UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Composição química e potencial biológico das algas vermelhas
marinhas *Laurencia filiformis*, *Laurencia intricata*, *Plocamium
brasiliense* e *Ochtodes secundiramea* da costa brasileira**

Vanessa Gressler

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Ernani Pinto

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Gressler, Vanessa

G832c Composição química e potencial biológico das algas vermelhas
marinhas *Laurencia filiformis*, *Laurencia intricata*, *Plocamium*
brasiliense e *Ochtodes secundiramea* da costa brasileira / Vanessa
Gressler. -- São Paulo, 2010.
283p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Pinto, Ernani

1. Produtos naturais : Farmacognosia 2. Alga vermelha : Ficologia
I. T. II. Pinto, Ernani, orientador.

615.321 CDD

Vanessa Gressler

**Composição química e potencial biológico das algas vermelhas marinhas
Laurencia filiformis, *Laurencia intricata*, *Plocamium brasiliense* e *Ochtodes
secundiramea* da costa brasileira**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Ernani Pinto
Orientador/Presidente

1°. examinador

2°. examinador

3°. examinador

4°. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Ao meu esposo Ricardo,
pelo amor, dedicação e apoio incondicional.

TE AMO MUITO!

Aos meus pais, irmã e avó,
por sempre me incentivarem a ir em busca dos meus
sonhos e por sempre estarem ao meu lado.

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Dr. Ernani Pinto pela orientação, estímulo e amizade, fundamentais para o meu crescimento científico.

Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo pela amizade, incentivo e ajuda constante.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Mutue T. Fujii e Nair S. Yokoya, do Instituto de Botânica, pelo auxílio nas coletas, identificação das espécies de algas e também pelas aulas de ficologia extracurriculares.

Ao Prof. Dr. Andras Hensel do *Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie, Westfälische Wilhelms Universität Münster*, Alemanha, pela oportunidade, colaboração científica e contribuição para meu amadurecimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Maurício Yonamine por disponibilizar seu laboratório no início do desenvolvimento deste trabalho, pelas contribuições e pela amizade.

À Dr^a. Lydia Fumiko Yamaguchi, por auxiliar nas análises de RMN e também pela amizade.

Ao Dr. Ricardo Vessecchi, da USP de Ribeirão Preto, pela disposição e contribuição com os cálculos teóricos de RMN.

À amiga Fabyana Maria dos Anjos, por me acolher em sua casa nos primeiros dias em que estive em São Paulo e pelo exemplo de força de vontade.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório Vania, Stella, Natália, Bruna, Mariah, Felipe, Ronaldo, Bruno, Regiane, Bárbara, Diogo, Vinícius, Fabiana, Arianne, Gabriela, Sara, Raphael, Sidnei e Paula, pela convivência diária no laboratório, pela companhia nos momentos de lazer, mas principalmente pela amizade construída ao longo do tempo.

Aos amigos e praticamente colegas do Pio's Lab, Ed, Érika, Aline, Ângela, Renato, João, Luiza, Daniel e Patrícia, pela amizade e companheirismo ao longo desses anos.

À minha quase irmã Fabiane Dörr, pela cumplicidade, conselhos, convivência diária e, principalmente, pela grande amizade que se fortaleceu ainda mais durante estes anos.

Aos amigos queridos que fiz durante a estadia na Alemanha, Prof. Schmidt, Frank, Matthias, Alex, Mareike, Michael, Claudia, Andrea, Andreas, Christian, Stefanie, Martina, Elke e principalmente à Ruxi, por me acolherem e me ajudarem nas mais diversas tarefas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro recebido e pela bolsa concedida, elementos essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo auxílio financeiro.

À Coordenação de Amparo de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida CAPES-PROBRAL para realização do estágio na Alemanha.

Tente ser uma pessoa de sucesso, mas
efetivamente tente ser uma pessoa de
valor.

Albert Einstein

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Universidade de São Paulo

Composição química e potencial biológico das algas vermelhas marinhas *Laurencia filiformis*, *Laurencia intricata*, *Plocamium brasiliense* e *Ochtodes secundiramea* da costa brasileira

Autora: Vanessa Gressler

Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto

O oceano apresenta uma vasta diversidade de espécies, entre elas as algas marinhas, as quais são usadas principalmente como fonte de alimentos, de produtos industriais e para uso medicinal. Considerando a biodiversidade encontrada, são poucos os estudos que verificam a composição química e atividade biológica de algas. Desta forma, o presente trabalho descreve especialmente compostos do metabolismo primário (lipídios, proteínas e aminoácidos), composição química volátil, e potencial antioxidante e antimicrobiano de quatro espécies de algas vermelhas da costa brasileira (*Laurencia filiformis*, *Laurencia intricata*, *Plocamium brasiliense* e *Ochtodes secundiramea*).

As análises de lipídeos revelaram que estas algas são ricas em ácidos graxos poliinsaturados $\omega 3$ e $\omega 6$, mas que apresentam o ácido palmítico como majoritário. O teor de proteínas encontrado é considerável e aproximadamente 50% da composição de aminoácidos é de aminoácidos essenciais.

Para extrair os compostos voláteis das algas selecionadas para o estudo, três métodos foram utilizados: arraste a vapor, extração por solvente e HS-SPME. A caracterização química dos compostos voláteis deu-se principalmente pela utilização de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Ainda foram isolados e identificados dois compostos majoritários do óleo essencial de *L. filiformis*, o (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol e o (-)-silfiperfolan-7 β -ol, e quatro compostos

do extrato acetona/água de *P. brasiliense*, o 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*E*)-octatrieno; o 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*Z*)-octatrieno; o 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*E*)-octatrieno e o 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*Z*)-octatrieno, utilizando diferentes técnicas cromatográficas, como CCDP e CLAE, para isolamento, e técnicas espectroscópicas (RMN uni e bidimensionais) e espectrométricas (HRMS e EIMS) para análise.

A atividade antioxidante dos óleos essenciais, dos extratos e das substâncias isoladas foi verificada utilizando-se dois métodos (DPPH e quimioluminescência). Os extratos diclorometano de *L. filiformis* (IC₅₀ de 48,5 µg/mL) e *L. intricata* (IC₅₀ de 58,0 µg/mL) mostraram-se como os mais potentes. As mesmas amostras não apresentaram potencial antimicrobiano em concentrações de até 500 µg/mL frente aos nove microrganismos testados.

Palavras-chave: algas marinhas, Rhodophyta, composição química, atividade biológica.

ABSTRACT

PhD Thesis

Toxicology and Toxicological Analysis Pos-Graduated Program

University of São Paulo

Chemical composition and biological potency of the marine red algae *Laurencia filiformis*, *Laurencia intricata*, *Plocamium brasiliense* and *Ochtodes secundiramea* of the Brazilian coast

Author: Vanessa Gressler

Supervisor: Prof. Dr. Ernani Pinto

The ocean provides large diversity of species, among them the seaweeds, which are mainly used as food, industrial products and as medicine. Considering the biodiversity, there are only few studies which analyze the algae volatile compounds and their biological activity. So that, this work describes specially compounds from the primary metabolism (lipids, proteins and amino acids), chemical volatile composition, and antioxidant and antimicrobial potencies of four red algae of the Brazilian coast (*Laurencia filiformis*, *Laurencia intricata*, *Plocamium brasiliense* and *Ochtodes secundiramea*).

The lipid analysis showed that these algae have $\omega 3$ and $\omega 6$ polyunsaturated fatty acids, but the palmitic acid is the most abundant. The protein content observed is considerable and approximately 50% of the amino acid composition is of essential amino acids.

To extract the volatile organic compounds from the algae selected for this study, three methods were used: hydrodistillation, solvent extraction and HS-SPME. For chemical characterization of the volatile compounds, the technique used was gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). In addition, the two most abundant compounds from the essential oil of *L. filiformis*, the (-)-7-*epi*-silphiperfolan-6 β -ol and the (-)-silphiperfolan-7 β -ol, and four compounds of the acetone/water extract of *P. brasiliense* the 3,4-*erythro*-7-dichloromethyl-3-methyl-3,4,8-trichloro-1,5(*E*),7(*E*)-

octatriene; the 3,4-*erythro*-7-dichloromethyl-3-methyl-3,4,8-trichloro-1,5(*E*),7(*Z*)-octatriene; the 3,4-*erythro*-1-bromo-7-dichloromethyl-3-methyl-3,4,8-trichloro-1(*E*),5(*E*),7(*E*)-octatriene and the 3,4-*erythro*-1-bromo-7-dichloromethyl-3-methyl-3,4,8-trichloro-1(*E*),5(*E*),7(*Z*)-octatriene, were isolated and identified using different chromatographic techniques like preparative TLC and HPLC for isolation and spectroscopic (NMR uni and bidimensional) and spectrometric techniques (HRMS and EIMS) for analysis.

The antioxidant activity of the essential oils, of the extracts and of the isolated compounds was verified by two methods (DPPH and chemiluminescence). The dichloromethane extracts of *L. filiformis* (IC₅₀ of 48.5 µg/mL) and *L. intricata* (IC₅₀ de 58.0 µg/mL) showed higher potency. The same samples do not have antimicrobial activity in concentrations until 500 µg/mL up against the nine microorganisms tested.

Keywords: marine seaweed, Rhodophyta, chemical composition, biological activity.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Substâncias naturais de algas marinhas (a) Micosporina-serinol; (b) Bromofenol-ianosol; (c) Polifenol-vidalol A; (d) Monoterpeno halogenado-violaceno; (e) Sesquiterpeno halogenado-caespitol; (f) Polissacarídeo-agar; (g) Polissacarídeo-κ-carragenina (h) Carotenóide β- caroteno	34
Figura 2 - Substâncias naturais identificadas em algas vermelhas e suas aplicações farmacológicas	36
Figura 3 - Reação de redução do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) com uma molécula antioxidante doadora de hidrogênio (RH)	48
Figura 4 - Reação de quimioluminescência do luminol catalisada pela enzima HRP e a interferência das moléculas antioxidantes sobre o sistema H ₂ O ₂ /luminol/HRP	49
Figura 5 - Localidade de realização das coletas (Praia de Ubú, Anchieta-ES, 20°48'S-40°38'O)	56
Figura 6 - Fracionamento do material vegetal para análises de compostos voláteis e atividades biológicas	58
Figura 7 - Fracionamento do material vegetal de <i>Plocamium brasiliense</i> para fins de isolamento	59
Figura 8 - Extração dos compostos voláteis por HS-SPME	59
Figura 9 - Efeito da quantidade de material utilizado (200 mg, 100 mg e 50 mg) na extração dos compostos voláteis por HS-SPME sobre a área total dos picos cromatográficos de <i>Laurencia filiformis</i> (L.f.), <i>Laurencia intricata</i> (L.i.), <i>Plocamium brasiliense</i> (P.b.) e <i>Ochtodes secundiramea</i> (O.s.) utilizando as fibras PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA. Condições: temperatura de extração de 60 °C, tempo de equilíbrio e de extração de 15 min	73
Figura 10 - Efeito do tempo de extração dos compostos voláteis (5 min, 15 min e 25 min) por HS-SPME sobre a área total dos picos cromatográficos de <i>Laurencia filiformis</i> (L.f.), <i>Laurencia intricata</i> (L.i.), <i>Plocamium brasiliense</i> (P.b.) e <i>Ochtodes secundiramea</i> (O.s.) utilizando as fibras PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA. Condições: temperatura de extração de 60 °C, tempo de extração de 15 min, utilizando 50 mg de material algal liofilizado	74
Figura 11 - Efeito do tempo de extração (5 min, 15 min e 25 min) no alargamento dos picos cromatográficos dos compostos voláteis por HS-SPME de <i>Laurencia filiformis</i> utilizando 50 mg de material algal liofilizado, fibra PDMS e temperatura de extração de 60 °C	75
Figura 12 - Cromatogramas obtidos após extração dos compostos voláteis por HS-SPME de <i>Laurencia filiformis</i> em temperaturas de 40 °C, 60 °C e 80 °C, utilizando 50 mg de material algal liofilizado, fibra de PDMS/DVB e tempo de extração e de equilíbrio de 15 min	76

Figura 13 - Efeito da temperatura de extração (40 °C, 60 °C e 80 °C) dos compostos voláteis por HS-SPME sobre a área total dos picos cromatográficos de <i>Laurencia filiformis</i> (L.f.), <i>Laurencia intricata</i> (L.i.), <i>Plocamium brasiliense</i> (P.b.) e <i>Ochtodes secundiramea</i> (O.s.) utilizando as fibras de PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA. Condições: 50 mg de amostra, tempos de equilíbrio e de extração de 15 min	76
Figura 14 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM das amostras extraídas por HS-SPME (PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA), óleo essencial (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) da espécie <i>Laurencia filiformis</i>	78
Figura 15 - Isolamento dos compostos LcAc1 e LfAc2: a) placa de CCD do óleo essencial de <i>Laurencia filiformis</i> ; b) placa de CCD dos compostos isolados; c) cromatografia gasosa de LfAc2; d) cromatografia gasosa de LfAc1	82
Figura 16 - Substâncias majoritárias isoladas do óleo essencial de <i>Laurencia filiformis</i>	83
Figura 17 - Espectro de RMN de HSQC de (-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol em CDCl ₃ a 500 MHz	84
Figura 18 - Espectro de RMN de HMBC de (-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol em CDCl ₃ a 500 MHz	85
Figura 19 - Espectro de massas de baixa resolução (EIMS) obtido de (-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol	86
Figura 20 - Espectro de massas de baixa resolução (EIMS) obtido de (-)-silfiperfolan-7 β -ol	87
Figura 21 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM das amostras extraídas por HS-SPME (PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA), óleo essencial (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) da espécie <i>Laurencia intricata</i>	88
Figura 22 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM das amostras extraídas por HS-SPME (PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA), óleo essencial (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) da espécie <i>Plocamium brasiliense</i>	93
Figura 23 - Cromatogramas obtidos em CLAE analítico para o extrato acetona/água e compostos isolados (detector de ultravioleta, λ = 256 nm). Condições cromatográficas: coluna Luna RP18 (25 cm x 2 μ m); fluxo de 0,8 mL/min; fase móvel gradiente 2-100% de acetonitrila em água (15 min), 100% acetonitrila (30 min)	97
Figura 24 - Estruturas dos compostos isolados de <i>Plocamium brasiliense</i> : (a) 3,4- <i>eritro</i> -7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(<i>E</i>),7(<i>E</i>)-octatrieno (PbF1); (b) 3,4- <i>eritro</i> -7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(<i>E</i>),7(<i>Z</i>)-octatrieno (PbF2); (c) 3,4- <i>eritro</i> -1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(<i>E</i>),5(<i>E</i>),7(<i>E</i>)-octatrieno (PbF3) e (d) 3,4- <i>eritro</i> -1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(<i>E</i>),5(<i>E</i>),7(<i>Z</i>)-octatrieno (PbF4)	98
Figura 25 - Espectro de RMN de HSQC de 3,4- <i>eritro</i> -7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(<i>E</i>),7(<i>E</i>)-octatrieno (PbF1) em CDCl ₃ a 500 MHz ...	102
Figura 26 - Espectro de RMN de HSQC de 3,4- <i>eritro</i> -1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(<i>E</i>),5(<i>E</i>),7(<i>E</i>)-octatrieno (PbF3) em CDCl ₃ a 500 MHz	103

Figura 27 - Espectro de RMN de COSY de 3,4- <i>eritro</i> -7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(<i>E</i>),7(<i>E</i>)-octatrieno (PbF1) em CDCl ₃ a 500 MHz	104
Figura 28 - Espectro de RMN de COSY de 3,4- <i>eritro</i> -1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(<i>E</i>),5(<i>E</i>),7(<i>E</i>)-octatrieno (PbF3) em CDCl ₃ a 400 MHz	105
Figura 29 - Espectro de RMN de HSQC de 3,4- <i>eritro</i> -7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(<i>E</i>),7(<i>Z</i>)-octatrieno (PbF2) em CDCl ₃ a 500 MHz	106
Figura 30 - Espectro de RMN de HSQC de 3,4- <i>eritro</i> -1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(<i>E</i>),5(<i>E</i>),7(<i>Z</i>)-octatrieno (PbF4) em CDCl ₃ a 500 MHz	107
Figura 31 - Estruturas dos fragmentos de massas (a) <i>m/z</i> 89, 91 e (b) <i>m/z</i> 167, 169, 171 observados para os compostos PbF1 a PbF4	111
Figura 32 - Comparação dos perfis cromatográficos obtidos por cromatografia gasosa de PbF1 a PbF4 em relação a amostra de HS-SPME utilizando fibra de PA de <i>Plocamium brasiliense</i>	111
Figura 33 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM das amostras extraídas por HS-SPME (PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA), óleo essencial (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) da espécie <i>Ochtodes secundiramea</i>	113
Figura 34 - Atividade antioxidante do óleo essencial e dos extratos das algas <i>Laurencia filiformis</i> , <i>Laurencia intricata</i> , <i>Plocamium brasiliense</i> e <i>Ochtodes secundiramea</i> , comparados com a Vitamina E pelo método do DPPH	119
Figura 35 - Atividade antioxidante de (-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6β-ol (LfAc1) e (-)-silfiperfolan-7β-ol (LfAc2) isolados do óleo essencial de <i>Laurencia filiformis</i> , comparados com o respectivo óleo essencial e com a vitamina E, pelo método do DPPH	121
Figura 36 - Atividade antioxidante do óleo essencial e dos extratos das algas <i>Laurencia filiformis</i> , <i>Laurencia intricata</i> , <i>Plocamium brasiliense</i> e <i>Ochtodes secundiramea</i> , comparados com o respectivo óleo essencial e com a <i>N</i> -acetil- <i>L</i> -cisteína, pelo método de quimioluminescência (H ₂ O ₂ /luminol/HRP)	122
Figura 37 - Atividade antioxidante de (-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6β-ol (LfAc1) e (-)-silfiperfolan-7β-ol (LfAc2) isolados do óleo essencial de <i>Laurencia filiformis</i> , comparados com a <i>N</i> -acetil- <i>L</i> -cisteína, pelo método de quimioluminescência (H ₂ O ₂ /luminol/HRP)	125
Figura 38 - Percentual de lipídeos totais (peso seco, n=3) nas espécies <i>Laurencia filiformis</i> (L.f.), <i>Laurencia intricata</i> (L.i.), <i>Plocamium brasiliense</i> (P.b.) e <i>Ochtodes secundiramea</i> (O.s.)	126
Figura 39 - Curva padrão de Albumina Sérica Bovina (BSA) utilizada na determinação da concentração relativa de proteínas.....	129

