente (1:1) de ^{79}Br e ^{81}Br . Deste modo, quando uma substância apresenta estes átomos, os picos dos EM aparecem de modo característico M , $M+2$, indicando a presença destes halogênios (PAVIA et al., 2009). O átomo iodo não apresenta isotopia interessante para este tipo de análise, porém perdas de 127 u.m.a. em alguns espectros nos fizeram suspeitar da presença de metabólitos iodados.

Finalmente, faltava esclarecer porque os halogênios foram inseridos na posição *orto* do anel aromático em relação ao grupo hidroxila. Partindo do princípio que os precursores eram anéis fenólicos 1,4-dissubstituídos, as possíveis posições para substituições nos anéis aromáticos seriam *orto* ou *meta* à hidroxila. Observando os espectros de massas dos derivados halogenados, notamos frequentemente a perda de HR ($\text{R} = \text{Cl}, \text{Br}$), mecanismo que, segundo Folk e

Wideman (1969), ocorre com maior facilidade em *orto*-halofenóis, devido à proximidade dos grupos. Neste artigo, os autores destacam que as eliminações de CO e COH, características dos fenólicos, competem com as eliminações de halogênio e seus hidretos (HCl, HBr e HI).

A literatura não dispõe de muitos estudos a respeito deste tipo de substâncias nestas condições de análise. Mesmo assim, nossas propostas de fragmentação vêm de encontro ao que se prevê para substâncias fenólicas halogenadas, justificando a linha de raciocínio estabelecida.

Vale ainda ressaltar que picos decorrentes e comuns em anéis benzênicos (m/z 79, 78, 77 e degradações), bem como perdas eventuais de hidrogênio (M-1) não foram consideradas determinantes para a elucidação das estruturas, mas reforçaram a proposta inicial de que os halogenados são derivados dos fenólicos (PAVIA et al., 2009).

Sequencialmente estão apresentados os metabólitos fenólicos identificados nas subfrações de BT-A, bem como seus derivados halogenados. Para verificação da ocorrência e distribuição destes metabólitos nas algas, no ambiente marinho ou mesmo como produtos naturais ou novas estruturas químicas, foram utilizados os bancos de dados CAPLUS e MEDLINE (consultados através do programa SciFinder Scholar[®], versão 2007).

II. 4.1.3.1. Identificação do 4-hidroxibenzoato de metila e derivados halogenados

Os EM que permitiram a identificação do metabólito 4-hidroxibenzoato de metila (**42**) encontram-se na Figura II.6.

Figura II.6 - Identificação do metabólito **42**. A) EM da subfração BT-A.8ac, $t_R = 7,512$ min; B) EM do banco de dados consultado apresentando 96% de similaridade; C) EM obtido a partir do padrão comercial, $t_R = 7,517$ min, apresentando 97% de similaridade.

Com base na comparação dos dados demonstrados na Figura II.6, pode-se verificar a presença do metabólito **42** na alga *Bostrychia tenella*. Podemos observar que do íon molecular (m/z 121) coincide até mesmo na intensidade apresentada nos diferentes espectros, bem como os demais picos em destaque (m/z 93 e m/z 65).

Fundamentado no perfil de fragmentação da substância **42** por impacto de elétrons, os derivados monohalogenados deste metabólito foram propostos, seguindo o esquema apresentado na Figura II.7 e confirmado pelos dados presentes na Figura II.8.

Figura II.7 - Proposta geral de fragmentação química por impacto de elétrons dos derivados monohalogenados do metabólito **42**.

De acordo com a Figura II.7, o íon molecular $\text{M}^{\bullet+}$ sofre a perda do radical oximetílico ($\cdot\text{OCH}_3$), formando um cátion acílio $[\text{M}-31]^+$, altamente estável, sendo este íon o pico base. Em seguida, a perda de CO levou à formação do cátion halofenílico $[\text{M}-59]^+$, do qual a quebra sequencial apresenta competição entre a perda dos fragmentos CO/COH e a perda dos fragmentos halogenados HR/R (FOLK; WIDEMAN, 1969).

Podemos observar na Figura II.8 que o padrão de fragmentação do 4-hidroxibenzoato de metila (picos $\text{M}^{\bullet+}$, $[\text{M}-31]^+$, $[\text{M}-59]^+$ e $[\text{M}-87]^+$) foi mantido para os EM em evidência, indicando a halogenação deste metabólito na posição *orto* do anel fenólico.

Figura II.8 - Derivados halogenados da substância **42** identificados nas subfrações de BT-A. (Em cada letra: EM do metabólito, fórmula e peso molecular, fórmula estrutural e nomenclatura química).

A possibilidade de dihalogenação foi considerada quando se notou a presença de picos M+4 como picos de íon molecular e como picos bases para EM de alguns compostos, como se pode observar nas Figuras II.9 e II.10. Com a finalidade de distinguir semanticamente os metabólitos, estes foram classificados como “di-homo-halogenados” e “di-hetero-halogenados”, para fazer referência aos compostos que, respectivamente, possuísem dois átomos de halogênios iguais e dois átomos diferentes.

Figura II.9 - Derivados di-homo-halogenados da substância **42** identificados nas subfrações de BT-A. (Em cada letra: EM do metabólito, fórmula e peso molecular, formula estrutural e nomenclatura química).

Figura II.10 - Derivados di-hetero-halogenados da substância **42** identificados nas subfrações de BT-A. (Em cada letra: EM do metabólito, fórmula e peso molecular, fórmula estrutural e nomenclatura química).

II. 4.1.3.1.1 Ocorrência e relevância do 4-hidroxibenzoato de metila e derivados halogenados

O metabólito 4-hidroxibenzoato de metila (**42**), usualmente conhecido como metilparabeno é integrante de uma série de compostos denominados parabenos, utilizados amplamente como conservantes na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, devido às suas propriedades microbiostáticas (ação em fungos,

bactérias gram-positivas e gram-negativas) (ANDERSEN, 2008; MEYER et al., 2007; SONI et al., 2002). Seu mecanismo de ação provém da capacidade de inibição da captação microbiana por aminoácidos e outras substâncias essenciais para seus suprimentos energéticos (ANDERSEN, 2008). Mais especificamente, o metilparabeno causa falhas em mitocôndrias dependentes da indução da transição de permeabilidade da membrana, acompanhada pela despolarização mitocondrial e depleção de ATP celular através de desacoplamento da fosforilação oxidativa (SONI et al., 2002).

Na natureza, o metabólito **42** é encontrado em cloudberries (*Rubus chamaemorus*), maracujá amarelo, vinho branco, e baunilha (SONI et al., 2002). Ainda, foi isolado do fungo *Cladosporium* sp. associado com a alga vermelha *Porphyra yezoensis* (DING et al., 2008), e do fungo *Penicillium* sp. isolado de sedimentos marinhos (LIU et al., 2010). Entretanto, não há relatos deste composto isolado diretamente a partir de algas marinhas.

Os derivados halogenados da substância **42**, 3-cloro-4-hidroxibenzoato de metila (**48**), 3-bromo-4-hidroxibenzoato de metila (**49**) e 4-hidroxi-3-iodobenzoato de metila (**50**); 3,5-dicloro-4-hidroxibenzoato de metila (**51**); 3-5-dibromo-4-hidroxibenzoato de metil (**52**); 3-bromo-5-cloro-4-hidroxibenzoato de metila (**53**); 3-cloro-4-hidroxi-5-iodobenzoato de metila (**54**) e 3-bromo-4-hidroxi-5-iodobenzoato de metila (**55**) possuem ocorrência muito mais restrita do que seu derivado fenólico. Na série de clorofenóis biossintetizados por diversos fungos basidiomicetos relatados por VERHAGEN, SWARTS e FIELD (1998) e FIELD, VERHAGEN e JONG (1995), foram identificados o metabólito **51**, o ácido da substância **48** e ainda outros derivados semelhantes.

O metabólito 3-bromo-4,5-dihidroxibenzoato de metila, quimicamente parecido com o metabólito **52**, foi isolado da alga vermelha *Rhodomela confervoides* (FAN; XU; SHI, 2002; FAN; XU; SHI, 2003), e apresentou atividade citotóxica potente em células tumorais das linhagens KB, Bel7402, A549 e HELF (HAN et al., 2005). O ácido do metabólito **49** foi identificado por CLAE em fase reversa nas espécies de algas vermelhas *Rhodomela larix* e *Prionitis lyallii*, sendo majoritário nesta última (PHILLIPS; TOWERS, 1981). Vale ainda destacar que derivados do ácido do metabólito **42**, mostraram atividade antitiroxina quando testados em ratos (WILKINSON, SHEAHAN; MACLAGAN, 1951).

Outros relatos sobre estes metabólitos remetem-se à utilização em processos sintéticos ou como intermediários destes. Deste modo, pode-se sugerir que os metabólitos **42**, **48** e **51** são relatados pela primeira vez em algas marinhas; as substâncias **49**, **50**, **52** e **53** estão sendo descritas pela primeira vez como produtos naturais, e, de acordo com a base pesquisada, os metabólitos **54** e **55** são inéditos, pois não há descrição na literatura para estes compostos.

II. 4.1.3.2. Identificação do 2-(4-hidroxifenil)acetato de metila e derivados halogenados

Os EM que permitiram a identificação do metabólito 2-(4-hidroxifenil)acetato de metila (**46**) estão apresentados na Figura II.11.

Figura II.11 - Identificação do metabólito **46**. L) EM da subfração BT-A.8ac, $t_R = 7,767$ min; M) EM do banco de dados consultado apresentando 97% de similaridade; N) EM obtido a partir do padrão comercial, $t_R = 7,777$ min, apresentando 97% de similaridade.

Baseado nos dados comparativos expostos na Figura II.11, a presença do fenólico **46** foi confirmada na alga *B. tenella*. É notável a coincidência das ocorrências e intensidades de picos, correspondendo ao alto índice de similaridade encontrado para este metabólito. Na Figura II.12 é demonstrado a proposta de fragmentação para a identificação dos derivados halogenados a partir do metabólito **46**.

Figura II.12 - Proposta geral de fragmentação química por impacto de elétrons dos derivados halogenados a partir do metabólito **46**.

Através da observação da Figura II.12, o íon molecular do composto **46** perde do radical oximetílico, formando um cátion estável, caracterizando o íon do pico base. Como no caso do 4-hidroxibenzoato de metila, perdas de CO e a proeminente competição entre as perdas dos fragmentos CO/COH e HR/R determinam o montante principal de picos para estes compostos.

Salientado pela breve discussão acima, ao observarmos a Figura II.13 notamos o perfil de fragmentação do precursor sendo mantido (picos M^{*+} , $[M-31]^+$, $[M-59]^+$ e $[M-87]^+$), apontando, como consequência, a *orto*-halogenação do 2-(4-hidroxifenil)acetato de metila.

Figura II.13 - Derivados halogenados do composto **46** identificados nas subfrações de BT-A. (Em cada letra: EM do metabólito, fórmula e peso molecular, fórmula estrutural e nomenclatura química).

II. 4.1.3.2.1 Ocorrência e relevância do 2-(4-hidroxifenil)acetato de metila e derivados halogenados

O metabólito 2-(4-hidroxifenil)acetato de metila (**46**) já foi isolado da alga vermelha *Gymnogongrus flabelliformis*, juntamente com uma série de outros derivados fenólicos, sendo que alguns mostraram atividade citotóxica frente linhagens tumorais (YUAN et al., 2007). Ainda, a substância **46** foi considerada ativa em ensaios envolvendo fungos filamentosos fitopatogênicos e bactérias relacionadas à contaminação de alimentos (MAO et al., 2006), e foi relatada como

constituente de um extrato que apresentou potencial antimicrobiano frente *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (WU et al., 2004).

Para os derivados halogenados do metabólito **46**, o 2-(3-cloro-4-hidroxifenil)acetato de metila (**61**), 2-(3-bromo-4-hidroxifenil)acetato de metila (**62**) e o 2-(4-hidroxi-3-iodofenil)acetato de metila (**63**), temos que o ácido do composto **61** foi isolado de basidiomicetos, destacando que estudos prévios citados indicam que metabólitos clorados anisólicos são sintetizados a partir de tirosina em fungos (FIELD; VERHAGEN; JONG, 1995).

Incubações da alga *Odonthalia floccosa* com o metabólito **45** e fonte de bromo levaram à produção do ácido do metabólito **62**, indicando a presença de haloperoxidases ativas nesta alga (MANLEY; CHAPMAN, 1979). Adicionalmente, é citada a ocorrência dos ácidos 2-(3,5-dibromo-4-hidroxi)acético e 3-(3,5-dibromo-4-hidroxifenil)-2-oxopropiônico na alga *Halopitya incurvus*.

Davis, Watters e Healy (2005), investigando a química do microfungo *Xylaria* sp., isolaram o ácido do metabólito **61** e ainda um derivado nitrogenado deste, o qual foi base para a síntese de derivados clorofenólicos que demonstraram inibição seletiva enzimática em carbonato-anidrases, enzima humana importante na fisiopatologia de diversas doenças (DAVIS et al., 2010).

Apesar da ocorrência dos ácidos descritos para as substâncias **61**, **62** e **63**, não há descrição dos respectivos ésteres metilados na literatura como sendo produtos naturais.

II. 4.1.3.3. Identificação do 4-(hidroximetil)fenol e derivados halogenados

Seguindo no mesmo delineamento teórico, os EM que permitiram a identificação do metabólito 4-(hidroximetil)fenol (**43**) são apresentados na Figura II.14.

Figura II.14 - Identificação do metabólito **43**. R) EM da subfração BT-A.8ac, $t_R = 6,634$ min; S) EM do banco de dados consultado apresentando 95% de similaridade; T) EM obtido a partir do padrão comercial, $t_R = 6,479$ min, apresentando 94% de similaridade.

A presença do metabólito **43** pode ser confirmada devido à semelhança entre os EM provenientes da amostra de alga, biblioteca consultada e padrão. Analogamente, o perfil de fragmentação para o metabólito **43** é apresentado na Figura II.15, sendo base para a identificação dos metabólitos halogenados 3-cloro-4-(hidroximetil)fenol (**56**) e 3-bromo-4-(hidroximetil)fenol (**57**) (Figura II.17).

A compreensão da Figura II.15 indica que o íon molecular do metabólito **43** perde uma hidroxila radicalar através de um mecanismo concertado. Entretanto, neste caso, o íon formado não seria o íon do pico base. A proposta para formação do íon do pico base está demonstrada na Figura II.16. Ainda, após a perda da hidroxila radicalar, novamente a competição entre as eliminações CO/COH e HR/R determinam o restante da fragmentação deste composto. Adicionalmente, vale frisar que o pico correspondente ao anel benzênico com perda de um substituinte (m/z 77) aparece intenso, equiparando-se com o pico base não foi usado como informação para elaboração das propostas estruturais.

Para os derivados **56** e **57**, temos a mesma sequência de fragmentação, verificada de acordo com a Figura II.15, com destaque para a não ocorrência de picos relativamente muito intensos referentes à perda M-29 (Figura II.16) que originou o pico base para o metabólito **43**, e que os picos $[M-R]^{+}$, sendo R = Cl ou

Br, aparecem intensos para estes compostos, indicando a perda preferencial dos halogênios ao invés dos haletos de hidrogênio.

Figura II.15 - Proposta geral de fragmentação química por impacto de elétrons dos derivados halogenados do metabólito **43**.

Figura II.16 - Proposta de fragmentação do metabólito **43** para a formação do pico base m/z 95.

Figura II.17 - Derivados halogenados do metabólito **43** identificados nas subfrações de BT-A. (Em cada letra: espectro de massas do metabólito, fórmula e peso molecular, formula estrutural e denominação química).

II. 4.1.3.3.1 Ocorrência e relevância do 4-(hidroximetil)fenol e derivados halogenados

O composto 4-(hidroximetil)fenol (**43**) é uma substância fenólica amplamente distribuída em espécies de plantas, incluindo algumas utilizadas na medicina popular (LIM et al., 2007). Há uma extensa literatura sobre a substância **43** tanto em relação à ocorrência em algas, quanto seu papel na biossíntese de metabólitos bromados, além de algumas propriedades biológicas relacionadas. Este metabólito fenólico é biossintetizado em algas a partir do 4-hidroxibenzaldeído (**41**) durante o metabolismo da *L*-tirosina, através de uma via que envolve desidrogenases, cujo substratos são compostos fenólicos ou derivados do álcool benzílico (MANLEY; CHAPMAN, 1979). Sua participação na biossíntese do composto 2,4,6-tribromofenol foi confirmada em estudos utilizando a alga verde *Ulva lactuca* (FLODIN; WHITFIELD, 1999). Ainda, foi relatado seu isolamento da alga vermelha *Vidalia* sp.

(YOO et al., 2002) e do fungo *Cladosporium* sp. associado à alga vermelha *Porphyra yezoensis* (DING et al., 2008).

Em termos de atividade biológica, a sustância **43** foi potencialmente antioxidante, com menores efeitos pró-oxidantes, quando comparado com a vanilina (LIU; MORI, 1993). Foi demonstrado também seu potencial anti-angiogênico, antiinflamatório, anti-nociceptivo (LIM et al., 2007), além da atuação protetora em células neuronais (YU et al., 2005; KIM et al., 2007).

Sobre os derivados halogenados do metabólito **43**, o 3-cloro-4-(hidroximetil)fenol (**56**) e o 3-bromo-4-(hidroximetil)fenol (**57**), há poucas referências na literatura, assim como os derivados halogenados anteriormente discutidos.

O metabólito **56** ainda não foi descrito como produto natural. Ao contrário, em treze diferentes espécies de algas da família Rhodomelaceae dos gêneros *Polysiphonia*, *Rhodomela* e *Haloptis* foram identificados diversos fenóis simples por CG-EM, incluindo o metabólito **57** e seu correlato dibromado, o 3,5-dibromo-4-(hidroximetil)fenol, sendo que este último apresentou atividade antibacteriana em *Bacillus subtilis* (GLOMBTZA et al., 1974). A fração antioxidante da alga *Polysiphonia urceolata*, analisada por CG-EM, apresentou em sua composição a substância **57**, e, majoritariamente, o metabólito 5-bromo-3,4-dihidroxibenzaldeído (FUJIMOTO; KANEDA, 1984).

Sendo assim, temos que o metabólito **56** receberia o primeiro relato como produto natural e que os metabólitos **43** e **57** seriam relatados pela primeira vez no gênero *Bostrychia*.

II. 4.1.3.4. Identificação do 4-(metoximetil)fenol e derivados halogenados

Continuando a identificação dos compostos químicos da alga *Bostrychia tenella*, o metabólito 4-(metoximetil)fenol (**44**) pode ser identificado de acordo com os EM observados na Figura II.18 .

Figura II.18 - Identificação do metabólito **44**. W) EM da subfração BT-A.08ac, pico t_R = 5,997 min; B) EM do banco de dados consultado, apresentando 91% de similaridade.

Pela observação da Figura II.18, notamos a similaridade entre os EM da subfração da alga e da biblioteca do banco de dados. Para esta substância, não foram feitas análises com padrão sintético comercial.

A fragmentação química para os derivados halogenados do metabólito **44** está apresentada na Figura II.19. De modo análogo ao metabólito **43**, o íon molecular do metabólito **44** também perde hidroxila radicalar através do mecanismo concertado já citado. Neste caso, o íon formado com esta perda apresenta-se como o íon do pico base. Em sequência, a competição entre as eliminações CO/COH e HR/R determinou o restante da fragmentação para esta substância.

Figura II.19 - Proposta geral de fragmentação química por impacto de elétrons dos derivados halogenados do metabólito **44**.

Para os derivados halogenados 2-cloro-4-(metoximetil)fenol (**58**), 2-bromo-4-(metoximetil)fenol (**59**) e 2-iodo-4-(metoximetil)fenol (**60**), temos sequência de fragmentação semelhante à demonstrada na Figura II.19. Os derivados halogenados **58**, **59** e **60**, também apresentam os picos $[M-R]^{\bullet+}$ (R = Cl, Br ou I) intensos, como pode ser observado na Figura II.20.

Figura II.20 - Derivados halogenados do metabólito **44** identificados nas subfrações de BT-A. (Em cada letra: espectro de massas do metabólito, fórmula e peso molecular, fórmula estrutural e denominação química).

II. 4.1.3.4.1 Ocorrência e relevância do 4-(metoximetil)fenol e derivados halogenados

O metabólito 4-(metoximetil)fenol (**44**) é um composto fenólico cuja ocorrência não é tão ampla quantos os outros fenólicos apresentados anteriormente. Este fenólico foi isolado de *Gastrodia elata*, uma importante planta medicinal, utilizada para uma série de problemas de saúde como dor de cabeça, epilepsia, reumatismo e outras desordens nervosas (HAYASHI et al., 2002; PYO et al., 2004). Não há relatos desta substância em algas marinhas.

Se para o metabólito **44** os relatos são escassos, para seus derivados halogenados 2-cloro-4-(metoximetil)fenol (**58**), 2-bromo-4-(metoximetil)fenol (**59**) e 2-iodo-4-(metoximetil)fenol (**60**), a ocorrência é mais rara ainda. Apenas a substância **59** foi isolada da alga marinha *Rhodomela larix*, sendo citada como também ocorrente em *Odonthalia dentata* (SUZUKI; KOWATA; KUROSAWA, 1980). Neste mesmo trabalho, uma série de fenóis halogenados de estrutura semelhante ao composto **59** também foram isolados e correlacionados às algas vermelhas, ilustrando o grande potencial de rodofíceas como profícuas produtoras de metabólitos contendo halogênios.

Quanto ao metabólito **58**, há somente um relato no qual seu uso é restrito à utilização em síntese química. Não há descrição química para o composto **60**. Sendo assim, temos o metabólito **44** sendo, pela primeira vez, descrito em algas marinhas, o metabólito **58** descrito pela primeira vez como produto natural, o metabólito **59** relatado pela primeira vez no gênero *Bostrychia* e ainda o metabólito **60** sendo caracterizado como inédito.

II. 4.1.3.5. Identificação do 4-hidroxibenzaldeído e derivado bromado

Como último derivado halogenado a ser apresentado, o 3-bromo-4-hidroxibenzaldeído (**47**) (Figura II.21) foi identificado de acordo com o perfil de fragmentação química proposto para o metabólito 4-hidroxibenzaldeído (**41**) (Figura II.23), previamente identificado de acordo com a semelhança dos EM, Figura II.22.

Figura II.21 - Identificação do metabólito **41**. AB) EM da subfração BT-A.8ac, $t_R = 6,666$ min; AC) EM do banco de dados consultado, apresentando 95% de similaridade; AD) EM obtido a partir do padrão comercial, $t_R = 6,670$ min, apresentando 96% de similaridade.

Figura II.22 - Derivado halogenado do metabólito **41** identificado nas subfrações de BT-A. (EM do metabólito, fórmula e peso molecular, fórmula estrutural e nomenclatura química).

II. 4.1.3.5.1 Ocorrência e relevância do 4-hidroxibenzaldeído e derivado bromado

Manley e Chapman (1978, 1979 e 1980) realizaram uma série de estudos biossintéticos em algas vermelhas, comprovando a participação destes compostos na via de degradação da *L*-Tirosina e a formação do 3-bromo-4-hidroxibenzaldeído na macroalga *Odonthalia floccosa*.

No estudo da composição volátil de frações apolares da alga *Bostrychia tenella*, o metabólito **47** foi identificado em uma das frações que mostrou atividade frente ao parasita *Leishmania amazonensis* e frente os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (de FELICIO et al., 2010). Ainda, o metabólito **41** foi isolado da alga *Laurencia tristicha* (SUN et al., 2006), enquanto que o metabólito **47** foi isolado da alga *Polysiphonia sphaerocarpa*

(FLODIN; WHITFIELD, 2000) e da alga *Rhodomela larix* (SUZUKI; KOWATA; KUROSAWA, 1980).

Deste modo, o metabólito **41**, já relatado em *Bostrychia tenella* anteriormente, tem sua identificação proposta novamente, e o metabólito **47**, amplamente ocorrente em algas vermelhas, tem seu primeiro relato no gênero *Bostrychia*.

II. 4.1.3.6. Identificação dos ácidos benzóico e 2(4-hidroxifenil)acético

Finalizando a série de compostos fenólicos identificado das subfrações de BT-A, as Figuras II.24 e II.25 apresentam os EM que proporcionaram a identificação dos ácidos benzóico (**40**) e 2(4-hidroxifenil)acético (**45**).

Figura II.24 - Identificação do metabólito **40**. AF) EM da subfração BTA.8ac, $t_R = 4,538$ min; AG) EM do banco de dados consultado apresentando 94% de similaridade; AH) EM obtido a partir do padrão comercial, $t_R = 4,763$ min, apresentando 98% de similaridade.

Figura II.25 - Identificação do metabólito **45**. AI) EM da subfração BT-A.8ac, $t_R = 8,346$ min; AJ) EM do banco de dados consultado apresentando 95% de similaridade; AK) EM obtido a partir do padrão comercial, $t_R = 8,545$ min, apresentando 95% de similaridade.

A observação das Figuras II.24 e II.25 indica a ocorrência das substâncias **40** e **45** devido aos altos índices de similaridade dos espectros do banco de dados utilizado e padrão comercial. Os mecanismos de fragmentação química para estas substâncias são análogos aos que já foram discutidos nos subitens anteriores.

II. 4.1.3.6.1 Ocorrência e relevância dos ácidos benzóico e 2(4-hidroxifenil)acético

O ácido benzóico (**40**) é um composto altamente difundido pela natureza. Tem implicações industriais por suas propriedades conservantes, assim como o 4-hidroxibenzoato de metila, e ainda apresenta-se como um importante precursor sintético para várias substâncias bioativas. O ácido benzóico inibe o crescimento de fungos filamentosos, leveduras e algumas bactérias, e por isto, é usado em formulação para o tratamento de dermatoses causadas por fungos (REYNOLDS, 1996).

Na natureza, o composto **40** ocorre nas formas livres e ligadas, como ésteres benzóicos, em várias plantas e animais. Em algas marinhas, já foi detectado em análises de compostos voláteis nas espécies de algas pardas *Stilophora rhizodes*,

Punctaria latifolia (KAMENARSKA et al., 2002), alga vermelha *Corallina granifera* (KAMENARSKA et al., 2006), dentre outras. Pela importância destes componentes em algas, Onofrejová e colaboradores (2010) aplicaram uma nova técnica de extração em fase sólida combinada com líquido pressurizado para analisar derivados benzóicos de algas.

O ácido 2-(4-hidroxifenil)acético (**45**) é também um metabólito fenólico conhecido por suas propriedades biológicas. Diversos derivados do composto **45** mostraram variação na atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, estabelecendo um estudo preliminar de estrutura-atividade (PARK et al., 2001). Um estudo semelhante foi realizado com outras variações estruturais de diversos derivados fenólicos, incluindo o metabólito **45**, para avaliação do efeito anti-inflamatório em modelos celulares CCD18-Co (linhagem de fibroblastos do cólon humano, ATCC: CRL-1459), através da inibição da liberação de prostaglandinas E₂ (LARROSA et al., 2009). Ainda, a substância **45** apresentou efeito de agente promotor de crescimento em culturas axênicas da alga *Porphyra tenera* (FRIES; IWASAKI, 1976).

Em algas marinhas, o composto **45** foi estabelecido como intermediário no metabolismo da L-Tirosina na alga *Odonthalia floccosa* (MANLEY; CHAPMAN, 1979) e como precursor na formação de bromofenóis em *Ulva lactuca* (FLODIN; WHITFIELD, 1999). Há relatos ainda de seu isolamento da alga *Undaria pinnatifida* (ABE; UCHIYAMA; SATO, 1974), do fungo marinho *Penicillium* sp., obtido de sedimentos (LIU et al., 2010), e do fungo *Cladosporium* sp., isolado da alga vermelha *Porphyra yezoensis* (DING et al., 2008).

Apesar da grande ocorrência dos compostos **40** e **45** em algas marinhas, é a primeira vez que estes metabólitos são relatados no gênero *Bostrychia*.