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos voláteis não halogenados e não sulfurados encontrados em macroalgas	37
Tabela 2 - Algas eventualmente utilizadas em experimentos	54
Tabela 3 - Fracionamento do material coletado em campo	57
Tabela 4 - Tipos de fibras de SPME utilizadas e suas respectivas siglas e espessuras	60
Tabela 5 - Microrganismos utilizados nos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM)	63
Tabela 6 - Rendimentos obtidos do processo de hidrodestilação das espécies de algas	71
Tabela 7 - Rendimentos obtidos dos extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) das espécies de algas	72
Tabela 8 - Compostos identificados por CG-EM das amostras extraídas por HS-SPME (PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA), óleo essencial (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) da espécie <i>Laurencia filiformis</i>	79
Tabela 9 - Deslocamentos químicos de ^{13}C das moléculas LfAc1 e LfAc2 (em CDCl_3 , 500 MHz) e valores da literatura	84
Tabela 10 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H de (-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol e (-)-silfiperfolan-7 β -ol em CDCl_3 a 500 MHz	86
Tabela 11 - Dados de RMN de HMBC (^1H - ^{13}C) de (-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol e (-)-silfiperfolan-7 β -ol em CDCl_3 a 500 MHz	86
Tabela 12 - Compostos identificados por CG-EM das amostras extraídas por HS-SPME (PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA), óleo essencial (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) da espécie <i>Laurencia intricata</i>	89
Tabela 13 - Compostos identificados por CG-EM das amostras extraídas por HS-SPME (PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA), óleo essencial (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) da espécie <i>Plocamium brasiliense</i>	94
Tabela 14 - Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos PbF1 a PbF4 (400 ou 500 MHz, δ em ppm relativos ao CDCl_3).....	99
Tabela 15 - Compostos identificados por CG-EM das amostras extraídas por HS-SPME (PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA), óleo essencial (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) da espécie <i>Ochtodes secundiramea</i>	114
Tabela 16 - Veículos possíveis para a realização dos testes de Concentração Inibitória Mínima	118
Tabela 17 - Valores encontrados/calculados de IC_{50} do potencial antioxidante dos óleos essenciais (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) pelo método do DPPH	120
Tabela 18 - Potenciais de inibição antioxidante encontrados ($\pm$ desvio padrão) para (-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol (LfAc1) e (-)-silfiperfolan-7 β -ol (LfAc2) isolados de <i>Laurencia filiformis</i> comparados com o potencial do óleo essencial (OE) pelo método do DPPH	121

Tabela 19 - Valores encontrados/calculados de IC ₅₀ do potencial antioxidante dos óleos essenciais (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) pelo método de quimioluminescência (H ₂ O ₂ /luminol/HRP)	123
Tabela 20 - Potenciais de inibição antioxidante encontrados (± desvio padrão) para (-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6β-ol (LfAc1) e (-)-silfiperfolan-7β-ol (LfAc2) isolados da alga <i>Laurencia filiformis</i> comparados com o potencial do óleo essencial (OE) pelo método de quimioluminescência (H ₂ O ₂ /luminol/HRP)	125
Tabela 21 - Composição de ácidos graxos de <i>Laurencia filiformis</i> (L.f.), <i>Laurencia intricata</i> (L.i.), <i>Plocamium brasiliense</i> (P.b.) e <i>Ochtodes secundiramea</i> (O.s.) (mg/g de peso seco, n=3)	128
Tabela 22 - Percentual de proteína (peso seco, n=3) nas espécies estudadas, ± desvio padrão	129
Tabela 23 - Composição de aminoácidos de <i>Laurencia filiformis</i> (L.f.), <i>Laurencia intricata</i> (L.i.), <i>Plocamium brasiliense</i> (P.b.) e <i>Ochtodes secundiramea</i> (O.s.) (% em peso seco, ± desvio padrão, n=3)	131

SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

min – minutos

COV – compostos orgânicos voláteis

OE – óleo essencial

W – watt

HS-SPME – microextração em fase sólida com *headspace*

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

IE – ionização eletrônica

CIM – Concentração Inibitória Mínima

ERO – espécies reativas de oxigênio

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilidrazila

HRP – *horseradish peroxidase*

RH – moléculas antioxidantes

seg – segundos

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

TMS – tetrametilsilano

HRMS – High Resolution Mass Spectrometry (Espectrometria de massas de alta resolução)

ED – extrato diclorometano

EM – extrato metanólico

EAc – extrato acetona/água

PDMS – polidimetilsiloxano

PDMS/DVB – polidimetilsiloxano/divinilbenzeno

CAR/PDMS – carboxen/polidimetilsiloxano

PA – poliacrilato

eV – elétron Volt

t_R – tempo de retenção

IK – índice de Kovat's

CCD – cromatografia em camada delgada

CCDP – cromatografia em camada delgada preparativa

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Intensificação da distorção por transferência de polarização)

COSY – Correlation Spectroscopy (Espectroscopia de correlação)

HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence (Correlação heteronuclear de quantum-simples)

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Coherence (Coerência heteronuclear através de múltiplas ligações)

ATCC – American Type Culture Collection

NCCLS – National Committee of Clinical Laboratory Standards

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

DMSO – dimetilsulfóxido

FAME – ésteres metílicos de ácidos graxos (fatty acid methyl esthers)

CG-FID – Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama

m/m – relação massa/massa

δ – deslocamento químico

CDCl_3 – clorofórmio deuterado

d – dubleto

s – singleto

m – multiplete

t – tripleto

q – quarteto

J – constante de acoplamento

$[\text{M}^+]$ - íon molecular

m/z – relação massa/carga

2D – bidimensional

IC_{50} – Concentração inibitória de 50%

AG – ácidos graxos

BSA - Albumina Sérica Bovina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	31
2. REVISÃO DA LITERATURA	33
2.1 Substâncias naturais de algas marinhas e suas aplicações farmacológicas..	33
2.2 Substâncias tóxicas de algas marinhas	34
2.3 Rhodophyta	35
2.4 Compostos voláteis de algas	36
2.5 Extração de compostos voláteis	43
2.5.1 Hidrodestilação	43
2.5.2 Hidrodestilação assistida por microondas	43
2.5.3 Extração por solvente	44
2.5.4 Extração por fluido supercrítico	44
2.5.5 Extração por <i>Headspace</i>	45
2.6 Identificação de compostos voláteis de algas por CG-EM	46
2.7 Atividade biológica e suas aplicações	46
2.7.1 Atividade antimicrobiana	47
2.7.2 Atividade antioxidante	47
2.7.2.1 Método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila)	48
2.7.2.2 Método de quimioluminescência	48
2.8 Justificativa	50
3. OBJETIVOS	51
4. MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 Materiais	53
4.1.1 Matéria-prima	53
4.1.2 Reagentes	54
4.1.3 Instrumentação	55
4.2 Métodos	56
4.2.1 Obtenção das algas e armazenamento	56
4.2.2 Métodos de extração	57
4.2.2.1 Hidrodestilação	57
4.2.2.2 Extração por solventes	57
4.2.2.2.1 Obtenção dos extratos diclorometano e metanólico	57

4.2.2.2.2 Extrato de <i>Plocamium brasiliense</i> para fins de isolamento	58
4.2.2.3 Extração de compostos voláteis por microextração em fase sólida por <i>headspace</i> (HS-SPME)	59
4.2.3 Análise qualitativa e quantitativa dos compostos voláteis por CG-EM ..	60
4.2.4 Isolamento de compostos majoritários de óleos essenciais e extratos .	61
4.2.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Preparativa (CCDP) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	61
4.2.4.2 Reagentes e métodos de identificação	61
4.2.4.3 Isolamento de LfAc1 e LfAc2 do óleo essencial de <i>Laurencia filiformis</i>	61
4.2.4.4 Isolamento de PbF1 a PbF4 do extrato acetona/água de <i>Plocamium brasiliense</i>	62
4.2.5 Determinação de estruturas químicas	62
4.2.6 Cálculos teóricos de deslocamento químico	63
4.2.7 Determinação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de óleos, extratos e substâncias isoladas pelo método da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	63
4.2.7.1 Microrganismos utilizados para o teste	63
4.2.7.2 Preparo do inóculo	64
4.2.7.3 Preparo dos antibióticos controles	64
4.2.7.4 Determinação da CIM	64
4.2.8 Avaliação da atividade antioxidante	65
4.2.8.1 Método do DPPH	65
4.2.8.2 Método de quimioluminescência	66
4.2.9 Determinação do teor de lipídeos totais em algas	66
4.2.10 Determinação de ácidos graxos em algas	67
4.2.11 Determinação do teor de proteínas solúveis em algas	68
4.2.12 Análise de aminoácidos com derivatização pós-coluna	68
4.2.12.1 Hidrólise ácida	68
4.2.12.2 Hidrólise alcalina	69
4.2.12.3 Análise de aminoácidos	69

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1 Extração dos compostos voláteis	71
5.1.1 Obtenção dos óleos essenciais (hidrodestilação)	71
5.1.2 Preparo dos extratos orgânicos	72
5.1.3 Extração por HS-SPME	72
5.1.3.1 Otimização do método de extração por HS-SPME	73
5.1.3.1.1 Seleção da quantidade de material liofilizado	73
5.1.3.1.2 Seleção do tempo de equilíbrio e de extração	74
5.1.3.1.3 Seleção da temperatura de extração	75
5.2 Avaliação da composição química volátil das espécies de estudo	77
5.2.1 <i>Laurencia filiformis</i>	77
5.2.1.1 Análise de extratos, óleo essencial e compostos extraídos por SPME por CG-EM	77
5.2.1.2 Isolamento de compostos majoritários do óleo essencial	82
5.2.1.3 Determinação estrutural de LfAc1 e LfAc2	83
5.2.2 <i>Laurencia intricata</i>	87
5.2.2.1 Análise de extratos, óleo essencial e compostos extraídos por HS-SPME por CG-EM	87
5.2.3 <i>Plocamium brasiliense</i>	92
5.2.3.1 Análise de extratos, óleo essencial e compostos extraídos por HS-SPME por CG-EM	92
5.2.3.2 Determinação estrutural de PbF1 a PbF4	97
5.2.4 <i>Ochtodes secundiramea</i>	111
5.2.4.1 Análise de extratos, óleo essencial e compostos extraídos por HS-SPME por CG-EM	111
5.3 Avaliação do potencial biológico	118
5.3.1 Determinação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de óleos, extratos e substâncias isoladas	118
5.3.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	118
5.3.1.1.1 Veículos de dissolução das amostras	118
5.3.1.1.2 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e extratos e substâncias isoladas	118
5.3.2 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> de óleos, extratos e	

substâncias isoladas	119
5.3.2.1 Método do DPPH	119
5.3.2.2 Método de quimioluminescência	122
5.4 Lipídeos totais	125
5.5 Ácidos graxos	126
5.6 Proteínas	129
5.7 Aminoácidos	130
6. CONCLUSÕES	133
7. RECOMENDAÇÕES	135
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
ANEXO A - Espectros de RMN de (-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol (LfAc1)	165
ANEXO B - Espectros de RMN de (-)-silfiperfolan-7 β -ol (LfAc2)	173
ANEXO C - Espectros de RMN de PbF1	181
ANEXO D - Espectros de RMN de PbF2	191
ANEXO E - Espectros de RMN de PbF3	197
ANEXO F - Espectros de RMN de PbF4	203
ANEXO G - Espectros de massas de alta resolução de PbF3 e PbF4	209
ANEXO H - Espectros de massas de alta resolução de PbF1	213
ANEXO I - Espectros de massas de alta resolução de PbF2	217
ANEXO J - Dados numéricos dos percentuais de atividade antioxidante pelo método do DPPH	221
ANEXO K - Dados numéricos dos percentuais de atividade antioxidante pelo método de quimioluminescência (H ₂ O ₂ /luminol/HRP)	225
ANEXO L - Review publicado “Useful strategies for algae volatile analysis”	229
ANEXO M - Artigo publicado “Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash in four Brazilian red algae species”	253
ANEXO N - Artigo publicado em colaboração “Antioxidant and antimicrobial properties of 2-(4,5-Dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-pyrimidine and 1- Carboxamidino-1H-pyrazole derivatives”	261
ANEXO O - Artigo publicado em colaboração “Ultrasound irradiation promoted large-scale preparation in aqueous media and antioxidant activity of azoles”	271

ANEXO P - Reportagem publicada no web site da Agência USP de Notícias (http://www.usp.br/agen/?p=25132) “FCF estuda potencial alimentar de algas do Sudeste do Brasil”	277
ANEXO Q - Reportagem publicada no Jornal Correio Braziliense de 29/06/2010 “Plantas multiuso”	281

1. INTRODUÇÃO

O oceano representa 70% da superfície terrestre e apresenta uma biodiversidade de aproximadamente 200.000 espécies marinhas, entre plantas, animais e microrganismos (Haefner, 2003; Pinto *et al.*, 2002). O litoral brasileiro alcança cerca de 7.400 km (IBGE, 2006) e, desta forma, abriga diversas espécies deste habitat.

Dentre os grupos de organismos presentes na costa litorânea e oceanos, as macroalgas marinhas constituem um grupo extremamente diversificado e representam parte considerável de sua biomassa e são classificadas em vermelhas (Rhodophyta), marrons (Phaeophyta) ou verdes (Chlorophyta), dependendo da sua composição nutricional e química (Dawczynski *et al.*, 2007). Como produtores primários, as algas desempenham um papel insubstituível nos ecossistemas aquáticos, pois constituem a base das cadeias alimentares (Santos *et al.*, 1999).

As macroalgas também são usadas em muitos países como fonte de alimento, fertilizantes e para aplicações industriais. A Ásia é o continente que mais utiliza estas plantas como alimento, principalmente algas vermelhas e marrons devido ao seu potencial nutritivo (considerando vitaminas, proteínas, fibras e ácidos graxos), e o seu cultivo tem se tornado uma importante atividade comercial. A utilização industrial baseia-se na extração de produtos químicos, principalmente ficocolóides como o ágar, carragenina e alginatos e, alguns estudos recentes mostram a utilização de algas marinhas como possível fonte de energia renovável. No entanto, as macroalgas também possuem potencial para serem usadas como fonte de produtos naturais para uso medicinal devido à sua diversidade de compostos químicos (Aguilera-Morales *et al.*, 2005; Aresta *et al.*, 2005; Cardozo *et al.*, 2007; Ortiz *et al.*, 2006).

Com relação às espécies bentônicas marinhas encontradas no Brasil, Oliveira Filho (1977) fez a primeira compilação de táxons, relacionando 327 Rhodophyta, 113 Chlorophyta e 64 Phaeophyta. Em 2008, Fujii *et al.* atualizaram a base de dados sobre a diversidade de algas no Brasil, relacionando 774 táxons, distribuídos em 482 Rhodophyta, 191 Chlorophyta e 101 Phaeophyta, sendo as mais estudadas aquelas encontradas nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo.

Mesmo sabendo-se das diversas aplicações que as algas apresentam, os investimentos da iniciativa privada e do governo brasileiro incentivam preferencialmente o turismo, a atividade pesqueira e a exploração racional da Mata Atlântica na costa brasileira, sendo escasso o estímulo do cultivo e exploração de algas. Em vista disso, o grupo de pesquisa orientado pelo Prof. Dr. Ernani Pinto, desde 2004, tem investido em estudos de espécies de algas brasileiras para uso potencial nas mais diversas áreas. Dentre estas espécies estão as algas vermelhas pertencentes aos gêneros *Laurencia*, *Plocamium* e *Ochtodes*.