II. 4.1.4 Biossíntese de metabólitos fenólicos halogenados em algas vermelhas

De acordo com os resultados estabelecidos e discutidos no item anterior, vinte e cinco metabólitos fenólicos foram detectados na alga marinha *Bostrychia tenella*, dos quais dezessete são halogenados. Do total, seis (**40**, **43**, **45**, **47**, **58**, **59**) estão sendo relatados pela primeira vez para o gênero *Bostrychia*, quatro (**42**, **44**, **48**, **51**) estão sendo relatado pela primeira vez em algas marinhas, nove (**49**, **50**, **52**, **53**,

57, 58, 61, 62, 63) estão sendo relatados pela primeira vez como produtos naturais, e três (**54, 55, 60**) estão tendo sua descrição química pela primeira vez, sendo considerados inéditos.

Pode-se dizer que grande parte do potencial químico evidenciado na macroalga *Bostrychia tenella* foi devido à ocorrência de substâncias halogenadas. Deste modo, é pertinente uma breve discussão sobre as vias biossintéticas de compostos fenólicos halogenados, bem como possíveis inferências sobre o perfil enzimático desta alga.

A captação e produção de compostos halogenados por algas marinhas são atribuídas ao envolvimento da enzima haloperoxidase vanádio-dependente. Estas enzimas catalisam a oxidação de haletos na presença de peróxido de hidrogênio, resultando na halogenação de compostos orgânicos diversificados (KLADI; VAGIAS; ROUSSIS, 2005).

Esta classe de enzimas pode ser subdivida em cloro- bromo- ou iodoperoxidases (HARTUNG, 1999). Bromoperoxidases, as quais podem ser ferro-heme-dependentes ou vanádio-dependentes, têm sido encontradas em todas as classes de algas marinhas, mesmo naquelas que não produzem halocompostos, o que sugere um papel biológico extenso para estas enzimas que catalisam a oxidação do brometo por peróxido de hidrogênio, produzindo o ácido hipobromoso (HBrO) que promove a reação de substituição eletrofílica aromática (DA SILVA et al., 2007).

Os primeiros relatos sobre estudos biossintéticos envolvendo algas marinhas e compostos fenólicos foram realizados por Manley e Chapman (1978), quando propuseram a via de formação do metabólito lanosol (álcool 2,3-dibromo-4,5-diidroxifenílico) a partir da *L*-Tirosina (Figura II.26). Posteriormente, através de ensaios utilizando frações contendo cloroplastos, puderam confirmar a proposta, utilizando experimentos nos quais incubavam possíveis precursores com frações enzimáticas da mesma espécie de alga (MANLEY; CHAPMAN, 1979).

Em um estudo semelhante, FLODIN e WHITFIELD (1999) propuseram a biossíntese do composto 2,4,6-tribromofenol na alga *Ulva lactuca*, utilizando ensaios enzimáticos contendo bromoperoxidase ativa e comparando dados obtidos sobre a rota biossintética com os resultados de Manley e Chapman (1979). Além disso, um estudo avaliando o conteúdo de bromofenóis e a atividade de bromoperoxidase na

alga verde *Ulva lactuca*, demonstrou que ocorre uma notável variação sazonal, sendo que no verão ambos têm altas atividades, ao contrário do inverno quando houve baixa produção (FLODIN; HELIDONIOTIS; WHITFIELD, 1999).

Figura II.26 - Rota biossintética proposta para o metabólito lanosol (MANLEY; CHAPMAN, 1978).

De acordo com o que foi exposto, a partir da Figura II.25 e dos metabólitos identificados em *Bostrychia tenella*, podemos suspeitar do possível envolvimento destes metabólitos em rotas biossintéticas ocorrentes no gênero *Bostrychia*. Logo, o trabalho químico realizado com esta espécie de alga abriu uma perspectiva para outras abordagens, lembrando que as frações BT-B e BT-M não foram quimicamente estudadas. Além disto, vislumbra-se o estudo do potencial enzimático

desta alga, uma vez que foram identificados compostos clorados, bromados e iodados.

II. 4.2. Potencial biológico da alga *Bostrychia tenella*

As amostras das frações orgânicas da alga *Bostrychia tenella* que foram submetidas aos ensaios citotóxico, antifúngico, antimicrobiano e de inibição da degranulação mastocitária foram: BT-H, BT-A, BT-B e BT-M.

II. 4.2.1 Avaliação da atividade citotóxica

Para a avaliação citotóxica foram usadas três linhagens tumorais (HL-60, HCT-8 e SF-295), através do método de MTT. Neste método, as células viáveis foram detectadas através da redução do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT), caracterizado pela mudança de coloração de amarelo para roxo. Esta redução (Figura II.27) decorreu da atividade da enzima redutase das mitocôndrias de células vivas, e comprovou que as amostras avaliadas não conseguiram induzir a morte celular, ou seja, foram inativas para citotoxicidade (MOSMANN, 1983).

Figura II.27 - Reação química empregando a substância MTT para verificação da viabilidade de células tumorais no ensaio de citotoxicidade.

A atividade citotóxica das amostras está apresentada na Tabela II.8, com seus respectivos percentuais de inibição. Apenas as substâncias que apresentaram valores de inibição $\geq 90\%$ em pelo menos duas linhagens tumorais foram escolhidas

para avaliações subseqüentes, valor esse considerado como mínimo para a triagem de novas substâncias com potencial antitumoral.

Tabela II.8 - Inibição do crescimento celular (IC%) ocasionada pelas amostras (100 µg/mL) avaliadas em três linhagens de células tumorais (média ± DPM).

Linhagens	SF-295	HCT-8	HL-60
Amostras			
BT-H	76,33 ± 1,34	102,09 ± 0,16	97,93 ± 0,97
BT-A	19,35 ± 4,42	42,00 ± 5,22	1,53 ± 1,39
BT-B	29,10 ± 0,54	25,20 ± 5,92	3,10 ± 3,62
BT-MH	18,16 ± 2,61	11,65 ± 5,30	6,01 ± 3,83

Controle positivo: Doxorubicina (0,3 µg/mL): IC%SF-295 = 88,13 ± 1,74; IC%HCT-8 = 93,09 ± 0,37; IC%HL-60 = 87,41 ± 0,31.

Apenas a fração BT-H mostrou-se atividade relevante (IC% > 90) para as linhagens avaliadas. Isso pode ser confirmado pela comparação dos valores obtidos da fração BT-H com o fármaco usado como controle positivo, a doxorubicina. A fração BT-H foi considerada ativa frente às linhagens HCT-8 (côlon) e HL-60 (leucemia), de acordo com o critério estabelecido. Entretanto, este ensaio foi realizado com uma concentração considerada elevada a fim de selecionar as frações que seriam submetidas a ensaios mais específicos.

A fração mais promissora, BT-H foi submetida ao mesmo ensaio, agora utilizando concentrações diferentes de amostras, no intuito de verificar o CI_{50} para a amostra. Os resultados podem ser visualizados na Tabela II.9.

Tabela II.9 - Valores de CI_{50} médios para a fração BT-H em diferentes linhagens tumorais, com intervalo de confiança estatística de 95%.

	IC ₅₀ (µg/mL)		
Amostra	SF 295	HCT-8	HL-60
BT-H	35,62	47,03	31,68
	(24,68 – 51,41)*	(32,48 – 68,10)*	(26,59 – 37,74)*

*intervalo de valores considerando o DPM.

O resultado observado na Tabela II.9 mostra os valores de CI_{50} da fração BT-H obtidas para as três linhagens ensaiadas. Pode-se notar que a fração BT-H

mostrou certa seletividade frente às linhagens, sendo, comparativamente, mais ativa frente HL-60. Porém este valor é demasiado alto para que esta fração seja considerada com potencial suficiente para ser trabalhada em seu fracionamento cromatográfico, objetivando a substância ou grupo mais restrito de substâncias responsáveis pela atividade notada.

De acordo com o critério adotado pelo grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a. Letícia Veras Costa-Lotufo, responsável por estes ensaios, o qual é o mesmo utilizado pelo American National Cancer Institute, extratos brutos ou frações a serem purificadas são considerados promissores quando os valores de CI_{50} apresentam-se abaixo de 30 $\mu\text{g/mL}$ (MESQUITA et al., 2009). Deste modo, a fração BT-H, mesmo apresentando um aparente potencial citotóxico frente a linhagens tumorais, não mostrou um valor de CI_{50} adequado para o prosseguimento destes estudos.

Macroalgas marinhas podem ser apontadas como prováveis biossintetizadoras de substâncias com ação anticâncer. A substância halomona, um monoterpene pentahalogenado isolado da alga vermelha *Portieria hornemanii*, apresentou citotoxicidade em linhagens tumorais de células nervosas, renais e do cólon, em estudos de triagem no National Cancer Institute (NCI), EUA (JHA; ZI-RONG, 2004). A halomona chegou a ser selecionada para estudos pré-clínicos para o desenvolvimento de fármacos (JHA; ZI-RONG, 2004), porém, problemas na obtenção desta substância a partir de fontes naturais confiáveis e falta de atividade em testes *in vivo*, desestimularam a continuidade dos estudos (ANDRIANASOLO et al, 2006).

Mayer e Gustafson (2006) enumeraram sete metabólitos - desidrotrisiferol, GA3 polissacarídeo, laurenditerpenol, anfidinolídeos X e Y, lingshuiol, protoceratina II-IV - produzidos por algas marinhas com comprovada atividade anticâncer, dos quais quatro – os quatro últimos citados - permanecem com mecanismos de ação desconhecidos. Ainda, pode-se citar o isolamento de diversos compostos de macroalgas pertencentes à família Rhodomelaceae com ação antitumoral (Tabela II.1, p. 16): dois sesquiterpenos halogenados isolados da alga *Laurencia microcladia* demonstraram alta atividade citotóxica em células tumorais das linhagens HT29, MCF7, PC3, HeLa e A431 (KLADI et al., 2007); e um bromofenol nitrogenado

isolado de *Osmundaria cotensoi* mostrou atividade moderada frente à linhagem tumoral HL-60 (POPPELWELL; NORTHCOTE, 2009).

Deste modo, a avaliação citotóxica para a macroalga *Bostrychia tenella* se fez plausível, uma vez que outras espécies de algas vermelhas apresentam potencial antitumoral.

II. 4.2.2 Avaliação da atividade antifúngica

Para verificação da atividade antifúngica das frações da espécie *B. tenella* foram utilizados as espécies de fungos filamentosos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries SPC e *Cladosporium sphaerospermum* (Penzig) SPC 491.

A metodologia utilizada para este ensaio foi bioautografia descrita inicialmente por HOMANS e FUCKS (1970). Este método consiste em avaliar substâncias separadas cromatograficamente: sobre uma placa de CCDC contendo as amostras já submetidas à eluição - em sistema de solvente apropriado a fim de proporcionar a melhor separação - e devidamente secas, foi aspergida uma solução de esporos dos fungos a serem avaliados. Estas placas contendo amostras e fungos são incubados apropriadamente para promover o crescimento microbiano.

Quando os fungos cresceram uniformemente sobre a placa, halos foram formados caracterizando a ocorrência de substâncias que inibiram o crescimento fúngico. Estas substâncias foram classificadas como detentoras de atividade antifúngica fraca, média ou forte, de acordo com comparação com o controle positivo nistatina.

O resultado obtido pode ser verificado na Tabela II.10, a qual foi elaborada a partir dos dados da Figura II.28. Reiterando que os potenciais atribuídos às amostras foram propostos conforme a comparação com o padrão nistatina (1 µg/mL).

Tabela II.10 - Avaliação da atividade antifúngica de frações da alga *B. tenella*.

Amostras	<i>C. cladosporioides</i>	Rf	<i>C. sphaerospermum</i>	Rf
BT-H	1	0,76	i	-
BT-A	1	0,74	1	0,74
BT-B	i	-	i	-
BT-MH	i	-	i	-

Legenda: i (inativo); 1 (inibição fraca); 2 (inibição média); 3 (inibição forte).
 Controle positivo: Nistatina (1µg/µL) : 3, para ambos

Figura II.28 - Avaliação antifúngica das frações orgânicas da alga *Bostrychia tenella* pelo método de bioautografia: placas cromatográficas contendo amostras de *B. tenella* reveladas com irradiação UV $\lambda = 254$ nm e $\lambda = 365$ nm, e reveladas com solução de esporos dos fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

As amostras BT-H e BT-A apresentaram em sua composição um metabólito que possui fraca atividade frente aos fungos utilizados no ensaio. Podemos suspeitar que se trata do mesmo composto, uma vez que os halos de inibição apresentam R_f próximos em ambas frações.

O resultado obtido para este ensaio não foi o esperado uma vez que experimentos anteriores realizados com frações apolares da alga *Bostrychia tenella* coletada na Ilha das Couves, Ubatuba-SP, mostraram que as algas possuíam uma considerável ação para estas mesmas linhagens fúngicas (de FELÍCIO et al., 2010) – Anexo I, p 201.

Então, o ensaio foi repetido utilizando-se outras alíquotas das mesmas amostras. O resultado desta repetição pode ser observado na Figura II.29, a qual mostra que o resultado se manteve aquém do esperado, já que nenhuma amostra analisada mostrou qualquer inibição ao crescimento dos fungos avaliados.

Figura II.29 – Repetição da avaliação antifúngica das frações orgânicas da alga *Bostrychia tenella* pelo método de bioautografia: placas cromatográficas contendo novas amostras de *B. tenella* reveladas com irradiação UV $\lambda = 254$ nm e $\lambda = 365$ nm, e reveladas com solução de esporos dos fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Confirmada a ausência de atividade das frações de *B. tenella*, podem-se inferir motivos para esta constatação. Como já mencionado, frações apolares da mesma espécie, *Bostrychia tenella*, mostraram-se ativas frente às mesmas espécies de fungos no mesmo tipo de ensaio (de FELÍCIO et al., 2010). Neste referido trabalho, as subfrações avaliadas (6 oriundas da fração hexânica e 2 da fração diclorometânica) mostraram considerável atividade (em comparação ao controle positivo utilizado - nistatina).

Discussões aprofundadas relacionando a diferença de composição química entre a fração inativa BT-H e as subfrações ativas descritas por de Felício e colaboradores (2010) esbarram numa questão fundamental: o considerável número de metabólitos que não foram identificados na fração BT-H (item II.4.1.1, p. 38). Estas lacunas impedem inferências precisas sobre o resultado biológico verificado para a falta de atividade antifúngica da fração BT-H.

Entretanto, uma informação relevante deve ser evidenciada: o local de coleta do material algal foi diferente para cada trabalho. Enquanto as amostras ativas foram coletadas nas encostas da Ilha das Couves, Ubatuba-SP, as amostras que originaram a fração BT-H foram obtidas dos costões rochosos da Praia da Fortaleza, Ubatuba-SP. São locais próximos (mesmo município), com características nicho-

ecológicas provavelmente semelhantes, mas que podem gerar variações em indivíduos da mesma espécie.

Devido ao próprio papel ecológico das algas, já foi relatado que extratos orgânicos e óleos voláteis de algas marinhas apresentem potencial antifúngico (KAMENARSKA et al., 2004; KARABAY-YAVASOGLU et al., 2006; RIZVI; SHAMEEL, et al., 2005). Habitando locais úmidos e rarefeitos em luz, condições propícias para desenvolvimento de fungos, algumas algas marinhas capacitaram-se da produção de substâncias que as protejam do parasitismo de fungos filamentosos que possam prejudicar sua prevalência no ambiente (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002).

Deste modo, o estudo do potencial antifúngico da alga *Bostrychia tenella* foi relevante no que diz respeito ao que se tem relatado sobre esta atividade e algas marinhas. Entretanto, o resultado negativo obtido intriga pela discrepância a dados anteriores, instigando outras investigações neste segmento.

II. 4.2.3 Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi realizada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em microplaca de 96 poços. As bactérias utilizadas foram a gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e a gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883). A cepa de *S. aureus* utilizada para este ensaio é a mesma preconizada pela ANVISA para validar desinfetantes hospitalares (ANVISA, 2010), devido à sua alta ocorrência nestes ambientes e sua relação com infecções oportunistas graves (NCCLS, 2003); a cepa de *K. pneumoniae* usada é uma das bactérias a qual se atribui problemas pulmonares relacionados a pneumonia, também utilizada como referencial (NCCLS, 2003).

O método empregado expôs o crescimento bacteriano frente à atuação das amostras ensaiadas. Para a revelação empregou o substrato resazurina (7-hidroxi-10-óxido-3H-fenoxazin-3-ona) o qual se apresenta como um detector eficiente da viabilidade de células bacterianas (CARROL et al., 2009; TANEJA; TYAGI, 2007). De acordo com a Figura II.30., a resazurina é reduzida pela ação da mitocôndria bacteriana, formando a resorufina, composto fortemente azul (CARROL et al., 2009).

Figura II.30 - Reação empregando a substância resarzurina para verificação da viabilidade das células bacterianas.

As frações orgânicas de *B. tenella* que foram avaliadas não inibiram o crescimento das bactérias mesmo na concentração mais alta (400 µg/mL). Este resultado, de certo modo, também representa um contraste à literatura, já que algas marinhas são consideradas potenciais produtoras de metabólitos antimicrobianos (BHADURY; WRIGHT, 2004; BHAKUNI; RAWAT, 2005).

Na Tabela II.1 (p. 16), podemos observar que dois sesquiterpenos isolados de *Laurencia* spp. demonstraram atividade frente a bactérias marinhas (VAIRAPPAN et al., 2008); dois bromofenóis isolados de *Osmundaria colensoi* foram ativos contra *Mycobacterium smegmatis* (POPPELWELL; NORTHCOTE, 2009); dois outros bromofenóis isolados de *Symphyocladia latiuscula* mostraram atividade em *Staphylococcus aureus* (XU et al., 2009); ainda, um novo macrolídeo tipo alfa-pirona isolado de *Neurymenia fraxinifolia* apresentou moderada atividade contra *S. aureus* resistente à meticilina e contra *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (STOUT et al., 2009).

Sendo assim, apresentando resultado negativo, o presente estudo estimula novas repetições e investigações, a fim de confirmar o potencial antibacteriano da alga *Bostrychia tenella*.

II. 4.2.4 Avaliação da inibição da degranulação de mastócitos

A atividade inibitória da degranulação mastocitária foi avaliada em ensaios direto utilizando células RBL-2H3 sensibilizadas, e quantificada com a utilização do substrato fluorogênico MUG (4-metil-umbeliferil-*N*-acetil-β-*D*-glucosaminida).

O método empregado baseou-se na propriedade que a enzima β-hexosaminidase possui de clivar a ligação entre a unidade glicosídica do substrato MUG, liberando a substância umbeliferona a qual tem propriedades de

fluorescência, cuja leitura é feita para estimar a concentração de enzima liberada no processo de degranulação mastocitária. Esta reação está devidamente demonstrada na Figura II.31.

Figura II.31 - Reação de degradação da substância MUG para obtenção do percentual de inibição da degranulação mastocitária através do ensaio direto utilizando células RBL-2H3.

Como resultados da avaliação das frações orgânicas da alga *Bostrychia tenella* para a inibição da degranulação de mastócitos, tem-se os dados da Tabela II.11, os quais foram obtidos com base nos gráficos apresentados na Figura II.32.

Tabela II.11. Efeito inibidor das frações da alga *B. tenella* sobre a liberação da enzima β -hexosaminidase de mastócitos da linhagem RBL-2H3.

Amostras	CI ₅₀ (µg/mL) ± DPM
BT-H	236,15 ± 13,87
BT-A	Inativo ^{*1}
BT-B	Inativo ^{*2}
BT-MH	Inativo ^{*3}

Controle positivo: Fumarato de Cetotifeno – CI₅₀ = 64,28 ± 3,12 µg/mL

^{*1} – Fração BT-A causou 31,2% de inibição em 300 µg/mL;

^{*2} – Fração BT-B provocou pequeno estímulo da liberação da enzima β -hexosaminidase a partir de 70 µg/mL;

^{*3} – Fração BT-M provocou pequeno estímulo da liberação da enzima β -hexosaminidase a partir de 300 µg/mL.

Figura II.32 - Gráficos que estabelecem a relação entre a concentração de amostra avaliada (abscissas, [amostra] escala logarítmica) e a % de β -hexosaminidase liberada (ordenadas, %).

Para obtenção do CI_{50} relativo a este ensaio, é essencial que a curva obtida pela relação entre a concentração de amostra avaliada (abscissas, [amostra] escala logarítmica) e a % de β -hexosaminidase liberada (ordenadas, %) tenha o formato de uma sigmóide, ou seja, apresente uma queda considerável no percentual de β -hexosaminidase detectado de acordo com o aumento da concentração de amostra (NAAL et al., 2004).

De acordo com a Figura II.32, a única amostra que demonstrou essa propriedade foi a BT-H, e portanto, considerada ativa. No entanto, o valor do CI_{50} obtido para esta fração ($236,15 \pm 13,87 \mu\text{g/mL}$) representa um valor elevado comparando-se ao valor do fármaco utilizado como controle positivo, fumarato de cetotifeno ($64,28 \pm 3,12 \mu\text{g/mL}$), caracterizando BT-H como fracamente ativa.

Deve-se destacar ainda que a fração BT-A apresentou uma queda na porcentagem de liberação de β -hexosaminidase na concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$, indicando um sinal de atividade para esta fração, mas sem possibilidade de ser

calculada devido a não formação da curva gráfica sigmóide (NAAL et al., 2004). Prováveis experimentos com substâncias isoladas desta fração poderiam responder se este potencial aparente é significativo ou não.

Já as frações BT-B e BT-M estimularam um aumento na porcentagem de liberação de β -hexosaminidase, indicando a presença de possíveis compostos que atuem com antígenos, ou seja, que estimulem a degranulação mastocitária. Este dado é relevante no sentido de atentar à toxicidade da composição química destas frações em trabalhos futuros.

A importância do estudo da degranulação mastocitária remete à possibilidade de intervenção farmacêutica em casos de reações alérgicas. A alergia é um dos principais problemas de saúde pública da sociedade contemporânea, destacando que a prevalência de certas doenças alérgicas tem crescido em muitos países industrializados durante as últimas décadas (RING et al., 2001). Mastócitos são células de defesa que estão normalmente distribuídas através do tecido conectivo e estão presentes na fase imediata de reações alérgicas mediadas pela imunoglobulina-E (IgE) (ARINOBU; IWASAKI; AKASHI, 2009; KNEILLING; RÖCKEN, 2009).

O ensaio enzimático para quantificar a enzima β -hexosaminidase tem sido amplamente empregado para monitorar a degranulação de mastócitos estimulados por um antígeno (KAWA et al., 2003; MATSUDA et al., 2004; MORIKAWA et al., 2003; NAAL et al., 2004). Este método é conveniente tanto para estudar os mecanismos de transdução de sinais, levando à exocitose (BAROODY, 2003), quanto para monitorar a potencialidade de novas moléculas em bloquear a ativação e degranulação de mastócitos (GRANBERG; FOWLER; JACOBSON, 2001).

A degranulação mastocitária tem como potentes inibidores a classe de compostos flavonóides os quais são tidos como referência em termos de produtos naturais com atividade antialérgica (MATSUDA et al., 2004; YAMAMOTO et al., 2004). De acordo com estudos feitos com alguns polifenóis, a presença de hidroxilas adicionais em determinadas posições substituintes aumentou a atividade destes compostos neste tipo de ensaio (MATSUDA et al., 2004).

Extratos das algas marinhas *Ecklonia cava* e *Chrysomenia wrightii* inibiram uma taxa maior que 50% da degranulação de células RBL-2H3 à concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que *Petalonia binghamiae*, *Scytosiphon lomentaria*, *Undaria*

pinnatifida, *Porphyra dentada*, *Codium fragile* e *Ulva japonica* causaram a mesma inibição à 200 µg/mL (KIMIYA et al., 2008). Ainda, florotaninos, compostos altamente hidroxilados presentes na alga parda *Eisenia arborea*, apresentaram forte atividade antialérgica no mesmo tipo de ensaio, utilizando células RBL-2H3 (SUGIURA et al., 2006; SUGIURA et al., 2007).

Sendo assim, a avaliação das frações da alga *B. tenella* para a inibição da degranulação de mastócitos utilizando células RBL-2H3 foi plausível, uma vez que há relatos da literatura ilustrando o potencial antialérgico de algas marinhas.

III. CAPÍTULO II

**Avaliação do potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados
à alga *Bostrychia tenella***

Cap. II - Introdução

III. 1. INTRODUÇÃO

III. 1.1 Produtos naturais microbianos

Produtos naturais de origem microbiana despontam como uma área extensa e promissora para a obtenção de novos e potentes agentes terapêuticos para diversas enfermidades (DEMAIN, 2009; GUNATILAKA, 2006; HERTWECK, 2009; LAM, 2007; LI; VEDERAS, 2009; WALSH; FISCHBACH, 2010).

Micro-organismos são altamente versáteis e podem ser encontrados nos mais diversos habitats, ocupando nichos ecológicos até mesmo inóspitos, de todos os ecossistemas ao redor do globo terrestre. É estimado que menos de 1% das espécies de bactérias e menos de 5% das espécies de fungos são conhecidas, sugerindo que existem milhões de espécies microbianas a serem descobertas (GUNATILAKA, 2006; LAM, 2007).

O papel ecológico de fungos e bactérias vai muito além de interações entre seres vivos. Uma vez que podem adaptar-se a praticamente qualquer ambiente, e consequentemente promover novas interações biológicas a partir de comunicações químicas, são aptos a estabelecer uma nova dinâmica ecológica neste ambiente o qual se inseriu (WALSH; FISCHBACH, 2010).

Nas últimas décadas, os micro-organismos estão recebendo atenção especial por parte da indústria e dos pesquisadores de produtos naturais (VIEGAS-JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). A fantástica capacidade biossintética microbiana é um dos grandes pilares que sustenta a importância de se estudar a química de micro-organismos. Além de produzirem uma infinidade de substâncias, das mais diversas classes metabólicas, ainda permitem que esta produção seja otimizada. Micro-organismos oferecem vantagens importantes quanto à sua manipulação, atraindo a atenção de vários segmentos industriais, inclusive o farmacêutico (GLASER; MAYER, 2009).

LAM (2007) relatou a existência de 67 compostos microbianos ou derivados, em vários estágios de desenvolvimento clínico como antibacterianos, antifúngicos, antiparasitários, anti-inflamatórios, anticancerígenos, e atuando em desordens neurológicas, cardiovasculares, metabólicas e imunológicas.

Outras publicações científicas também têm contemplado a relevância destes micro-seres para o desenvolvimento farmacêutico. Ganesan (2008) elencou 24 produtos naturais que se tornaram fármacos, no período compreendido entre 1970 e 2006, sendo que 19 destes eram provenientes de fontes microbianas. Buttler (2008) ressaltou a importância de produtos naturais no mercado farmacêutico da última década, e numerou 17 compostos derivados de micro-organismos que estão em testes clínicos avançados para serem lançados como fármacos anticâncer nos próximos anos. Ainda, Farnet e Zazopoulos (2005) e Lam (2007) destacaram que produtos naturais microbianos não apresentam somente potentes atividades biológicas, mas também apresentam as propriedades farmacocinéticas desejáveis e essenciais para o desenvolvimento clínico de fármacos.

Historicamente, diversos produtos naturais com importantes propriedades farmacológicas foram identificados em diferentes espécies de fungos, especialmente agentes quimioterápicos, como os antibióticos β -lactâmicos (BARREIRO; FRAGA, 2008). Desde a descoberta da penicilina-G por Alexander Flemming em 1928, fungos e bactérias têm contribuído consideravelmente para a descoberta de novos medicamentos para as mais diversas terapias (BARREIRO; FRAGA, 2008; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Após o sucesso da penicilina-G, estudos a partir de seres microbianos resultaram na descoberta de antibióticos de diversas classes, como β -lactâmicos (cefalosporina (1)), aminoglicosídicos (estreptomicina (2)), tetraciclina (clortetraciclina (3)), macrolídeos (eritromicina (4)), peptídicos (vancomicina (5)), dentre outros (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010). Ainda, fármacos de outras classes terapêuticas como os anticancerígenos daunorubicina (6), e seu análogo doxorubicina (7), bleomicina A (8), e o antihelmíntico avermectina B₁ (9), também foram obtidos a partir de micro-organismos (BARREIRO; FRAGA, 2008).