Espécies do gênero *Laurencia* (Ceramiales, Rhodomelaceae) têm sido objeto de pesquisas intensas desde o início dos estudos de produtos naturais marinhos. Este gênero, que compreende mais de 130 *sensu lato* morfologicamente complexas, está amplamente distribuído em mares temperados-quentes e tropicais do mundo. O gênero *Laurencia* é uma fonte rica em metabólitos secundários halogenados ou não de estruturas diversas, como terpenos, C15-acetogeninas e compostos aromáticos, totalizando mais de quinhentos metabólitos secundários, muitos deles com atividade biológica (Erickson, 1983 in Scheuer, 1983; Pereira e Teixeira, 1999; Rashid *et al.*, 1995).

O gênero *Plocamium* (Gigartinales, Plocamiaceae) abrange mais de 40 espécies as quais estão distribuídas desde oceanos de áreas tropicais e subtropicais a habitats polares como da Antártida (Saunders e Lehmkuhl, 2005). Investigações químicas mostraram que estas algas produzem, tipicamente, monoterpenos halogenados cíclicos e acíclicos (Stierle e Sims, 1979; Stierle *et al.*, 1979) com atividade antimicrobiana, antiincrustante, citotóxica, inseticida, acaricida, antiplasmódica, antioxidante, entre outras (Afolayan *et al.*, 2009; Huang e Wang, 2004; Kladi *et al.*, 2004).

O gênero *Ochtodes* (Cryptonemiales, Rhizophyllidaceae) é conhecido por sintetizar monoterpenos halogenados cíclicos e acíclicos com função de defesa contra herbívoros (Paul *et al.*, 1980). Poucas referências deste gênero são encontradas na literatura e apenas informações das espécies *O. secundiramea* e *O. crockeri* são apresentadas (Barahona e Rorrer, 2003; Gerwick, 1984; Maliakal e Cheney, 2001; Masaki *et al.*, 1982; McConnell e Fenical, 1978; Paul *et al.*, 1980; Paul *et al.*, 1987; Polzin e Rorrer, 2003; Wise *et al.*, 2002; Zegarski e Howard, 1985).

2. REVISÃO DA LITERATURA

Todos os organismos precisam transformar e interconverter um número grande de compostos orgânicos para possibilitar a vida, crescimento e reprodução, e estas inúmeras reações constituem o metabolismo. A síntese de compostos essenciais para a sobrevivência das espécies vegetais, tais como: carboidratos, proteínas, ácidos graxos, ácidos nucleicos e seus polímeros derivados, fazem parte do metabolismo primário das plantas. Já compostos sintetizados por outras vias, e que aparentam não ter grande utilidade na sobrevivência das espécies, fazem parte do metabolismo secundário, sendo, portanto, denominados de compostos secundários. Os metabólitos secundários são caracterizados por não serem vitais para as plantas e, na maioria das vezes, são produzidos em pequenas quantidades.

A classificação dos compostos em primários e secundários depende muito da importância do determinado composto para uma determinada espécie. Enquanto que os compostos primários são comumente encontrados em todos os organismos, alguns compostos do metabolismo secundário são encontrados apenas em organismos específicos ou grupos de organismos expressando, desta forma, a individualidade das espécies (Dewick, 2002).

2.1 Substâncias naturais de algas marinhas e suas aplicações farmacológicas

A produção de compostos químicos das algas está extremamente relacionada à fisiologia das espécies. A maioria das algas são organismos bentônicos e, desta forma, precisam se aclimatar ao estresse abiótico (umidade, composição mineral, temperatura, água do mar, pressão, entre outros fatores) durante o seu ciclo de vida (Kajiwara *et al.*, 1989 e 1997). Em vista da presença abundante de halogênios e ânions sulfato no ambiente marinho, os organismos desenvolvem mecanismos para utilizar os solutos disponíveis e, por consequência, acabam por biossintetizar substâncias halogenadas e sulfatadas (Carvalho e Roque, 2000).

Os organismos marinhos são ricos em metabólitos secundários com grande diversidade estrutural. As macroalgas são ricas em ácidos graxos poliinsaturados, esteróides, terpenos (mono e sesquiterpenos), carotenóides, polissacarídeos sulfatados, hidroquinonas sesquiterpênicas, micosporinas, acetogeninas, derivados de aminoácidos, fenóis simples, polifenóis, entre outras (Carvalho e Roque, 2000;

Britton e Liaaen-Jensen, 1995; Hoyer *et al.*, 2001; Schaeffer e Krylov, 2000; Shick e Dunlap, 2002; Sinha *et al.*, 2000; Stein e Borden, 1984; Tringali, 1997; Talyshinsky *et al.*, 2002; Xiong *et al.*, 1999). Alguns destes compostos estão representados na Figura 1. Estas estruturas possuem diferentes atividades biológicas, dentre as quais se destacam atividades antineoplásica (Kobayashi, 1989), anticancerígena (Kobayashi, 1989; Lieberman *et al.*, 2001; Luesch *et al.*, 2001; Nogle *et al.*, 2001), antimicrobiana (Bennamara *et al.*, 1999; Findlay e Patil, 1984; König *et al.*, 1999a; Murakami *et al.*, 1991; Ploutno e Carmeli, 2000), antiinflamatória (Guzmán *et al.*, 2001 e 2003; Prinsep *et al.*, 1996), antioxidante (Dunlap e Yamamoto, 1995; Guzmán *et al.*, 2001), anti-HIV (Loya *et al.*, 1998; Schaeffer e Krylov, 2000), proteção contra radiação UV (Shick e Dunlap, 2002) e algicida (König *et al.*, 1999b; Carvalho e Roque, 2000).

Figura 1 - Substâncias naturais de algas marinhas (a) Micosporina-serinol; (b) Bromofenol-lanosol; (c) Polifenol-vidalol A; (d) Monoterpeno halogenado-violaceno; (e) Sesquiterpeno halogenado-caespitol; (f) Polissacarídeo-agar; (g) Polissacarídeo- κ -carragenina (h) Carotenóide β -caroteno.

2.2 Substâncias tóxicas de algas marinhas

A literatura traz poucos relatos de substâncias tóxicas presentes em algas marinhas. Sato *et al.* (1996) investigou a presença do ácido domóico, ácido caínico e o ácido *N*-metil-D-aspartico em 46 espécies de algas marinhas e verificou que a presença destas substâncias constava em apenas algumas espécies de algas

vermelhas do Japão. Segundo alguns autores, estas substâncias são neurotóxicas, pois ativam os receptores glutamaérgicos no cérebro, regulando a excitabilidade neural e transmissão sináptica (Bianchin *et al.*, 2000; Kalda *et al.*, 2000; Rozas e Freitas, 2008) e, em altas concentrações, são responsáveis por um número de fatalidades (Doucette *et al.*, 2000).

2.3 Rhodophyta

As espécies de algas vermelhas são amplamente distribuídas pelo mundo, ocupando diferentes habitats (Santelices e Doty, 1989). O filo Rhodophyta abrange cerca de 5000 a 6000 espécies (Graham e Wilcox, 2000) em aproximadamente 670 gêneros marinhos (Ragan e Guttel, 1995).

Nas algas vermelhas marinhas, os halogênios cloro, bromo e iodo apresentam uma importante função nos processos bioquímicos destas espécies (Talyshinsky *et al.*, 2002). Estudos mostraram a habilidade de várias espécies em biossintetizar compostos orgânicos halogenados, variando de cetonas de baixo peso molecular e compostos aromáticos, a terpenos com estruturas exóticas e de alto peso molecular (Ragan e Guttel, 1995). Fenóis e oligofenóis também são citados em algumas revisões (Accorinti, 1988; Erickson, 1983 in Scheuer, 1983). Os fenóis bromados englobam desde fenóis simples (C_6) a polímeros complexos. Sobre os primeiros existe farta bibliografia (Gribble, 1996 in Herz, 1996; Higa, 1981 in Scheuer, 1981), além de haver registros de atividade biológica. Os oligofenóis também são citados na literatura e alguns apresentam atividade biológica (Carvalho e Roque, 2000).

Devido ao fato do ambiente marinho ser rico em sulfato, os seus organismos apresentam uma vasta diversidade de substâncias sulfatadas. No filo Rhodophyta, os metabólitos primários sulfatados mais importantes e frequentes são os polissacarídeos sulfatados. Esses polímeros formam as famílias de galactanos, como o ágar e a carragenina, e apresentam atividades farmacológicas. Metabólitos secundários sulfatados de algas que pertencem a outras classes químicas, como glicerídeos, ribosídeos, lipídeos esteróides e fenóis, também são conhecidos (Carvalho e Roque, 2000). Na Figura 2 estão representadas algumas das substâncias presentes nas algas vermelhas e suas atividades biológicas.

Isolaurinesol
Laurencia obtusa
citotóxica
(Kladi *et al.*, 2006)

Palitina
Grateloupia doryphora
fotoprotetora
(Huovinen *et al.*, 2004)

Plocamium cartilagenium
antifúngico
(Stierle e Sim, 1979)

Lanosol
Polysiphonia brodiaei
antibiótica, antiinflamatória e
algicida
(Carvalho e Roque, 2000)

Ochtodene
Ochtodes secundiramea
antimicrobiana
(McConnell e Fenical, 1978)

Vidalol B
Vidalia obtusilola
antiinflamatória
(Weimer *et al.*, 1991)

Digenea simplex
neurotóxica
(Sato *et al.*, 1996)

Bonnemaisionia asparagoides
antimicrobiana
(McConnell e Fenical, 1977)

X ₁	X ₂	X ₃
H	Cl	Br
Cl	Cl	Br
Br	Br	Cl
Cl	Br	Br
Br	Br	Br

Ácido caínico R= -C(-CH₃)=CH₂

Ácido domóico R= -C(-CH₃)=CH-CH=CH-CH(-CH₃)-COOH

Figura 2 - Substâncias naturais identificadas em algas vermelhas e suas aplicações farmacológicas e toxicológicas.

2.4 Compostos voláteis de algas

Compostos orgânicos voláteis (COV) são moléculas pequenas de baixa a moderada hidrofiliicidade (Fink, 2007) e de alta pressão de vapor, e podem atravessar facilmente as membranas celulares para serem liberados para a atmosfera (Dudavera *et al.*, 2006). Estes compostos são usados pelas plantas para sua comunicação e interação com o meio ambiente que as cercam, como sistema de defesa ou para reprodução (Dudavera *et al.*, 2006; Kamenarska *et al.*, 2006; Wiesemeier *et al.*, 2007). Também é sabido que alguns grupos de compostos

identificados em espécies de algas exercem importante função no relacionamento entre plantas superiores e insetos (Kamenarska *et al.*, 2006).

Os COV de algas marinhas vêm sendo estudados por um longo período devido às suas habilidades de produzirem uma ampla faixa de compostos secundários que são de interesse para drogas terapêuticas (Karabay-Yavasoglu *et al.*, 2007). Hidrocarbonetos, terpenos, ácidos graxos, ésteres, álcoois, aldeídos, cetonas, polifenóis, compostos halogenados e sulfatados estão distribuídos entre as algas marinhas (Carvalho e Roque, 2000; Hattab *et al.*, 2007; Kajiwara *et al.*, 1989; Kamenarska *et al.*, 2006; Karabay-Yavasoglu *et al.*, 2007; Kawasaki *et al.*, 1998; Kladi *et al.*, 2004; Ozdemir *et al.*, 2006). A Tabela 1 traz uma revisão dos compostos voláteis não-halogenados e não-sulfatados já encontrados em algas marinhas.

Tabela 1 - Compostos voláteis não halogenados e não sulfurados encontrados em macroalgas.

Metabólitos	Referências
Hidrocarbonetos	
Heptano	[1] [2]
Octano	[1] [2] [3]
Undecano	[1] [2] [4]
Dodecano	[4]
Tridecano	[1] [2] [4] [5] [6]
Tetradecano	[1] [4] [5] [6] [7]
Pentadecano	[1] [2] [3] [4] [5] [6] [8]
Hexadecano	[1] [2] [4] [5] [6]
Heptadecano	[1] [2] [4] [5] [6] [8] [9]
Octadecano	[1] [2] [4] [5] [6] [10]
Nonadecano	[1] [2] [4] [5] [6] [10]
Eicosano	[1] [2] [4] [6] [10]
Heneicosano	[1] [2] [4]
Docosano	[1] [2] [4] [10]
Tricosano	[4] [9] [10]
Tetracosano	[1] [2] [4] [10]
Pentacosano	[1] [2] [4]
Hexacosano	[1] [2] [4]
Heptacosano	[4]
Octacosano	[1] [2] [4] [10]
Nonacosano	[1] [2] [4]
Triacotano	[1] [2] [4]
Hentriacotano	[4]
Dotriacotano	[4] [10]
Tritriacotano	[1] [2] [4]
Tetratriacotano	[1] [2]
Pentatriacotano	[1] [2]
Hexatriacotano	[10]
3-etil-3-metilheptano	[1]
2,6,10,14-tetrametilpentadecano	[4]
2,6,10,14-tetrametilhexadecano	[4]
Oct-1-eno	[1] [2]
Dodeceno*	[4]
Tetradeceno*	[4]
Hexadec-1-eno	[4]

Continua

Tabela 1 - Continuação

Metabólitos	Referências
(Z)-heptadec-7-eno	[4] [7]
Octadec-1-eno	[4]
Octadec-5-eno	[8]
Nonadec-5-eno	[4]
2,4-dimetilhept-1-eno	[1] [2]
3E,5Z-octa-1,3,5-trieno	[11]
Undeca-2,4,6-trieno	[8]
Undeca1,3,5-trieno	[8] [12]
(3E,5Z)-undeca-1,3,5-trieno	[13]
(3E,5E)-undeca-1,3,5-trieno	[13]
(2E,4E,6E)-undeca-2,4,6-trieno	[13]
(3E,5Z,8Z)-undeca-1,3,5,8-trieno	[13] [14]
(3E,5E,8Z)-undeca-1,3,5,8-trieno	[12] [13]
(1S,2S,Z)-1-(hex-1-enil)-2-vinilciclopropano	[14]
(E)-5-etilideno-2-metilciclopenta-1,3-dieno	[11]
(Z)-3-(hex-1-enil)ciclopent-1-eno	[8]
Heptadecilciclohexano	[1]
Trimetilciclopenta-1,3-dieno	[11]
Biciclo[2,2,1]heptadieno	[2]
6-butilciclohepta-1,4-dieno	[2]
Multifideno	[15]
Aucanteno	[15]
(R,2Z,6Z)-4-butilciclohepta-2,6-dienona	[16]
4-((E)-hex-1-enil)ciclopent-1-eno	[12]
4-((Z)-hex-1-enil)ciclopent-1-eno	[17]
6-((Z)-but-1-enil)ciclohepta-1,4-dieno	[12]
6-((E)-but-1-enil)ciclohepta-1,4-dieno	[8] [14]
(3S,4S)-3-butil-4-vinilciclopenteno	[8] [12] [17]
Dictioptereno A	[8] [12] [17]
Dictioptereno B	[12] [14]
Dictioptereno C'	[12] [17]
Dictioptereno D' ou Ectocarpeno	[12] [17]
C ₁₁ H ₁₆	[12] [14]
Alcoois	
Butan-1-ol	[11]
Pentan-1-ol	[3]
Pentan-2-ol	[4] [5]
Pent-3-en-2-ol	[5]
Hexan-1-ol	[3]
Octan-1-ol	[4]
Tridecan-1-ol	[1]
Tetradecan-1-ol	[1] [6]
Pentadecan-1-ol	[1] [5] [6]
Octadecan-1-ol	[1] [7]
Nonadecan-1-ol	[5]
2-propilpentan-1-ol	[4]
Butano-1,3-diol	[4]
Butano-2,3-diol	[4]
3-metil-butanol	[11]
2-metilbut-3-en-2-ol	[5]
2-etilhexan-1-ol	[7]
Pent-1-en-3-ol	[3] [11]
Pent-2-en-1-ol	[3]
2-pentenol	[5]
Hex-3-en-1-ol	[3]
(Z)-oct-3-en-1-ol	[3] [5]
(S,Z)-octa-1,5-dien-3-ol	[18]

Continua

Tabela 1 - Continuação

Metabólitos	Referências
Octadeca-9,12,15-trien-1-ol	[4]
Ciclopentanol	[3]
Fenilmetanol	[6]
6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno-2-carbaldeído	[19]
Dictiopterol ou Selinen-1 β -ol	[20] [21]
Fenóis	
Fenol	[4]
4-nonilfenol	[4]
2,4-di- <i>tert</i> -butilfenol	[1] [2]
Aldeídos	
Hexanal	[3] [4] [5] [11]
Heptanal	[11]
Octanal	[3] [11]
Nonanal	[11]
Decanal	[4]
Tridecanal	[5] [6] [7]
Tetradecanal	[6] [7]
Pentadecanal	[6] [7]
3-metilbutanal	[11]
2,2-dimetilpropanal	[11]
Butenal	[4]
Hex-2-enal	[3] [4]
(<i>E</i>)-hex-2-enal	[11]
(<i>Z</i>)-hex-2-enal	[5]
Heptenal	[4]
Hept-2-enal	[3] [8]
(<i>E</i>)-oct-2-enal	[7]
(<i>E</i>)-non-2-enal	[7]
(<i>Z</i>)-hexadec-7-enal	[6]
(<i>Z</i>)-heptadec-8-enal	[5] [6] [7]
Hepta-2,4-dienal	[4] [5]
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-octa-2,4-dienal	[6]
(2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i>)-nona-2,6-dienal	[6]
(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i>)-deca-2,4-dienal	[4] [6]
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-deca-2,4-dienal	[6]
(7 <i>Z</i> ,10 <i>Z</i>)-hexadeca-7,10-dienal	[6]
(8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i>)-heptadeca-8,11-dienal	[5] [6] [7]
(9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i>)-octadeca-9,12-dienal	[5]
(6 <i>Z</i> ,9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i>)-pentadeca-6,9,12-trienal	[7]
(7 <i>Z</i> ,10 <i>Z</i> ,13 <i>Z</i>)-hexadeca-6,9,12-trienal	[7]
(8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i>)-heptadeca-8,11,14-trienal	[5] [7]
(9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i> ,15 <i>Z</i>)-octadeca-9,12,15-trienal	[5]
Fenilacetaldeído	[4] [8]
Benzaldeído	[3] [4]
3,4-diidrobenzaldeído	[4]
2-tridecil-2-heptadecanal	[1]
Cetonas	
3-metilpentan-2-ona	[4]
Octan-3-ona	[3] [11]
Nonan-2-ona	[19]
Undecan-3-ona	[8] [12]
Dodecan-3-ona	[1]
Nonadecan-2-ona	[1]
Heptadecan-2-ona	[5]
Heptacosan-2-ona	[9]
Nonacosan-2-ona	[9]
Undeca-1,4-dien-3-ona	[8]

Continua

Tabela 1 - Continuação

Metabólitos	Referências
4-metoxi-4-metil-2-pentenona	[4]
6-metilhepta-3,5-dien-2-ona	[4]
2,3-butanodiona ou biacetil	[5]
Pentano-2,3-diona	[11]
Pent-1-en-3-ona	[3]
Undec-1-en-3-ona	[8]
6-metil-1,5-hepten-2-ona	[3]
6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona	[5] [6] [7]
4-hidroxipentan-2-ona	[4]
4-hidroxi-4-metilpentan-2-ona	[4]
2,6-bis-(1,1-dimetil)-2,5-ciclohexadieno-1,4-diona	[4]
4-(2,6,6-trimetil-2-ciclohexeno-1-il)-3-buten-2-ona	[4]
Geranilacetona ou 6,10-dimetilundeca-5,9-dien-2-ona	[5]
(+)-6-butilciclohepta-2,4-dienona	[16]
Dictioproleno ou Selinen-1-ona	[8] [12] [14] [20]
Ácidos	
Ácido propiônico	[4]
Ácido butírico	[4]
Ácido pentanóico	[4]
Ácido hexanóico	[4] [5]
Ácido octanóico	[4]
Ácido nonanóico	[4] [6]
Ácido decanóico	[4] [6]
Ácido dodecanóico	[4] [8]
Ácido tetradecanóico	[4] [5] [8]
Ácido pentadecanóico	[4] [6]
Ácido hexadecanóico	[4] [5] [8] [9]
Ácido octadecanóico	[4]
Ácido 2-metilbutanóico	[4]
Ácido 3-metilbutanóico	[4]
Ácido 4-metilpentanóico	[4]
Ácido octadec-9-enóico	[8]
Ácido palmítico	[6] [7]
Ácido oléico	[6]
Ácido pirúvico ou ácido 2-oxopropanóico	[4]
Ácido benzóico	[4]
Ácido 2-hidroxi-2-fenilacético	[4]
Ésteres	
Metil-3-oxopentanoato	[4]
Metil-9-oxopentanoato	[4]
Metil-3-hidroxidecanoato	[4]
Metil decanoato	[4]
Metil dodecanoato	[4]
Metil tridecanoato	[4]
Metil tetradecanoato	[4]
Metil 12-metiltridecanoato	[4]
Isopropil miristato ou isopropil tetradecanoato	[4]
Metil 2-metiltetradecanoato	[4]
Metil pentadecanoato*	[4]
Metil hexadecanoato ou metil palmitato	[1] [4] [5]
Metil hexadecadienoato*	[4]
Metil 14-metilpentadecanoato	[4]
Metil 14-metilhexadecanoato	[4]
Metil heptadecanoato	[4]
Metil octadecatrienoato	[4]
Metil octadecadienoato	[4]
Metil octadecanoato	[1] [4]

Continua

Tabela 1 - Continuação

Metabólitos	Referências
Metil octadecenoato*	[4]
Metil linoleato	[5]
Metil eicosatrienoato	[4]
Metil eicosatetraenoato	[4]
Metil eicosapentaenoato	[4]
Metil hexacosanoato	[9]
Metil fenilacetato	[4]
Etil acetato	[3]
Etil tetradecanoato	[4]
Etil pentadecanoato	[4] [8]
Etil hexadecenoato	[4] [8]
Etil octadecadienoato	[4]
Etil octadecenoato*	[4]
Etil 15-metilheptadecanoato	[4]
Etil icosatetraenoato	[4]
Etil icosapentaenoato	[4]
Dimetil glutarato	[4]
Dimetil heptanodioato	[4]
Dimetil octanodioato	[4]
Dimetil nonanodioato	[4]
sec-butil acetato	[4]
Butil metacrilato	[4]
Benzilbenzoato	[4]
Eicosa-5,8,11,14-metiltetradecanoato	[8]
Eicosa-5,8,11,14,17-metilpentadecanoato	[8]
9,12,15-metiloctadecatrienoato	[8]
9,12-metiloctadecadienoato	[8]
Terpenos	
Albicanol	[8]
α -amorfenol	[8]
Aromandreno	[8]
Axenol	[8]
Azuleno	[8]
β -bourboneno	[8]
Cadaleno	[22]
γ -cadineno	[22]
δ -cadineno	[5] [8]
α -cadinol	[6] [7]
δ -cadinol	[5] [22]
α -calacoreno	[8]
α -copaeno	[8]
(-)-copaeno	[22]
α -cubebeno	[8]
β -cubebeno	[8]
1,10-di- <i>epi</i> -cubebol	[8]
Cubenol	[6] [7] [14]
<i>epi</i> -cubenol	[5]
β -elemeno	[14] [22]
Diidroactinidiolida	[4] [6] [7] [19]
Eucaliptol	[4]
(<i>E</i>)-farneseno	[2]
Germacreno D	[8] [14]
Hexaidrofarnesilacetona	[4] [19]
Isofitol	[4] [5]
α -ionona	[6] [7]
β -ionona	[4] [5] [6] [7]

Continua

Tabela 1 - Continuação

Metabólitos	Referências
Limoneno	[6] [7]
Fitol	[4] [6] [5] [7] [8] [9]
Sativeno	[8]
Esqualeno	[4] [9]
α -terpineol	[6] [7]
Zonareno	[8] [21]
Compostos nitrogenados	
Palmitamida	[5]
Estearamida	[5]
Heptadecan-1-amida	[1] [2]
2-etil-1,6-diidro-1-metilpiridina	[4]
4-metilpiridina	[5]
1-pirrolina ou 3,4 diidro-2 <i>H</i> -pirrol	[5]
Nicotina	[5]
<i>N</i> -etil- <i>N</i> -propilformamida	[4]
Outros	
(<i>S</i>)-3-acetoxi-1,5-undecadieno	[7]
3-aliciclobutano ou aliciclobutano	[2]
<i>epi</i> -biciclosesquifelandreno	[8]
2,3-dimetil-2-nonen-4-olida	[7]
Ergost-7-en-2-ol	[9]
1,2,3,4,4a,7-hexaidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)naftaleno	[8]
4,4a,5,6,7,8-hexaidro-5-metil-8-(1-metiletil)-2(3 <i>H</i>)naftalenona	[8]
1-(1,3,4,5,6,7-hexaidro-4-hidroxi-3,8-dimetil-5-azulenil)etanona	[23]
γ -muuroleno	[5]
Neodictioproleno	[21]
Fenantreno	[4]
Stigmas-7,22-dien-3-ol	[9]
Stigmas-7-en-3-ol	[9]
α -tocoferol	[9]
γ -tocoferol	[9]
α -tocoferolquinol	[9]
3,5,5-trimetilfuran-2(5 <i>H</i>)-ona	[4]
1,2,4-trimetilbenzeno	[11]
5,6,7,7a-trimetil-2-(4 <i>H</i>)benzofuranona	[8]
Vulgarol B	[8]
<i>p</i> -xileno	[3]

* mais de um isômero. [1] Karabay-Yavasoglu *et al.*, 2007; [2] Ozdemir *et al.*, 2006; [3] Beauchêne *et al.*, 2000; [4] Kamenarska *et al.*, 2006; [5] Kawasaki *et al.*, 1998; [6] Kajiwara *et al.*, 1990; [7] Fujimura *et al.*, 1990; [8] Hattab *et al.*, 2007; [9] Püttmann, 1991; [10] Crespo e Yusty, 2004; [11] Pape *et al.*, 2004; [12] Boland e Müller, 1987; [13] Moore *et al.*, 1974; [14] Kajiwara *et al.*, 1989; [15] Jaenicke *et al.*, 1974; [16] Moore e Yost, 1973; [17] Kajiwara *et al.*, 1997; [18] Woolard *et al.*, 1975; [19] Elenkov *et al.*, 1995; [20] Irie *et al.*, 1964; [21] Fenical e Sims, 1972; [22] Yamada *et al.*, 1986; [23] Saleh *et al.*, 1984.

Ainda, Pohnert *et al.* (2002) descreveu doze feromônios encontrados em 61 espécies de algas marrons: ectocatpeno, desmaresteno, dictioteno, lamoxireno, cistoforeno, fucoserrateno, pre-ectocarpeno, hormosireno, multifideno, viridieno, caudoxireno e finavarreno, e Dembitsky e Srebnik (2002) reportaram a separação e identificação de aproximadamente 200 COV da espécie *Corallina elongata*.

Assim como os demais compostos biossintetizados por algas, a produção de compostos voláteis também é influenciada pelo ambiente marinho em que elas habitam. Desta forma, diferentes condições abióticas de crescimento de uma mesma

espécie proporcionam diferentes composições e propriedades dos compostos voláteis (Kajiwara *et al.*, 1989).

2.5 Extração de compostos voláteis

Há diversas técnicas para extração de COV, sendo hidrodestilação, hidrodestilação assistida por microondas, extração por solvente, extração por fluido supercrítico e extração por *headspace* as mais comumente utilizadas.

2.5.1 Hidrodestilação

Hidrodestilação, utilizando os sistemas de Clevenger e Dean-Stark, é o método mais empregado para extrair COV. Este método utiliza água aquecida para promover a volatilização dos COV e é normalmente realizado num período de 4 horas (Golmakani e Rezaei, 2008; Marongiu *et al.*, 2007; Ozdemir *et al.*, 2006). Além de não ser um método de extração sofisticado, a hidrodestilação apresenta algumas desvantagens, tais como considerável consumo de tempo, perda de compostos voláteis e baixa eficiência de extração (Golmakani e Rezaei, 2008).

O processo de hidrodestilação resulta na extração do óleo essencial (OE), que também é chamado de óleo volátil (Burt, 2004). Estes óleos são, em geral, misturas complexas de compostos orgânicos, a maioria volátil (90-95%), e são responsáveis pelas características odoríferas e flavorizantes do material vegetal.

2.5.2 Hidrodestilação assistida por microondas

A hidrodestilação assistida por microondas, primeiramente descrita por Ganzler *et al.*, (1986), tem recebido atenção na extração de óleos essenciais. Este método acopla o sistema de Clevenger (ou Dean-Stark) a um forno de microondas, e a energia de microondas proporciona a volatilização dos COV muito mais rapidamente que o método de hidrodestilação tradicional (Golmakani e Rezaei, 2008). Segundo Hattab *et al.*, (2007), as condições ótimas de extração são obtidas quando utilizada a potência de 180 W por um período de 10 min.

A utilização de microondas pode levar a um aumento do rendimento de extração em um menor período de tempo, resultando numa diminuição do custo de operação. Teoricamente, a composição dos COV é a mesma, entretanto, isto não tem sido totalmente comprovado, ou seja, pode haver a deterioração de compostos durante a exposição da radiação de microondas (Golmakani e Rezaei, 2008).

2.5.3 Extração por solvente

A extração por solventes é dividida em três categorias: sistema sólido-líquido, líquido-líquido e gás-líquido. No caso de extração de COV de materiais vegetais, o sistema sólido-líquido é o mais empregado. Este sistema é caracterizado pela dependência da desintegração da matriz sólida pelo contato intenso com o solvente escolhido (Savova *et al.*, 2005). As variáveis geralmente investigadas são: proporções solvente/amostra, tipo de solvente, tempo e temperatura de extração.

Há várias desvantagens quando a extração por solventes é aplicada para COV. Entre elas, a perda de compostos durante os vários passos da extração, a necessidade de etapas de concentração dos extratos, a deterioração da amostra levando à formação de artefatos e a poluição ambiental (Nongonierma *et al.*, 2006).

Vários solventes apolares e suas misturas podem ser utilizados na extração por solvente para COV, sendo os mais comuns o hexano, o éter etílico e o diclorometano (Crespo e Yusty, 2004; Dembitsky e Srebnik, 2002; Marongiu *et al.*, 2007; Ozdemir *et al.*, 2006). O sistema mais comumente utilizado é o soxhlet, operado por 4 horas. Entretanto, a extração à temperatura ambiente também tem sido bastante empregada (Marongiu *et al.*, 2007).

2.5.4 Extração por fluido supercrítico

Fluidos supercríticos são obtidos quando a substância é mantida acima da temperatura e pressão crítica. Comparado com solventes líquidos, fluidos em condições supercríticas apresentam maior difusibilidade e menor viscosidade, promovendo uma extração mais rápida e efetiva (Reid *et al.*, 1977). O fluido supercrítico mais utilizado é o CO₂, pois apresenta baixos pontos críticos de temperatura e pressão (P_c 71 atm, T_c 31 °C), alta volatilidade e difusibilidade, baixa viscosidade, não é tóxico, não é inflamável, é relativamente barato e é capaz de solubilizar analitos apolares e de média polaridade (Houck *et al.*, 1994; Rizvi *et al.*, 1986) como a maioria dos constituintes do óleo essencial (Marongiu *et al.*, 2007; Stahl e Gerard, 1985). Vários parâmetros podem interferir potencialmente no processo de extração. Dentre eles, tem-se o tipo de solvente, pressão, temperatura, tempo de extração e fluxo.

Este método apresenta várias vantagens: requer menos solvente, extração mais rápida e capacidade de extrair compostos termolábeis. A hidrólise e degradação térmica são praticamente ausentes e o extrato mantém as

características organolépticas do material de partida. Além disso, os possíveis resíduos não causam risco à saúde (Marongiu *et al.*, 2007).

2.5.5 Extração por *Headspace*

A extração por *headspace* é um método não destrutivo de extração de COV, dando um perfil mais realístico da composição volátil do material (Tholl *et al.*, 2006). Neste processo, os constituintes voláteis da amostra são primeiramente transferidos para a forma gasosa com posterior análise por cromatografia gasosa (Kolb, 1999). O método utiliza apenas uma pequena quantidade de massa de material para extração e não utiliza solventes. Além disso, é capaz de extrair compostos voláteis de menor abundância (Moshonas e Shaw, 1997; Tholl *et al.*, 2006). A técnica de amostragem por *headspace* pode ser dividida em estática, dinâmica e acoplada à microextração em fase sólida (HS-SPME).

No modo estático, a amostra é inserida num frasco o qual é hermeticamente selado e este frasco é inserido num forno de temperatura controlada. Neste sistema, os COV são capturados e, após o equilíbrio ser estabelecido, parte destes COV da atmosfera saturada é removida com o auxílio de uma seringa e injetada no CG para análise. Neste sistema, o manuseio da amostra é mínimo, mas a ausência de uma fase de concentração faz com que a sensibilidade seja baixa (Mestres *et al.*, 2000), além de ser um método apenas aplicável para fins analíticos (Vitenberg, 2003).

O modo dinâmico é o mais utilizado para extração por *headspace*, uma vez que este pode ser utilizado em escala de laboratório e industrial, mas também exige instrumentos mais complexos e padronização de vários parâmetros para se obter uma alta reprodutibilidade no processo de extração (Bicchi *et al.*, 2008). Este método utiliza um fluxo contínuo de um gás inerte (geralmente He) através da amostra. Os COV são capturados num adsorvente, que pode ser de vários materiais, concentrando-os. Após este processo, uma etapa de dessorção, geralmente térmica, é necessária (Tholl *et al.*, 2006).