Em 1976, o derivado policetídeo compactina (10) levou à descoberta de uma nova classe de antilipêmicos, as estatinas (BARREIRO; FRAGA, 2008; BARREIRO; BOLZANI, 2009), dentre as quais se destaca a atorvastatina (11). Trata-se de um inibidor eficaz da enzima HMG-CoA redutase, envolvida na biossíntese do colesterol, fármaco este que atingiu a impressionante marca de US\$ 13,8 bilhões de faturamento anual em 2008 (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Apesar do grande potencial dos micro-organismos como fonte para novos fármacos, duas limitações cruciais interpõem-se no avanço desta área: com o advento da pós-genômica, pode-se comprovar que muitos micro-organismos possuem um considerável número de genes que permanecem silenciados quando estes são cultivados em laboratório, sendo o verdadeiro potencial biossintético microbiano desconhecido (HERTWECK, 2009; SCHERLACK; HERTWECK, 2009). Além disso, muitos micro-organismos produtores são incultiváveis em laboratório (HERTWECK, 2009), sendo que este número seja estimado em torno de 99% de todas as espécies, incluindo as desconhecidas (LI; VEREDAS, 2009).

Devido ao grande número de fármacos e/ou candidatos produzidos por micro-organismos, Newman e Cragg (2007) consideram que esta área de pesquisa deve ser expandida significativamente, estimulando pesquisadores a participarem deste avanço, considerando que, segundo previsões baseadas em estudos genéticos, 90% do potencial biossintético de micro-organismos é desconhecido (WALSH, FISCHBACH, 2010).

Figura III.1 - Substâncias químicas obtidas a partir de micro-organismos e produtos sintéticos derivados de importância histórica na pesquisa de produtos naturais microbianos.

III. 1.2 Micro-organismos marinhos

Agregando as particularidades do ambiente marinho com a versatilidade própria dos seres microscópicos, os micro-organismos marinhos têm sido constantemente abalizados como a fonte natural mais promissora para a descoberta de novos fármacos (GLASER; MAYER, 2009; LAM, 2007). Isso decorre da sobreposição de duas grandes áreas naturais que são consideradas inexploradas: o ambiente marinho e os micro-organismos. No ambiente marinho, estima-se que exista aproximadamente o impressionante número de $3,7 \times 10^{30}$ micro-organismos, muitos dos quais potenciais produtores de candidatos a fármacos (LI; VEDERAS, 2009), corroborando a escassa literatura científica para esta área.

Os micro-organismos marinhos têm demonstrado uma capacidade biossintéticas promissora quanto a produção de metabólitos biologicamente funcionais (BERDY et al., 2005; JENSEN et al., 2005; PENESYAN; KJELLEBERG; EGAN, 2010; SIMMONS et al., 2008). No período compreendido de 2000 a 2003 foram isolados 129 compostos bioativos da microbiota marinha (DEMAIN, 2009). Substâncias providas de micro-organismos marinhos são conhecidas por apresentarem diversas atividades biológicas, destacando antimicrobiana, antiprotozoária, antiparasitária, antitumoral e anti-incrustante, todas inspiradas na função ecológica destes seres (PENESYAN; KJELLEBERG; EGAN, 2010).

A microbiota marinha é composta por cianobactérias, bactérias filamentosas ou actinobactérias, e os fungos filamentosos, além de outros grupos com menos destaque. Certamente, estes três grupos de micro-organismos marinhos despontam como os mais estudados em diversas áreas científicas, inclusive quanto ao potencial ecológico, biossintético e farmacêutico (BHAKUNI; RAWAT, 2005; LE GAL; ULBER, 2005). Cianobactérias e actinomicetos marinhos, organismos de ampla ocorrência nos oceanos, representam importantes fontes para descobrimento de fármacos, uma vez que o isolamento de novas substâncias ativas são frequentemente relatados (BERDY, 2005; BHAKUNI; RAWAT, 2005; JENSEN et al., 2005; JONES et al., 2009; LAM, 2007).

Apesar de ser subestimada (PANG; MITCHELL, 2005), a comunidade fúngica marinha também é, comprovadamente, uma fonte farta de produtos bioativos (LAM, 2007). Fungos marinhos compreendem um grupo pequeno e ecologicamente bem

"Produtos naturais marinhos: identificação de metabólitos fenólicos halogenados na macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) e potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados"

conhecido de ascomicetos filamentosos, seus anamorfos e leveduras (PANG; MITCHELL, 2005). A definição mais aceita sugere que fungos marinhos obrigatórios são aqueles que se desenvolvem e esporulam exclusivamente em um habitat marinho ou de estuário, enquanto fungos marinhos facultativos são aqueles provenientes de ambiente de água doce ou terrestres e que são capazes de crescer e até mesmo esporular no ambiente marinho (PANG; MITCHELL, 2005; VITA-MARQUES et al., 2008).

A evidência de que micro-organismos e hospedeiros marinhos invertebrados estabeleçam uma forte relação simbiótica se solidifica cada vez mais, uma vez que vários estudos indicam que as substâncias ativas produzidas por esponjas, ascídias, corais, dentre outros, são produtos microbianos (GLASER; MAYER, 2009; SIMMONS et al., 2008).

Os últimos 10 anos de estudos indicam que os micro-organismos marinhos estabelecem relações comensais com todos os filos. Ainda, sabe-se que os leitos marinhos não são desertos microbianos, mas são ricamente povoados por micro-organismos dos três domínios: bactéria, archaea e eucarya (NEWMAN; HILL, 2006). Não obstante, das 20 moléculas oriundas ou inspiradas do ambiente marinho que estão em testes finais para aprovação como novos fármacos para o tratamento do câncer, 16 possuem biossíntese diretamente relacionada à micro-organismos, apesar de somente 5 das 20 substâncias serem derivados microbianos (SIMMONS et al., 2008).

III. 1.3 Micro-organismos endofíticos

Visto o papel fundamental dos micro-organismos na hipótese da produção de metabólitos ativos de invertebrados marinhos, é fundamental apontarmos a relevância do estudo de micro-organismos endofíticos no ambiente marinho.

Considera-se como endófito um micro-organismo (fungo ou bactéria) que passa ao menos parte de seu ciclo de vida dentro de tecidos saudáveis de uma planta hospedeira, numa relação que pode variar de fitopatogênese latente a simbiose mutualística (STROBEL et al., 2004; TAN; ZOU, 2001). A habilidade peculiar de micro-organismos em utilizar vários substratos sólidos como fonte de

"Produtos naturais marinhos: identificação de metabólitos fenólicos halogenados na macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) e potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados"

energia vital, levou-os a habitarem tecidos de vegetais superiores, nos quais são protegidos e alimentados enquanto retribuem fornecendo substâncias que “fortificam” seu hospedeiro (GUNATILAKA, 2006; GUO et al., 2008; TAN; ZOU, 2001).

A complexidade e importância desta relação ecológica são refletidas pelo potencial químico e biológico de endófitos na pesquisa de produtos naturais. De uma maneira geral, o estudo de micro-organismos endofíticos figura como um ramo relativamente novo e, conseqüentemente, pouco explorado (GUO et al., 2009; STROBEL et al., 2004). Entretanto, o interesse nesta área através de revisões científicas abordando o isolamento de endófitos de vegetais, seus produtos secundários e respectivas atividades biológicas evidenciam informações que acabam estimulando o aprofundamento nesta área. Tan e Zou (2001) listaram 138 metabólitos caracterizados em endófitos antes do ano 2000; Gunatilaka (2006) contabilizou 184 metabólitos, dos quais 96 são novos a partir de 59 linhagens de micro-organismos endofíticos evidenciados após a revisão de Tan e Zou (2001). Ainda, Borges e colaboradores (2009) listaram 284 moléculas isoladas à partir de endófitos entre 2006 e 2008, ilustrando o crescente interesse neste tipo de pesquisa.

É importante destacar que o estudo de micro-organismos endofíticos adquiriu impulso quando pesquisadores começaram a verificar a habilidade que endófitos possuíam em biossintetizar substâncias ativas que foram inicialmente descobertas em suas plantas hospedeiras. Vide o caso do anticâncer taxol, produzido por vegetais do gênero *Taxus* e também isolado do endófito *Taxomyces adreanae* (GUO et al., 2008).

A diversidade metabólica de produtos naturais oriundos de micro-organismos endofíticos bem como as respectivas vias metabólicas e atividades biológicas são discutidas por alguns autores (GUNATILAKA, 2006; GUO et al., 2008; TAN; ZOU, 2001). Das classes químicas isoladas de endófitos destacam-se os alcalóides, terpenóides, flavonóides e esteróides, dentre outros; da funcionalidade biológica podemos destacar as atividades antibiótica, anticâncer e o controle de agentes biológicos (GUO et al., 2008).

A associação entre algas e fungos apresenta-se bem estabelecida cientificamente, no entanto, pouco foi estudado acerca de fungos endofíticos isolados de algas marinhas. Destes, a maioria refere-se a táxons de ambiente

temperado, justificando estudos adicionais em representantes de ambiente tropical/subtropical (JONES; STANLEY; PINRUAN, 2008). A Tabela III.1 apresenta um levantamento de metabólitos inéditos isolados de micro-organismos endofíticos associados a algas marinhas. A diversidade estrutural apresentada, assim como as atividades biológicas relevantes destacam que esta área de estudo merece uma maior atenção, uma vez que existe um potencial praticamente ilimitado a ser explorado.

Tabela III.1. Metabólitos inéditos obtidos a partir de micro-organismos endofíticos isolados de algas marinhas (ordem cronológica de publicação).

Alga: <i>Cytoseira</i> sp.	Micro-organismo: <i>Varicosporina ramulosa</i>
----------------------------	--

HÖLLER; KÖNIG; WRIGHT; 2000

Alga: <i>Ulva</i> sp.	Micro-organismo: <i>Ascochyta salicorniae</i>
-----------------------	---

atividade antiplasmódica; tripanocida; citotóxica
OSTERHAGE et al., 2000

Alga: <i>Cladostephus spongus</i>	Micro-organismo: <i>Acremonium</i> sp.
-----------------------------------	--

ABDEL-LATEFF et al., 2002

Continua

Continuação

Alga: *Liagora viscida*Micro-organismo: *Drechslera dematioidea* # atividade antiparasitária
OSTERHAGE et al., 2002aAlga: *Fucus spiralis*Micro-organismo: *Phoma tropica*

OSTERHAGE et al., 2002b

Alga: *Fucus vesiculosus*Micro-organismo: *Epicoccum sp.* atividade antioxidante
ABDEL-LATEFF et al., 2003

Continua

Continuação

Alga: *Halymenia acuminata*Micro-organismo: *Aspergillus terreus* atividade antioxidante fotoprotetora
LEE et al., 2003Alga: *Ulva pertusa*Micro-organismo: *Alternaria sp.*

LI et al., 2003

Alga: não informada

Micro-organismo: *Emericella nidulans*
var. *acristata*

KRAJL et al., 2006.

Alga: *Sargassum sp.*

Micro-organismo: No. ZZF36

YANG et al., 2006

Continua

Continuação

Alga: *Polysiphonia urceolata*Micro-organismo: *Chaetomium globosum*

atividade antioxidante e citotóxica
WANG et al., 2006

Alga: *Codium fragile*Micro-organismo: *Valsa ceratosperma*

atividade citotóxica
EL-BEIH et al., 2007

Alga: não informada

Micro-organismo: *Monodictys putredinis*

- # $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{OH}$
- # $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$
- # $R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{CH}_3$

modulação enzimática
KRICK et al., 2007

Alga: *Enteromorpha compressa*Micro-organismo: *Botrytis sp.*

LI et al., 2007

Continua

Continuação

Alga: *Colpomenia sinuosa*Micro-organismo: *Aspergillus niger* EN-13 # atividade antifúngica e antioxidante
ZHANG; LI; WANG, 2007.Alga: *Colpomenia sinuosa*Micro-organismo: *Aspergillus niger* EN-13 atividade antifúngica
ZHANG et al., 2007Alga: *Valonia utricularis*Micro-organismo: *Chaetomium* sp. inibidor enzimático (p56^{lck})
ABDEL-LATEFF, 2008

Continua

Continuação

Alga: não informado

Micro-organismo: não informado

inibidor enzimático (DNA pol)

NAGANUMA et al., 2008

Alga: não informada

Micro-organismo: *Monodictys putredinis*

moduladores enzimáticos

PONTIUS et al., 2008a

Alga: *Plocamium* sp.Micro-organismo: *Acremonium* sp.

PONTIUS et al., 2008b

Alga: não informada

Micro-organismo: *Nodulisporium* sp.

PONTIUS et al., 2008b

Continua

Continuação

Alga: não informada

Micro-organismo: *Nodulisporium sp.* modulador enzimático
PONTIUS et al., 2008cAlga: *Blidingia minima*Micro-organismo: *Penicillium sp.* atividade citotóxica
ZHU et al., 2008Alga: *Sargassum kjellmanianum*Micro-organismo: *Aspergillus ochraceus* # atividade antioxidante
CUI et al., 2009Alga: *Ulva sp.*Micro-organismo: *Penicillium sp.* modulador enzimático
GAMAL-ELDEEN; ABDEL-LATEFF; OKINO, 2009

Continua

Conclusão

Alga: *Enteromorpha* sp.Micro-organismo: *Cadophora malorum*

ALMEIDA et al., 2010

III. 2. OBJETIVOS

III. 2.1 OBJETIVO GERAL

Considerando o potencial microbiano marinho relatado, uma parte deste projeto de mestrado teve como objetivo geral realizar o isolamento de micro-organismos endofíticos associados à macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) e investigar o potencial biológico de ensaios de atividade.

III. 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolamento de micro-organismos endofíticos associados à espécie *B. tenella* coletada na Praia da Fortaleza, Ubatuba, litoral de São Paulo;
- Avaliação das atividades biológicas *in vitro* de extratos e frações dos micro-organismos isolados de *B. tenella*:
 - Utilizando os fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, para investigação da atividade antifúngica;
 - Utilizando as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, para investigação da antibacteriana;
 - Utilizando linhagens tumorais HL-60 (leucemia), HCT-8 (cólon) e SCF-295 (sistema nervoso central), para investigação da citotoxicidade;
 - Utilizando células RBL-2H3, para investigação da inibição da degranulação mastocitária.

Cap. II – Material e métodos

III. 3. MATERIAL E MÉTODOS

III. 3.1 Especificações do material e instrumentos utilizados no estudo químico dos fungos endofíticos associados à alga *Bostrychia tenella*

O material e instrumentos utilizados nas análises dos fungos endofíticos associados à alga *Bostrychia tenella* são os mesmos descritos no Cap. I, item II. 3.1, p. 31. Adicionalmente, devido aos procedimentos microbiológicos que envolveram esta etapa, outros materiais e equipamentos foram usados.

Todos os procedimentos microbiológicos foram realizados em fluxo laminar da marca Pachane, modelo 410. As vidrarias e meios foram esterilizados utilizando autoclave vertical Phoenix. Os meios de cultura utilizados foram BDA e ágar da marca HIMedia Laboratories. Para preservação das linhagens foi utilizado óleo mineral VETEC e conservados em refrigerador Consul 280. As linhagens microbianas foram cultivadas em placas com meio semi-sólido em estufa incubadora para BOD da marca Novatecnica, modelo NT708.

Para a preparação de amostras analisadas por ressonância magnética nuclear foram utilizados solventes deuterados da marca Aldrich, contendo TMS como padrão interno. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos utilizando espectrômetro BRUKER DRX 500.

III. 3.2. Análise do potencial biológico dos micro-organismos endofíticos associados à alga *Bostrychia tenella*

O potencial biológico dos endófitos associados à alga *Bostrychia tenella* foi avaliado pela triagem de bioatividade. Extratos brutos e frações orgânicas (hexano, acetato e metanol/água) foram submetidos às mesmas avaliações biológicas às quais foi submetida a alga *Bostrychia tenella*, de acordo com o item II.3.3, p. 38 do Capítulo I.

III. 3.2.1. Isolamento de micro-organismos endofíticos associados à *B. tenella*

III. 3.2.1.1. Coleta das algas

Amostras de macroalgas vermelhas da espécie *Bostrychia tenella* foram coletadas nos Costões Rochosos da Praia Dura (23°30'07"S, 45°10'27"O), em Ubatuba-SP, litoral norte do estado de São Paulo. O material algal foi lavado rapidamente em água do mar para remoção de contaminantes (areia, crustáceos) e, em seguida, estocado em 2 frascos de vidro com água do mar filtrada, suplementada com antibiótico cloranfenicol (200 mg/L) e esterilizada por autoclavagem. Estes frascos foram conservados em caixas térmicas, em temperatura baixa (~4°C), e transportadas ao Laboratório de Química do Ambiente Marinho – FCFRP/USP.

III. 3.2.1.2. Esterilização da superfície das amostras

A esterilização da superfície das amostras foi realizada com o propósito de evitar o isolamento de micro-organismos associados superficialmente à alga, ou seja, garantir que a microbiota endofítica seja evidenciada.

O material algal contido em cada frasco foi dividido em 3 lotes, e as respectivas amostras foram submetidas ao processo de esterilização das superfícies. Este procedimento foi realizado em fluxo laminar, ambiente asséptico, por meio de diferentes metodologias, conforme descrito na Tabela III.2.

Tabela III.2 - Metodologias de esterilização da superfície (M.E.S.) de algas da espécie *B. tenella*.

	M.E.S. I	M.E.S. II	M.E.S. III
Incubação em etanol 70%	15 s	5 s	5 s
Incubação em hipoclorito de sódio	-	5 s	10 s

Após cada procedimento de esterilização das superfícies das algas, as amostras foram lavadas três vezes (em recipientes diferentes) em água do mar esterilizada. As metodologias de esterilização de superfície (M.E.S) fundamentam-se na propriedade antimicrobiana dos produtos etanol 70% e hipoclorito de sódio.

"Produtos naturais marinhos: identificação de metabólitos fenólicos halogenados na macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) e potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados"

Optou-se por variar o tempo de contato das amostras com estas soluções a fim de observar a capacidade esterilizante destas combinações (Tabela III.2). As lavagens sequenciais em água do mar esterilizada são necessárias para retirar resíduos de etanol 70% e hipoclorito de sódio, uma vez que os prováveis micro-organismos provenientes dos tecidos das algas poderiam não sobreviver devido ao contato com estes agentes químicos. Para controle da eficácia das M.E.S, uma alíquota da última lavagem foi semeada pela técnica de propagação em placa (spread plate) nos meios utilizados para o isolamento microbiológico.

As amostras de algas esterilizadas foram fragmentadas com uso de bisturi cirúrgico e de pinças estéreis, e transferidas para placas de Petri com o meio de escolha (13-15 fragmentos por placa). As placas contendo os fragmentos foram incubadas em estufa a uma temperatura de 30 °C e observações periódicas foram realizadas a fim de monitorar o surgimento de possíveis endófitos desenvolvendo-se ao redor dos fragmentos de alga.

A validade destas metodologias foi corroborada pela recente publicação feita na renomada revista *Nature (Nature Protocols)*, por Kjer e colaboradores (2010). O processo de obtenção de endofíticos a partir de organismos marinhos descrito nesta artigo é bastante semelhante às metodologias utilizadas, dando crédito ao trabalho aqui exposto.

III. 3.2.1.3. Meios de cultura utilizados

Cada lote de material algal esterilizado e fragmentado foi distribuído em dois meios de cultivo sólidos diferentes: alga-ágar (BTA = “*Bostrychia tenella* Ágar”) e batata-dextrose-ágar (BDA).

O meio BTA foi preparado pesando-se 20 g de alga, as quais foram fragmentadas em liquidificador com 200 mL de água do mar filtrada. Foram adicionados 15 g de ágar, e o volume foi completado com água do mar filtrada para 1000 mL. O meio BDA foi preparado segundo instruções do fabricante, ou seja, 39 g por litro de água do mar filtrada. Em ambos os meios foram adicionados 200 mg de cloranfenicol, para evitar o desenvolvimento de bactérias.

Quando prontos, os meios foram esterilizados em autoclave durante 15 min a temperatura média de 120 °C e, após resfriamento, distribuídos em placas de Petri

esterilizadas. As placas prontas foram armazenadas sob refrigeração até o momento do uso.

III. 3.2.1.4. Isolamento e preservação das linhagens microbianas

Em um período variável de tempo – de acordo com a observação periódica do experimento - colônias de micro-organismos foram crescendo ao redor dos fragmentos de alga contidos nas placas incubadas (Figura III.2). A fim de promover o isolamento microbiológico das linhagens, pequenos pedaços do meio semi-sólido contendo as colônias foram retirados cuidadosamente com o auxílio de uma alça de platina (formato em L) esterilizada e transferidos a outras placas com o mesmo meio no qual cresceram.

Após crescimento da linhagem isolada dos micro-organismos, estes foram submetidos à estocagem e preservação em óleo (ARAÚJO et al., 2002) e água (CASTELLANI, 1963). Foram utilizados frascos de penicilina de 10 mL, água do mar e meio BDA esterilizados. Discos de meio contendo os micro-organismos foram retirados com auxílio de “tubos transferidores” esterilizados, e colocados nos frascos de penicilina contendo meio BDA inclinado ou água do mar.

A preservação em água foi finalizada imediatamente ao depósito dos discos nos frascos de penicilina, enquanto que, no meio BDA, esperou-se o estabelecimento dos micro-organismos no meio inclinado (aproximadamente uma semana). Posteriormente, vaselina líquida esterilizada foi adicionada e o recipiente devidamente selado.

Figura III.2 - À esquerda, fragmentos da alga *B. tenella* esterilizados e, ao redor de alguns destes, micro-organismos endofíticos em crescimento (meio BDA, 7 dias após incubação). À direita, exemplo de linhagem microbiana isolada (meio BDA, 21 dias após incubação).

III. 3.2.2. Obtenção dos extratos brutos e frações orgânicas dos micro-organismos obtidos de *B. tenella*

III. 3.2.2.1 Seleção das linhagens

Como resultado do processo de obtenção dos micro-organismos endofíticos associados à *B. tenella*, foram isoladas e preservadas 45 linhagens microbianas. Deste total, 10 linhagens foram escolhidas para crescimento em meio sólido arroz, uma vez que, para o momento, era inviável propor o crescimento de todas as linhagens. Para uma devida seleção das linhagens, foram adotados critérios subjetivos, levando em consideração as diferenças morfológicas observadas visualmente. Optou-se por escolher os micro-organismos que mais se distinguiam entre si, e/ou que os que se destacavam devido a colorações intensas ou estruturas morfoanatômicas peculiares.

III. 3.2.2.2 Cultivo em meio sólido das linhagens microbianas selecionadas

As 10 linhagens microbianas escolhidas foram reativadas do meio de preservação em placas de Petri contendo meio BDA, as quais foram incubadas em estufa, durante 7 dias, a temperatura de 30 °C. Após este período e consequente crescimento das colônias, cerca de 10 discos de meio contendo as culturas de micro-organismos foram transferidas para 2 erlenmeyers de 500 mL contendo 90 g de arroz parbolizado esterilizado em autoclave (120 °C, 40 min). O meio de crescimento foi mantido a temperatura de 25 °C, durante 28 dias. Foi feito um controle contendo somente arroz parbolizado esterilizado, para verificação da eficiência da descontaminação do meio sólido.

Após 28 dias, houve o crescimento das linhagens e formação micelial dos micro-organismos. O meio de crescimento foi submetido a extração por maceração com MeOH durante 24 h, com posterior filtração e nova extração por 24 h. Os extratos metanólicos foram concentrados a pressão reduzida em evaporador rotatório, e secos em ar pressurizado. As linhagens fúngicas que foram colocadas para crescimento no meio sólido estão apresentadas na Figura III.3.

Figura III.3 - As 10 linhagens de endófitos de *B. tenella* que foram selecionadas para cultivo em meio sólido.

O fracionamento dos extratos brutos dos micro-organismos selecionados seguiu o mesmo padrão aplicado à extração e fracionamento da alga *B. tenella*

(Cap. I, item II.3.2.2, p. 33), diferindo na não utilização do solvente orgânico n-butanol durante o processo de partição líquido-líquido (Figura III.4).

Figura III.4 - Metodologia empregada para obtenção do extrato bruto e frações dos micro-organismos endofíticos da alga *Bostrychia tenella*.

O processo de partição líquido-líquido dos extratos metanólicos das linhagens microbianas selecionadas resultou num total de 33 frações, incluindo o branco, as quais estão apresentadas na Tabela III.3. Vale ressaltar que alíquotas do extrato hidro-metanólico inicial dos micro-organismos foi reservada e submetida à secagem para posteriores avaliações de atividade biológica.

Tabela III.3 - Frações orgânicas das linhagens de endófitos selecionadas.

Código da Linhagem	<i>Massas das frações orgânicas secas (g)</i>		
	Fração Hexânica	Fração Acetato	Fração Hidro-metanólica
T06	0,66	1,01	7,05
T65	0,25	1,11	3,49
T66	0,16	0,31	4,19
T67	0,18	0,88	3,98
T68	0,11	1,09	6,05
T69	0,57	1,64	7,12
T70	0,27	0,31	5,13
T71	0,31	0,52	6,65
T72	0,20	0,25	3,05
T73	0,19	0,47	2,47
Branco	0,06	0,20	1,81

III. 3.3. Identificação dos micro-organismos endofíticos obtidos de *B. tenella*

Devido aos resultados obtidos sobre das atividades biológicas dos extratos e frações dos micro-organismos endofíticos associados à alga *Bostrychia tenella*, fez-se necessário a identificação de algumas linhagens. Estas identificações foram realizadas sob a responsabilidade da Dr^a. Lara Durães Sette, pesquisadora do CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas), vinculado à UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas).

Placas contendo micro-organismos cultivados em meio semi-sólido BDA durante 21 dias, a 30 °C, foram enviadas ao laboratório da Dr^a. Lara. Para a

realização da identificação, foi adotada a metodologia de taxonomia molecular, a qual dispõe das seguintes etapas:

- Extração de DNA genômico, de acordo com o protocolo descrito por Hoog e colaboradores (2003);
- Amplificação da região D1/D2 (DNAr 28S) através de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente das amostras. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram NL-1m e NL-4m homólogos às extremidades da região D1/D2;
- Amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 através de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* utilizados para esta reação de PCR foram ITS-1 e ITS-4 homólogos às extremidades da região ITS;
- Sequenciamento dos fragmentos purificados em seqüenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Os *primers* utilizados para os sequenciamento foram NL-1m, NL-2m, NL-3m e NI-4m, para a região D1/D2 e ITS-1 e ITS-4, para a região ITS;
- Análise filogenética feita com a comparação das sequências parciais das regiões D1/D2 e ITS obtidas com os diferentes *primers* e montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos), com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) e CBS (<http://www.cbs.knaw.nl/>). As sequências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1994) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 3.0 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004). As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1000 re-amostragens, utilizando o software de rotina incluído no programa MEGA 3.0.

Cap. II – Resultados e Discussão

III. 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

III. 4.1. Isolamento de micro-organismos endofíticos associados à alga *Bostrychia tenella*

Os experimentos visando o isolamento de micro-organismos endofíticos da macroalga *Bostrychia tenella* conduziram à obtenção de 45 linhagens microbianas. Estas linhagens, às quais foram obtidas a partir de três métodos de esterilização da superfície da alga (MES I, MES II e MES III) (item III.3.2.1.2, p. 110), foram submetidas isoladas utilizando dois meios semi-sólidos como suporte de fornecimento de nutrientes, BDA e BTA. A Figuras III.5, apresenta uma análise superficial quantitativa a respeito da influência dos meios de suporte e dos métodos de esterilização de superfície empregados neste trabalho.

Figura III.5 - Avaliação da prevalência do isolamento de micro-organismos endofíticos da macroalga *Bostrychia tenella* de acordo com: **A)** MES utilizada; **B)** meio de cultura utilizado.

De acordo com a Figura III.5.A, pode-se considerar que o MES teoricamente mais brando (MES I) foi aquele que determinou o menor número de linhagens isoladas, enquanto os outros dois MES (II e III) foram igualmente prevalentes no número de micro-organismos obtidos.

Quanto ao meio de cultivo (Figura III.5.B) no qual os micro-organismos desenvolveram-se inicialmente, podemos verificar que o meio BDA apresentou uma prevalência determinante em relação ao meio BTA constituído substancialmente de material algáceo (*B. tenella*).