Já o método de extração por *headspace* acoplado à microextração em fase sólida (HS-SPME) utiliza uma fibra de SPME, que pode ser de vários materiais e diâmetros, para adsorver e concentrar os COV. Este método integra extração e concentração num único passo, resultando num alto desempenho analítico e menor manipulação da amostra (Arthur e Pawliszyn, 1990; O'Reilly *et al.*, 2005). A extração é baseada na inserção da fibra de SPME no frasco selado contendo a amostra.

Após o processo de extração, a fibra é removida e inserida no injetor do CG. Os COV são termicamente desorvidos e introduzidos na coluna cromatográfica. A dessorção térmica elimina a necessidade de solventes, entretanto não é possível realizar injeções repetidas da amostra.

Polidimetilsiloxano (PDMS), divinilbenzeno (DVB), carboxen (CAR), poliacrilato (PA) com espessuras de 7 a 100 μm são as fibras mais utilizadas. A afinidade dos analitos com o adsorvente é de extrema importância para detectar compostos traços em diferentes amostras (Kolb, 1999).

2.6 Identificação de compostos voláteis de algas por CG-EM

A estratégia mais comum para a caracterização de compostos orgânicos voláteis é o acoplamento de uma técnica poderosa de separação, como a cromatografia gasosa, com um método sensível de detecção. Geralmente, a determinação se dá com o acoplamento de um cromatógrafo gasoso (CG) com um espectrômetro de massas com ionização eletrônica (IE-EM) (Barre *et al.*, 2004).

Em razão da variedade de funções químicas presentes na mistura de compostos voláteis em algas, o CG-EM precisa ser capaz de cobrir um largo espectro de constituintes, desde não polares a polares. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas é uma ferramenta amplamente utilizada para a identificação desta variedade de compostos, pois se mostra capaz de separar e identificar compostos halogenados e sulfatados (Chung *et al.*, 2003; Hattab *et al.*, 2007) e outras moléculas não-halogenadas e não-sulfatadas (Hattab *et al.*, 2007; Kamenarska *et al.*, 2006).

A análise dos compostos voláteis é realizada pela comparação dos espectros de massas obtidos com os das bibliotecas disponíveis (Wiley, NBS, NIST e Mass Finder), com os da literatura, além da comparação dos seus índices de Kovat's (tempos de retenção relativos a misturas de *n*-alcanos) e/ou por co-injeção de padrões comerciais (Boland e Müller, 1987; Pape *et al.*, 2004).

2.7 Atividade biológica e suas aplicações

A crescente busca por moléculas bioativas devido ao surgimento de novas doenças e constantes alterações das mesmas, devido às aplicações comerciais como filmes bioativos, inibidores de crescimento e de reprodução, entre outros, torna imprescindível o estudo de espécies, principalmente de origem vegetal. Para fins de

aplicação terapêutica, muitas substâncias naturais, óleos essenciais e extratos vegetais são avaliados quanto ao respectivo potencial biológico. Na literatura, ensaios antimicrobianos e antioxidantes são comumente encontrados e estas atividades já têm sido registradas para as espécies dos gêneros *Laurencia*, *Plocamium* e *Ochtodes* (Anggadiredja *et al.*, 1997; Bansemir *et al.*, 2004; Huang e Wang, 2004; König *et al.*, 1999a; McConnel e Fenical, 1978).

2.7.1 Atividade antimicrobiana

As bactérias e fungos são responsáveis por inúmeras infecções, como: oculares, de pele, genitais, urinárias, gastrointestinais, pulmonares, infecções pós-cirúrgicas, meningites, endocardites entre outras (Roitt e Williams, 1998; Koneman, 2001; Howard, 1994; Silva, 1999; Davis *et al.*, 1980) e as propriedades antimicrobianas de substâncias extraídas de plantas e algas vêm sendo demonstradas em experimentos científicos e em pesquisas realizadas em vários países. Extratos e substâncias isoladas de espécies de algas mostram diferentes potenciais no controle do crescimento de microrganismos. Laurinterol e isolaurinterol, isolados de *Laurencia okamurae*, se mostraram fortemente ativos contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Enterococcus faecalis* (Sims *et al.*, 1975; Vairappan *et al.*, 2004), já terpenos cíclicos isolados de *Plocamium cartilagineum* foram ativos frente à bactéria *Penicillium oxalicum* (König *et al.*, 1990).

A análise dos potenciais antimicrobianos pode ser realizada de diversas formas: por bioautografia, difusão em disco e microdiluição (Kamatou *et al.*, 2005; Reid *et al.*, 2005; Shai *et al.*, 2008; Oloyede, 2009), sendo a concentração inibitória mínima (CIM) a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo (bacteriostática ou fungistática) no teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo (NCCLS, M38-A).

2.7.2 Atividade antioxidante

Espécies reativas de oxigênio (ERO) e radicais livres estão envolvidos em várias doenças humanas (Gutteridge, 1993). ERO, incluindo ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil, são co-produtos de uma variedade de reações do metabolismo aeróbio. Eles são instáveis e reagem prontamente com uma grande variedade de substratos biológicos como lipídeos, DNA e proteínas,

resultando em danos celulares (Braugher *et al.*, 1986; Halliwell e Gutteridge, 1989; Roberfroid e Colderon, 1995). Desta forma, substâncias antioxidantes podem prevenir danos e morte de células.

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com seu modo de ação sendo sequestradores de radicais livres, agentes quelantes de íons metálicos envolvidos na catálise da oxidação lipídica ou sequestradores de oxigênio que reagem com oxigênio em sistemas fechados (Shahidi *et al.*, 1992). Diferentes métodos têm sido utilizados na avaliação da capacidade antioxidante de várias amostras puras e misturas. Dois métodos comumente utilizados são: método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) e quimioluminescência na presença da enzima HRP (*horseradish peroxidase*), também conhecido por H_2O_2 /luminol/HRP.

2.7.2.1 Método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila)

O ensaio antioxidante utilizando DPPH (radical livre estável) fundamenta-se na propriedade deste radical em extrair prótons de moléculas doadoras, reduzindo-se. O radical DPPH apresenta absorção máxima em 517 nm e, após reação com moléculas antioxidantes, esta absorção é diminuída, ou seja, é observada uma mudança na coloração, de um violeta intenso ao amarelo claro (Hostettmann *et al.*, 2003; Molineux, 2003). A reação química que ocorre está apresentada na Figura 3.

Figura 3 - Reação de redução do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) com uma molécula antioxidante doadora de hidrogênio (RH).

2.7.2.2 Método de quimioluminescência

Revisões recentes mostram que o método de quimioluminescência H_2O_2 /luminol/HRP é largamente utilizado como um ensaio sensível para um *screening* de atividade antioxidante (Yildiz e Demiryurek, 1998; Georgetti *et al.*, 2003; Krol *et al.*, 1990; Yasaei *et al.*, 1996; Yildiz *et al.*, 1998).

O método de quimioluminescência baseia-se na emissão de luz que surge de uma reação química (Harris, 2001). Neste caso, a oxidação quimioluminescente do luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinediona) envolve a formação de um complexo entre o oxidante (H_2O_2) e a enzima HRP oxidada, para a produção do radical luminol.

A enzima HRP nativa (+3) reage com H_2O_2 e, desta forma, cataliza a oxidação do luminol (LH^-) através do ciclo enzimático (Figura 4). A maioria do luminol (LH_2) existe na forma de LH^- em pH 7,5 a 8,0. O luminol reage com os intermediários da enzima HRP [complexos I (+5) e II (+4)] formando o radical luminol ($\text{L}^{\bullet-}$), o qual reage com oxigênio, formando um endoperóxido (LO^{2-}). Este endoperóxido se decompõe formando o diânion 3-aminofталato eletronicamente excitado (AP^{*2-}), que retorna ao estado fundamental, emitindo luz (Kamidate *et al.*, 1995). A enzima retorna à forma reduzida (+3) pela reação com uma segunda molécula de luminol (Dodeigene *et al.*, 2000).

Na presença de moléculas antioxidantes (RH), o radical luminol reage mais rapidamente com estas moléculas do que com o oxigênio, prevenindo a oxidação dos radicais luminol a 3-aminofталato e subsequente emissão de luz. Esta redução da emissão de luz pode ser considerada uma medida da atividade antioxidante.

Figura 4 - Reação de quimioluminescência do luminol catalisada pela enzima HRP e a interferência das moléculas antioxidantes sobre o sistema H_2O_2 /luminol/HRP.

2.8 Justificativa

Mundialmente, as algas ocupam uma posição de grande importância na pesquisa de novos compostos biologicamente ativos, pois estudos bioquímicos e farmacológicos com produtos naturais de algas têm revelado uma série de compostos com grande potencial de aplicação como medicamento ou cosmético.

O Brasil apresenta uma grande extensão litorânea e, apesar de apresentar uma atraente biodiversidade, as informações científicas relatando compostos voláteis e demais substâncias isoladas de algas marinhas, bem como a investigação da atividade biológica são escassas. Por isso a importância dos estudos com as algas brasileiras pela busca de novas moléculas com potencial biológico e terapêutico.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese de doutorado é a identificação e caracterização de substâncias do metabolismo primário e secundário de algas vermelhas (*Laurencia filiformis* (Mont) M. Howe; *Laurencia intricata* J. V. Lamouroux; *Plocamium brasiliense* (Grev.) M. Howe & W. R. Taylor; e *Ochtodes secundiramea* (Mont) M. Howe) coletadas no estado do Espírito Santo, além da avaliação da atividade biológica das espécies.

Os objetivos específicos deste trabalho consistem em:

- a) extrair compostos voláteis por diferentes métodos;
- b) desenvolver uma metodologia para a análise de compostos voláteis por HS-SPME;
- c) identificar e caracterizar compostos voláteis por CG-EM através da comparação de seus tempos de retenção e espectros de massas com aqueles apresentados na literatura e em bibliotecas;
- d) isolar componentes majoritários e/ou bioativos dos óleos essenciais ou dos extratos;
- e) caracterizar quimicamente os compostos isolados por RMN e EM;
- f) avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais, dos extratos e das substâncias isoladas; e
- g) verificar a composição de lipídeos totais, de ácidos graxos, de proteínas totais e de aminoácidos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Matéria-prima

Para classificação das algas foi utilizado o sistema de Wynne (2005) e uma exsicata do material está depositado no herbário do Instituto de Botânica de São Paulo.

Espécie: *Laurencia filiformis* (Mont) M. Howe

Coleta e identificação: M. T. Fujii & E. Stein

Número de depósito: SP 400.198

Classificação: Filo: Rhodophyta
Subfilo: Eurhodophytina
Classe: Florideophyceae
Subclasse: Rhodymeniophycidae
Ordem: Ceramiales
Família: Rhodomelaceae
Gênero: *Laurencia*

Espécie: *Laurencia intricata* J. V. Lamouroux

Coleta e identificação: M. T. Fujii & E. Stein

Número de depósito: SP 400.206

Classificação: Filo: Rhodophyta
Subfilo: Eurhodophytina
Classe: Florideophyceae
Subclasse: Rhodymeniophycidae
Ordem: Ceramiales
Família: Rhodomelaceae
Gênero: *Laurencia*

Espécie: *Plocamium brasiliense* (Grev.) M. Howe & W. R. Taylor

Coleta e identificação: M. T. Fujii & E. Stein

Número de depósito: SP 399.944

Classificação: Filo: Rhodophyta
 Subfilo: Eurhodophytina
 Classe: Florideophyceae
 Subclasse: Rhodymeniophycidae
 Ordem: Plocamiales
 Família: Plocamiaceae
 Gênero: *Plocamium*

Espécie: *Ochtodes secundiramea* (Mont) M. Howe

Coleta e identificação: M. T. Fujii & E. Stein

Número de depósito: SP 400.897

Classificação: Filo: Rhodophyta
 Subfilo: Eurhodophytina
 Classe: Florideophyceae
 Subclasse: Rhodymeniophycidae
 Ordem: Gigartinales
 Família: Rhizophyllidaceae
 Gênero: *Ochtodes*

Outros materiais eventualmente utilizados em experimentos estão apresentados na tabela a seguir (Tabela 2).

Tabela 2 - Algas eventualmente utilizadas em experimentos.

Espécie	Coleta	Nº exsicata
<i>Laurencia filiformis</i>	Julho/2008	SP 399.806
<i>Plocamium brasiliense</i>	Abril/2009	SP 400.200

4.1.2 Reagentes

Solventes grau analítico (Vetec Química Fina, Brasil) e água destilada/água Milli Q[®] (Millipore Corporation, EUA) foram utilizados nos processos de extração e fracionamento em cromatografia dos óleos essenciais e extratos. Para análises em CG-EM foi empregado gás He de alta pureza. Todos os reagentes necessários para os ensaios foram de alto grau de pureza.

4.1.3 Instrumentação

Para a eliminação de solventes orgânicos e água presentes nas amostras foram utilizados evaporador rotatório (R-215, Buchi, Suíça) e liofilizador (Liotop L101, Liobras Ind. Com. Serv. Liofilizadores Ltda., Brasil).

As extrações foram realizadas com o auxílio de ultrassom (USC700, Unique, Brasil) e Ultra-Turrax® T50 (IKA®, Alemanha).

CLAE analítico 9050 (Varian, Palo Alto, CA, USA) e CLAE preparativo (Waters, Corporation, Milford, MA, USA) foram utilizados para o isolamento de compostos de interesse.

As análises antioxidantes pelo método do DPPH, análises de proteínas e a análise da concentração bacteriana para os ensaios antimicrobianos foram realizadas em espectrofotômetro (Spectrum Power Wave_x 340, Bio-Tec Instruments, INC). Já para as análises antioxidantes pelo método H₂O₂/luminol/HRP foi utilizado leitor de luminescência em microplacas (Tecan-Infinite® M200, Tecan, EUA).

Para as análises de determinação química volátil das espécies algais foram utilizadas fibras de SPME (Supelco, Bellefonte, PA, EUA), suporte manual para fibras (Supelco, Bellefonte, PA, EUA), além do cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas tipo quadrupolo (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu, Japão). Já para as análises de ácidos graxos utilizou-se cromatógrafo a gás GC-17A (Class GC 10, Shimadzu, Japão) com detecção por ionização em chama (FID).

As análises de aminoácidos foram conduzidas em analisador automático de aminoácidos LC-3000 (Eppendorf-Bio-tronik, Alemanha).

Os aparelhos utilizados para a obtenção dos espectros de RMN ¹³C e ¹H foram o Espectrômetro DPX 400 (Bruker, Alemanha) e o Espectrômetro DPX 500 (Bruker, Alemanha). Estes operam a 400,13 MHz para ¹H e 100,62 MHz para ¹³C e 500,13 MHz para ¹H e 125,75 MHz para ¹³C, respectivamente. Os tubos de ressonância utilizados para as análises foram de 5 mm e o solvente utilizado foi o clorofórmio deuterado (CDCl₃). O tetrametilsilano (TMS) foi usado como referência interna.

As medidas de massas de alta resolução (HRMS) foram realizadas em Orbitrap LTQ XL™ (Thermo Scientific, EUA), no modo negativo, com ionização por *nanospray*.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção das algas e armazenamento

A seleção do material de estudo foi realizada de acordo com sua abundância devido à necessidade de uma biomassa relativamente grande para os experimentos. As algas foram coletadas manualmente na zona entre-marés, em profundidades de 20 cm a 1,20 m em vários locais da Praia de Ubú, Anchieta, ES (20°48'S-40°38'O) (Figura 5), independentemente do seu estágio reprodutivo. Após a coleta, as algas foram lavadas com água do mar, eliminando-se sedimentos e organismos estranhos. O material foi separado em três partes: uma parte foi armazenada a temperaturas inferiores a -20 °C (para análises de proteínas), outra parte foi liofilizada (para extrações por solventes, HS-SPME, análises de lipídeos, ácidos graxos e aminoácidos) e parte do material mantida fresca (para extração dos óleos essenciais). A Tabela 3 mostra a quantidade de material coletado e seu particionamento. Após a separação, o material foi armazenado em sacos plásticos tipo *zip* e o material destinado ao congelamento e liofilização foram levados imediatamente ao freezer. Para o transporte do material, utilizaram-se caixas de isopor contendo barras de gelo.

Figura 5 - Localidade de realização das coletas (Praia de Ubú, Anchieta-ES, 20°48'S-40°38'O). Fontes: <http://www.relevobr.cnpm.embrapa.br/> (acessado em 21/10/2009), http://maps.google.com.br/maps?f=q&source=s_q&hl=pt-BR&geocode=&view=map&q=Praia+de+Ubu,+ES&sl=-20.807472,-39.199219&sspn=2.346547,4.938354&ie=UTF8&hq=Praia+de+Ubu,&hnear=Esp%C3%ADrito+Santo&ll=-19.83906,-40.78125&spn=4.721759,9.876709&t=h&z=7 (acessado em 23/10/2009) e <http://www.apolo11.com/latlon.php?uf=es&cityid=828> (acessado em 23/10/2009).

Tabela 3 - Fracionamento do material coletado em campo.

Espécie	Coleta	Material fresco (g)	Material congelado (g)	Material liofilizado (g)
<i>Laurencia filiformis</i>	Out/2006	500,0	106,1	38,2
	Jul/2008	378,7	-	35,5
<i>Laurencia intricata</i>	Jul/2008	420,0	311,9	27,3
<i>Plocamium brasiliense</i>	Out/2006	36,8	30,4	61,8
	Abr/2009	-	-	18,3
<i>Ochtodes secundiramea</i>	Out/2006	171,9	183,6	52,2

4.2.2 Métodos de extração

4.2.2.1 Hidrodestilação

As algas coletadas (frescas) foram submetidas à destilação por arraste a vapor em aparelho de Clevenger modificado por um período de 4 horas, conforme descrito pela Farmacopéia Britânica (British Pharmacopeia Commission, 2003). O óleo essencial foi retirado do aparelho com éter etílico, e a fase orgânica foi separada e seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e posteriormente seca com N_{2(g)}. Após o processo de secagem, o material foi conservado a 4 °C.

4.2.2.2 Extração por solventes

4.2.2.2.1 Obtenção dos extratos diclorometano e metanólico

Aproximadamente 5 g do material fresco coletado foi primeiramente triturado em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizado. O material seco foi submetido à extração primeiramente com diclorometano (50 mL) em banho de ultrassom durante 30 min e, posteriormente, com metanol (50 mL) também em banho de ultrassom por igual período. O processo de extração foi repetido por três vezes para cada solvente utilizado. Ao solvente retirado da extração, foi adicionado sulfato de sódio anidro, filtrado em papel filtro e em seguida removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Desta forma obtiveram-se os extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM). O processo de fracionamento do material vegetal está esquematizado na Figura 6.

Figura 6 - Fracionamento do material vegetal para análises de compostos voláteis e atividades biológicas.

4.2.2.2.2 Extrato de *Plocamium brasiliense* para fins de isolamento

Para aumentar o rendimento de extração dos compostos de interesse da espécie *P. brasiliense*, seguiu-se o seguinte método de obtenção dos extratos: o material fresco foi primeiramente triturado em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizado, obtendo-se 40,3 g de material seco. Ao material seco, uma mistura de acetona e água, numa proporção de 7:3, foi adicionada. Em seguida, efetuou-se a extração em Ultra-Turrax® por 5 min (repetida por 3 vezes). O extrato acetona/água (EAc) foi filtrado em funil de Büchner à vácuo e o solvente removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida. O fracionamento do material vegetal está esquematizado na Figura 7.

Figura 7 - Fracionamento do material vegetal de *Plocamium brasiliense* para fins de isolamento.

4.2.2.3 Extração de compostos voláteis por microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME)

Devido ao alto teor de água presente nas algas e para evitar a formação de gotas, a extração dos compostos voláteis por HS-SPME foi realizada utilizando-se material liofilizado. O material algal foi inserido em frascos de vidro com 10 mL de capacidade e posteriormente selado para evitar o escape dos compostos voláteis. Para fins de controle de temperatura do *headspace*, um frasco contendo a mesma quantidade de amostra foi selado juntamente com um termômetro (Figura 8). Após o tempo de equilíbrio da temperatura de extração, a fibra de SPME foi introduzida ao frasco para iniciar o processo de adsorção dos compostos voláteis.

Figura 8 - Extração dos compostos voláteis por HS-SPME.

Os parâmetros de SPME, incluindo tipo de fibra (Tabela 4), quantidade de amostra liofilizada (50, 100 e 200 mg), temperatura de extração (40, 60 e 80 °C),

tempo de equilíbrio (5, 15 e 25 min) e tempo de extração (5, 15 e 25 min) foram otimizados. Para a otimização de um dos parâmetros, os demais foram mantidos constantes. As condições finais de extração para os quatro tipos de fibras foram: 50 mg de material liofilizado, temperatura de 60 °C, 15 min de equilíbrio, 15 min de extração e tempo de dessorção de 10 min.

Tabela 4 - Tipos de fibras de SPME utilizadas e suas respectivas siglas e espessuras.

Fibra	Sigla	Espessura
Polidimetilsiloxano	PDMS	100 µm
Polidimetilsiloxano-Divinilbenzeno	PDMS/DVB	65 µm
Carboxen-Polidimetilsiloxano	CAR/PDMS	75 µm
Poliacrilato	PA	85 µm

Após a extração nas condições estabelecidas, os analitos adsorvidos na fibra foram dessorvidos termicamente pela sua exposição no injetor do CG-EM.

4.2.3 Análise qualitativa e quantitativa dos compostos voláteis por CG-EM

Para a análise dos COV, as seguintes condições cromatográficas foram utilizadas: coluna cromatográfica HP-5MS (5% fenil-metilpolisiloxano) 30 m x 250 µm x 0,10 µm; temperatura do injetor de 220 °C; programação da temperatura do forno de 60 °C a 260 °C (3 °C/min) e mantida a 260 °C por 40 min; temperatura de interface de 240 °C; temperatura do detector de 240 °C; volume de injeção de 0,1 µL; split de 1:10; gás de arraste He, a um fluxo constante de 1,0 mL/min. O modo de ionização utilizado foi ionização eletrônica (70 eV).

A identificação dos constituintes químicos foi baseada na comparação dos espectros de massas de compostos de referência das bibliotecas NIST 08, NIST 21 e NIST 107 (National Institute of Standards and Technology) disponível no equipamento e também por meio de comparação dos índices de retenção linear (índice de Kovat's) calculado em relação aos tempos de retenção (t_R) de uma série homóloga de *n*-alcanos (padrões Sigma-Aldrich) conforme equação abaixo.

$$IK = 100 \times NC + 100 \times \left(\frac{t_R(X) - t_R(P_z)}{t_R(P_{z+1}) - t_R(P_z)} \right)$$

Onde: NC é o número de carbonos do padrão hidrocarboneto anterior;

X é o tempo de retenção do componente em análise;

P_z é o tempo de retenção do hidrocarboneto anterior ao componente avaliado; P_{z+1} é o tempo de retenção do hidrocarboneto posterior ao componente avaliado.

A proporção de cada constituinte presente no óleo essencial foi realizada de modo semi-quantitativo. A análise constituiu-se na comparação da área relativa de cada pico em relação ao somatório das áreas relativas dos picos presentes no cromatograma.

4.2.4 Isolamento de compostos majoritários de óleos essenciais e extratos

4.2.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Preparativa (CCDP) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Foram empregadas cromatofolhas Al de sílica gel 60 F_{254} (Merck e Sorbent Technologies). Ainda utilizaram-se placas preparadas em laboratório com sílica gel F_{254} (Merck) sobre lâminas de vidro (2 x 7 cm).

Placas preparativas (CCDP), que consistiram de lâminas de vidro (20 x 20 cm) cobertas de sílica gel F_{254} (Merck), CLAE analítico e CLAE preparativo também foram utilizados.

4.2.4.2 Reagentes e métodos de identificação

Para a revelação das cromatoplas foram utilizados os seguintes métodos:

- irradiação com lâmpada de ultravioleta nos comprimentos de onda de $\lambda = 254$ nm e $\lambda = 365$ nm (Boitton, Tecnal, Brasil);
- borrifamento de ácido fosfomolibdico 7% em MeOH (Merck) seguido de aquecimento em chapa quente por alguns segundos;
- borrifamento de *p*-anisaldeído (0,5 mL *p*-anisaldeído, 10 mL ácido acético 99%, 85 mL MeOH, 5 mL H_2SO_4 98%, Merck) seguido de aquecimento em chapa quente por alguns segundos; e
- iodo (Merck).

4.2.4.3 Isolamento de LfAc1 e LfAc2 do óleo essencial de *Laurencia filiformis*

Os dois compostos majoritários presentes no óleo essencial de *L. filiformis* foram isolados por CCDP. Para isso, aplicou-se aproximadamente 10 mg do óleo

essencial (10 mg/mL em diclorometano) na base de três placas preparativas e as mesmas foram eluídas com hexano/acetato de etila (9:1) por duas vezes.

Após o término da eluição, as placas foram parcialmente reveladas com ácido fosfomolibdico (1 a 2 cm da lateral direita da placa) e as faixas correspondentes aos compostos de interesse (LfAc1 e LfAc2) foram retiradas da placa por raspagem da sílica. Os compostos foram posteriormente dessorvidos com o auxílio de solventes orgânicos. Por fim, as amostras foram secas em N_{2(g)} e verificadas quanto a sua pureza por CCD em vários sistemas de solvente e por CG-EM.

4.2.4.4 Isolamento de PbF1 a PbF4 do extrato acetona/água de *Plocamium brasiliense*

Os quatro picos majoritários presentes no extrato acetona/água de *P. brasiliense* foram isolados por CLAE preparativo. Aproximadamente 1 mL do extrato (10 mg/mL) foi injetado na coluna (C18, Hypersil ODS, 250 x 16 mm, 7 µm) com o seguinte sistema de eluição (acetonitrila/água): 70-80% de acetonitrila em 30 min; 80-100% de acetonitrila em 15 min; 100% acetonitrila por 5 min. O fluxo foi de 5 mL/min.

4.2.5 Determinação de estruturas químicas

Métodos específicos como Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C foram utilizadas para a determinação da estrutura química dos compostos isolados. Outras técnicas de RMN uni e bidimensionais com DEPT 135°, COSY (¹H-¹H), HSQC (¹H-¹³C de curta distância) e HMBC (¹H-¹³C de longa distância), e Espectrometria de Massas (EM) foram empregadas na identificação e caracterização estrutural dos metabólitos isolados.

Para a determinação do erro em relação à exatidão da massa (em espectros de HRMS) utilizou-se a fórmula abaixo (Balogh, 2004):

$$\text{Erro} = \frac{m_{\text{exp}} - m_{\text{calc}}}{m_{\text{calc}}} \times 10^6 \quad (\text{ppm})$$

Onde: m_{exp} é a massa molecular obtida experimentalmente;

m_{calc} é a massa molecular calculada pelo equipamento.

4.2.6 Cálculos teóricos de deslocamento químico

A obtenção dos deslocamentos químicos para os monoterpenos em questão foi realizada em colaboração com o Dr. Ricardo Vessecchi da FCFRP-USP.

Todas as moléculas tiveram suas geometrias otimizadas através do programa Gaussian 03 (Frisch *et al.*, 2003) por se aplicar o modelo B3LYP/6-31+G(d,p) (Becke, 1988 e 1993; Lee *et al.*, 1988; Ditchfield *et al.*, 1971). Para que se confirmasse que todas as geometrias correspondiam a um ponto de mínimo na superfície de energia potencial, as frequências harmônicas foram obtidas. A influencia do sistema solvente foi considerada por se aplicar o método PCM (Polarized Continuum Model) (Barone *et al.*, 1998). Os deslocamentos químicos para H¹ e C¹³ foram obtidos através do método GIAO (Ditchfield, 1974), empregando como referencia o TMS.

4.2.7 Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de óleos, extratos e substâncias isoladas pelo método da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da CIM pelo método de microdiluição, técnicas descritas pelo The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) foram empregadas (NCCLS, M38-A, 2002; NCCLS, M100-S15, 2005).

4.2.7.1 Microrganismos utilizados no teste

As cepas padrão de ATCC (American Type Culture Collection) utilizadas no teste foram selecionadas de acordo com as normas descritas pelo NCCLS. Dentre os microrganismos utilizados têm-se microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e uma espécie fúngica (Tabela 5).

Tabela 5 - Microrganismos utilizados nos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Características	Microrganismos	ATCC
Gram-positivo	<i>Staphylococcus aureus</i>	29213
	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619
Gram-negativo	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883
	<i>Salmonella thipy</i>	19430
	<i>Escherichia coli</i>	25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
Fungo	<i>Candida albicans</i>	10231

ATCC - American Type Culture Collection

4.2.7.2 Preparo do inóculo

Com o auxílio de uma alça de platina, uma alçada do concentrado celular liofilizado foi diluída em caldo Mueller Hinton II (Synth[®], Brasil) e mantida por aproximadamente 24 horas a 35 °C para o crescimento das bactérias, e em caldo Sabouraud dextrose (Synth[®], Brasil), por aproximadamente 48 horas a 35 °C, para o crescimento da espécie fúngica. A partir do caldo, as bactérias e fungos foram inoculados em placas de petri contendo 12-15 mL de meio (ágar nutriente para bactérias ou ágar Sabouraud dextrose para fungos). Deixou-se crescer em estufa por 24 horas a 35 °C ou 48 horas a 35 °C para bactérias e fungos, respectivamente.

Posteriormente, com uma alça de platina esterilizada, transferiu-se de 3 a 4 colônias para tubos de ensaio com tampa contendo 5 mL de caldo Mueller Hinton II para bactérias ou caldo Sabouraud dextrose para fungos. O desenvolvimento procedeu-se em *shaker* ou estufa (35 °C) por 2 a 3 horas.

O número de células/mL de bactérias e fungos foi ajustado segundo a escala McFarland em seus respectivos meios por espectrofotometria ($\lambda = 625 \text{ nm}$), obtendo-se uma absorvância de 0,08 a 0,1 que representa uma concentração de 1×10^8 UFC/mL. De acordo com as normas propostas pelo NCCLS, a concentração final dos microrganismos no teste de CIM por microdiluição deve ser de 1×10^5 UFC/mL para bactérias e 5×10^2 UFC/mL para fungos. Para isso, foram realizadas diluições seriadas em seus respectivos meios de cultura líquidos.

4.2.7.3 Preparo dos antibióticos controles

Para controle de viabilidade do teste, os antibióticos controle para bactérias e fungo utilizados foram tetraciclina (Sigma-Aldrich) e fluconazol (Sigma-Aldrich) respectivamente. Para o teste ser considerado válido, a tetraciclina deve apresentar uma CIM de 0,5 a 2 $\mu\text{g/mL}$ para *Escherichia coli* (ATCC 25922) e de 8 a 32 $\mu\text{g/mL}$ para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), e o fluconazol uma CIM de 0,125 a 64 $\mu\text{g/mL}$ para *Candida albicans* (ATCC 10231) (NCCLS, M38-A, 2002; NCCLS, M100-S15, 2005).

4.2.7.4 Determinação da CIM

Soluções mãe de 2000 $\mu\text{g/mL}$ das amostras (óleos essenciais, extratos e substâncias isoladas) foram preparadas em água/Tween 80/MeOH (88:2:10). As

amostras foram posteriormente filtradas em filtro esterilizado (Millipore®, diâmetro do poro de Φ 20 μ m) e armazenadas em frascos Eppendorf® também esterilizados.

Primeiramente, 50 μ L de meio de cultura foram colocados em cada um dos 96 poços da placa. Após, 50 μ L da solução mãe da amostra teste esterilizada foram colocados na primeira fileira da placa (em triplicata). Em seguida, com o auxílio de uma pipeta multicanal, realizou-se a diluição seriada das amostras com adição subsequente (50 μ L) do microrganismo teste. Neste teste, concentrações finais de 500 μ g/mL, 250 μ g/mL, 125 μ g/mL, 62,5 μ g/mL, 32,25 μ g/mL e 15,525 μ g/mL de amostra foram avaliadas. Em cada placa, controles de esterilidade do meio, de crescimento do microrganismo e do antibiótico sugerido pelo NCCLS também foram realizados.

Após o período de incubação em estufa (24 horas a 35 °C ou 48 horas a 35 °C para bactérias e fungos, respectivamente), a menor concentração na qual não houve turvação do meio de cultura (crescimento de microrganismos) foi considerada a CIM.

4.2.8 Avaliação da atividade antioxidante

4.2.8.1 Método do DPPH

Para esta determinação, soluções de concentração finais de 500, 250, 100, 50 e 5 μ g/mL das amostras de interesse foram preparadas. Para fins de comparação, utilizou-se vitamina E (α -tocoferol), ácido gálico e *N*-acetil-*L*-cisteína nas mesmas concentrações como controle positivo. Para cada 100 μ L da amostra, adicionou-se 10 μ L da solução de DPPH (1 mM).

Após o preparo, a placa foi levada ao espectrofotômetro e incubada por 30 min em temperatura de 25 °C no escuro e então o decréscimo da absorvância foi medido em λ = 517 nm. Para cada concentração do óleo essencial, extrato ou substância isolada testada foi descontado o branco (amostra contendo a mesma quantidade de metanol, mas sem DPPH). Os testes foram realizados em triplicata para cada concentração (Pellati *et al.*, 2004; Yokozawa *et al.*, 1998; Ferreres *et al.*, 2006). A porcentagem de inibição foi calculada através da equação indicada abaixo:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(\text{Abs}_{\text{DPPH}} - \text{Abs}_{\text{amostra}})}{\text{Abs}_{\text{DPPH}}} \times 100$$

Onde: Abs_{DPPH} é a absorção do branco (MeOH + DPPH);

$Abs_{amostra}$ é a absorção da solução teste + DPPH ($t = 30$ min).