Kjer e colaboradores (2010) apontaram o uso com sucesso de BDA para o isolamento de micro-organismos a partir dos fragmentos de organismos marinhos. Estes autores estabeleceram um protocolo para o isolamento de micro-organismos marinhos a partir de seres vivos, semelhante ao qual foi utilizado para o isolamento das linhagens microbianas associadas à macroalga *Bostrychia tenella* (item III.3.2.1, p. 115).

Romminger (2008) utilizou três modos de preparação do material – fragmentação, homogeneização e esfregaço - para obtenção de fungos endofíticos associados à macroalga *Sargassum sp.*, obtendo maior sucesso com a metodologia de fragmentação. Em sequência, utilizou diversos meios de cultura semi-sólidos (agarizados – água de glicose e levedura, batata e cenoura, malte 2%, malte 3%, fubá, dentre outros) para o isolamento inicial das linhagens microbianas, obtendo mais linhagens ao utilizar o meio malte 2%. Entretanto, em termos qualitativos de micro-organismos, a variação de meios não representou significância relevante.

É importante ressaltar o crescente interesse no isolamento de endófitos de organismos marinhos (vide Tabela III.1, p. 105). Como exemplo de estudos abordando a diversidade de micro-organismos endofíticos marinhos, Schulz e colaboradores (2008) realizaram uma extensa triagem a fim de avaliar quais as melhores fontes de microrganismos endofíticos marinhos. Foram isoladas aproximadamente 2000 linhagens microbianas, porém em torno de 50% não puderam ser reativadas ou cultivadas em laboratório. Vale destacar que foram obtidos 1527 extratos brutos de 1049 linhagens microbianas, dos quais 99% foram ativos em pelo menos um ensaio biológico realizado (antifúngico, antibacteriano, antialgal e herbicida), evidenciando o potencial promissor de endofíticos marinhos para a descoberta de novas substâncias bioativas.

Logo, pode-se dizer que a metodologia empregada para o isolamento de micro-organismos endofíticos associados à macroalga *Bostrychia tenella* foi satisfatória ao permitir o isolamento de 45 linhagens microbianas.

III. 4.2. Análise biológica de micro-organismos endofíticos associados à alga *Bostrychia tenella*

Os extratos hidro-metanólicos e as frações hexânica, acetato e hidro-metanólica dos dez micro-organismos (além do branco) foram submetidos às avaliações biológicas descritas no Cap. I, item II.3.3, p. 38, para determinação do potencial biológico das linhagens microbianas endofíticas isoladas da alga *Bostrychia tenella*. É importante ressaltar que estas avaliações biológicas, além de nos indicarem quais os micro-organismos com maior potencial, nortearão o fracionamento cromatográfico, isolamento e identificação de substâncias em pesquisas sequenciais a este projeto de mestrado.

As amostras referentes aos brancos (EBB, FHB, FAB e FMB) foram inativas em todas as avaliações biológicas. Esta informação demonstra que o meio no qual os micro-organismos foram cultivados (arroz) não representou influenciou nos resultados. Portanto, para melhor compreensão, serão consideradas apenas as amostras referentes aos micro-organismos endofíticos, ou seja, 40 amostras, das quais 10 são extratos brutos e 30 são frações orgânicas obtidas a partir destes.

III. 4.2.1 Considerações gerais sobre o potencial biológico dos fungos endofíticos associados à alga *Bostrychia tenella*

Com o objetivo de avaliar de modo global o potencial dos micro-organismos associados obtidos da macroalga *Bostrychia tenella*, dados sobre as linhagens microbianas, tipo de amostra (extrato bruto ou fração orgânica) e ensaio biológico foram agrupados de modo a permitir observações e discussões pertinentes.

De acordo com a Figura III.6., temos o número de amostras ativas classificado por ensaio biológico e por composição química das amostras (extrato bruto, fração hexânica, fração acetato e fração hidro-metanólica).

Figura III.6 - Distribuição do potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados à alga *Bostrychia tenella*: número de amostras ativas em cada ensaio biológico realizado e subdividido pela composição química.

Podemos observar que houve atividade observada em todos os ensaios avaliados, ilustrando a versatilidade dos metabólitos de fungos endofíticos marinhos. Notadamente, as atividades citotóxica e antifúngica foram as que mais foram susceptíveis às ações das amostras. Seguido pelas atividades antibacteriana e IDM.

A literatura pode ser abordada de diferentes modos, tanto para a diversidade biológica de micro-organismos endofíticos, quanto micro-organismos marinhos e mesmo unindo as duas características (micro-organismos endofíticos marinhos). Em qualquer um destes âmbitos, o potencial verificado em termos de ação biológica de extratos e substâncias puras é evidente (GLASER; MAYER, 2009; GUNATILAKA, 2006; GUO et al., 2008; LAM, 2007; SCHULZ et al., 2008). Discussões mais específicas relacionando as atividades avaliadas serão feitas nos itens a seguir.

Em seguida, foi feita a análise da distribuição das atividades biológicas de acordo com a composição química das amostras (Figura III.7). Isso indica se foram

mais ativos extratos brutos (EB), frações hexânicas (FH), frações acetato (FA) e frações hidro-metanólicas (FM).

Figura III.7 - Distribuição das atividades biológicas apresentadas pelos micro-organismos endofíticos associados à alga *Bostrychia tenella* de acordo com a composição química das amostras.

Da observação da Figura III.7 podemos inferir que os componentes químicos mais ativos dos micro-organismos avaliados apresentam baixa a média polaridade, uma vez que o número de amostras ativas aponta FH e FA como maiores ocorrentes de atividade biológica.

Superficialmente, pode-se atribuir características gerais de composição química às classes de metabólitos secundários. Basicamente, ácidos graxos, esteróides, lipídeos, terpenos e acetogeninas pouco oxidadas, apresentam-se majoritariamente concentrados em frações hexânicas. Já terpenos com alto grau de oxidações, compostos aromáticos e heteroaromáticos, metabólitos contendo nitrogênio (alcalóides, derivados de peptídeos de cadeias curtas, etc) são mais encontrados em frações de média polaridade, como por exemplo, as frações obtidas utilizando acetato de etila. Finalmente, açúcares, oligo- e polissacarídeos, polipeptídeos de cadeia longa, compostos sulfatados e compostos altamente

oxidados são encontrados em frações polares, geralmente hidroalcoólicas (SIMÕES et al., 1999).

Sendo assim, o presente dado (Figura III.7) corrobora o que se tem relatado sobre a composição química ativa de micro-organismos. De acordo com as revisões consultadas (BORGES et al., 2009; GUNATILAKA, 2006; GUO et al., 2008; STROBEL et al., 2004; TAN; ZOU, 2001), a maioria dos metabólitos isolados de endofíticos correspondem a derivados alcalóides, peptídicos, terpenóides e esteróides, considerados de polaridade média, e logicamente, extraídos ou obtidos com solventes compatíveis com estas classes químicas.

Ainda, pode-se inferir que o modo de obtenção dos EBs foi insuficiente para que estes mostrassem atividade. Nota-se que é necessário fracionar os extratos para que sejam observados resultados positivos para atividade. Isto é um ponto importante a ser considerado quando se realizam triagens para avaliação de extratos brutos.

Quando o extrato bruto concentra uma grande diversidade de metabólitos, supressões de atividade biológica podem ocorrer devido às interações entre as diferentes classes de substâncias. Outro ponto a ser observado é que em extratos brutos, a concentração de substâncias ativas pode ser insuficiente para determinar a ação biológica. Neste sentido, à medida que a fração ativa vai sendo purificada, a substância responsável pela atividade apresenta-se mais concentrada, elevando os resultados dos indicadores biológicos até a obtenção da substância pura com atividade biológica comprovada.

Finalizando a análise global do potencial biológico dos micro-organismos endofíticos associados à alga *Bostrychia tenella*, apresentamos os dados evidenciando o potencial de cada linhagem frente às atividades biológicas avaliadas (Figura III.8). Este levantamento dispõe uma informação importante para estudos posteriores: qual micro-organismo apresentou potencial biológico, ou seja, aquele que se apresentou ativo nas diferentes metodologias de ensaios biológicos utilizadas na triagem.

A Figura III.8 remete esta informação de modo satisfatório. Certamente, as linhagens dos micro-organismos T67 e T69 se destacaram uma vez que tiveram um considerável número de amostras ativas nos diferentes ensaios realizados. Isto pode conduzir a algumas considerações como a presença de substâncias capazes

de atuar em mais de um modelo de avaliação biológica. Esta observação requer cuidado no que se refere a classificar um composto com esta chamada versatilidade, pois este poderia estar agindo de modo inespecífico, característica que não é desejada para futuros candidatos a fármacos (BARREIRO; FRAGA, 2008).

Figura III.8 - Distribuição das atividades biológicas dos micro-organismos endofíticos associados à alga *B. tenella* por linhagem microbiana.

Outro ponto relevante nesta discussão seria o potencial do micro-organismo em biossintetizar substâncias com potenciais seletivos para as diversas atividades biológicas. Neste caso, poderíamos dizer que o micro-organismo seria versátil e, consequentemente, merecedor de estudos químicos mais minuciosos referentes ao metabolismo secundário.

Vale destacar ainda que estas atividades biológicas utilizadas na triagem do potencial biológico destes micro-organismos, apesar de abordarem diferenciados mecanismos de ação, representam apenas um indício de potencial biológico. Além disso, os micro-organismos são seres extremamente versáteis em termos de metabolismo secundário (GUNATILAKA, 2006). Variações de meios nutricionais e condições de cultivo podem representar um imenso universo a ser explorado utilizando, por exemplo, um único fungo. O que deve ficar claro é que um micro-

organismo não deve ter seu estudo negligenciado porque não apresentou atividade biológica. Entretanto, esta triagem é essencial, uma vez que em pesquisa acadêmica é inviável realizar estudos aprofundados de grande número de micro-organismos.

III. 4.2.2 Atividade citotóxica

As atividades citotóxicas dos extratos e frações obtidos dos micro-organismos endofíticos isolados de *B. tenella* estão apresentadas na Tabela III.4. De um total de 40 amostras avaliadas, 8 demonstraram atividade citotóxica considerável em pelo menos uma das linhagens tumorais avaliadas. Entenda-se por considerável, aquelas amostras que causaram morte celular em pelo menos 50% das células de determinada linhagem, desconsiderando-se o desvio padrão das médias.

Tabela III.4 - Inibição do crescimento celular (IC%) ocasionado pelas amostras (100 µg/mL) de endófitos associados à *B. tenella*, avaliadas em três linhagens de células tumorais (média ± DPM).

Linhagens				
Amostras		SF-295	HCT-8	HL-60
EB68		32,10 ± 8,74	67,39 ± 46,11	22,83 ± 4,09
EB69		<u>55,40 ± 11,03</u>	<u>92,32 ± 10,86</u>	<u>23,26 ± 20,32</u>
FH69		<u>93,05 ± 0,11</u>	<u>97,78 ± 0,00</u>	<u>92,23 ± 2,60</u>
FA06		7,18 ± 2,36	17,85 ± 0,15	82,17 ± 0,07
FA67		<u>89,30 ± 6,38</u>	<u>87,90 ± 2,83</u>	<u>86,88 ± 1,97</u>
FA68		58,74 ± 0,21	68,03 ± 1,49	29,17 ± 0,41
FA69		<u>79,38 ± 1,06</u>	<u>88,46 ± 0,65</u>	<u>84,93 ± 1,86</u>
FA71		50,84 ± 2,08	59,61 ± 0,00	30,37 ± 0,48

Controle positivo: Doxorubicina (0,3 µg/mL): IC%SF-295 = 88,13 ± 1,74; IC%HCT-8 = 93,09 ± 0,37; IC%HL-60 = 87,41 ± 0,31.

Entretanto, de acordo com o critério adotado pelos colaboradores responsáveis, foram selecionadas para testes subseqüentes apenas as amostras EB69, FH69, FA67, FA69. O novo experimento foi realizado nas mesmas condições empregadas, com as mesmas linhagens celulares, porém variando a concentração

das amostras, a fim de obterem-se os valores de Cl_{50} para as mesmas (Tabela III.5).

Tabela III.5 - Valores de Cl_{50} médios para extratos e frações dos endófitos de *B. tenella*, em diferentes linhagens tumorais, com intervalo de confiança estatística de 95%.

Linhagens			
Amostras	SF-295	HCT-8	HL-60
EB69	>25	19,53	>25
FH69	0,87	0,43	0,56
FA67	20,93	6,63	3,78
FA69	14,57	4,38	11,73

A observação da Tabela III.5 nos aponta com destaque as frações FA67, FA69 e, principalmente, FH69 como detentoras de substâncias que possam apresentar potencial citotóxico destacável. Isto pode ser atestado pelos valores de Cl_{50} anotados para estas, dando ênfase aos baixos valores observados para a fração FH69, comparáveis aos valores obtidos para o controle positivo doxorrubicina.

O potencial citotóxico de micro-organismos endofíticos tem sido frequentemente relatado nos diversos artigos científicos e revisões. Dentre os metabólitos de endofíticos obtidos a partir de algas (Tabela III.1, p. 105), nota-se a ocorrência de três moléculas que apresentaram atividade citotóxica. A substância ascosalipirrolidinona A apresentou citotoxicidade em mioblastos de ratos e em macrófagos de camundongo (OSTERHAGE et al., 2000); o composto 6-hidroxi-5-metilramulosina apresentou citotoxicidade moderada em células HeLa (EL-BEIH et al., 2007); e a substância citrinal A demonstrou atividade citotóxica fraca nas linhagens celulares A-549 e HL-60 (ZHU et al., 2008).

Ainda, Tan e Zou (2001), Strobel e colaboradores (2004), Gunatilaka (2006) e Borges e colaboradores (2009) enumeraram 73 substâncias obtidas de diversas espécies de endofíticos, as quais apresentaram atividade citotóxica em ensaios com células tumorais, corroborando o potencial destes seres vivos em biossintetizar compostos que possam tornar-se novos candidatos a fármacos para o tratamento e cura do câncer.

III. 4.2.3 Atividade antifúngica

As amostras de micro-organismos endofíticos associados a *B. tenella* que demonstraram atividade antifúngica frente aos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* estão apresentadas na Tabela III.6. Esta tabela foi elaborada de acordo com a observação das placas cromatográficas contendo as amostras ensaiadas após eluição e reveladas com soluções salinas contendo os fungos fitopatogênicos. Fotografias destas placas podem ser observadas na Figura III.9.

Tabela III.6 - Avaliação da atividade antifúngica de extratos brutos e frações orgânicas obtidas de micro-organismos endofíticos associados a alga *B. tenella*.

Fungo		<i>C. cladosporioides</i>		<i>C. sphaerospermum</i>	
Amostra	R _f	Atividade	R _f	Atividade	
EB67	0,87	2	0,84	2	
EB69	0,86	1	0,83	1	
FH06	i	i	0,32	1	
FH67	0,2	2	0,21	2	
FH69	rastro	3	rastro	3	
FA66	i	i	0,84/0,76	2/1	
FA67	0,83/0,21	2/3	0,89/0,22/0,12	3/1/1	
FA69	0,85	1	i	i	
FM67	0,92	1	0,92	1	

Legenda: i (inativo); 1 (inibição fraca); 2 (inibição média); 3 (inibição intensa).

Controle positivo: Nistatina (1µg/µL) : 3, para ambos

Nota-se que novamente extratos e frações oriundas das linhagens EB67 e EB69 demonstraram atividade, neste caso, frente a fungos fitopatogênicos. Destacando-se mais uma vez, a fração FH69 mostrou forte inibição ao crescimento de ambos os fungos avaliados, elevando o interesse sobre sua constituição. Neste ensaio biológico, a linhagem T66, através da fração acetato, mostrou atividade somente em relação ao fungo *C. sphaerospermum*, constituindo um dado interessante, pois foi seletivo a uma das espécies.

Figura III.9 - Avaliação antifúngica dos extratos brutos e frações orgânicas de micro-organismos endofíticos associados a *B. tenella* pelo método de bioautografia: placas cromatográficas contendo amostras dos endófitos de *B. tenella* reveladas com irradiação UV $\lambda = 254$ nm e $\lambda = 365$ nm, e reveladas com solução de esporos dos fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

A propriedade antifúngica também tem sido atribuída a extratos e substâncias puras oriundas de micro-organismos endofíticos. Na Tabela III.1 (p. 105), a substância nigerasperona C e um derivado naftoquinoneimina, ambos isolados do fungo *Aspergillus niger* EN-13, endofítico obtido da alga marrom *Colpomenia sinuosa*, apresentaram fraca e moderada atividades, respectivamente, frente ao fungo *Candida albicans* (ZHANG; LI; WANG, 2007; ZHANG et al., 2007).

Além disso, de acordo com as revisões de Tan e Zou (2001), Strobel e colaboradores (2004), Gunatilaka (2006), Borges e colaboradores (2009), já foram relatados 84 produtos naturais originados de micro-organismos endofíticos de

plantas e organismos marinhos com atividade antifúngica utilizando diversos fungos, inclusive patogênicos a humanos. Isso comprova a eficiência características de endófitos em produzirem substância com potencial fungicida agregado, e estimula pesquisas subsequentes utilizando as frações ativas dos micro-organismos endofíticos associados à alga *Bostrychia tenella* para averiguação do composto que apresenta esta propriedade.

III. 4.2.4 Atividade antibacteriana

As amostras de micro-organismos endofíticos associados a *B. tenella* que demonstraram atividade antibacteriana utilizando a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e a gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) estão apresentadas na Tabela III.7.

Tabela III.7 – Valores das CIMs das frações ativas dos endófitos de *B. tenella*.

Bactéria	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Amostra		
FH66	400	≥ 400
FH67	200	≥ 400
FH69	≤ 25	400
FH73	100	≥ 400
FA67	400	≥ 400
FA69	400	≥ 400

Controle positivo:

S. aureus: Penicilina-G (0,0028 µg/mL); *K. pneumoniae*: Estreptomicina (0,7375 µg/mL)

Controle negativo:

DMSO 5% ≥ 400 (para ambos)

A observação da Tabela III.7 nos indica que a bactéria gram-positiva *S. aureus* foi mais susceptível à ação das amostras obtidas dos micro-organismos, em relação à gram-negativa *K. pneumoniae*. Este resultado pode ser considerado como esperado uma vez que substâncias tóxicas a estas bactérias possuem mecanismo de ação diferenciado (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010).

Outra observação interessante é que a fração FH69 apresentou-se ativa contra as duas bactérias com diferentes valores de CIM, indicando que pode conter substâncias seletivas, com mecanismos de atuação diferenciados.

Assim como a atividade antifúngica discutida no item anterior, o potencial bactericida de micro-organismos endofíticos também tem sido verificado na literatura. Novamente, de acordo com as revisões utilizadas como base (TAN; ZOU, 2001; STROBEL et al., 2004; GUNATILAKA, 2006; BORGES et al., 2009), já foram isolados 50 compostos antibacterianos, a partir de micro-organismos endofíticos. Entretanto, a Tabela III.1 não apresenta nenhuma ocorrência de substâncias bactericidas isoladas de endófitos oriundos de algas. Este fato estimula trabalhos futuros com as frações ativas discutidas neste item, objetivando o isolamento dos compostos responsáveis pelas atividades frente às bactérias *S. aureus* e *K. pneumoniae*.

III. 4.2.4 Atividade antialérgica

As amostras de micro-organismos endofíticos associados a *B. tenella* que demonstraram inibição à degranulação de mastócitos utilizando células RBL-2H3 estão apresentadas na Tabela III.8. Dados que permitiram a elaboração desta tabela foram coletados da observação dos gráficos apresentados na Figura III.10.

Tabela III.8 - Efeito inibidor dos extratos brutos e frações orgânicas de micro-organismos endofíticos associados a alga *B. tenella* sobre a liberação da enzima β -hexosaminidase de mastócitos utilizando a linhagem RBL-2H3.

Amostras	CI ₅₀ (µg/mL) ± DPM
EB70	98,05 ± 3,07
FM65	76,96 ± 3,82
FM68	137,28 ± 11,56
FM71	74,57 ± 3,92

Controle positivo: Fumarato de Cetotifeno – CI₅₀ = 64,28 ± 3,12 µg/mL

Observa-se pela Tabela III.8 e Figura III.10 que as amostras ativas para IDM, diferentemente dos resultados que vem sendo observados até o presente momento, são majoritariamente polares (frações hidro-metanólicas). Nota-se ainda que este

foi o único ensaio no qual as linhagens T70 e T71 foram ativas, indicando uma seletividade interessante, que deve ser considerada.

Ainda vale destacar que somente o extrato bruto da linhagem T70 foi ativo, nos fazendo suspeitar de uma possível ação sinérgica, já que as frações orgânicas não se mostraram ativas.

A literatura não dispõe de dados sobre avaliação de compostos de origem microbiana utilizando células RBL-2H3 para a inibição da liberação de β -hexosaminidase. Sobre a propriedade antialérgica de metabólitos microbianos, Erkel e colaboradores (2008) relataram atividade antialérgica intermediada por IL-4, através da ação da lactona macrocíclica clorada oxaciclododecindiona, obtida da fermentação do fungo filamentoso *Exserohilum rostratum*.

Deste modo, o presente estudo, no qual extratos e frações de micro-organismos endofíticos de alga marinha (*Bostrychia tenella*) foram avaliados utilizando o modelo de inibição da liberação de β -hexosaminidase em células RBL-2H3, representa uma nova área a ser explorada em termos de potencial biológico de produtos naturais.

Figura III.10 - Gráficos que estabelecem a relação entre a concentração de amostra avaliada (abscissas, [amostra] escala logarítmica) e a % de β -hexosaminidase (ordenadas, %) para as amostras de micro-organismos endofíticos associados a *B. tenella* que se demonstraram ativas.

III. 4.3. Identificação das linhagens microbianas mais promissoras

De acordo com o item III.4.2.1, p. 125, as linhagens T67 e T69 foram escolhidas para serem as primeiras a serem identificadas, uma vez que mostraram potencial perante as atividades biológicas avaliadas, destacando-se dentre as outras linhagens.

Portanto, as linhagens microbianas T67 e T69 foram submetidas ao cultivo em meio semi-sólido BDA e, após período de crescimento (Figura III.11), foram enviadas ao CPQBA, para serem devidamente identificadas por taxonomia molecular.

Figura III.11. Micro-organismos desenvolvidos em placas com meio de cultivo BDA para identificação por taxonomia molecular. A) Linhagem T67; B) Linhagem T69.

Até a elaboração desta dissertação, somente o micro-organismo T67 pode ser identificado: fragmentos da região D1/D2 foram amplificados com sucesso a partir do DNA genômico extraído das amostras. Os materiais foram purificados em colunas (GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit, Amersham Biosciences) e submetidos ao sequenciamento automático no sistema MegaBACE.

As sequências foram analisadas usando a rotina BLAST do GenBank e o banco de dados do CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre).

A amostra da linhagem T67 apresentou alta similaridade de sequência (100%) com a espécie de fungo *Penicillium decaturense*. Na árvore filogenética gerada para esta amostra, o material isolado de T67 não apresentou distância evolutiva do fungo *P. decaturense*. Resultados de análises micro e macromorfológicas confirmaram a identificação do fungo T67 como *Penicillium decaturense*.

De acordo com os principais bancos de dados científicos (CAPLUS e MEDLINE), existem somente três referências para esta espécie de fungo, sendo somente um contendo dados químicos de substâncias isoladas e atividade biológica.

Penicillium decaturense foi citado pela primeira vez por Zhang e colaboradores (2003). Neste estudo, foram isolados três alcalóides (Figura III.12) com propriedades inseticidas. Posteriormente, o estudo detalhado a cerca de sua taxonomia e filogenia foi publicado (PETERSON; BAYER; WICKLOW, 2004). Estas substâncias, além de outras análogas também foram isoladas do fungo *Penicillium*

thiersii (LI et al., 2005) e de uma outra linhagem de *Penicillium sp.* (ABE et al., 2007), ambas com ações inseticidas.

Linhagens de *P. decaturense* foram obtidas a partir de basidiomicetos presentes em madeira em decomposição (ZHANG et al., 2003, PETERSON; BAYER; WICKLOW, 2004), e ainda a partir de casca de cortiça (SERRA et al., 2008). Não há relatos sobre o isolamento de *P. decaturense* a partir do ambiente marinho.

Figura III.12 - Metabólitos isolados do fungo *Penicillium decaturense* (ZHANG et al., 2003).

Deste modo, o fungo identificado apresenta um potencial químico e biológico a ser explorado, visto a escassa informação a respeito desta espécie.

Conclusões

IV. CONCLUSÕES

O trabalho realizado permitiu o conhecimento de parte do arsenal metabólico da macroalga vermelha *Bostrychia tenella*. A técnica de CG-EM foi utilizada com sucesso para identificação tanto de metabólitos de cadeias carbônicas longas, na fração mais apolar (BT-H), quanto de metabólitos fenólicos e fenólicos halogenados, na fração de média polaridade (BT-A), totalizando 63 metabólitos identificados.

A técnica de espectrometria de massas empregada foi satisfatória no intuito de fornecer dados suficientes para elucidação das estruturas químicas dos metabólitos fenólicos halogenados. Vale ressaltar que a identificação de possíveis precursores destes halogenados foi determinante para as proposições das estruturas químicas.

É importante destacar que dos 25 metabólitos fenólicos e fenólicos halogenados identificados, até o presente momento, 6 estão sendo relatados pela primeira vez para o gênero *Bostrychia*, 4 estão sendo relatados pela primeira vez em algas marinhas, 9 estão sendo relatados pela primeira vez como produtos naturais, e 3 estão sendo considerados inéditos, já que não há descrição destas estruturas químicas na literatura.

O isolamento destas substâncias não foi possível, e consequentemente, suas atividades biológicas não foram determinadas. Entretanto, a continuação da investigação química de macroalgas marinhas deve ser estimulada, considerando a necessidade da busca por novas estruturas químicas que sejam ativas para uso na terapêutica de doenças.

A ocorrência diversa de metabólitos halogenados na macroalga *B. tenella* contribui para o aumento do conhecimento do potencial biossintético de algas vermelhas em produzirem produtos naturais contendo halogênios. Neste sentido, um futuro estudo sobre o arsenal enzimático desta alga torna-se interessante, no intuito de comprovar e/ou aprofundar-se na biossíntese destes compostos halogenados. Ainda, a síntese química destes produtos naturais halogenados (vide Apêndice B) representa uma alternativa eficiente para a obtenção destas substâncias purificadas e isoladas a fim de proporcionar estudos de atividade biológica envolvendo estes metabólitos acumulados na espécie *B. tenella*.

Outro fator relevante a ser apontado foi que o potencial químico da alga *Bostrychia tenella* foi deliberadamente mais expressivo do que suas propriedades biológicas, considerando os ensaios biológicos realizados. As frações avaliadas desta alga não mostraram potencial suficiente para as atividades citotóxica, antifúngica, antibacteriana e de inibição da degranulação mastocitária (antialérgica) a ponto de conduzir um estudo químico biomonitorado. Esta constatação se contrapõe parcialmente à literatura, principalmente quanto aos potenciais antifúngico e antibacteriano. A identificação de estruturas fenólicas, algumas comprovadamente antimicrobianas, é uma forte indicação de que novas abordagens devem ser realizadas, quanto ao potencial biológico de *Bostrychia tenella*.

O isolamento de 45 linhagens microbianas endofíticas da macroalga *B. tenella* nos permitiu concluir que esta espécie de alga também apresenta um potencial microbiológico passível de ser estudado com maior aprofundamento.

As metodologias de esterilização de superfície (MES) empregadas para *B. tenella* foram satisfatórias quanto a garantir que os micro-organismos isolados fossem endofíticos. Do mesmo modo, os meios de cultivo semi-sólidos utilizados permitiram o desenvolvimento dos micro-organismos, enquanto que o uso do meio de cultivo sólido arroz permitiu a obtenção de extratos brutos e frações orgânicas os quais apresentaram atividade relevante nos quatro ensaios biológicos utilizados.

A obtenção de micro-organismos com potencial biológico agregado remete à alga *B. tenella* o atributo de fonte orgânica de micróbios interessantes aos estudos químicos e biológicos para obtenção de novas estruturas que possam se tornar candidatos a fármacos.

Como conclusão final, pode-se dizer que os objetivos propostos nos capítulos I e II foram atingidos de modo satisfatório. Ainda, vale destacar que outros estudos relativos ao potencial químico e biológico da macroalga *Bostrychia tenella* e à seus micro-organismos endofíticos associados poderão ser realizados, visto que a literatura envolvendo estes temas ainda é demasiadamente escassa.