4.2.8.2 Método de quimioluminescência

A análise antioxidante por quimioluminescência foi realizada de acordo com protocolo descrito por Krol *et al.* (1994), com algumas modificações. Em uma placa de 96 micropoços, branca e de fundo chato, foram adicionados, a cada poço, 175 μ L das amostras teste (2 mg/mL, tampão fosfato pH 7,4/DMSO 5%). Em seguida adicionou-se a solução de luminol (em DMSO) a uma concentração final de $1,13 \times 10^{-4}$ M e H_2O_2 numa concentração final de 5×10^{-5} M. A placa foi incubada por 3 min, a 30 °C. A reação foi iniciada pela adição da enzima HRP numa concentração final de 0,2 IU/mL em tampão fosfato (pH 7,4). O volume final foi de 250 μ L e as concentrações finais das amostras analisadas foram de 500, 250, 100, 50 e 5 μ g/mL.

Como controle máximo de emissão de luz utilizou-se 175 μ L de tampão fosfato/DMSO 5% em substituição à amostra. A emissão de luminescência da amostra na ausência da enzima HRP também foi medida e o valor obtido foi descontado do valor final.

A partir da adição da enzima HRP, a emissão de luz foi monitorada por 15 min, a 30 °C. A medida da emissão de luminescência *versus* tempo foi plotada e calculada a área sob a curva. Estes valores de área foram utilizados para o cálculo do potencial de inibição, realizado de acordo com a equação mostrada abaixo:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

Onde: A_{controle} é a área sob a curva do branco (tampão + H_2O_2 + luminol + HRP) durante 15 min;

A_{amostra} é a área sob a curva da amostra (amostra + H_2O_2 + luminol + HRP) durante 15 min.

4.2.9 Determinação do teor de lipídeos totais em algas

Para avaliar o conteúdo de lipídeos totais, utilizou-se basicamente o método de extração proposto por Erickson (1993). Para isso, 2 g de alga liofilizada foram

submetidos à extração com clorofórmio/metanol 2:1 (14 mL) seguido de agitação em vortex por 2 min. O material foi filtrado e o resíduo foi submetido novamente à extração com 5 mL da mistura de solventes em vortex por 30 seg. O solvente resultante foi filtrado, e os filtrados reunidos e concentrados até secar em $N_{2(g)}$. Os lipídeos totais foram determinados gravimetricamente, em triplicata.

4.2.10 Determinação de ácidos graxos em algas

A verificação da composição de ácidos graxos seguiu um método adaptado, baseado no descrito pela AOCS (Método Oficial Ce 1h-05, 2005) e pela AOAC (Método Oficial 996.06, 1996) que consiste em três etapas principais: extração, metilação e análise dos ácidos graxos.

Extração:

Pesou-se aproximadamente 1 g de alga liofilizada, adicionou-se 50 mg de ácido pirogálico, 0,5 mL da solução padrão triglicerídeo $C_{13:0}$ (5 mg/mL em clorofórmio) e 1 mL de etanol. Para efetuar a hidrólise ácida, adicionou-se 5 mL de HCl 8,3 M e misturou-se em *shaker* (70-80 °C) por 40 min, acompanhada de agitação em vortex a cada 10 min. Deixou-se esfriar a temperatura ambiente e posteriormente extraiu-se com éter etílico (12 mL, agitação em vortex por 1 min) e éter de petróleo (12 mL, agitação em vortex por 1 min). Após centrifugação para separação das fases, transferiu-se a fase etérea para um tubo Pyrex® 9826 (30 mL) e evaporou-se o solvente em banho termostatizado (inferior a 40 °C) usando $N_{2(g)}$.

Metilação:

A reação de metilação dos ácidos graxos a ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME - fatty acid methyl ester) foi feita dissolvendo-se o resíduo da gordura em 1 mL de BF_3 (7% em metanol) e 0,5 mL de tolueno. Aqueceu-se a 100 °C por 45 min com agitação suave a cada 10 min.

Após o término da reação, deixou-se esfriar a temperatura ambiente, adicionou-se 2,5 mL de água e extraiu-se os FAMES com 1 mL de hexano. A fração hexânica foi seca sob $N_{2(g)}$ e ressuspensa em 100 μ L de hexano para posterior análise.

Análise:

Os FAMES foram analisados por CG-FID. Os componentes foram separados em coluna capilar SP 2560 (100 m x 0,25 cm x 0,25 μ m) nas seguintes condições cromatográficas: programação de temperatura da coluna 100 °C por 5 min, 100-240

°C a 3 °C/min, permanecendo a 240 °C por 20 min; temperatura do injetor de 225 °C; temperatura do detector de 285 °C; gás de arraste He; fluxo linear de gás de 20 cm/s; split 1:50.

Padrões FAMES utilizados para a identificação foram: C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C21:0, C22:0, C23:0, C24:0, C14:1 (ω 5), C15:1 (ω 5) *cis*, C16:1 (ω 7) *cis*, C17:1 (ω 7), C18:1 (ω 9) *cis*, C20:1 (ω 9), 22:1 (ω 9), C24:1(ω 9) *cis*, C18:2 (ω 6) *cis*, C18:3 (ω 6) *cis*, C18:3 (ω 3) *cis*, C18:4, C20:2, C20:3 (ω 6) *cis*, C20:3 (ω 3) *cis*, C20:4 (ω 5) *cis*, C20:5, C22:2, C22:6, C18:1 (ω 9) *trans*, C18:2 (ω 6) *trans* (189.19 e 189.20, Sigma).

4.2.11 Determinação do teor de proteínas solúveis em algas

Para a determinação da concentração de proteínas solúveis, utilizou-se o método Bio-Rad® Protein Assay, baseado no método de Bradford (Bradford, 1976). A 1 g de material fresco triturado em N₂(l), adicionou-se 9,9 mL de tampão fosfato (0,2 M, pH 8,0), 100 μ L de EDTA 0,5 M e 20 μ L de ditioneitol DTT (0,5 M, pH 5,2, GibcoBRL), em seguida centrifugou-se a 12000 rpm, por 15 min, a 4 °C. Um volume de 40 μ L do sobrenadante do centrifugado foi transferido para um frasco Eppendorf®, adicionou-se 760 μ L de água destilada e 200 μ L de Bio-Rad obtendo-se uma concentração de 4 μ g/ μ L do centrifugado. 100 μ L desta solução foram transferidos para uma placa de 96 micropoços e após foi realizada a medida da absorvância em λ = 595 nm. Para a obtenção da curva padrão, utilizou-se padrão BSA (bovine serum albumin) nas concentrações de 2, 4, 5, 7 e 10 μ g/ μ L. Os testes foram realizados em triplicata.

4.2.12 Análise de aminoácidos com derivatização pós-coluna

4.2.12.1 Hidrólise ácida

A hidrólise ácida de proteínas e peptídeos foi realizada para quantificar os seguintes aminoácidos: lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, glicina, alanina, cisteína, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina e fenilalanina.

Alíquotas de amostras contendo aproximadamente 5,0 a 50 nmol de proteína (ou 5-10 mg de sólidos sem gorduras) foram transferidos para ampolas de borosilicato de 10 x 150 mm (Pyrex®) previamente pirolizadas a 400 °C, por 8 horas.

A cada ampola foram adicionados 0,5 mL de HCl 6M com 0,1% de fenol (m/v), selou-se sob vácuo e então as ampolas foram submetidas a aquecimento a 110 °C, por 22 horas (Moore *et al.*, 1958).

4.2.12.2 Hidrólise alcalina

Para a análise do aminoácido triptofano, amostras contendo aproximadamente 40-80 nmols de proteínas (ou 10-20 mg de sólidos desengordurados) foram necessárias. As amostras foram transferidas para ampolas de borosilicato (10 x 150 mm, Pyrex[®]) previamente pirolizadas a 400 °C, por 8 horas. A cada ampola, 0,5 mL de LiOH 4 M foram adicionados. Após seladas sob vácuo, as ampolas foram colocadas em um forno a 110 °C por 24 horas (Lucas e Sotelo, 1980).

4.2.12.3 Análise de aminoácidos

As amostras hidrolisadas foram analisadas de acordo com os procedimentos da Comunidade Européia (98/64/EG). Amostras de aminoácidos foram separadas por cromatografia de troca iônica e os aminoácidos foram detectados fotometricamente pela reação com ninidrina em $\lambda = 570$ nm (e em $\lambda = 440$ nm para prolina) utilizando um analisador automático de aminoácidos LC-3000 (Eppendorf-Bio-tronik, Alemanha). Solução de padrões de aminoácidos (A9781, Sigma-Aldrich, Alemanha), numa concentração de 0,5 $\mu\text{mol/mL}$, foi injetada a fim de calibrar o analisador e para quantificar os aminoácidos nas amostras.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração dos compostos voláteis

Neste trabalho, três métodos de extração (hidrodestilação, extração por solvente e HS-SPME) foram selecionados com a finalidade de observar os perfis químicos e de obter resultados informativos sobre compostos voláteis das algas de interesse.

5.1.1 Obtenção dos óleos essenciais (hidrodestilação)

As espécies de algas *L. filiformis*, *L. intricata*, *P. brasiliense* e *O. secundiramea* procedentes de populações naturais foram submetidas à hidrodestilação segundo método descrito no item 4.2.2.1. Os resultados de rendimentos dos óleos essenciais de cada espécie estudada estão relatados na Tabela 6.

Tabela 6 - Rendimentos obtidos do processo de hidrodestilação das espécies de algas.

Espécie	Massa (g)	Óleo essencial (g)	Rendimento (%)
<i>Laurencia filiformis</i>	500,01	0,39	0,08
<i>Laurencia intricata</i>	420,04	0,21	0,05
<i>Plocamium brasiliense</i>	36,75	0,02	0,06
<i>Ochtodes secundiramea</i>	171,91	0,10	0,06

Os resultados obtidos mostram que as espécies de algas apresentam óleo essencial em quantidades inferiores aos geralmente encontrados em plantas terrestres. Como pode ser observado na Tabela 6, os rendimentos variaram entre 0,05 a 0,08% para as algas testadas, sendo a *L. filiformis* a que apresentou maior rendimento. Para plantas terrestres, segundo Esmaeili *et al.* (2008) e Jiménez-Carmona *et al.* (1999), é comum observar valores superiores a 0,8% (óleo/massa fresca) pelo método de hidrodestilação.

Com relação ao baixo rendimento da extração de óleos essenciais, os resultados mostram que a presença de compostos voláteis não é comum em grandes proporções entre as algas. É sabido que as plantas terrestres utilizam compostos voláteis para interagir com o ambiente e estes aleloquímicos são, predominantemente, estruturas de baixo peso molecular e de média a baixa polaridade (Dudavera *et al.*, 2006). No ambiente aquático, talvez como alternativa, o mais comum seja a produção de compostos mais solúveis em água para facilitar a

interação intra e entre espécies. De fato, é relatado na literatura que macroalgas podem biossintetizar algumas substâncias alelopáticas, principalmente para a prevenção do crescimento de epífitas em seus tecidos, para prevenir o sombreamento provocado por produtores primários planctônicos e por competição por espaço (Schmitt *et al.*, 1995; Gross, 2003).

5.1.2 Preparo dos extratos orgânicos

Nesta parte do trabalho, os extratos foram preparados para análise de sua composição química por CG-EM e também para verificação do potencial biológico. Desta forma, prepararam-se os extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) de todas as espécies de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.2.2. A Tabela 7 traz os resultados de rendimentos obtidos.

Tabela 7 - Rendimentos obtidos dos extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) das espécies de algas.

Espécies	Rendimento (% m/m)	
	ED	EM
<i>Laurencia filiformis</i>	2,30	4,87
<i>Laurencia intricata</i>	1,11	2,73
<i>Plocamium brasiliense</i>	1,34	4,52
<i>Ochtodes secundiramea</i>	1,36	4,29

O extrato metanólico apresentou maior rendimento para as todas as espécies. Este resultado já era esperado, visto o baixo rendimento dos óleos essenciais (compostos menos polares) apresentados e por ser conhecido o fato das algas apresentarem altos teores de polissacarídeos (ágar, carragenina e alginato), os quais são solúveis em solventes de maior polaridade (Cardozo *et al.*, 2007).

5.1.3 Extração por HS-SPME

A extração por *headspace* acoplada à microextração em fase sólida foi realizada para as quatro espécies deste trabalho. Com a finalidade de identificar diferentes classes de compostos voláteis de algas, as fibras PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA foram selecionadas por apresentarem maior afinidade com: PDMS - moléculas polares e apolares, de baixo peso molecular; PDMS/DVB - aminas e álcoois; CAR/PDMS - hidrocarbonetos; PA - fenóis e ácidos carboxílicos (www.sigmaaldrich.com).

5.1.3.1 Otimização do método de extração por HS-SPME

Diferentes condições de extração podem afetar a área total dos picos cromatográficos. Desta forma, este parâmetro (calculado pelo equipamento, unidade adimensional) foi utilizado na otimização das condições de extração (Guo *et al.*, 2006). Neste sentido, diferentes tipos de fibras, quantidades de material liofilizado de alga, temperaturas, e tempos de extração e de equilíbrio foram testados conforme descrito no item 4.2.2.3.

5.1.3.1.1 Seleção da quantidade de material liofilizado

Primeiramente avaliou-se a quantidade de material liofilizado de alga utilizada na extração. Para isso, os valores intermediários dos demais parâmetros previamente selecionados foram mantidos constantes (60 °C, 15 min de equilíbrio, 15 min de extração). Após a análise com 50, 100 e 200 mg, observou-se um aumento gradativo na área total dos picos com o aumento de massa utilizada (Figura 9). Porém, quando se trabalhou com 50 mg, foram observados cromatogramas mais limpos e com menor sobreposição de picos. Além disso, o cromatograma permaneceu com o mesmo perfil, sem haver perdas de extração de compostos. Este resultado foi observado para os quatro tipos de fibras testadas, com exceção da fibra de PA para *L. intricata*, na qual se utilizou 200 mg para extração.

Figura 9 - Efeito da quantidade de material utilizado (200 mg, 100 mg e 50 mg) na extração dos compostos voláteis por HS-SPME sobre a área total dos picos cromatográficos de *Laurencia filiformis* (L.f.), *Laurencia intricata* (L.i.), *Plocamium brasiliense* (P.b.) e *Ochtodes secundiramea* (O.s.) utilizando as fibras PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA. Condições: temperatura de extração de 60 °C, tempo de equilíbrio e de extração de 15 min.

5.1.3.1.2 Seleção do tempo de equilíbrio e de extração

Uma vez estabelecida a quantidade de material utilizado nas extrações, as avaliações do tempo de equilíbrio e do tempo de extração foram realizadas (5, 15 e 25 min). Os resultados mostraram um aumento da área total dos picos com o aumento do tempo de equilíbrio e de extração. O gráfico apresentado na Figura 10 mostra este aumento em relação ao tempo de extração.

Figura 10 - Efeito do tempo de extração dos compostos voláteis (5 min, 15 min e 25 min) por HS-SPME sobre a área total dos picos cromatográficos de *Laurencia filiformis* (L.f.), *Laurencia intricata* (L.i.), *Plocamium brasiliense* (P.b.) e *Ochtodes secundiramea* (O.s.) utilizando as fibras PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA. Condições: temperatura de extração de 60 °C, tempo de extração de 15 min, utilizando 50 mg de material algal liofilizado.

Em relação ao tempo de equilíbrio, não foram observadas diferenças relevantes com relação à composição e proporção dos picos extraídos. Já os intervalos de tempo de extração mostraram uma tendência à saturação da fibra, promovendo o alargamento e sobreposição de alguns picos (Figura 11), além de elevar a linha de base do cromatograma. Desta forma, a fim de diminuir o tempo da análise e de se obter cromatogramas mais informativos, o tempo de equilíbrio e o de extração, de 15 min, foram selecionados.

Figura 11 - Efeito do tempo de extração (5 min, 15 min e 25 min) no alargamento dos picos cromatográficos dos compostos voláteis por HS-SPME de *Laurencia filiformis* utilizando 50 mg de material algal liofilizado, fibra PDMS e temperatura de extração de 60 °C.

5.1.3.1.3 Seleção da temperatura de extração

A avaliação de diferentes temperaturas (40, 60 e 80 °C) para a extração dos compostos voláteis mostrou diferenças expressivas entre vários cromatogramas obtidos. No geral, quando a temperatura de 40 °C foi utilizada, observou-se uma diminuição no número de picos e também uma diminuição na intensidade de outros quando comparados aos cromatogramas cuja extração foi realizada a 60 e 80 °C. Já na comparação entre os cromatogramas obtidos com extração a 60 e 80 °C, não se observou diferença em número de picos, mas sim um aumento na intensidade de alguns compostos, assim como sobreposição de sinais e elevação da linha de base do cromatograma (Figura 12). Levando em consideração todos estes fatores, a temperatura de extração de 60 °C resultou em uma melhor resposta.

Figura 12 - Cromatogramas obtidos após extração dos compostos voláteis por HS-SPME de *Laurencia filiformis* em temperaturas de 40 °C, 60 °C e 80 °C, utilizando 50 mg de material algal liofilizado, fibra de PDMS/DVB e tempo de extração e de equilíbrio de 15 min.