Referências

V. REFERÊNCIAS

- ABDEL-LATEFF, A.; KÖNIG, G. M.; FISCH, K. M.; HÖLLER, U.; JONES, P. G.; WRIGHT, A. D. New antioxidant hydroquinone derivatives from the algicolous marine fungus *Acremonium* sp. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1605-1611, 2002.
- ABDEL-LATEFF, A.; Fisch, K. M.; Wright, A. D.; KÖNIG, G. M. A new antioxidant isobenzofuranone derivative from the algicolous marine fungus *Epicoccum* sp. **Planta Medica**, v. 69, p. 831-834, 2003.
- ABDEL-LATEFF, A. Chaetominedione, a new tyrosine kinase inhibitor isolated from the algicolous marine fungus *Chaetomium* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 6398-6400, 2008.
- ABE, H.; UCHIYAMA, M.; SATO, R. Isolation of phenylacetic acid and its p-hydroxy derivative as auxin-like substances from *Undaria pinnatifida*. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 38, p. 897-898, 1974.
- ABE, M.; IMAI, T.; ISHII, N.; USUI, M.; OKUDA, T.; OKI, T. Isolation of an insecticidal compound oxalicine B from *Penicillium* sp. TAMA 71 and confirmation of its chemical structure by X0ray crystallographic analysis. **Journal of Pesticide Science**, v. 32, p. 124-127, 2007.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 1^a. Ed. Illinois:Allured Publishing Corporation,1995. 469 p.
- ALGAE MARIS BRASILIS, 2010a - <http://www.ib.usp.br/algaemaris/busca3.php?id=86>, acessado em 18 de junho de 2010.
- ALGAE MARIS BRASILIS, 2010b - http://www.ib.usp.br/algaemaris/verimg.php?path=images_algas/86/AMB%20Bostrychia%20tenella.jpg, acessado em 18 de junho de 2010.
- ALMEIDA, C.; EGUEREVA, E.; KEHRAUS, S.; SIERING, C.; KÖNIG, G. M. Hidroxylated sclerosporin derivatives from the marine-derived fungus *Cadophora malorum*. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 476-478, 2010.
- ANDERSEN, F. A. Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products. **International Journal of Toxicology**, v. 27, p. 1-82, 2008.
- ANDRIANASOLO, E. H.; FRANCE, D.; CORNELL-KENNON, S.; GERWICK, W. H. DNA methyl transferase inhibiting halogenated monoterpenes from the Madagascar red marine alga *Portieria hornemannii*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 576-579, 2006.
- 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.

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010-
http://www.anvisa.gov.br/reblas/bio/anali/analitico_007.htm#1, acessado em 29 de junho de 2010.
- ARAÚJO, L. W.; LIMA, S. O. A.; AZEVEDO, L. J.; MARCON, J.; SOBRAL, K. J.; LAVACA, T. P. **Manual: Isolamento de Micro-organismos Endofíticos**. 1ª. Ed. Piracicaba: ESALQ, 2002, 86 p.
- ARINOBU, Y.; IWASAKI, H.; AKASHI, K. Origin of basophils and mast cells. **Allergology International**, v. 58, p. 21-28, 2009.
- ASCENCIO, S. D.; ORSATO, A.; FRANÇA, R. A.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D. Complete ¹H and ¹³C NMR assignment of digeneaside, a low-molecular-mass carbohydrate produced by red seaweeds. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 677-682, 2006.
- BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Research**, v. 24, p. 1225-1244, 2007.
- BARNATHAN, G. Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: occurrence, characterization and biological properties. **Biochimie**, v. 91, p. 671-678, 2009.
- BAROODY, F. M. Allergic rhinitis: broader disease effects and implications for management. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v.128, p. 616-631, 2003.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 536 p.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.
- BARSUMIAN, E. L.; CHAVIVA, I.; PETRINO, M. G.; SIRAGANIAN, R. P. Ig-E induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones. **European Journal of Immunology**, v. 11, p. 317-323, 1981.
- BASABE, P.; DIEGO, A.; DELGADO, S.; DÍEZ, D.; MARCOS, I. S.; URONES, J. G. Short and efficient synthesis of (+)-subersic acids. **Tetrahedron**, v. 59, p. 9137-9177, 2003.
- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 1-26, 2005.
- BERGÉ, J. -P.; BARNATHAN, G. Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, role as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. In: LE GAL, Y.; ULBER, R. Marine biotechnology I. 1ª. Ed. Berlin: Springer, 2005. Cap. 2, p. 49-126.
- BERLINCK, R. G. S.; HADJU, E.; ROCHA, R. M.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; HERNANDEZ, I. L. C.; SELEGHIM, M. H. R.; GRANATO, A. C.; ALMEIDA, E. V. R.; NUÑEZ, C. V.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; THIEMANN, O.; SILVA, 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.

BHADURY, P.; WRIGHT, P. C. Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. **Planta**, v. 219, p. 561-578, 2004.

BHAKUNI, D. S.; RAWAT, D. S. **Bioactive marine natural products**. Nova Delhi: Anamaya, 2005, 382 p.

BINGHAM, J. -P.; MITSUNAGA, E.; BERGERON, Z. L. Drug from slugs – past, present and future perspectives of ω -conotoxin research. **Chemical Biological Interaction**, v.183, p. 1-18, 2010.

BLAY, J. -Y. Trabectedin: an emerging therapeutic option in soft tissue sarcoma. **European Journal of Clinical & Medical Oncology**, v. 1, p. 1-7, 2009.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; WAN-PING, H.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 35-94, 2008.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; WAN-PING, H.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 170-244, 2009.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 165-237, 2010.

BONATO, P. S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. 1^a. Ed. Campinas: Ed. Unicamp, 2006. p. 203-272.

BORGES, W. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; PUPO, M. T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 1137-1163, 2009.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Products Reports**, v. 25, p. 475-516, 2008.

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146C, p. 60-78, 2007.

CARROL, J.; DOUARRE, P.; COFFEY, A.; BUCKLEY, J.; CASHMAN, B.; O'FARREL, K.; O'MAHONY, J. Optimization of a rapid viability assay for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by using alamarblue. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 7870-7872, 2009.

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

CARVALHO, L. R.; ROQUE, N. F. Correlations between primary and secondary metabolites in Ceramiales (Rhodophyta). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 337-342, 2004.

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.

CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathologia et mycologia applicata**, v. 20, p. 1-6, 1963.

CASTELLO, G. Retention index systems: alternatives to the *n*-alkanes as calibration standards. **Journal of Chromatography A**, v. 842, p. 51-64, 1999.

CHATTER, R.; KLADI, M.; TARHOUNI, S.; MAATOUG, R.; KHARRAT, R.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. Neorogioltriol: a brominated diterpene with analgesic activity from *Laurencia glandulifera*. **Phytochemistry Letters**, v. 2, p. 25-28, 2009.

CHRISTINAT, A.; LEYVRAZ, S. Role of trabectedin in the treatment of soft tissue sarcoma. **OncoTargets and Therapy**, v. 2, p. 105-113, 2009.

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

CROTTI, A. E. M.; CAROLLO, C. A.; GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M. D.; GATES, P. J.; LOPES, N. P. LC-hyphenated techniques: uses in the structural elucidation of low- and high-molecular weight compounds. In: TAFT, C. A. **Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry**. 1a. Ed. Kerala: Research Signpost, 2008. p. 99-142.

CUI, C. -M.; LI, X. -M.; LI, H. -F.; GAO, S. -S.; WANG, B. -G. Benzodiazepine alkaloids from marine-derived endophytic fungus *Aspergillus ochraceus*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 92, p. 1366-1370, 2009.

D'ALESSANDRO, M.; TURLINGS, T. C. J. Advances and challenges in the identification of volatiles that mediate interactions among plants and arthropods. **Analyst**, v. 131, p. 24-32, 2006.

DA SILVA, V. M.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B.; VELOSO, M. C. C.; SANTOS, G. V.; OLIVEIRA, A. S. Bromofenóis simples relacionados ao "flavor" de organismos marinhos. **Química Nova**, v. 30, p. 629-635, 2007.

DAVIS, R. A.; WATTERS, D.; HEALY, P. C. The isolation and synthesis of 3-chloro-4-hydroxy-phenylacetamide produced by a plant-associated microfungus of the genus *Xylaria*. **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 919-921, 2005.

DAVIS, R. A.; INNOCENTI, A.; POULSEN, S. -A.; SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors. Identification of selective inhibitors of the human mitochondrial isozymes VA and VB over the cytosolic isozymes I and II from a natural product-based phenolic library. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 14-18, 2010.

- DEMAIN, A. L.; ZHANG, L. Natural products and drug discovery. In: ZHANG, L.; DEMAIN, A. L. **Natural products – drug discovery and therapeutic medicine**. Nova Jersey: Humana Press, 2005, Cap. 1, p. 3-29.
- DEMAIN, A. L. Antibiotics: natural products essential to human health. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, p. 821-842, 2009.
- DÍAZ-MARRERO, A. R.; BRITO, I.; de La ROSA, J. M.; DARIAS, J.; CUETO, M. Gomerones A-C, halogenated sesquiterpenoids with a novel carbon skeleton from *Laurencia majuscula*. **Tetrahedron**, v. 64, p. 10821-10824, 2008.
- DÍAZ-MARRERO, A. R.; BRITO, I.; de La ROSA, J. M.; D'CROZ, L.; FABELLO, O.; RUIZ-PÉREZ, C.; DARIAS, J.; CUETO, M. Novel lactone chamigrene-derivatred metabolites from *Laurencia majuscula*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 9, p. 1407-1411, 2009.
- DICKE, M. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. **Plant, Cell and Environment**, v. 32, p. 654-665, 2009.
- DING, L.; QIN, S.; LI, F.; CHI, X.; LAATSCH, H. Isolation, antimicrobial activity, and metabolites of fungus *Cladosporium* sp. associated with red alga *Porphyra yezoensis*. **Current Microbiology**, v. 56, p. 229-235, 2008.
- DIRETÓRIO DOS GRUPOS DE PESQUISA DO CNPQ. 2010.
<http://www.dgp.cnpq.br/buscaoperacional/>, acessada em junho/2010. Base corrente: grupo; palavra-chave: produtos naturais marinhos.
- DREWS, J. Drug Discovery: a historical perspective. **Science**, v. 287, p. 1960-1964, 2000.
- DUAN, X.-J.; LI, X.-M.; WANG, B.-G. Highly brominated mono- and bis-phenols from marine red alga *Symphocadia latiuscula* with radical-scavenging activity. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1210-1213, 2007.
- 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-BEIH, A. A.; KATO, H.; OHTA, T.; TSUKAMOTO, S. (3R, 4aR,5S,6R)-6-Hydroxy-5-methylramulosin: a new ramulosin derivative from a marine-derived sterile mycelium. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 953-954, 2007.
- ERKEL, G.; BELAHMER, H.; SERWE, A.; ANKE, T.; KUNZ, H.; KOLSHORN, H.; LIERMANN, J.; OPATZ, T. Oxacyclododecindione, a novel inhibitor of IL-4 signaling from *Exserohilum rostratum*. **Journal of Antibiotics**, v. 65, p. 285-290, 2008.

- FAN, X.; XU, N. -J.; SHI, J. -G. A new brominated phenylpropylaldehyde and its dimethyl acetal from red alga *Rhodomela confervoides*. **Chinese Chemical Letters**, v. 14, p. 1045-1047, 2002.
- FAN, X.; XU, N. -J.; SHI, J. -G. Bromophenols from the red alga *Rhodomela confervoides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 455-458, 2003.
- FARNET, C. M.; ZAZOPOULOS, E. Improving drug Discovery from microorganisms. In: ZHANG, L.; DEMAINE, A. L. **Natural products: drug discovery and therapeutic medicine**. Totowa: Human Press Inc., 2005. Cap. 95-106.
- de 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.
- de FELÍCIO, R.; ALBUQUERQUE, S.; YOUNG, M. C. M.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 763-769, 2010.
- FIELD, J. A.; VERHAGEN, J. M.; DE JONG, E. Natural organohalogen production by basidiomycetes. **Trends in Biotechnology**, v. 13, p. 451-456, 1995.
- FINK, P. Ecological functions of volatile organic compounds in aquatic systems. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 40, p. 155-168, 2007.
- FLODIN, C.; WHITFIELD, F. B. 4-Hydroxybenzoic acid: a likely precursor of 2,4,6-tribromophenol in *Ulva lactuca*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 249-255, 1999.
- FLODIN, C.; HELIDONIS, F.; WHITFIELD, F. B. Seasonal variation in bromophenol content and bromoperoxidase activity *Ulva lactuca*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 135-138, 1999.
- FLODIN, C.; WHITFIELD, F. B. Brominated anisoles and cresols in the red alga *Polysiphonia sphaerocarpa*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 77-80, 2000.
- FOLK, T. L.; WIDEMAN, L. G. Competing fragmentations in the mass spectra of halogenated phenols. **Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications**, p. 491-492, 1969.
- FRANCESCHINI, I. M.; BURLIGA, A. L.; REVIERS, B.; PRADO, J. F.; RÉZIG, S. H. **Algas – uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. 1ª. Ed. Porto Alegre: ARTMED. 2010, 332 p.
- FRIES, L.; IWASAKI, H. *p*-Hydroxyphenylacetic acid and other phenolic compounds as growth stimulators of the red alga *Porphyra tenera*. **Plant Science Letters**, v. 6, p. 299-307, 1976.
- FUJIMOTO, K.; KANEDA, T. Separation of antioxygenic (antioxidant) compounds from marine algae. **Hydrobiologia**, p. 111-113, 1984.

GAMAL-ELDEEN, A. M.; ABDEL-LATEFF, A.; OKINO, T. Modulation of carcinogen metabolizing enzymes by chromanone A; a new chromone derivative from algicolous marine fungus *Penicillium* sp. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 317-322.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p. 306-317, 2008.

GINER, J. –L. Biosynthesis of marine sterol side chains. **Chemical Reviews**, v. 93, p. 1735-1752, 1993.

GLASER, K. B.; MAYER, A. M. S. A renaissance in marine pharmacology: from preclinical curiosity to clinical reality. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p. 440-448, 2009.

GLOERICH, J.; Van den BRINK, D. M.; RUITER, J. P. N.; van VLIES, N.; VAZ, F. M.; WANDERS, R. J. A.; FERDINANDUSSE, S. Metabolism of phytol to phytanic acid in the mouse, and the role of PPAR α in its regulation. **Journal of Lipid Research**, v. 48, p. 77-85, 2007.

GLOMBITZA, Von K. –W.; STOFFELEN, H.; MURAWSKI, U.; BIELACZEK, J.; EGGE, H. Antibiotics from algae. 9. Bromophenols from Rhodomelaceae. **Planta Medica**, v. 25, p. 105-114, 1974.

GOVENKAR, M. B.; WAHIDULLA, S. Studies on the fatty acids of the ref alga *Chondria armata* (Kütz.). **Botanica Marina**, v. 42, p. 3-5, 1999.

GRANBERG, M.; FOWLER, C. J.; JACOBSON, S. O. Effects of the cannabimimetic fatty acid derivatives 2-arachidonoylglycerol, anandamide, palmitoylethanolamide and methanandamide upon IgE dependent antigen-induced beta- hexosaminidase, serotonin and TNF alpha release from rat RBL-2H3 basophilic leukaemia cells. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v. 364, p. 66-73, 2001.

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

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 509-526, 2006.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, p. 136-142, 2008.

HAN, L.; XU, N.; SHI, J.; YAN, X.; ZENG, C. Isolation and pharmacological activities of bromophenols from *Rhodomela confervoides*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 23, p. 226-229, 2005.

HARTUNG, J. The biosynthesis of barbamide – a radical pathway for “biohalogenation”? **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, p. 1209-1211, 1999.

- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 894-901, 2008.
- 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.
- HERTWECK, C. Hidden biosynthetic treasures brought to light. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 450-452, 2009.
- HESTER, R. E.; HARRISON, R. M. **Chemistry in the marine environment**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000, 98 p.
- HILL, R. A. Marine natural products. **Annual Reports on the Progress of Chemistry, Section B**, v. 105, p. 150-166, 2009.
- HÖLLER, U.; KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. A new tyrosine inhibitor from a marine isolate of *Ulocladium botrytis* and new metabolites from the marine fungi *Asteromyces cruciatus* and *Varicosporina ramulosa*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 1999, p. 2949-2955, 1999.
- HOMANS, A. L.; FUCKS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v. 51, p. 327-329, 1970.
- HOWARD, D. H. **Fungi pathogenic for humans and animals**. New York: Marcel Dekker, 1983.
- HOOG, G. S.; VICENTE, V.; CALIGIORNE, R. B.; KANTARCIOGLU, S.; TINTELNOT, K.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; HAASE, G. Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4767-4778, 2003.
- HOLZAPFEL, C. W.; WILLIAMS, D.; BRADLEY, G. A facile route to 3a,8a-dihydrofuro[2,3-b]benzofuran. **Tetrahedron**, v. 51, p. 8555-8564, 1995.
- IANORA, A.; BOERSMA, M.; CASOTTI, R.; FONTANA, A.; HARDER, J.; HOFFMAN, F.; PAVIA, H.; POTIN, P.; POULET, S. A.; TOTH, G. New trends in marine chemical ecology. **Estuaries and Coasts**, v. 29, p. 531-551, 2006.
- INOUE, Y.; HADA, T.; SHIRAISHI, A.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; KOBAYASHI, S. Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 1770-1774, 2005.
- JENSEN, P. R.; MINCER, T. J.; WILLIAMS, P. G.; FENICAL, W. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 87, p. 43-48, 2005.
- JHA, R. K.; ZI-RONG, X. Biomedical compounds from marine organisms. **Marine Drugs**, v. 2, p. 123-146, 2004.

JI, N. -Y.; LI, X. -M.; CUI, C. -M.; WANG, B. -G. Terpenes and polybromindodeles from the marine red alga *Laurencia decumbens* (Rhodomelaceae). **Helvetica Chimica Acta**. v. 90, p. 1731-1736, 2007a.

JI, N. -Y.; LI, X. -M.; LI, K.; DING, L. -P.; GLOER, J. B.; WANG, B. -G. Diterpenes, sesquiterpenes, and a C₁₅-acetogenin from the marine red alga *Laurencia mariannensis*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1901-1905, 2007b.

JI, N. -Y.; LI, X. -M.; CUI, C. -M.; WANG, B. -G. Two new brominated diterpenes from *Laurencia decumbens*. **Chinese Chemical Letters**, v. 18, p. 957-959, 2007c.

JI, N. -Y.; LI, X. -M.; ZHANG, Y.; WANG, B. -G. Two new halogenated chamigrene-type sesquiterpenes and other secondary metabolites from the marine red alga *Laurencia okamurai* and their chemataxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 627-630, 2007d.

JI, N. -Y.; LI, X. -M.; DING, L. -P.; WANG, B. -G. Two new aristolane sesquiterpenes from *Laurencia similis*. **Chinese Chemical Letters**, v. 18, p. 178-180, 2007e.

JI, N. -Y.; LI, X. -M.; DING, L. -P.; WANG, B. -G. Aristolane sesquiterpenes and highly brominated indoles from the marine red alga *Laurencia similis* (Rhodomelaceae). **Helvetica Chimica Acta**. v. 90, p. 385-391, 2007f.

JI, N. -Y.; LI, X. -M.; LI, K.; 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, 2007g.

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

JI, N. -Y.; LI, X. -M.; 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, 2008b.

JI, N. -Y.; LI, X. -M.; LI, K.; DING, L. -P.; GLOER, J. B.; WANG, B. -G. Halogenated sesquiterpenes and non-halogenated linear C₁₅-acetogenins from the marine red alga *Laurencia composita* and their chemataxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 938-941, 2009a.

JI, N. -Y.; LI, X. -M.; LI, K.; WANG, B. -G. Halogenated sesquiterpenes from the marine red alga *Laurencia saltoi* (Rhodomelaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 92, p. 1873-1879, 2009b.

JIN, H. J.; OH, M. Y.; JIN, D. H.; HONG, Y. K. Identification of *Taq* DNA polymerase inhibitor from the red seaweed *Symphyclocladia latiuscula*. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, p. 475-478, 2008.

JOLY, A. B. **Gêneros de algas marinhas da costa Atlântica latino-americana**. Ed. Única. São Paulo: Ed. USP, 1967. 464 p.

- JONES, E. B. G.; STANLEY, S. J.; PINRUAN, U. Marine endophyte sources of new chemical natural products: a review. **Botanica Marina**, v. 51, p. 163-170, 2008.
- JONES, A. C.; GU, L.; SORRELS, C. M.; SHERMAN, D. H.; GERWICK, W. H. New tricks from ancient algae: natural products biosynthesis in marine cyanobacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 13, p. 216-223, 2009.
- KAMENARSKA, Z.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.; STEFANOV, K.; NAJDENSKI, H.; TZVETKOVA, I.; POPOV, S. Comparative study of the volatile compounds from some Black Sea brown algae. **Botanica Marina**, v. 45, p. 502-509, 2002.
- KAMENARSKA, Z.; STEFANOV, K.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.; NAJDENSKI, H.; TSVETKOVA, I.; POPOV, S. Chemical composition and biological activity of the brackish-water green alga *Cladophora rivularis* (L.) Hoek. **Botanica Marina**, v. 47, p. 215-221, 2004.
- 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.
- KARABAY-YAVASOGLU, N. U.; SUKATAR, A.; OZDEMIR, G.; HORZNUM, Z. Antimicrobial activity of volatile components and various extracts of the red alga *Jania rubens*. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 153-156, 2007.
- KARSTEN, U.; SAWALL, T.; WEST, J.; WIENCKE, C. Ultraviolet sunscreen compounds in epiphytic red algae from mangroves. **Hydrobiologia**, v. 432, p. 159-171, 2000.
- 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.
- KAWA, T.; TAKEDA, K.; HARADA, S.; HATTA, T.; MORIGUCHI, J.; MIKI, S.; MORIMOTO, S.; ITOH, H.; NAKATA, T.; SASAKI, S.; NAKAGAWA, M. The role of the hypothalamic nitric oxide in the pressor responses elicited by acute environmental stress in awake rats. **Life Sciences**, v.72, p. 2427-2428, 2003.
- KEGGE, W.; PIERIK, R. Biogenic volatile organic compounds and plant competition. *Trends in Plant Science*, v. 15, p. 126-132, 2010.
- KERR, R. G.; BAKER, B. J. **Marine sterols**. Natural Products Report, v. 8, p. 465-497, 1991.
- KIMIYA, T.; OHTANI, K.; SATOH, S.; ABE, Y.; OGITA, Y.; KAWAKITA, H.; HAMADA, H.; KONISHI, Y.; KUBOTA, S.; TOMINAGA, A. Inhibitory effects of edible marine algae extracts on degranulation of RBL-2H3 cells and mouse eosinophils. **Fisheries Science**, v. 74, p. 1157-1165, 2008.
- KING, R. J.; PUTTOCK, C. F. Morphology and taxonomy of *Bostrychia* and *Stictiosiphonia* (Rhodomelaceae/Rhodophyta). **Australian Systematic Botany**, v. 3, p. 1-73, 1989.

- KINGHORN, D. A. Drug discovery from natural products. In: LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 6^a. Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. Cap. 1, p. 12-25.
- KIM, H. J.; HWANG, I. K.; WON, M. H. Vanillin, 4-hydroxybenzyl aldehyde and 4-hydroxybenzyl alcohol prevent hippocampal CA1 cell death following global ischemia. **Brain Research**, v. 1181, p. 130-141, 2007.
- KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.
- KJER, J.; DEBBAB, A.; ALY, A. H.; PROKSCH, P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. **Nature Protocols**, v. 5, p. 479-490, 2010.
- KLADI, M.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. Volatile halogenated metabolites from marine red algae. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p. 337-366, 2005.
- KLADI, M.; VAGIAS, C.; PAPAFAFIRI, P. ; FURNARI, G. ; SERIO, D. ; ROUSSIS, V. New sesquiterpenes from the red alga *Laurencia microcladia*. **Tetrahedron**, v.63, p.7606-7611, 2007.
- KLADI, M.; VAGIAS, C.; PAPAFAFIRI, P. ; BROGI, S. ; TAFI, A. ; ROUSSIS, V. Tetrahydrofuran acetogenin from *Laurencia glandulifera*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 190-193, 2009.
- KRALJ, A.; KEHRARUS, S.; KRICK, A.; EGUEREVA, E.; KELTER, G.; MAURER, M.; WORTMANN, A.; FIEBIG, H. –H.; KÖNIG, G. M. Arugosins G and H: prenylated polyketides from the marine-derived fungus *Emericella nidulans* var. *acristata*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 995-1000, 2006.
- KRICK, A.; KEHRAUS, S.; GERHÄUSER, C.; KLIMO, K.; NIEGER, M.; MAIER, A.; FIEBIG, H. –H.; ATODIRESEI, I.; RAABE, G.; FLEISCHHAUER, J.; KÖNIG, G. M. Potential cancer chemopreventive in vitro activities of monomeric xanthone derivatives from the marine algicolous fungus *Monodictys putredinis*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 353-360, 2007.
- KNEILLING, M.; RÖCKEN, M. Mast cells: novel clinical perspectives from recent insights. **Experimental Dermatology**, v. 18, p. 488-496, 2009.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 150-153, 2004.
- LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 15, p. 279-289, 2007.
- LARROSA, M.; LUCERI, C.; VIVOLI, E.; PAGLIUCA, C.; LODOVICI, M.; MONETI, G.; DOLARA, P. Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 53, p. 1044-1054, 2009.

- LEE, K. -I.; RHEE, S. -H.; PARK, K. -Y. Anticancer activity of phytol and eicosatrienoic acid identified from *Perilla* leaves. **Han'guk Sikk'um Yongyang Kwahak Hoechi**, v. 28, p. 1107-112, 1999.
- LEE, S. M.; LI, X. F.; JIANG, H.; CHENG, J. G.; SEONG, S.; CHOI, H. D.; SON, B. W. Terreusinone, a novel UV-A protecting dipyrroloquinone from the marine algicolous fungus *Aspergillus terreus*. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 7707-7710, 2003.
- LHULLIER, C.; DONNANGELO, A.; CARO, M.; PALERMO, J. A.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M.; SCHENKEL, E. P. Isolation of elatol from *Laurencia microcladia* and its palatability to the sea urchin *Echinometra lucunter*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 254-259, 2009.
- LI, X.; FAN, X.; HAN, L.; LOU, Q. Fatty acids of some algae from the Bohai Sea. **Phytochemistry**, v. 59, p. 157-161, 2002.
- LI, X.; JEONG, J. H.; LEE, K. T.; RHO, J. R.; CHOI, H. D.; KANG, J. S.; SON, B. W. γ -Pyrone derivatives, kojic acid methyl ethers from a marine-derived fungus *Alternaria* sp. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 26, p. 532-534, 2003.
- LI, C.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T.; DOWD, P. F. Antiinsectan decaturin and oxalicine analogues from *Penicillium thiersii*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 319-322, 2005.
- LI, X.; ZHANG, D.; LEE, U.; LI, X.; CHENG, J.; ZHU, W.; JUNG, J. H.; CHOI, H. D.; SON, B. W. Bromomyrothenone B and botrytinone, cyclopentenone derivatives from a marine isolate of the fungus *Botrytis*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 307-309, 2007.
- LI, K.; LI, X.-M.; JI, N.-Y.; WANG, B.-G. Natural bromophenols from the marine red alga *Polysiphonia urceolata* (Rhodomelaceae): Structural elucidation and DPPH radical-scavenging activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 6627-6631, 2008a.
- 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, 2008b.
- 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, 2008c.
- LI, J. W. -H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.
- LIANG, Y.; LI, X. M.; CUI, C. M.; LI, C. S.; WANG, B. G. A new rearranged chamigrene sesquiterpene from *Laurencia okamurai*. **Chinese Chemical Letters**, v. 20, p. 190-192, 2009.
- LIM, E. -J.; KANG, H. -J.; JUNG, H. -J.; PARK, E. -H. Anti-angiogenic, anti-inflammatory and anti-noceptive activity of 4-hydroxybenzyl alcohol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 1235-1240, 2007.

LIU, J.; MORI, A. Antioxidant and pro-oxidant activities of *p*-hydroxybenzyl alcohol and vanillin: effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxyribose, amino acids and DNA. **Neuropharmacology**, v. 32, p. 659-669, 1993.

LIU, Q. -W.; QIAO, Q. -A.; ZHANG, T.; SUN, L. -X.; WANG, M. -S. The structure elucidation of new bromophenol metabolite from *Polysiphonia urceolata* by experimental and DFT theoretical methods. **Journal of Molecular Structure**, v. 929, p. 1-5, 2009.

LIU, S.; YAN, X.; YU, M.; CHEN, J.; ZHANG, L. A novel compound from *Penicillium* sp. (M207142). **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, p. 116-118, 2010.

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.

MANLEY, S. L.; CHAPMAN, D. J. Formation of 3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde from *L*-Tyrosine in cell-free homogenates of *Odonthalia floccosa* (Rhodophyceae): a proposed biosynthetic pathway for brominated phenols. **FEBS Letters**, v. 93, p. 97-101, 1978.

MANLEY, S. L.; CHAPMAN, D. J. Metabolism of *L*-Tyrosine to 4-hydroxybenzaldehyde and 3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde by chloroplast-containing fractions of *Odonthalia floccosa* (Esp.) Falk. **Plant Physiology**, v. 64, p. 1032-1038, 1979.

MANLEY, S. L.; CHAPMAN, D. J. Metabolism of 4-hydroxybenzaldehyde, 3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde and bromide by cell-free fractions of the marine red alga *Odonthalia floccosa*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 1453-1457, 1980.

MAO, S.; JIN, R. -D.; LEE, S. -J.; KIM, Y. -W.; KIM, I. -S.; SHIM, J. -H.; PARK, R. -D.; KIM, K. -Y. Isolation and *in vitro* antimicrobial activity of low molecular phenolic compounds from *Burkholderia* sp. MP-1. **Korean Journal of Soil Science and Fertilizer**, v. 39, p. 195-203, 2006.

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; UEDA, K.; MANAGI, H.; YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-induced degranulation, TNF- α and IL-4 production from RBL-2H3 cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 3123-3128, 2002.

MATSUO, Y.; SUZUKI, M.; MASUDA, M.; IWAI, T.; MORIMOTO, Y. Squalene-derived triterpene polyethers from the red alga *Laurencia omaezaiana*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, p. 1261-1266, 2008.

MAYER, A. M. S.; GUSTAFSON, K. R. Marine pharmacology in 2003-2004: antitumour and cytotoxic compounds. **European Journal of Cancer**, v. 42, p. 2241-2270, 2006.

MAYER, A. M. S.; GUSTAFSON, K. R. Marine pharmacology in 2005-2006: antitumour and cytotoxic compounds. **European Journal of Cancer**, v. 44, p. 2357-2387, 2008.

MAYER, A. M. S.; RODRÍGUEZ, A. D.; BERLINCK, R. G. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2005-6: marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities, affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, p. 283-308, 2009.

MAYER, A. M. S.; GLASER, K. B.; CUEVAS, C.; JACOBS, R. S.; KEM, W.; LITTLE, R. D.; McINTOSH, J. M.; NEWMAN, D. J.; POTTS, B. C.; SHUSTER, D. E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 255-265, 2010.

McCLINTOCK, J. B.; BAKER, B. J. **Marine Chemical Ecology**. Boca Raton: CRC Press, 2001, 610 p.

McGIVERN, J. G. Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 3, p. 69-85, 2007.

MESQUITA, M. L.; PAULA, J. E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 439-445, 2009.

MEYER, B. K.; NI, A.; HU, B.; SHI, L. Antimicrobial preservative use in parenteral products: past and present. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 3155-3167, 2007.

MIYAZAWA, M.; HORIUCHI, E.; KAWATA, J. Components of the essential oil from *Matteuccia struthiopteris*. **Journal of Oleo Science**, v. 56, p. 457-461, 2007.

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

MORIKAWA, T.; TAO, J.; UEDA, K.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Medicinal foodstuffs. XXXI. Structures of new aromatic constituents and inhibitors of degranulation in RBL-2H3 cells from a Japanese folk medicine, the stem bark of *Acer nikoense*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p. 62-67, 2003.

MORRIS, J. C.; PHILLIPS, A. J. Marine natural products: synthetic aspects. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 245-265, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAAL, R. M. Z. G.; TABB, J.; HOLOWKA, D.; BAIRD, B. In situ measurement of degranulation as a biosensor based on RBL-2H3 mast cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 791-796, 2004.

NAGANUMA, M.; NISHIDA, M.; KURAMOCHI, K.; SUGAWARA, F.; YOSHIDA, H.; MIZUSHINA, Y. 1-Deoxyrubralactone, a novel specific inhibitor of families X and Y of eukaryotic DNA polymerases from a fungal strain derived from sea algae. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 2939-2944, 2008.

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard**. 6^a Ed. Pennsylvania: NCCLS document, 2003.

NEUMEYER, J. L. Historical perspective of medicinal chemistry. In: LEMKE, T. L; WILLIAMS, D. A. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 6^a. Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. p. 1-9.

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.; HILL, R. T. New drugs from marine microbes: the tide is turning. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 539-544, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 2589-2599, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as drugs and leads to drugs: the historical perspective. In: BUSS, A. D.; BUTLER, M. S. **Natural product chemistry for drug discovery**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2010. cap. 1, p. 3-27.

NIESSEN, W. M. A. **Current practice of gas chromatography – mass spectrometry**. 1^a. Ed. Nova York: Marcel Dekker, Inc, 2001. 495 p.

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.

OH, K.-B.; LEE, J.-H.; CHUNG, S.-C.; SHIN, J.; SHIN, H.-J.; KIM, H.-K.; LEE, H.-S. Antimicrobial activities of the bromophenols from the red alga *Odonthalia corymbifera* and some synthetic derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 104-108, 2008.

OLIVEIRA, A. L. L.; SILVA, D. B.; TURATTI, I. C. C.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Volatile constituents of Brazilian *Bostrychia* species (Rhodomelaceae) from mangrove and rocky shore. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 761-765, 2009.

ONOFREJOVÁ, L.; VASICKOVA, J.; KLEJDUS, B.; STRATIL, P.; MISURCOVA, L.; KRACMAR, S.; KOPECKY, J.; VACEK, J. Bioactive phenols in algae: the application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 464-470, 2010.

OSTERHAGE, C.; KAMINSKY, R.; KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. Ascosalipyrrolidinone A, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, p. 641206417, 2000.

OSTERHAGE, C.; KÖNIG, G. M.; HÖLLER, U.; WRIGHT, A. D.; Rare sesquiterpenes from the algicolous fungus *Drechslera dematioidea*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 306-313, 2002a.

OSTERHAGE, C.; KÖNIG, G. M.; JONES, P. G.; WRIGHT, A. D. 5-Hydroxyramulosin, a new natural product produced by *Phoma tropica*, a marine-derived fungus isolated from the alga *Fucus spiralis*. **Planta Medica**, v. 68, p. 1052-1054, 2002b.

PANG, K. -L.; MITCHELL, J. I. Molecular approaches for assessing fungal diversity in marine substrata. **Botanica Marina**, v. 48, p. 332-347, 2005.

PARK, E. -S.; MOON, W. -S.; SONG, M. -J.; KIM, M. -N.; CHUNG, K. -H.; YOON, J. -S. Antimicrobial activity of phenol and benzoic acid derivatives. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, p. 209-214, 2001.

PAUL, V. J.; PUGLISI, M. P.; RITSON-WILLIAMS, R. Marine chemical ecology. **Natural Products Reports**, v. 23, p. 153-180, 2006.

PAUL, V. J.; RITSON-WILLIAMS, R. Marine chemical ecology. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 662-695, 2008.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to spectroscopy**. 4a. Ed. Belmont: Brooks/Cole, 2009.

PENESYAN, A.; KJELLEBERG, S.; EGAN, S. Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. **Marine Drugs**, v. 8, p. 438-459, 2010.

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

PETERSON, S. W. *Penicillium thiersii*, *Penicillium angulare* and *Penicillium decaturense*, new species isolated from wood-decay fungi in North America and their phylogenetic placement from multilocus DNA sequence analysis. **Mycologia**, v. 96, p. 1280-1293, 2004.

PHILLIPS, D. W.; TOWERS, G. H. N. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of red algal bromophenols. **Journal of Chromatography**, v. 206, p. 573-580, 1981.

POLAT, S.; OZOGUL, Y. Biochemical composition of some red and brown macro algae from the Northeastern Mediterranean Sea. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 59, p. 566-572, 2008.

- PONTIUS, A.; KRICK, A.; MERSY, R.; KEHRAUS, S.; FOEGEN, S. E.; MÜLLER, M.; KLIMO, K.; GERHÄUSER, C.; KÖNIG, G. M. Monodictyochromes A and B, dimeric xanthone derivatives from the marine algicolous fungus *Monodictys putredinis*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1793-1799, 2008a.
- PONTIUS, A.; MOHAMED, I.; KRICK, A.; KEHRAUS, S.; KÖNIG, G. M. Aromatic polyketides from marine algicolous fungi. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 272-274, 2008b.
- PONTIUS, A.; KRICK, A.; KEHRAUS, S.; FOEGEN, S. E.; MÜLLER, M.; KLIMO, K.; GERHÄUSER, C.; KÖNIG, G. M. Noduliprevenone: a novel heterodimeric chromanone with cancer chemopreventive potential. **Chemistry European Journal**, v. 14, p. 9860-9863, 2008.
- POPPELWELL, W. L.; NORTHCOTE, P. T. Colensolide A: a new nitrogenous bromophenol from the New Zealand marine red alga *Osmundaria colensoi*. **Tetrahedron Letters**, v. 50, p. 6814-6817, 2009.
- PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, p. 1446-1455, 2007.
- PYO, M. K.; JIN, J. L.; KOO, Y. K.; YUN-CHOI, H. S. Phenolic and furan type compounds isolated from *Gastrodia elata* and their anti-platelet effects. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 27, p. 381-385, 2004.
- RADULOVIC, N.; DEKIC, M.; ZLATKOVIC, B.; DEKIC, S.; DEKIC, V.; PALIC, R. A detailed analysis of volatile constituents of *Aquilegia pancicii* Degen, a Serbia steno-endemic species. **Chemical Papers**, v. 61, p. 4005-409, 2007.
- RENAUD, S. M.; LUONG-VAN, J. T. Seasonal variation in the chemical composition of tropical Australian marine macroalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 18, p. 381-387, 2006.
- REVIERS, B. de. **Biologia e Filogenia das Algas**. 1ª. Ed. Porto Alegre: ARTMED. 2006, 260 p.
- REYNOLDS, J. E. F. **Martindale - the extra pharmacopoeia**. 31ª. Ed. Londres: Royal Pharmaceutical Society, 1996. p. 1118-1119.
- RING, J.; KRÄMER, U.; SCHÄFER, T.; BEHRENDT, H. Why are allergies increasing? **Current Opinion in Immunology**, v. 13, p. 701-708, 2001.
- RIZVI, M. A.; SHAMEEL, M. Pharmaceutical biology of seaweeds from the Karachi Coast of Pakistan. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, p. 97-107, 2005.
- RODGMAN, A. Composition of cigarette smoke. III. Phytadienes. **Journal of Organic Chemistry**, v. 24, p. 1916-1924, 1959.
- ROMMINGER, S. **Avaliação do potencial metabólico de linhagens de fungos isolados de uma espécie de alga marinha do gênero *Sargassum***. 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biological Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SANTOS, F. J.; GALCERAN, M. T. Modern developments in gás chromatography – mass spectrometry- based environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 125-151, 2003.

SARMA, N. S.; KRISHNA, M. S. R.; PASHA, S. G. Marine algal natural products: contributions from India in the global context. **Indian Journal of Chemistry**, v. 45B, p. 433-449, 2006.

SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, p. 1753-1760, 2009.

SCHULZ, B.; DRAEGER, S.; DELA CRUZ, T. E.; RHEINHEIMER, J.; SIEMS, K.; LOESGEN, S.; BITZER, J.; SCHLOERKE, O.; ZEECK, A.; KOCK, I.; HUSSAIN, H.; DAI, J.; KROHN, K. Screening strategies for obtaining novel, biologically active, fungal secondary metabolites from marine habitats. **Botanica Marina**, v. 51, p. 219-234, 2008.

SERRA, R.; PETERSON, S.; CTCOR, VENÂNCIO, A. Multilocus sequence identification of *Penicillium* species in cork bark during plank preparation for the manufacture of stoppers. **Research in Microbiology**, v. 159, p. 178-186, 2008.

SIMMONS, T. L.; COATES, R. C.; CLARK, B. R.; ENGINE, N.; GONZALEZ, D.; ESQUENAZI, E.; DORRESTEIN, P. C.; GERWICK, W. H. Biosynthetic origin of natural products isolated from marine microorganism – invertebrate assemblages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 4587-4594, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1ª. Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1999. 1104 p.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T. BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SKALTZA, H. D.; DEMETZOS, C.; LAZARI, D.; SOKOVIC, M. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. **Phytochemistry**, v. 64, p. 743-752, 2003.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica 1**. 8ª. Ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2005. 715 p.

SONI, M. G.; TAYLOR, S. L. GREENBERG, N. A.; BURDOCK, G. A. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1335-1373, 2002.

STOJANOVIC, G.; PALIC, R.; SLADJANA, A.; ZEKOVIC, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil and CO₂ extracts of semi-oriental tobacco, Otlja. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, p. 335-338, 2000.

STONIK, V. A. Marine polar steroids. **Russian Chemical Reviews**, v. 70, p. 673-715, 2001.

STOUT, E. P.; HASEMEYER, A. P.; LANE, A. L.; DAVENPORT, T. M.; ENGEL, S.; HAY, M. E.; FAIRCHILD, C. R.; PRUDHOMME, J.; LE ROCH, K.; AALDERSBERG, W.; KUBANECK, J. Antibacterial neurymenolides from the Fijan red alga *Neurymenia fraxinifolia*. **Organic Letters**, v. 11, p. 225-228, 2009.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

SU, H.; YUAN, Z. H.; LI, J.; GUO, S. J.; DENG, L. P.; HAN, L. J.; ZHU, X. B.; SHI, D. Y. Two new bromoindoles from red alga *Laurencia similis*. **Chinese Chemical Letters**, v. 20, p. 456-458, 2009a.

SU, H.; YUAN, Z. -H.; LI, J.; GUO, S. -J.; DENG, L. -P.; HAN, L. -J.; ZHU, X. -B.; SHI, D. -Y. Sesquiterpenes from the marine red alga *Laurencia saitoi*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 92, p. 1291-1297, 2009b.

SUGIURA, Y.; MATSUDA, K.; YAMADA, Y.; NISHIKAWA, M.; SHIOYA, K.; KATSUZAKI, H.; IMAI, K.; AMANO, H. Isolation of a new anti-allergic phlorotannin, phlorofucofuroeckol-B, from an edible brown alga, *Eisenia arborea*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, p. 2807-2811, 2006.

SUGIURA, Y.; MATSUDA, K.; YAMADA, Y.; NISHIKAWA, M.; SHIOYA, K.; KATSUZAKI, H.; IMAI, K.; AMANO, H. Anti-allergic phlorotannins from the edible brown alga, *Eisenia arborea*. **Food Science Technology Reserach**, v. 13, p. 54-60, 2007.

SUN, J.; SHI, D. -Y.; LI, S.; WANG, S. -J.; HAN, L. -J.; FAN, X.; YANG, Y. -C.; SHI, J. -G. Chemical constituents of red alga *Laurencia tristicha*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 9, p. 725-734, 2007.

SUZUKI, M.; KOWATA, N.; KUROSAWA, E. Bromophenols from the red alga *Rhodomela latrix*. **Bulletin of the Chemical Social of Japan**, v. 53, p. 2099-2100, 1980.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Report**, v. 18, p. 448-459, 2001.

TANAKA, J. Morphology of *Bostrychia tenella* (Rhodophyceae) in Indonesia. **Bulletin of National Science Museum**, v. 15, p. 115-124, 1989.

TANEJA, N. K.; TYAGI, J. S. Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 288-293, 2007.

TERASAKI, M.; MAKINO, M. Disinfection by-products of para-hydroxybenzoate esters (parabens): synthesis and mass spectrometric study. **Journal of Health Science**, v. 55, p. 631-635, 2009.

THAKUR, N. L.; JAIN, R.; NATALIO, F.; HAMER, B.; THAKUR, A. N.; MÜLLER, W. E. G. Marine molecular biology: an emerging field of biological sciences. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 233-245, 2008.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TREE OF LIFE, 2010. <http://tolweb.org/Rhodomelaceae/23531>, acessado em 18 de junho de 2010.

UTSONOMIYA, H.; KAWATA, J.; CHANOKI, W.; SHIRAKAWA, N.; MIYAZAWA, M. Components of essential oil from woods of *Prunus mume* Sieb. et Zucc. **Journal of Oleo Science**, v. 54, p. 609-612, 2005.

VAIRAPPAN, C. S.; SUZUKI, M.; ISHII, T.; OKINO, T.; ABE, T.; MASUDA, M. Antibacterial activity of halogenated sesquiterpenes from Malaysian *Laurencia* spp. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2490-2494, 2008.

VERHAGEN, F. J. M.; SWARTS, H. J.; WIJNBERG, J. B. P. A.; FIELD, J. A. Organohalogen production is a ubiquitous capacity among basidiomycetes. **Chemosphere**, v. 37, p. 2091-2104, 1998.

VITA-MARQUES, A. M.; LIRA, S. O.; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; SPONCHIADO, S. R. P.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; BARATA, M.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; CAVALVANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; DE SOUZA, A. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; SILVA, M.; PIMENTA, E.; THIEMANN, O.; PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D. A multi-screning approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. **Química Nova**, v. 31, p. 1099-1103, 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.

VIEGAS-JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

YAMAMOTO, T.; YOSHIMURA, M.; YAMAGUCHI, F.; KOUCHI, T. Anti-allergic activity of narigenin chalcone from a tomato skin extract. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 68, p. 1706-1711, 2004.

YANG, R. -Y.; LI, C. -Y.; LIN, Y. -C.; PENG, G. -T.; SHE, Z. -G.; ZHOU, S. -N. Lactones from a brown alga endophytic fungus (No. ZZ36) from the South China Sea and their antimicrobial activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 4205-4208, 2006.

- YIN, S. -W.; WANG, C. -Y.; LI, X. -M.; WANG, B. -G. A new clerosterol derivative, trans-phytol, and related metabolites from marine green alga *Codium fragile* (Codiaceae) and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 1288-1292, 2005.
- YOO, H. -D.; KETCHUM, S. O.; FRANCE, D.; BAIR, K.; GERWICK, W. H. Vidalenolone, a novel phenolic metabolite from the tropical red alga *Vidalia* sp. **Journal Natural Product**, v. 65, p. 51-53, 2002.
- YU, S. J.; KIM, J. R.; LEE, C. K.; HAN, J. E.; LEE, J. H.; KIM, H-S.; HONG, J. H.; KANG, S. G.; *Gastrodia elata* Blume and an active component, *p*-hydroxybenzyl alcohol reduce focal ischemic brain injury through antioxidant related gene expressions. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 1016-1020, 2005.
- YUAN, Z.; HAN, L.; FAN, X.; LI, S.; SHI, D.; SUN, J.; YANG, Y.; SHI, J. Cytotoxic constituents from red alga *Gymnogongrus flabelliformis*. **Zhongcaoyao Zazhi Bianjibu**, v. 38, p. 652-655, 2007.
- XU, X.; SONG, F.; FAN, X.; FANG, Z.; SHI, J. A novel bromophenol from marine red alga *Symphyocladia latiuscula*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, p. 811-813, 2009.
- WALSH, C T.; FISCHBACH, M. A. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. **Journal of American Chemical Society**, v. 132, p. 249-2493, 2010.
- WANG, S.; LI, X. -L.; TEUSCHER, F.; LI, D. -L.; DIESEL, A.; EBEL, R.; PROKSCH, P.; WNG, B. -G. Chaetopyranin, a benzaldehyde derivative, and other related metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus derived from the marine red alga *Polysiphonia urceolata*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1622-1625, 2006.
- WEST, J. A.; ZUCARELLO, G. C.; HOMMERSAND, M.; KARSTEN, U.; GÖRS, S. Observations on *Bostrychia radicata* comb. nov. (Rhodomelaceae, Rhodophyta). **Phycological Research**, v. 54, p. 1-14, 2006.
- WIESEMEIER, T.; HAY, M.; POHNERT, G. The potential role of wound-activated volatile release in the chemical defence of the brown alga *Dictyota dichotoma*: blend recognition by marine herbivores. **Aquatic Science**, v. 69, p. 403-412, 2007.
- WILKINSON, J. H.; SHEAHAN, M. M.; MACLAGAN, N. F. The biological action of substances related to thyroxine 2. Further derivatives of 3,5-diiodo-4-hydroxybenzoic acid. **Biochemical Journal**, v. 49, p. 710-714, 1951.
- WU, B.; WU, L.; ZHANG, L.; KIM, C. Studies on the antibacterial chemical constituents of *Senecio cannabifolius* Less. (I). **Shenyang Yaoke Daxue Xuebao Bianjibu**, v. 21, p. 341-345, 2004.
- ZHANG, Y.; LI, C.; SWENSON, D. C.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T.; DOWD, P. F. Novel antiinsectan oxalicine alkaloids from two undescribed fungicolous *Penicillium* spp. **Organic Letters**, v. 5, p. 773-776, 2003.

ZHANG, Y.; LI, X. -M.; WANG, B. -G. Nigerasperones A~C, new monomeric and dimeric naphtho- γ -pyrones from a marine alga-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. **Journal of Antibiotics**, v. 60, p. 204-210, 2007.

ZHANG, Y.; LI, X. -M.; WANG, C. Y.; WANG, B. -G. A new naphthoquinoneimine derivative from the marine algal-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. **Chinese Chemical Letters**, v. 18, p. 951-953, 2007.

ZHU, T. J.; DU, L.; HAO, P. F.; LIN, Z. J.; GU, Q. Q. Citrinal A, a novel tricyclic derivative of citrinin, from an algicolous fungus *Penicillium* sp. i-1-1. **Chinese Chemical Letters**, v. 20, p. 917-920, 2009.

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.

Apêndice A

Propostas de fragmentação química dos metabólitos halogenados identificados por
CG-EM, na macroalga *Bostrychia tenella*

APÊNDICE A – Propostas de fragmentação química dos metabólitos halogenados identificados por CG-EM, na macroalga *Bostrychia tenella*.

No Cap. I (item II.4.1.3, p. 55-85), foi discutida a identificação de 17 metabólitos halogenados de subfrações da alga *Bostrychia tenella*, detectados por meio de análises realizadas por CG-EM nas subfrações BT-A.8act, BT-A.10act, BT-A.12act (Figuras VI.1-VI.3). Neste mesmo item, foram apresentados e discutidos os perfis de fragmentação química obtidos por impacto de elétrons (analisador do CG-EM) para cada grupo de metabólito, agrupados de acordo com os supostos precursores fenólicos, também identificados na alga *B. tenella*.

Este modo resumido de apresentar os resultados foi uma opção escolhida para que a apresentação dos resultados e compreensão do raciocínio fosse mais dinâmica. Entretanto, como foram identificadas substâncias incomuns e inéditas, deseja-se que as propostas de fragmentação devam ser mais detalhadas. Sendo assim, o objetivo deste apêndice é mostrar, de modo detalhado, as propostas de fragmentação dos 17 metabólitos fenólicos halogenados identificados nas subfrações de BT-A.

Como estratégia para expor estes dados, cada substância foi abordada do seguinte modo (Figuras VI.4- VI.20): EMs obtidos por CG-EM relacionado à amostra (e respectivo t_R); e a proposta de fragmentação por impacto de elétrons. Ainda, são evidenciados os picos (m/z) determinantes para a identificação de cada substância e, entre parênteses, as porcentagens relativas aos respectivos picos. Constan também as fórmulas moleculares e estruturais para cada composto. Importante esclarecer que as relações massa-carga (m/z) colocadas nas propostas são valores inteiros aproximados.

Figura VI.1 – Cromatograma obtido a partir da análise da subfração BT-A.8act por CG-EM. A) Cromatograma apresentado de 0 a 25 min; B) Cromatograma apresentado de 5 a 13 min.

Figura VI.2 – Cromatograma obtido a partir da análise da subfração BT-A.10act por CG-EM. A) Cromatograma apresentado de 0 a 25 min; B) Cromatograma apresentado de 5 a 13 min.

Figura VI.3 – Cromatograma obtido a partir da análise da subfração BT-A.12act por CG-EM. A) Cromatograma apresentado de 0 a 25 min; B) Cromatograma apresentado de 5 a 13 min.

Figura VI.4 - Identificação e proposta de fragmentação da substância 3-cloro-4-hidroxibenzoato de metila.

Figura VI.5 - Identificação e proposta de fragmentação da substância 3-bromo-4-hidroxibenzoato de metila.

Figura VI.6 - Identificação e proposta de fragmentação da substância 4-hidroxi-3-iodobenzoato de metila.

EM da subfração BT-A.12act; $t_R = 8,880$ min

Fragmentação: 188,95 (100,0); 190,90 (76,0); 219,95 (33,5); 62,00 (23,0); 221,90 (21,8); 133,00 (20,1); 97,00 (18,2); 124,95 (17,1); 161,05 (15,6); 192,90 (14,2); 163,00 (11,5); 61,05 (11,2); 63,10 (10,1); 99,00 (9,2); 126,00 (7,9); 127,00 (7,7); 90,00 (7,6); 164,80 (2,5); 91,00 (1,2).

Fórmula Molecular: $C_8H_6Cl_2O_3$

Substância química: 3,5-dicloro-4-hidroxibenzoato de metila

Estrutura Molecular:

Figura VI.7 - Identificação e proposta de fragmentação da substância 3,5-dicloro-4-hidroxibenzoato de metila.

EM da subfração BT-A.12act; $t_R = 10,610$ min

Fragmentação: 278,85 (100,0); 276,85 (51,2); 280,85 (49); 62,00 (44,6); 309,9 (39,8); 63,00 (29,4); 61,00 (22,8); 91,00 (19,8); 307,90 (19,8); 90,05 (19,6); 311,8 (18,4); 171,95 (12,4); 169,90 (11,9); 250,80 (10,7); 252,80 (5,9); 248,80 (5,8); 222,85 (5,5); 310,90 (5,3); 230,90 (3,4).

Fórmula Molecular: $C_8H_6Br_2O_3$

Substância química: 3,5-dibromo-4-hidroxibenzoato de metila

Estrutura Molecular:

Figura VI.8 - Identificação e proposta de fragmentação da substância 3,5-dibromo-4-hidroxibenzoato de metila.

EM da subfração BT-A.12act; $t_R = 9,705$ min

Fragmentação: 234,90 (100,0); 232,90 (75,9); 265,9 (37,8); 62,1 (33,2); 263,9 (27,4); 236,85 (24,8); 63,05 (24,0); 125,95 (22,2); 61,00 (16,6); 96,95 (13,3); 206,85 (11,1); 90,00 (10,8); 267,95 (9,5); 128,05 (9,0); 205,00 (9,0); 125,00 (8,1); 177,00 (8,1); 91,10 (7,3); 208,90 (4,4); 178,95 (4,1).

Fórmula Molecular: $C_8H_6BrClO_3$

Substância química: 3-bromo-5-cloro-4-hidroxibenzoato de metila

Estrutura Molecular:

Figura VI.9 - Identificação e proposta de fragmentação da substância 3-bromo-5-cloro-4-hidroxibenzoato de metila.

EM da subfração BT-A.12act; $t_R = 10,94$ min

Fragmentação: 280,85 (100,0); 311,90 (69,6); 63,05 (39,9); 157,05 (39,6); 126,00 (35,9); 282,90 (35,0); 62,05 (34,1); 184,90 (29,0); 313,90 (24,5); 61,00 (16,0); 91,05 (15,6); 97,10 (12,5); 159,00 (12,4); 252,90 (12,0); 187,00 (11,6); 155,05 (8,7) 90,00 (7,7); 254,90 (5,4).

Fórmula Molecular: $C_8H_6ClIO_3$

Substância química: 3-cloro-4-hidroxi-5-iodobenzoato de metila

Estrutura Molecular:

Figura VI.10 - Identificação e proposta de fragmentação da substância 3-cloro-4-hidroxi-5-iodobenzoato de metila.

EM da subfração BT-A.12act; $t_R = 11,955$ min

Fragmentação: 326,85 (100,0); 324,85 (94,1); 357,95 (76,7); 355,85 (75,0); 62,05 (74,2); 63,05 (54,8); 91,00 (40,8); 61,00 (38,0); 171,90 (23,7); 90,00 (21,2); 169,90 (20,7); 296,80 (13,8); 92,00 (12,6); 143,10 (8,8); 141,10 (8,1); 298,90 (7,9); 200,95 (4,7); 121,10 (3,2); 230,90 (2,1); 123,10 (2,0).

Fórmula Molecular: $C_8H_6BrIO_3$

Substância química: 3-bromo-4-hidroxi-5-iodobenzoato de metila

Estrutura Molecular:

Figura VI.11 - Identificação e proposta de fragmentação da substância 3-bromo-4-hidroxi-5-iodobenzoato de metila.

Figura VI.12 - Identificação e proposta de fragmentação da substância 2-(3-cloro-4-hidroxifenil)acetato de metila.

Figura VI.13 - Identificação e proposta de fragmentação da substância 2-(3-bromo-4-hidroxifenil)acetato de metila.

Figura VI.14 - Identificação e proposta de fragmentação da substância 2-(4-hidroxi-3-iodofenil)acetato de metila.

Figura VI.15 - Identificação e proposta de fragmentação da substância 2-cloro-4-(hidroximetil)fenol.

Figura VI.16 - Identificação e proposta de fragmentação da substância 2-bromo-4(hidroximetil)fenol.

Figura VI.17 - Identificação e proposta de fragmentação da substância 2-cloro-4-(metoximetil)fenol.

Figura VI.18 - Identificação e proposta de fragmentação da substância 2-bromo-4-(metoximetil)fenol.

Figura VI.19 - Identificação e proposta de fragmentação da substância 2-iodo-4-(metoximetil)fenol.

Figura VI.20 - Identificação e proposta de fragmentação da substância 3-bromo-4-hidroxibenzaldeído.

Apêndice B

Síntese das substâncias fenólicas halogenadas identificadas na macroalga

Bostrychia tenella

APÊNDICE B – Síntese das substâncias fenólicas halogenadas identificadas na macroalga *Bostrychia tenella*

Os metabólitos fenólicos halogenados identificados na alga *Bostrychia tenella*, descritos e discutidos no capítulo I (item II.4.1.3, p. 55-85), não foram isolados pois constituíam-se substâncias minoritárias na fração BT-A. Consequentemente, a atribuição de propriedades biológicas para estes compostos, bem como a devida comprovação da elucidação estrutural, através da obtenção de dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C , não foram estabelecidas.

A fim de dar continuidade ao trabalho de caracterização dos halofenóis identificados na alga *B. tenella*, o aluno de iniciação científica Luís Paulo Mascarenhas Costa, regularmente atuante no Laboratório de Química Orgânica, sob orientação e co-orientação, respectivamente, do Prof. Dr. João Luis Callegari Lopes e do Prof. Dr. Giuliano Cesar Clososki, docentes do Departamento de Física e Química da FCFRP/USP, está desenvolvendo o projeto de pesquisa: “Síntese de compostos halogenados visando a caracterização química de extratos de origem marinha”, (proc. FAPESP 10/05544-0). Este projeto tem por objetivo sintetizar os produtos naturais fenólicos halogenados identificados pelo aluno Rafael de Felício na macroalga *B. tenella*, bem como caracterizá-los através de métodos espectroscópicos e espectrométricos.

Como resultados preliminares do projeto, já foram sintetizadas cinco substâncias fenólicas halogenadas, as quais são apresentadas na Figura VI.21. As estratégias sintéticas utilizadas para obter os metabólitos fenólicos halogenados baseiam-se na literatura científica.

É importante salientar que o projeto mencionado acima está sendo realizado com participação ativa do aluno Rafael, tanto na elaboração e execução dos experimentos, quanto na discussão dos resultados.

Figura VI.21 – Propostas de síntese química para alguns metabólitos fenólicos halogenados identificados na alga *Bostrychia tenella*.

A halogenação de substâncias aromáticas é realizada através de reações de substituição eletrofílica aromática (SEA). Neste tipo de reação, geralmente emprega-se um ácido de Lewis, uma vez que os halogênios necessitam de uma carga residual positiva para serem inseridos no anel aromático. De acordo com a Figura VI.21, o precursor comum - o 4-hidroxibenzoato de metila (**A**) - possui um grupo químico ativante *orto*-, *para*-dirigente (-OH), e um grupamento desativante *meta*-dirigente (-COOCH₃). Ou seja, temos as reações preferencialmente direcionadas para a posição *orto* em relação à hidroxila, posição almejada nas sínteses propostas. Ainda, não foi necessário o uso de ácido de Lewis, pois o anel encontra-se ativado para a reação de SEA (SOLOMONS; FRYHLE, 2005).

Sendo assim, o mecanismo geral para as reações propostas está descrito na Figura VI.22.

Figura VI.22 - Mecanismo reacional geral proposto para a SEA com halogênios na substância 4-hidroxibenzoato de metila.

- Bromação do 4-hidroxibenzoato de metila

Os metabólitos 3-bromo-4-hidroxibenzoato de metila (**B**) e 3,5-dibromo-4-hidroxibenzoato de metila (**C**) foram os primeiros a serem sintetizados. Para síntese destes compostos foi utilizada a metodologia descrita por Basabe e colaboradores (2003).

Figura VI.23 - Síntese dos compostos 3-bromo-4-hidroxibenzoato de metila (**B**) e 3,5-dibromo-4-hidroxibenzoato de metila (**C**) (BASABE et al., 2003).

Ambos produtos **B** e **C** foram analisados por CG-EM utilizando as mesmas condições empregadas para as análises da fração BT-A, na qual foram identificados. Nas Figuras VI.24 e VI.25, encontram-se os EMs dos compostos identificados obtidos a partir das algas e os sintetizados, bem como seus t_R s.

Figura VI.24 - Comparação dos EMs do metabólito 3-bromo-4-hidroxibenzoato de metila, identificado na alga *B. tenella* e sintetizado em laboratório. A) EM da subfração BT-A.12act, $t_R = 8,045$ min (alga); B) EM relativo ao produto purificado (B) da reação apresentada na Figura VI.23.

*m/z 121 e m/z 138 são pertencentes a uma substância que foi detectada junto com o metabólito em questão, sendo, portanto, contaminantes neste espectro

Figura VI.25 - Comparação dos EMs do metabólito 3,5-dibromo-4-hidroxibenzoato de metila, identificado na alga *B. tenella* e sintetizado em laboratório. A) EM relativo da subfração BT-A.12act, $t_R = 10,610$ min (alga); B) EM relativo ao produto purificado (C) da reação apresentada na Figura VI.23.

Adicionalmente, a substância 3-bromo-4-hidroxibenzoato de metila foi submetida à análise espectroscópica por RMN ^1H , cujo espectro e dados gerados encontram-se na Figura VI.26 e Tabela VI.1, e espectrométrica por HR-ESI-TOF-MS, onde os dados obtidos são exibidos na Tabela VI.2.

Figura VI.26 - Espectro de RMN ^1H do metabólito sintetizado 3-bromo-4-hidroxibenzoato de metila, em CDCl_3 . Em destaque, expansão da região onde são observados os hidrogênios desblindados da molécula, evidenciando os sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos da substância.

Tabela VI.1 - Dados referentes ao espectro de RMN ^1H da substância 3-bromo-4-hidroxibenzoato de metila.

	Dados exp.				Dados lit.*	
	Int.	Mult.	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	J (Hz)
H₁	3	s	3,92	-	3,89	-
H₂	1	<i>dd</i>	7,94	8,5/1,9	7,92	8,4/2,2
H₃	1	<i>d</i>	7,07	8,5	7,05	8,4
H₄	1	<i>d</i>	8,21	1,9	8,19	2,2
H₅	1	s	6,11	-	-	-

Legenda: Int.: Integral; Mult.: Multiplicidade; exp.: experimental; lit.: literatura.

* Basabe et al., 2003.

Através da análise da Figura VI.26, pode-se sugerir que o metabólito contém um anel aromático 1,2,4-trissubstituído, uma vez que o deslocamento químico (δ) dos sinais e suas respectivas multiplicidades e constantes de acoplamento (J) nos indicam este padrão de substituição.

Os três sinais na região desprotegida do espectro de RMN ^1H ($\delta = 6,5$ a $8,5$ ppm) indicam a presença de anel aromático trissubstituído. O padrão de substituição 1,2,4 é confirmado analisando as multiplicidades dos hidrogênios, um duplo dubleto correspondente ao H que acopla com outros Hs nas posições *orto* e *meta*, sendo confirmado pelos J característicos de acoplamentos *orto* e *meta*, respectivamente ($J^{2,3} = 8,5$ Hz; $J^{2,4} = 1,9$ Hz) (PAVIA et al., 2009). Ainda, o sinal dos hidrogênios oximetílicos é observado em uma região bastante desprotegida ($\delta\text{H}_1 = 3,92$ ppm). Sendo assim pressupõe-se que seja um grupamento metílico diretamente ligado a um átomo de oxigênio, que neste caso relaciona-se à função éster. A função éster apresenta-se ligada ao anel aromático, que desloca a nuvem eletrônica através da ressonância, atribuindo ao carbono carbonílico uma carga residual positiva ainda maior, aumentando o efeito indutor da carbonila no grupo OCH_3 .

Toda a proposta teórica acima destacada é alicerçada pela comparação com os dados de RMN ^1H da literatura para o 3-bromo-4-hidroxibenzoato de metila (BASABE et al., 2003). Ainda, pelos dados obtidos a partir de HS-ESI-TOF-MS (Tabela VI.2), podemos observar o valor dos íons M-H das duas substâncias em discussão (experimento realizado no modo negativo). O erro obtido para ambas

estruturas foi menor que 1 ppm, erro aceitável para moléculas já descritas na literatura.

Tabela VI.2 - Dados obtidos por HS-ESI-TOF-MS¹ operando no modo negativo para as substâncias 3-bromo-4-hidroxibenzoato de metila e 3,5-dibromo-4-hidroxibenzoato de metila.

Substância	M. teo.	M. exp.	Erro* (ppm)
228,9506	228,9504	0,87
306,8611	306,8613	0,65

Legenda: M.teo.: massa teórica; M.exp.: massa experimental.

*.Para cálculo do erro utiliza-se a seguinte fórmula: $\text{Erro} = \frac{|M.\text{teo.} - M.\text{exp.}|}{M.\text{teo.}} \times 10^6$

- Cloração e Iodação do 4-hidroxibenzoato de metila

Prosseguindo com os processos sintéticos, os metabólitos 3-cloro-4-hidroxibenzoato de metila (**D**) e 3,5-dicloro-4-hidroxibenzoato de metila (**E**) foram sintetizados. A metodologia utilizada para as reações foi baseada no relato de Terasaki e Makino (2009). As reações utilizadas para as sínteses das moléculas **D** e **E** são apresentadas na Figura VI.27.

Com um controle rígido da primeira reação (Figura VI.27), pode-se obter majoritariamente o produto **D**, porém houve a produção de **E** e foi necessário realizar purificação. Estes compostos não foram analisados por CG-EM nas mesmas condições da fração BT-A, entretanto, pode-se observar a semelhança de seus perfis de fragmentação de acordo com as Figuras VI.28 e VI.29.

¹. Especificações do equipamento utilizado. Espectrômetro UltraOTOF_Q-ESI-TOF (alta resolução), fabricante Bruker Daltonics, detecção em modo negativo, Bomba de infusão com fluxo de 300 µL/h, solução de calibração usada NA-TFA 10 mg/mL (TOF), nitrogênio como gás carreador, exercendo secagem a 150°C, em um fluxo de 4L/min, pressão de 2 Bar.

Figura VI.27 - Síntese dos compostos 3-cloro-4-hidroxibenzoato de metila (D) e 3,5-dicloro-4-hidroxibenzoato de metila (E).

Figura VI.28 - Comparação dos EMs para o metabólito 3-cloro-4-hidroxibenzoato de metila identificado na alga *B. tenella* e sintetizado em laboratório. A) EM da subfração BT-A.8act, $t_R = 7,260$ min (alga); B) EM relativo ao produto purificado (D) da reação apresentada na Figura VI.27.

Figura VI.29 - Comparação dos EMs para o metabólito 3,5-dicloro-4-hidroxibenzoato de metila identificado na alga *B. tenella* e sintetizado em laboratório. A) EM da subfração BT-A.8act, $t_R = 8,880$ min (alga); B) EM relativo ao produto purificado (E) da reação apresentada na Figura VI.27.

Ainda, após a produção dos derivados clorados do 4-hidroxibenzoato de metila, foi obtido o composto 4-hidroxi-3-iodobenzoato de metila (**F**), de acordo com a reação apresentada na Figura VI.30 e respectiva identificação exposta na Figura VI.31. A reação utilizada foi proposta com base na metodologia descrita por Holzapfel; Williams (1995).

Figura VI.30 - Síntese do composto 4-hidroxi-3-iodobenzoato de metila, e observação da produção do metabólito 4-hidroxi-3,5-iodobenzoato de metila, não identificado nas subfrações de BT-A.

Figura VI.31 - Comparação dos EMs para o metabólito 4-hidroxi-3-iodobenzoato de metila identificado na alga *B. tenella* e sintetizado em laboratório. A) EM da subfração BT-A.10act, $t_R = 9,225$ min (alga); B) EM relativo ao produto (**F**) da reação apresentada na Figura VI.30.

Conforme os dados obtidos até o momento, é evidente que os processos sintéticos que estão sendo empregados são satisfatórios. Estes resultados, além de corroborarem as propostas estruturais para os compostos fenólicos halogenados identificados na alga *Bostrychia tenella*, serão valiosos para futuros experimentos de avaliação biológica e complementação da caracterização química dos halofénols.

Próximas etapas do projeto desenvolvido pelo aluno Luis Paulo remetem a síntese de outras substâncias identificadas pelo aluno Rafael, bem como aumento dos rendimentos das reações já evidenciadas, além da caracterização química destas por técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

ANEXO A – Artigo publicado: Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales)

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 51 (2010) 202–210

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpbs

Short communication

Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales)

Rafael de Felício^a, Sérgio de Albuquerque^b, Maria Cláudia Marx Young^c,
Nair Sumie Yokoya^d, Hosana Maria Deboni^{a,*}

^a Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^b Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

^c Setor de Fisiologia e Bioquímica Vegetal, Instituto de Biologia de São Paulo, São Paulo, Brazil

^d Setor de Fisiologia, Instituto de Biologia, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 August 2009

Received in revised form 8 February 2010

Accepted 16 February 2010

Available online 18 February 2010

Keywords:

Trypanocidal and leishmanicidal activity

Antifungal potential

GC/MS

Marine red alga

Bostrychia tenella

ABSTRACT

Specimens of the red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales) were collected from the São Paulo coast and submitted to room-temperature solvent extraction. The resulting extract was fractionated by partitioning with organic solvent. The n-hexane (BT-H) and dichloromethane (BT-D) fractions showed antiprotocatal potential in biological tests with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis* and presented high activity in an antifungal assay with the phytopathogenic fungus *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium sphaerosporum*. Chromatography methods were used to generate sub-fractions from BT-H (H01 to H11) and from BT-D (D01 to D19). The sub-fractions were analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS), and the substances were identified by retention index (Kováts) and by comparison to databases of commercial mass spectra. The volatile compounds found in marine algae were identified as fatty acids, low molecular mass hydrocarbons, esters and steroids; some of these have been previously described in the literature based on other biological activities. Moreover, uncommon substances, such as neophytadiene were also identified. In a trypanocidal assay, fractions H1-H and H1-L showed IC_{50} values of 16.8 and 19.1 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and were more active than the gentian violet standard (11 $\mu\text{g/mL}$); sub-fractions H02, H03, D01 and D02 were active against *L. amazonensis*, exhibiting IC_{50} values of 1.5, 2.7, 4.4, and 4.3 $\mu\text{g/mL}$, respectively (standard amphotericin B: IC_{50} = 13 $\mu\text{g/mL}$). All fractions showed antifungal potential. This work reports the biological activity and identification of compounds by GC/MS for the marine red alga *B. tenella* for the first time.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Infectious diseases present a serious health problem around the world. Notably, protozoan diseases, particularly malaria, leishmaniasis, Chagas disease and African trypanosomiasis, are major causes of mortality in several tropical and subtropical regions [1,2].

Chagas disease or American trypanosomiasis is endemic to Central and South America. It is estimated that 15–18 million people are currently infected with the protozoan flagellate *Trypanosoma cruzi*, and more than 100 million are exposed to the risk of infection [1,3]. Research for more efficient and less toxic drugs than those

currently available for Chagas disease is necessary, since there is a lack of effective medicine against this acute and chronic disease. At present, gentian violet is the only trypanocidal compound used to prevent infection in blood banks, but its use is limited due to toxic effects and the alarming color acquired by the skin and urine of transfusion recipients. Toxic side effects are also evidenced in most of the synthetic compounds used to treat parasitic diseases, as shown by the use of the nitroheterocycles nifurtimox and benznidazole, the unique drugs prescribed in the early stages of trypanosomiasis in America. Benznidazole is currently preferred due to the gastrointestinal and neurological side effects, genotoxicity, and carcinogenic activity in the liver, kidney, urinary bladder and mammary gland of rats caused by nifurtimox use [2,3].

Another very harmful parasitic disease, leishmaniasis, caused by *Leishmania* parasites, is among the six most serious tropical diseases and affects around 12 million people in 88 countries according to the World Health Organization. There are an estimated 1.5 million new cases every year and 350 million people are at risk of infection. In Brazil alone, about 26,000 cases of leishmaniasis are

* Corresponding author at: Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida dos Capões s/nº, 14040-003 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.
Tel.: +55 16 36024711; fax: +55 16 36024040.

E-mail addresses: rafaelfelicio@fcp.usp.br (R. de Felício), stafasap@fcp.usp.br (S. de Albuquerque), marcyoung@yahoo.com.br (M.C.M. Young), nyokoyafcp.usp.br (N.S. Yokoya), hosana@fcp.usp.br (H.M. Deboni).

registered per year [1,4]. Historically, the chemotherapy of leishmaniasis has been based on the use of pentavalent antimonial drugs. Other medications, such as pentamidine and amphotericin B, have been used as alternative drugs. However, these drugs are not orally active, requiring long-term parenteral administration, and often display serious side effects. There is a significant need for the discovery of new and better therapeutic antileishmanial drugs and macrophage-stimulating compounds, especially those derived from natural sources [4].

There is great interest in screening algae for therapeutic drugs from natural products, as their ability to produce secondary metabolites has been extensively documented [5]. Some research has been carried out concerning marine natural products and their biological effects, such as fungicidal, antimicrobial, antimalarial, antimycobacterial, cytotoxic and antiviral activities. However, only a few studies have investigated the biological potential of Brazilian marine algae (seaweeds) [6]. Among the seaweeds, the genus *Bostrychia* (Rhodomelaceae, Ceramiales) is widespread in tropical and warm temperate environments around the world [7]. A few studies have focused on their chemical composition and detected carbohydrates and polysaccharides. Sorbitol, dulcitol and mannitol, the major carbohydrates in *Bostrychia* species, are biochemical exceptions and are rare in red algae [8]. Notably, the polysaccharides from *Bostrychia montagniei* Harvey showed antitherpetic and anticoagulant activities [9]. In addition, the literature shows the occurrence of ultraviolet sunscreen compounds in some species of genus *Bostrychia* [10].

Recently, our research group reported the isolation of aromatic compounds from *Bostrychia tenella* (J.V. Laminouroux) J. Agardh, including a previously unknown saturated natural product [11]. Because this marine organism produces pharmaceutically useful compounds, fractions containing volatile metabolites from *B. tenella* were evaluated against the parasites *T. cruzi* and *Leishmania amazonensis* and the phytopathogenic fungi *Cladosporium chrysosporium*, *rioides* and *Cladosporium sphaerospermum*. Herein, we report the biological activity of these fractions and compound identification by GC/MS for the marine red alga *B. tenella*.

2. Experimental

2.1. Algal collection

Samples of *B. tenella* J. Agardh were collected in September 2003 on the coast of Ilha das Coqueiras, Ubatuba, São Paulo, Brazil. The algal material was identified, washed in seawater selected and maintained at 4 °C. Voucher specimens were deposited at Herbario do Instituto de Botânica-SP, Brazil, with voucher number SP 400217.

2.2. Extraction and chromatographic separation

The fresh algae was dried by freeze-drying method, powdered (118.17 g) and extracted by maceration three times using CH_2Cl_2 :MeOH (2:1, v/v) at room temperature. The solvent was evaporated, and the obtained crude extract (8.13 g) was resuspended in MeOH:H₂O (9:1) and partitioned with n-hexane and dichloromethane. The n-hexane (1.30 g) and dichloromethane (0.57 g) fractions were submitted to chromatographic column separation using Silica Gel 60 (70–230 mesh, Merck) with a step-wise gradient (n-hexane, dichloromethane, and methanol), yielding 11 fractions from n-hexane (H-01 to H-11) and 19 fractions from dichloromethane (D-01 to D-19). The n-hexane (HT-H) and dichloromethane (HT-D) fractions as well as some fractions obtained from chromatographic separation (H01, H02, H03, H05, H06, D01 and D02) were evaluated for their trypanocidal, leishmanicidal and fungicidal potential.

2.3. GC/MS analysis

Gas chromatography–mass spectrometry analysis was performed on a Shimadzu GCMS model QP2010 apparatus. The carrier gas (H_2) was adjusted to a constant flow rate (1.62 mL min^{-1}). The DB5-MS column (30 m $\times$ 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μm [8% crosslinked phenyl-methylpolysiloxane]) was temperature controlled from 40 (0 min hold) to 200 °C at $15^\circ\text{C min}^{-1}$, from 200 °C (5 min hold) to 230 °C at 5°C min^{-1} , from 230 (10 min hold) to 280 °C at $15^\circ\text{C min}^{-1}$, and finally isothermally at 288 °C for 12 min. The injector temperature was set at 250 °C with a split ratio of 1:60. The column outlet was inserted directly into the electron ionization source block operating at 70 eV. The scan range was 40–500 Da. Linear retention indices (Ri) were calculated according to the Kovats method using n-alkanes (C_7 – C_{20}) as external references. Mass spectral identification was completed by comparison with the commercial mass spectral databases Wiley and NIST.

Additionally, in order to verify the repeatability of volatile compounds, the seven samples (H01, H02, H03, H05, H06, D01, and D02) analyses we carried out in 3-day replicate, each sequence was analyzed twice a day, totaling six repetitions.

2.4. Trypanocidal assay

The n-hexane and dichloromethane fractions and their subfractions were evaluated in vitro against trypomastigote blood forms of *T. cruzi* (Y strain), which were obtained from parasitic culture in LLCMK2 cells [12]. The cells were cultivated in RPMI 1640 medium, supplemented with 2 mM L-glutamine, 10 mM NaHCO_3 , 100 U/mL of penicillin, 100 $\mu\text{g/mL}$ of streptomycin and 5% inactivated fetal bovine serum, in culture bottles at 37 °C in an atmosphere with 5% CO_2 and 95% humidity. Infected blood with trypomastigote forms was added to the culture, and the mixture was incubated for 24 h. Following this initial treatment, cells were washed with culture medium, only leaving the parasite-infected cells. After about 5 days, when the process of cellular lysis had started and the trypomastigote forms in the medium were observed, the supernatant containing trypomastigote forms was removed and measured (10^6 parasites/mL) in 96-well microplates. Samples of *B. tenella* in concentrations of 0.5, 2.0, 8.0 and 32.0 $\mu\text{g/mL}$ were added to the mixtures.

After 24 h of incubation, the biological activity was determined using a colorimetric assay with MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (ACROS Organics). First, 10 μL of MTT (5 mg/mL/plate) was added and incubated at 37 °C for 4 h. Subsequently, acid-isopropanol (100 μL of 0.04N HCl in isopropanol) was added to the solutions, and the microplate absorbances were measured in a Sunrise – Tecan apparatus with a 570 nm filter (reference at 630 nm). The data were processed by the program Magellan 3 (TSCAN). A DMSO solution was used as the negative control with the same concentrations as the evaluated samples. The activity of the positive control (benznazotol) was verified quantitatively using a previously described methodology [13].

2.5. Antileishmanial activity assay

Promastigote forms of *L. amazonensis* were cultivated at 22 °C in 199 (LCC) medium supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin and streptomycin. These parasite forms ($1 \times 10^6/\text{mL}$), obtained by culture in stationary phase, were put in 24 well plates at 22 °C. Different concentrations of algae subfractions (0.5, 2.0, 8.0, 12.0 and 128.0 $\mu\text{g/mL}$) were added and then evaluated after 24 h. After 24 h, a 100 μL sample of incubated material was withdrawn, and the activity was assayed using MTT (oxidation colorimetric

Fig. 1. Dose-response curves of the trypanocidal (A) and leishmanicidal (B) activities of BT-H and BT-D fractions from *E. tenella*. In these assays it was used gentian violet as positive control ($IC_{50} = 4.1 \text{ ng mL}^{-1}$) or amphotericin B as an antiprotozoan ($IC_{50} = 1.2 \text{ µg mL}^{-1}$) in continuous concentrations.

assay). A solution of DMSO was used as the negative control in the same concentration applied for the algae subfractions.

2.6. Statistical analysis

The subfractions were prepared in triplicate and measured for their trypanocidal and leishmanicidal activity, as expressed by the percentage of activity (%AE) according to the formula:

$$\%AE = \frac{(AE - AEB)}{(AC - AEB)} \times 100,$$

where AE represents the "absorbance of tested plates," AEB is the "absorbance of plates containing medium and sample," AC is the "absorbance of plates containing negative control," and ACE is the "absorbance of plates containing culture medium."

All the IC_{50} values were calculated by nonlinear regression equation, using the computer program GraphPad Prism v.4.02.

2.7. Antifungal activity

The phytopathogenic microorganisms used in the antifungal assays: *C. spherospermum* (Percig) SPC 401 and *C. cladosporioides* (Presen) de Vries SPC 140 were cultured at the Instituto de Botânica, São Paulo, SP Brazil. The *n*-hexane and dichloromethane fractions, as well as the subfractions obtained by chromatographic separation, were dissolved in polar and nonpolar solvents and applied to pre-coated TLC plates. For the BT-H samples, the TLC plates were developed with *n*-hexane:ethyl acetate (9:1); the BT-D samples with dichloromethane:methanol (9:1); and the H01, H02, H03, H05, H06, D01 and D02 with *n*-hexane:ethyl acetate (3:2) as the mobile phase. After eluting, the plates were dried for complete removal of the solvents. The chromatograms were sprayed with a spore suspension of *C. spherospermum* or *C. cladosporioides* in a glucose and salt solution and incubated for 72 h in a dark moistened chamber at 25 °C. A clear inhibition zone appeared against a dark background, indicating favorable sample activity. Nystatin was used as the positive control [14].

3. Results and discussion

3.1. Antiprotozoan and antifungal activities of BT-H and BT-D

The BT-H (*n*-hexane) and BT-D (dichloromethane) fractions contained active substances against the protozoa *T. cruzi* (trypanocidal form), as shown in Fig. 1A. In addition, BT-H was moderately active against the protozoan *L. amazonensis* (leishmanicidal form – Fig. 1B), based on the IC_{50} values of standard drugs used in this experiment: gentian violet ($IC_{50} = 31 \text{ µg/mL}$) and amphotericin B ($IC_{50} = 13 \text{ µg/mL}$). The BT-D (dichloromethane) fraction

was weakly active against *L. amazonensis*. The R_f (retention factor) in thin layer chromatography, as shown in Table 1, indicated that the BT-H and BT-D fractions consisted of more than one active substance. These fractions may contain promising pharmacological properties that should be explored more thoroughly.

With the aim of identifying the substance or groups responsible for the biological activities, the obtained fractions were evaluated after chromatographic separation (see Section 2.2) (Table 1).

After silica gel chromatography, the fractions displaying high antiprotozoan and antifungal activities were H02, H03, H05, H06, D01 and D02.

In the trypanocidal assay (Fig. 2A) the sample H02 ($IC_{50} = 15.8 \text{ µg/mL}$) was stood out, showing higher activity than gentian violet (standard compound), whereas H01 ($IC_{50} = 34.5 \text{ µg/mL}$) and D02 ($IC_{50} = 36.5 \text{ µg/mL}$) displayed moderate activity. In the leishmanicidal assay (Fig. 2B), samples H02 ($IC_{50} = 1.5 \text{ µg/mL}$), H03 ($IC_{50} = 2.7 \text{ µg/mL}$), D01 ($IC_{50} = 4.4 \text{ µg/mL}$) and D02 ($IC_{50} = 4.3 \text{ µg/mL}$) were highly active, presenting IC_{50} values less than amphotericin B (standard compound). Furthermore, two inhibition spots by H02 indicate the presence of at least two substances or groups of substances that might demonstrate antifungal properties.

Fraction BT-D was weakly active against *L. amazonensis* (Fig. 3B), however its D01 and D02 subfractions were active (Fig. 2B). These results indicate that the BT-D fraction contains substances that may be interacting with each other or inhibiting some active compound, and thus appearing inactive. Alternatively, the active substances in the BT-D fraction could be in concentrations insufficient to promote positive activity, but are more concentrated after fractionation and men are to exhibit activity.

Several published reports have demonstrated the antiprotozoan activity of fresh algae and seaweeds. In a study involving the

Table 1
Antifungal inhibition of organic fractions and subfractions from *E. tenella*.

Sample	<i>C. cladosporioides</i>		<i>C. spherospermum</i>	
	R_f	Potential	R_f	Potential
BT-H	0–0.27	3	3–0.35	3
H01	0.37/0.34	1/1	1.27/0.34	1/1
H02	0.23/0.43	1/1	1.37/0.42	1/2
H03	0.3	2	1.25	3
H05	0.24	1	1.14	3
H06	0.21	3	1.15	3
BT-D	0.57/0.64/0.71–1.00	3/2/3	1.81/0.805	3/3
D01	0.37	3	1.26	3
D02	0.34	3	1.25	3

Positive control: Nystatin.

Potential legend: 1 (weak potential); 2 (medium potential); 3 (strong potential).

Fig. 2. Dose-response curves of the trypanocidal (A) and leishmanicidal (B) activities of HT-H- and HT-D-derived extractions from *B. tenella*. In these assay it was used gentian violet as positive control ($IC_{50} = 31 \mu\text{g/mL}$) in *Trypanosoma cruzi* and amphotericin B ($IC_{50} = 12 \mu\text{g/mL}$) in *Leishmania amazonensis*.

inhibition of protozoan dihydromotate dehydrogenase (DHOD), the extracts from two brown algae, *Fucus evanescens* and *Polysiphonia babingtonii*, yielded a 56% and 58% decrease in the recombinant DHOD activity, respectively, at a concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$. These results imply that *F. evanescens* and *P. babingtonii* contain inhibitor(s) against the *T. cruzi* DHOD activity and the protozoan infection and proliferation in mammalian cells [15].

The ethanolic extracts of a number of marine macroalgae (*Dictyota dichotoma*, *Halopleura scoparia*, *Peridonia oceanica*, *Sargassum furcellum*, *Sargassum natans* and *Ulva lactuca*) displayed trypanocidal activity against *Trypanosoma brucei rhodesiense*, with *S. natans* being the most active (IC_{50} 7.4 $\mu\text{g/mL}$). Except for *H. scoparia*, all extracts also demonstrated leishmanicidal potential. The highest antileishmanial activity was exhibited by *U. lactuca* and *P. natans* (IC_{50} values of 5.0 and 8.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively) [16]. Organic extracts from *Laurencia miricola* (Rhodophyta), *D. caribaea*, *Turbinaria turbinata* and *Lobophora variegata* (Phaeophyta) have promising *in vitro* activity against *Leishmania mexicana* promastigotes (IC_{50} values ranging from 10.9 to 409 $\mu\text{g/mL}$) [17].

Some samples such as H05 and H06 showed weak activity in the antiprotozoan assay, but contained substances with antifungal potential, suggesting that these samples have selective and active substances for different biological targets. Similar work was performed by Saito et al. [18] using thin-layer chromatographic screening of growth inhibitors for an imperfect fungus in calcareous red algae (Corallinales) *Coralline pilulifera*, *Leathochium porifera*, and *Cladophoridium circumscriptionum*. In this work, several substances with positive activity against *Cladophoridium circumscriptionum* were detected in the alcoholic extracts of the marine plants. The observed differences among the substances can be attributed to the morphological characteristics of seaweeds [18].

3.2. Chemical profile of HT-H and HT-D by GC/MS

Fractions (H01–H06 and D01–D02) with previously observed trypanocidal and antileishmanial activity were submitted to chemical analysis by GC/MS (Table 2) [29–28]. The major compounds in the fractions were identified, and the variation of these compounds in the different fractions is shown in Table 2.

Table 2 shows the diversity of the classes of substances found in the active samples: alkanes, alkenes (including dienes), alcohols (including diol), ketones, aldehydes, aromatics, esters, lactones, long-chain carboxylic acids, amides, imides and cholesterol derivatives. In a study involving some species of red algae from the Mack Sea, the volatiles from most of the investigated red algae had moderate activity against *Staphylococcus aureus*. The volatiles from *H. virgatum* were rich in fatty acid methyl esters (76.4% from the total volatiles), whereas the volatiles from *C. elongata* contained phenol, 3,4-dihydroxy benzaldehyde, benzoic acid and the

monoterpene eucalyptol. The volatiles from *Polysiphonia denudata* and *P. denudata* f. *fragilis* had similar activities against *S. aureus*, which might be attributed to the presence of aldehydes, free fatty acids, and phenol [19]. The presence of benzoic acid and 4-hydroxy-benzaldehyde has already been established in marine algae [20,21] and may be responsible for the biological potential of fraction D02. Moreover, a series of aromatic aldehydes, including 4-hydroxy-benzaldehyde showed moderate activity against the fungi *Coriaria vesicular* and *Leptopus sulphureus* [22], which supports our assumption that these compounds, observed in *B. tenella*, can be responsible for the antileishmanicidal activity.

We were also able to detect free fatty acids, which serve as energetic substrates and allelopathic agents [23]. The hexadecanoic acid (palmitic acid) produced by green algae was one of the substances evaluated in the cytotoxic assays involving phytoplankton and cyanobacteria. In a work involving fungal growth in the laboratory, a mixture of palmitic and oleic acids enhanced the growth of continuous-tomato and continuous-cucumber seedlings. Except for oleic acid, the fatty acids inhibited the mycelial growth of one or more tested fungi in a Petri dish assay. The saturated fatty acids showed stronger antifungal activity than the unsaturated fatty acids, suggesting that these fatty acids might be applicable as alternative approaches to the integrated control of phytopathogens [24]. The mode of action of these compounds against molds is not well understood, although it has been suggested that the fatty acids could disrupt the plasma membrane of fungi, thereby inhibiting the formation of aporesoria in the infected leaf [25].

Other groups identified in our study include 2,6,10-trimethyl-14-ethyl-14-pentadecene (neophytadiene), (E)-7R,11R)-3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadec-1-ol (phytol), 2,6,10,14-tetramethyl-hexadecadiene (phytadiene), 2,6,10,14-tetramethyl-2-hexadecene (phyt-2-ene) and 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone (hexahydrolauryl acetone). Phytol and neophytadiene have already been proposed to have certain antimicrobial activities [26]. The oleic-type phytol had antibacterial activity and inhibited the growth of *S. aureus*, at a concentration of 0.15 $\mu\text{g/mL}$, as determined by damage to the cell membranes. The crude methanol extract of the Kenyan shrub *Leucos valletii* Gürke (Labiateae) displayed antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in a radiometric bioassay. The bioassay-guided fractionation of the crude extract led to the identification of (E)-phytol as the principal active component with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 2 $\mu\text{g/mL}$, a value also observed for (3R,5Z/8,11R)-phytanol, (Z)-phytol, and a commercially available α : mixture of (E)- and (Z)-phytol [27]. Two nitrogenous sterols 7 β -aminomethylcholesterol and 7 α , β -aminomethylcholesterol were active against *Leishmania donovani* promastigotes. Furthermore, (24R,5)-24-hydroxy-24-methylcholesterol (MEC, 12.5 μM) was the most active compound

Table 2
Compounds detected by GC/MS in active fractions of *B. tenella* (% of the total volatile mixture).

Compound	R ₁ (m ²)	R ₂ (m ²)	Ident.	101	102	103	105	106	107	108
3-Methyl-3-cyclopenten-1-one	–	–	MS ¹⁷	0.74	3.23	–	0.79	5.13	4.23	3.80
2-Pentanoic acid	–	–	MS ⁷¹	4.89	13.73	25.00	1.61	29.08	12.28	30.96
3-Hexone-2,5-diol	–	–	MS ⁷¹	–	–	–	9.98	–	–	–
NI	1060.9	–	–	0.51	–	–	2.90	9.57	4.46	4.06
Nonanal	1101.8	1102 ^a	MS, RI	0.27	–	–	–	–	–	–
NI	1115.8	–	–	–	–	–	–	3.24	2.28	1.80
trans-5-Methyl-2-(1-methylpropyl)-cyclohexanone	1147.5	1154 ^a	RI	0.33	–	–	6.83	5.77	5.59	3.31
5-Oxo-hexanoic acid	1150.6	–	MS ⁷¹	–	–	–	9.78	–	–	10.27
NI	1163.2	–	–	–	–	–	–	–	–	5.67
2-Decanone	1202.3	1202 ^a	RI	–	–	–	0.99	–	–	–
3-Ethyl-4-methyl-10-cyclohept-2,5-dione	1220.2	1231 ^a	RI	0.53	1.62	–	–	–	–	–
Benzoic acid	1244	1246 ^a	MS, RI	–	–	–	–	–	–	1.39
(R)-3-Deconal	1265.4	1267 ^a	MS, RI	–	0.78	–	–	–	–	–
NI	1277.4	–	–	–	–	–	–	1.28	1.88	2.56
4-Hydroxy-benzaldehyde	1363	–	MS ⁷¹	–	–	–	–	–	–	5.88
3-Hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl-isobutylate	1370	–	RI	0.34	–	–	–	–	–	–
4-Methyl-tetradecane	1452.4	1462 ^a	MS, RI	–	–	–	0.27	–	0.71	–
NI	1465.3	–	–	–	–	–	–	–	1.75	2.54
N-Acetyl-2-methyl-cyclopentanone	1489.2	–	MS ⁷¹	–	2.02	–	–	–	–	–
Pentadecanal	1706.2	1712 ^a	MS, RI	0.20	–	–	–	–	–	–
Tetradecanoic acid	1742.8	1750 ^a	MS, RI	3.18	–	–	1.14	3.13	3.87	–
Hexadecanal	1808	1817 ^a	MS, RI	–	–	–	1.35	–	–	–
Pentadecanoic acid	1815.4	–	MS ⁷¹	0.34	–	–	–	–	–	–
2,6,10-Trimethyl-14-hydroxypentadecanone	1820.4	1827 ^a	MS, RI	0.85	12.38	14.38	22.29	2.14	1.72	3.88
6,10,14-Trimethyl-3-pentadecanone	1828.5	1834 ^a	MS, RI	0.73	3.73	–	2.50	1.28	1.29	2.39
2,6,10, 4-Tetramethyl-2-hexadecanone	1945.9	–	MS ⁷¹	–	2.89	–	6.19	–	–	–
2,6,10, 4-Tetramethyl-hexadecanone	1965.7	1967 ^a	MS, RI	0.34	4.33	0.05	9.28	0.80	0.78	1.34
Methyl-hexadecanoate	1912.2	1919 ^a	MS, RI	–	–	–	–	0.85	0.84	–
Hexadecanoic acid	1950	1960 ^a	MS, RI	61.44	7.08	5.48	4.44	30.14	10.64	2.32
2-Hydroxy-1,3-propanediylhexadecanoate	2002.4	–	MS ⁷¹	0.37	–	–	–	–	–	–
Heptadecanoic acid	2054.1	2062 ^a	MS, RI	0.18	–	–	–	–	–	–
5-Dodecylidihydro-2(1H)-furanone	2085.1	–	MS ⁷¹	0.56	–	–	–	–	0.56	–
(E)-7(11H)-3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadec-1-ol	2103.6	2108 ^a	MS, RI	–	–	1.28	1.92	–	–	–
6-Hydroxytetradec-2H-pentan-3-one	2126.3	2134 ^a	RI	0.34	–	–	–	–	–	–
2'-O-Octadecanoic acid	2134.5	2139 ^a	MS, RI	2.52	–	–	–	–	–	–
8-O-Octadecanoic acid	2138.8	–	MS ⁷¹	1.44	–	–	–	–	–	–
Octadecanoic acid	2152.6	2164 ^a	MS, RI	0.80	–	–	–	–	–	–
Hexadecanamide	2168.4	–	MS ⁷¹	–	–	–	0.25	–	–	–
4,8,12, 6-Tetramethylheptadecan-4-ol	2332.4	–	MS ⁷¹	0.42	–	–	–	–	–	–
NI	–	–	–	0.10	–	3.19	–	–	–	–
4,8-Cholestadien-3-β-ol	–	–	MS ⁷⁹	4.37	7.33	10.00	2.99	1.03	0.83	–
NI	–	–	–	0.77	1.47	1.09	0.51	–	–	–
3-β-Cholest-5-en-3-ol	–	–	MS ⁷⁹	5.84	23.58	2.40	0.93	–	–	–
3,3-Cyclocholestan-6-one	–	–	MS ⁷⁹	0.38	–	–	–	–	–	–
Cholesta-2,5-dien-7-one	–	–	MS ⁷⁹	1.80	1.84	7.30	0.82	–	–	–
4,8-Cholestadien-3-one	–	–	MS ⁷⁹	0.21	0.29	–	–	–	–	–
NI	–	–	–	–	5.86	–	–	–	–	–
NI	–	–	–	–	–	5.75	–	–	–	–

RI is RI, references for R₁ literature values (Appendix B, *) to *RI: fragmentation profile for substances identified by MS (Appendix B).

^a Calculated retention index.

^b Retention index from literature.

against *Trypanosoma brucei brucei* from a series of evaluated oxysterols, including ketosterols and hydroxysterols [28].

This experiment was evaluated based on retention time of majority compounds (more than 50) in each fraction, expressed as relative standard deviation (RSD). For all substances analyzed, the RSD values were below 1%, indicating the satisfactory repeatability of the proposed method. In addition, the compounds not compared by literature data were submitted to mass spectrometry analysis, confirming the structures by the fragmentation pattern (Table 2).

4. Conclusions

In this work, a general chromatographic procedure to obtain fractions containing volatile compounds from the marinated alga *B. tenella* is presented. The GC/MS method was also applied for the

identification of the volatile composition, allowing for the characterization of bioactive extracts that could be potentially used for the pharmaceutical industry. The biological evaluation allowed for a correlation between functional groups and exhibited activity. The possibility of finding functional and interesting compounds from the alga *B. tenella* using this methodology and other assays (phytopathogenic fungi *C. didymosporoides* and *C. schaefferianum*, and antibacterial assays using *T. cruzi* and *L. amazonensis*) looks promising.

Acknowledgements

The authors are grateful to FAPESP for a fellowship (2007/07985-8) and financial support (05/53808-9) and to CNPq for financial support (485421/2006-2 and 420.015/2005-1).

Appendix A

References for retention index: literature values shown in Table 2.

- #1 J.A. Pina, J. Mesa, Y. Saubert, M.F. Martí, R. Marbot, Volatile components from Mango (*Mangifera indica* L.) cultivars, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 2213–2223.
 #2 M. Sohma, F. Bananagatien, R.L. Johnson, F.R. Whitfield, Volatile aroma components of soy protein isolate and acid-hydrolyzed vegetable protein, *Food Chem.* 90 (2005) 891–893.
 #3 M. Miyazawa, E. Horieuchi, J. Kawata, Components of the essential oil from *Melastomaceae* *Leptocarpus*, *J. Chem. Sci.* 56 (2007) 457–461.
 #4 N. Radošević, M. Đekić, B. Zlatković, I. Đekić, V. Đekić, R. Palić, A detailed analysis of volatile constituents of *Apulagi parviflora* Vegen, a Serbian-Serbo-endemic species, *Chem. Pap.* 63 (2007) 405–409.
 #5 H.D. Scudera, C. Delnecro, D. Luzzi, M. Soković, Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Scutellaria* species from Greece, *Phytochemistry* 64 (2003) 743–752.
 #6 D. Tracita, A. Said, A. Farag, K. Rashid, Volatile constituents of *Albanitia exilis* Benth, *Raysoni Frag. J.* 2 (2005) 839–841.
 #7 R.R.S. Torres, J.A.D. Lopes, J.M. Matta-Reto, A.M.G.L. Crô, Constituintes voláteis de *protopia platensis*, *Quim. Nova* 31 (2008) 475–483.
 #8 M. Miyazawa, S. Nagai, T. Oshima, Volatile components of the stems of *Oryza sativa* L., *J. Chem. Sci.* 57 (2006) 139–143.

Appendix B

The fragmentation profile for the compounds identified by means of mass spectrometry, Table 2.

- *1: 90 (100); 67 (69); 53 (30); 81 (36); 40 (32); 41 (23); 95 (23); 68 (17); 97 (12); 41 (10).
 *2: 43 (100); 58 (17); 86 (16); 41 (9); 71 (7); 42 (6); 55 (6).
 *3: 43 (100); 71 (40); 55 (24); 83 (23); 57 (21); 98 (21); 41 (14); 42 (10); 70 (8); 58 (8).
 *4: 43 (100); 42 (14); 113 (13); 41 (12); 45 (11); 70 (10); 40 (7); 68 (7); 83 (6).
 *5: 121 (100); 122 (90); 65 (41); 57 (41); 63 (10); 66 (7); 123 (6).
 *6: 81 (100); 41 (17); 79 (11); 43 (10); 82 (7); 53 (6); 55 (5); 83 (5).
 *7: 43 (100); 73 (72); 41 (69); 57 (60); 60 (66); 55 (52); 71 (40); 69 (36); 120 (12); 109 (25); 81 (24); 83 (23); 87 (21); 56 (20).
 *8: 82 (100); 81 (98); 68 (88); 43 (86); 95 (85); 57 (84); 41 (69); 69 (59); 123 (54); 51 (34); 67 (31); 71 (44); 83 (43); 79 (36); 96 (36); 96 (36); 97 (31); 124 (31); 124 (31); 109 (20); 56 (22); 110 (19); 79 (18); 111 (16).
 *9: 43 (100); 57 (87); 41 (61); 55 (56); 71 (52); 73 (50); 60 (45); 69 (38); 129 (29); 81 (27); 97 (24); 132 (21); 85 (19); 113 (18); 56 (17); 42 (15); 145 (15).
 *10: 85 (100); 43 (34); 41 (33); 55 (48); 69 (34); 57 (37); 84 (36); 97 (34); 83 (31); 55 (29); 70 (21); 98 (20); 96 (18); 111 (17); 128 (10); 192 (8); 138 (6); 236 (6); 210 (5).
 *11: 55 (100); 41 (89); 69 (74); 48 (62); 83 (46); 97 (45); 57 (37); 56 (36); 70 (29); 84 (29); 61 (27); 98 (27); 98 (27); 73 (24); 96 (23); 81 (21); 82 (20); 60 (20); 111 (20); 71 (20); 68 (19); 125 (19); 264 (9); 137 (7).
 *12: 59 (100); 72 (34); 43 (22); 41 (15); 55 (12); 69 (8).
 *13: 99 (100); 43 (44); 57 (26); 55 (25); 69 (24); 41 (22); 71 (16); 70 (16); 126 (16); 56 (15); 134 (15); 83 (14); 111 (13); 97 (11); 85 (8); 98 (7); 109 (6); 110 (6); 125 (6).
 *14: 138 (100); 166 (89); 143 (76); 43 (57); 81 (48); 119 (47); 140 (41); 95 (41); 241 (37); 55 (16); 41 (16); 57 (15); 129 (14); 105 (13); 91 (12); 145 (11); 158 (11); 144 (10); 69 (10).
 *15: 386 (100); 43 (80); 55 (68); 301 (65); 187 (65); 95 (64); 275 (63); 81 (60); 101 (60); 27 (60); 41 (60); 143 (59); 368 (48); 91 (47); 93 (46); 69 (46); 213 (42); 79 (44); 67 (44); 353 (41); 119 (39); 161 (39); 133 (39); 119 (38); 163 (34); 255 (34); 371 (33); 231 (27); 173 (21); 247 (16).
 *16: 384 (100); 136 (60); 43 (58); 79 (34); 122 (33); 123 (30); 55 (40); 95 (45); 41 (41); 121 (35); 385 (31); 57 (31); 81 (31); 91 (30); 94 (30); 161 (29); 369 (28); 229 (22); 27 (13).
 *17: 174 (100); 382 (47); 161 (27); 159 (25); 187 (23); 43 (21); 175 (16); 91 (16); 41 (15); 81 (15); 269 (11); 367 (7).
 *18: 124 (100); 43 (69); 229 (39); 384 (31); 55 (30); 41 (29); 261 (29); 95 (26); 147 (26); 81 (25); 260 (24); 135 (23); 97 (21); 93 (21); 342 (13); 299 (8); 187 (8).

References

- [1] WHO (World Health Organization), Neglected Tropical Diseases – Innovative and Intensified Disease Management, 2007.
- [2] A. Cavalli, M.L. Bologna, Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 7339–7350.
- [3] F.A. Medeiros, A.T. Bruni, K.M. Honório, A.B.F. da Silva, A structure-activity relationship study of quinine compounds with trypanocidal activity, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 329–338.
- [4] R.B. Mifra, R.K. Singh, A. Srivastava, V.J. Tripathi, V.K. Thwart, Fighting against leishmaniasis: search of alkaloids as future hit potential anti-leishmanial agents, *Mini-Rev. Med. Chem.* 9 (2009) 107–123.
- [5] K.K. Jha, X. Zi-rong, Biomedical compounds from marine organisms, *Mar. Drugs* 2 (2004) 123–146.
- [6] F.D. Rocha, A.R. Soares, P.J. Houghton, R.C. Perreira, M.A.C. Kaplan, V.L. Teixeira, Potential cytotoxic activity of some Brazilian seaweeds on human melanoma cells, *Phytother. Res.* 21 (2007) 170–175.
- [7] G.C. Zuccarello, J.A. West, Multiple cryptic species: molecular diversity and reproductive isolation in the *Bostrychia nuda* complex (*Bostrychia nuda* complex) (Rhodomelaceae, Rhodophyta) with focus on north American isolates, *J. Phycol.* 39 (2003) 948–959.
- [8] U. Karsten, S. Gons, A. Eggert, J.A. West, Thialysol, digemastol and flutolide in the Rhodomelaceae (Rhodophyta) – a reevaluation of its chemotaxonomic value, *Phycologia* 46 (2007) 143–150.
- [9] M.J.R. Duarte, D.G. Nogueira, M.J. Nogueira, S. Tallo, C.A. Pezot, E.B. Damasceno, Inhibitory effect of sulphated galactans from marine alga *Bostrychia montana* on herpes simplex virus replication in vitro, *Phytomedicine* 8 (2001) 53–58.
- [10] U. Karsten, T. Sawall, J. West, C. Wiericke, Ultraviolet absorbance corresponds to epiphytic red algae from mangroves, *Hydrobiologia* 432 (2000) 159–171.
- [11] R. Felício, N.S. Yokoyama, H.M. Debern, Potassium 4-(hydroxymethyl)-benzenesulfonate: a novel metabolite isolated from the marine red alga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Ceramiales), *Quim. Nova* 31 (2008) 837–839.
- [12] D.B. da Silva, E.C. Teófilo, G.C. Mello, L.V. Costa-Letitia, C. Pessoa, M.O. de Moraes, S. Albuquerque, J.M. de Siqueira, The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Dugesia japyfascia*, *Phytomedicine* 18 (2009) 1059–1063.
- [13] R. Docampo, S.N. Moreno, F.R. Galeffi, W. de Souza, F.S. Cruz, Prevention of Chagas' disease resulting from blood transfusion by treatment of blood: toxicity and mode of action of gentian violet, *Biomed. Environ. Sci.* 1 (1988) 406–413.
- [14] A.L. Romano, A. Pardo, Direct bioassay on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungotoxic substances, *J. Chromatogr.* 51 (1970) 327–329.
- [15] T. Nara, Y. Kamei, A. Tsubouchi, T. Amosaka, K. Hirota, K. Hara, Y. Dohmoto, T. Ono, T. Aoki, Inhibitory action of marine algae extracts on the *Trypanosoma* crust dihydroacetate dehydrogenase activity and on the protein growth in mammalian cells, *Parasitol. Int.* 54 (2005) 59–64.
- [16] I. Orhan, B. Setzer, T. Altun, B. Ilhan, R. Percec, D. Toderici, Turkish freshwater and marine macrophyte extracts show in vitro antiprotozoal activity and inhibit Fald, a key enzyme of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis, *Phytomedicine* 13 (2006) 388–393.
- [17] F. Freije-Peláez, D. Robledo, M.J. Chan-Bacab, B.D. Ortega-Morales, Antileishmanial properties of tropical marine algae extracts, *Fitoterapia* 79 (2008) 374–377.
- [18] K. Saito, H. Yabe, J. Ishii, Chromatographic screening of growth inhibitors for *Chlamydomonas reinhardtii* in the extracts of calcareous red algae, *Acta Biol. Hung.* 48 (1997) 203–210.
- [19] Z. Kamenarica, J. Serkezijeva, H. Najdenski, K. Stefanov, I. Tsvetkova, S. Dimitrova-Kozaklieva, S. Popov, Antibacterial, antiviral, and cytotoxic activities of some red and brown seaweeds from the Black Sea, *Bot. Mar.* 52 (2009) 80–86.
- [20] Z. Kamenarica, A. Ivanova, R. Stancheva, M. Stoyanova, K. Stefanov, S. Dimitrova-K, S. Popov, Volatile compounds from some Black Sea red algae and their chemotaxonomic application, *Bot. Mar.* 46 (2006) 47–56.
- [21] Z. Kamenarica, A. Ivanova, R. Stancheva, K. Stefanov, S. Dimitrova-K, S. Popov, Polar constituents of some Black Sea red and brown algae and their application in chemotaxonomy and chemosynthesis, *Acta Hydrobiol.* 162 (2006) 139–154.
- [22] S. Wang, P. Chen, S. Chang, Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum cinnamomum*) leaves against wood decay fungi, *Bioresour. Technol.* 96 (2005) 813–818.
- [23] Z. Kamenarica, K. Stefanov, S. Dimitrova-K, H. Najdenski, I. Tsvetkova, S. Stoyanova, S. Popov, Chemical composition and biological activity of the brackish water green alga *Chlorella rivularis* (L.) Hook. *Bot. Mar.* 47 (2004) 215–221.
- [24] S. Uti, W. Shain, J. Li, H. Xu, J. Wang, Y. Gao, J. Wang, Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids, *Mycopathology* 166 (2008) 83–100.
- [25] C. Altieri, A. Benfante, D. Carillo, M. Strigaglia, Antifungal activity of fatty acids and their monoglycerides against *Fusarium* spp. in a laboratory medium, *Int. J. Food Sci. Technol.* 44 (2009) 242–245.
- [26] Y. Iwano, T. Hada, A. Shimada, K. Hara, H. Hamashima, S. Kobayashi, Eliphasic effects of geranylgeraniol, isoprene, and phytol on the growth of *Sagittaria* *arifolia*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 1770–1774.
- [27] M. Bazzio, F.M. Linares, C. Berio, Y. Lefebvre, S. Rault, L. B. Kéfi, Synthesis of covalent and nitrogenous sterols with antileishmanial and trypanocidal activities, *Eur. J. Med. Chem.* 41 (2006) 1109–1116.
- [28] M.S. Rajah, C.L. Cantrell, S.G. Franzblau, M.H. Fisher, Antimicrobial activity of (E)-phytol and derivatives. A preliminary structure-activity study, *Planta Med.* 64 (1998) 2–4.