Outro fator a ser considerado foi a formação de gotas na parede do frasco de extração. Segundo Guo *et al.* (2006), a formação destas gotas diminui a capacidade dos compostos serem adsorvidos na fibra, pois o coeficiente de partição dos analitos entre a microgota e o *headspace* diminui. Ou seja, temperaturas mais elevadas não promovem uma maior extração dos compostos e sim uma maior formação de microgotas diminuindo a concentração dos analitos no *headspace*. A Figura 13 mostra o somatório das áreas dos picos para cada espécie utilizando as diferentes fibras e temperaturas de extração.

Figura 13 - Efeito da temperatura de extração (40 °C, 60 °C e 80 °C) dos compostos voláteis por HS-SPME sobre a área total dos picos cromatográficos de *Laurencia filiformis* (L.f.), *Laurencia intricata* (L.i.), *Plocamium brasiliense* (P.b.) e *Ochtodes secundiramea* (O.s.) utilizando as fibras de PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA. Condições: 50 mg de amostra, tempos de equilíbrio e de extração de 15 min.

5.2 Avaliação da composição química volátil das espécies em estudo

A avaliação qualitativa e quantitativa dos compostos voláteis das espécies baseou-se nas análises dos óleos essenciais (OE), extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM), bem como nos compostos extraídos por HS-SPME, utilizando principalmente CG-EM, RMN e HRMS. A seguir estão apresentados os resultados obtidos para *L. filiformis*, *L. intricata*, *P. brasiliense* e *O. secundiramea*.

Para os compostos cujos IK iguais ou semelhantes foram encontrados na literatura, consideraram-se percentuais de similaridade superiores a 85%. No caso de compostos cujos IK não foram encontrados na literatura, apenas calculados pela biblioteca NIST 08, consideraram-se percentuais de similaridade superiores a 90%.

5.2.1 *Laurencia filiformis*

4.2.1.1 Análise de extratos, óleo essencial e compostos extraídos por HS-SPME por CG-EM

A Figura 14 compara os sete cromatogramas obtidos e a Tabela 8 correlaciona os tempos de retenção de cada pico observado com os respectivos IK e estruturas identificadas, além de indicar sua proporção em cada amostra.

Figura 14 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM das amostras extraídas por HS-SPME (PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA), óleo essencial (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) da espécie *Laurencia filiformis*.

Tabela 8 - Compostos identificados por CG-EM das amostras extraídas por HS-SPME (PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA), óleo essencial (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) da espécie *Laurencia filiformis*.

Nº	t _R (min)	IK _{ob}	IK _{lit}	Composto	%							Similaridade
					PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS	PA	OE	ED	EM	
1	3,8	-	662 ¹	(E)-3-penten-2-ona	-	-	-	-	-	0,21	-	96
2	5,0	-	735 ¹	etildimetilcarbamato	-	-	-	-	0,88	-	-	96
3	5,9	925	925 ²	cumeno	-	-	-	-	3,05	-	49,47	97
4	6,9	962	962 ³	benzaldeído	-	-	-	-	-	-	2,28	97
5	10,6	1072	1069 ⁴	dietil malonato	-	-	-	-	0,19	-	-	92
6	13,1	1133	1088 ¹	4-acetil-1-metilciclohexeno	0,17	0,36	0,46	0,20	0,21	-	-	97
7	15,3	1188	1188 ⁵	o-acetiltolueno	0,18	0,59	-	0,35	0,11	-	-	94
8	16,1	1207	1199 ¹	2-metil-5-(1-metiletil)-1-ciclopenteno-1-metanol	0,13	0,26	0,35	0,16	0,19	-	-	90
9	23,5	1380	1382 ⁶	α-gurjuneno	3,46	3,51	1,90	2,11	-	-	-	85
10	23,6	1382	1368 ¹	(5-metil-2H-[1,2,4]triazol-3-il)acetonitrila	0,33	0,44	0,45	0,15	1,87	-	-	91
11	23,9	1390	1394 ¹	2,3,3a,4-tetrahidro-3,3a,6-trimetil-1-(1-metiletil)-1H-indeno	0,80	0,84	0,88	0,27	-	-	-	90
12	24,0	1393	1398 ¹	[1aS-(1α,3α,7α,7bα)]-1,1,3a-trimetil-7-metilenodecahidro-1H-ciclopropa[a]naftaleno	0,57	0,59	0,63	0,16	-	-	-	90
13	24,3	1399	1394 ¹	butil 3,4-dimetilfenil éter	1,01	1,01	1,37	0,48	-	0,64	-	92
14	24,3	1400	1400 ⁷	tetradecano	-	-	-	-	0,23	-	-	91
15	26,0	1441	1440 ⁸	cariofileno	0,35	0,32	0,39	0,22	-	-	-	88
16	27,5	1478	1470 ⁹	β-guaieno	0,27	0,21	0,37	0,18	-	-	-	87
17	28,9	1514	1520 ¹⁰	α-bisaboleno	0,52	0,29	-	5,99	-	-	-	85
18	29,5	1529	-	LfAc1 e LfAc2 (ver item 5.2.1.3)	6,36	6,42	9,96	0,53	61,67	5,69	-	-
19	29,6	1532	1526 ⁹	cadina-1(10),6,8-trieno	0,33	0,54	-	-	-	-	-	85
20	30,7	1559	1557 ¹¹	β-iraldeino	-	-	-	-	0,15	1,45	-	85
21	30,8	1562	1560 ¹²	globulol	-	-	-	-	0,16	1,16	-	87
22	30,9	1566	1550 ¹²	β-himachaleno	5,04	5,03	4,71	4,56	-	-	-	86
23	31,1	1571	1570 ¹³	espatulenol	0,60	0,95	0,85	0,46	-	-	-	85
24	31,5	1580	1581 ¹	2-metil-4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2-butenal	-	-	-	-	0,12	-	-	91

Continua

Tabela 8 - Continuação

Nº	t _R (min)	IK _{ob}	IK _{lit}	Composto	%							Similaridade
					PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS	PA	OE	ED	EM	
25	31,6	1584	1567 ¹	1-(2,3,6-trimetilfenil)-3-butanona	-	-	-	-	0,17	-	-	90
26	31,5	1580	1586 ¹	2-metil-4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2-butenal	-	-	-	-	0,12	-	-	91
27	31,6	1584	1567 ¹	1-(2,3,6-trimetilfenil)-3-butanona	-	-	-	-	0,17	-	-	90
28	32,0	1594	1582 ¹	8-cloro-neoisolongifoleno	0,32	0,50	0,59	0,41	-	0,31	-	93
29	32,2	1600	1603 ¹⁴	dietilftalato	-	0,20	-	-	0,20	-	-	90
30	33,9	1645	1649 ¹	1-hidroxi-6-(3-isopropenil-cicloprop-1-enil)-6-metil-heptan-2-ona	-	-	-	-	0,42	-	-	91
31	34,0	1648	1657 ¹⁵	8-cedre-3-ol	0,71	0,67	2,43	0,70	0,41	-	-	90
32	34,1	1650	1657 ¹⁵	8-cedren-13-ol	0,36	0,36	-	0,48	-	0,34	-	92
33	34,3	1656	1651 ¹	vidrol	0,33	0,48	0,27	0,42	-	0,44	-	90
34	34,6	1662	1662 ¹⁶	α-cadinol	-	-	0,17	0,16	-	-	-	88
35	35,2	1681	1682 ¹⁷	1-heptadeceno	0,79	0,87	0,27	0,39	-	0,55	-	93
37	35,9	1699	1681 ¹	1,3,5-trimetil-2-(2-nitroalil)benzeno	-	-	-	-	1,11	-	-	94
38	36,2	1708	1711 ⁷	heptadecano	6,15	7,06	-	0,13	-	3,54	-	96
39	36,6	1719	1717 ¹⁸	pentadecanal	0,94	0,97	-	-	-	-	-	89
40	36,9	1727	1726 ¹⁹	metil tetradecanoato	-	-	-	-	0,51	-	-	90
41	39,5	1802	1816 ¹	4-ciclohexilcarbonil-1,3-dimetilbenzeno	-	-	-	-	0,31	-	-	93
42	41,9	1874	1871 ²⁰	isobutilftalato	0,35	0,39	0,17	0,59	0,29	0,34	1,25	87
44	42,0	1877	1888 ¹	1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-2-propionamida	-	-	-	-	0,20	-	-	90
45	43,6	1924	1918 ²¹	(E,E)-7,11,15-trimetil-3-metileno-hexadeca-1,6,10,14-tetraeno	0,28	0,28	0,12	0,32	-	-	-	85
46	43,7	1928	1928 ²²	metil hexadecanoato	-	-	-	-	1,23	-	0,95	86
47	45,0	1967	1965 ²⁰	dibutilftalato	1,74	1,99	1,77	2,80	3,28	2,08	0,80	86
48	49,6	2118	2118 ²³	fitol	0,27	0,19	-	0,34	-	0,36	-	96
50	61,4	2549	2546 ²⁴	bis(2-etilhexil)ftalato	-	-	-	0,18	-	-	3,36	86
51	61,5	2555	2572 ¹	N-[(pentafluorofenil)metileno]-β,3,4-tris[(trimetilsilil)oxi]-benzenoetanamina	-	-	-	-	-	-	2,36	90

Continua

Tabela 8 - Continuação

Nº	t _R (min)	IK _{ob}	IK _{lit}	Composto	%							
					PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS	PA	OE	ED	EM	Similaridade
Número total de picos analisados					94	93	83	108	58	53	12	-
Número de picos identificados					26	26	20	26	23	13	7	-
Total identificado (%)					32,36	35,32	28,11	22,74	77,25	17,11	60,47	-

¹ IK teórico; ² Wang *et al.*, 1994; ³ Spadone *et al.*, 1990; ⁴ Boulanger e Crouzet, 2001; ⁵ Hamm *et al.*, 2004; ⁶ Senatore *et al.*, 1998; ⁷ von Kováts, 1958; ⁸ Le Quere e Latrasse, 1990; ⁹ Elias *et al.*, 1997; ¹⁰ Larsen e Frisvad, 1995; ¹¹ Tudor, 1997; ¹² Larsen e Frisvad, 1994; ¹³ Zunino *et al.*, 1997; ¹⁴ Ramarathnam *et al.*, 1993a; ¹⁵ Roscigno, 1998; ¹⁶ Tzakou *et al.*, 2000; ¹⁷ Flamini *et al.*, 2003a; ¹⁸ Flamini *et al.*, 2003b; ¹⁹ Boulanger *et al.*, 1999; ²⁰ Weber, 1986; ²¹ Heinrich *et al.*, 2002; ²² Ansorena *et al.*, 2001; ²³ Esteban *et al.*, 1999; ²⁴ Fukui *et al.*, 1997. * Coluna utilizada na literatura diferente da utilizada neste trabalho.

A espécie *L. filiformis* apresentou 203 compostos voláteis diferentes, sendo alguns deles particulares a um sistema de extração e outros comuns a duas ou mais amostras. O somatório de compostos identificados por meio da comparação dos IK e espectros de massas com compostos presentes nas bibliotecas NIST 08, NIST 21 e NIST 107 variaram de 17,11 (ED) a 60,47% (EM) nas amostras analisadas.

Como se pode observar, o óleo essencial desta espécie apresenta um pico majoritário ($t_R = 29,5$ min) representando 61,67% da composição. Este pico mostrou-se presente no extrato diclorometano e também nas amostras extraídas por HS-SPME. Porém, pelo fato desta molécula não constar no banco de dados das bibliotecas (NIST) utilizadas para identificação, optou-se por isolá-la por CCDP e identificá-la por RMN.

5.2.1.2 Isolamento de compostos majoritários do óleo essencial

O óleo essencial de *L. filiformis* foi avaliado por CCD com diversos sistemas de solventes de eluição. Quando utilizada uma mistura de hexano/acetato de etila (95:5) observou-se o aparecimento de duas bandas intensas, sugerindo, desta forma, que o pico majoritário do óleo essencial era constituído por dois compostos diferentes. Por esta razão, procedeu-se o isolamento das mesmas por CCDP (item 4.2.4.3) e verificou-se a pureza por CCD e por CG (Figura 15).

Figura 15 - Isolamento dos compostos LfAc1 e LfAc2: a) placa de CCD do óleo essencial de *Laurencia filiformis*; b) placa de CCD dos compostos isolados; c) cromatografia gasosa de LfAc2; d) cromatografia gasosa de LfAc1.

Os compostos isolados (6,8 e 8,1 mg para LfAc1 e LfAc2, respectivamente) apresentaram o mesmo tempo de retenção ($t_R = 29,5$ min) e Índice de Kovat's (IK = 1529). A avaliação da proporção dos dois compostos presentes no óleo essencial foi realizada gravimetricamente, obtendo-se 28,2% de LfAc1 e 33,46% de LfAc2.

5.2.1.3 Determinação estrutural de LfAc1 e LfAc2

As amostras LfAc1 e LfAc2 foram analisadas por RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (DEPT 135, COSY, HMBC, HSQC). Através da análise dos espectros de RMN e comparação com os da literatura, a estrutura proposta para LfAc1 é (1R*,2S*,3R*,5S*,8S*,9R*)-2,3,5,9-tetrametiltriciclo[6.3.0.0^{1,5}]undecan-3-ol, também conhecido como (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol e para LfAc2 é (1S*,2S*,3S*,5S*,8S*,9S*)-2,3,5,9-tetrametiltriciclo[6.3.0.0^{1,5}]undecan-2-ol, também conhecido como (-)-silfiperfolan-7 β -ol (Figura 16). Ambos os álcoois apresentam aspecto oleoso de cor levemente amarelada e odor semelhante ao da cânfora.

Figura 16 - Substâncias majoritárias isoladas do óleo essencial de *Laurencia filiformis*.

A Tabela 9 mostra os dados de RMN de ^{13}C para os dois sesquiterpenos não halogenados de fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ comparados com dados já apresentados por Coll e Wright (1989) e Wright *et al.* (1990) para a espécie *Laurencia majuscula* e por Davyt *et al.* (2006) para a espécie *L. scoparia*. Verificou-se, no entanto, que Wright *et al.* (1990) atribuíram erroneamente o sinal de RMN de ^{13}C de δ 27,8 ppm ao grupo metílico ligado ao C3 (δ 81,1 ppm) para (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol. A Figura 17 mostra a correlação entre os carbonos e seus respectivos hidrogênios (HSQC) para (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol e a Figura 18 (HMBC) mostra que os hidrogênios ligados ao C14 (δ 27,8 ppm) se correlacionam com o C5 e não com o C3. Os espectros de RMN uni e bidimensionais de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol (LfAc1) e (-)-silfiperfolan-7 β -ol (LfAc2) encontram-se nos Anexos A e B.

Tabela 9 - Deslocamentos químicos de ^{13}C das moléculas LfAc1 e LfAc2 (em CDCl_3 , 500 MHz) e valores da literatura.

Nº C	(-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol		(-)-silfiperfolan-7 β -ol	
	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	$\delta^{13}\text{C}$ ppm literatura ^a	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	$\delta^{13}\text{C}$ ppm literatura ^a
1	65,9	65,9	69,9	70,0
2	53,9	53,9	85,3	85,2
3	81,2	81,1	41,0	41,1
4	55,7	55,7	47,3	47,5
5	50,2	50,2	49,7	49,8
6	42,7	42,7	41,8	41,9
7	26,9	26,9	29,0	29,1
8	63,1	63,9	57,7	57,8
9	38,4	38,4	42,5	42,5
10	37,1	37,1	36,4	36,4
11	26,9	26,9	27,9	27,8
12	8,3	8,3	22,3	22,3
13	26,3	27,8	12,5	12,4
14	27,8	26,3	26,8	26,7
15	19,7	19,7	19,6	19,5

^a Wright et al., 1990.

Figura 17 - Espectro de RMN de HSQC de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol em CDCl_3 a 500 MHz.

Figura 18 - Espectro de RMN de HMBC de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol em CDCl₃ a 500 MHz.

O sesquiterpeno (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol apresentou todas as ressonâncias de hidrogênio entre δ 0,87 e 1,86 ppm. Devido a isso, apenas quatro sinais foram úteis na determinação da estrutura: dubletos em δ 0,87 e 0,97 ppm e singletos em δ 1,07 e 1,10 ppm, com integrações relativas a três hidrogênios, mostrando a presença de quatro metilas. Um espectro de RMN de ^1H similar ao descrito anteriormente foi observado para o (-)-silfiperfolan-7 β -ol. Todas as ressonâncias de hidrogênio apareceram entre δ 0,89 e 1,69 ppm e ressonâncias correspondendo a quatro metilas em δ 0,89 (3H, d), 0,92 (3H, d), 1,11 (3H, s) e 1,17 (3H, s) também foram observadas. A Tabela 10 mostra os dados de RMN de ^1H e a Tabela 11 mostra as correlações de RMN de ^1H - ^{13}C de longa distância (HMBC) obtidos para os dois sesquiterpenos isolados.

Tabela 10 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol e (-)-silfiperfolan-7 β -ol em CDCl_3 a 500 MHz.

Nº C	(-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol	(-)-silfiperfolan-7 β -ol
1	-	-
2	1,53 (q, $J = 7.5$ Hz)	-
3	-	1,63 (m)
4	1,55 (d, $J = 7,5$ Hz), 1,62 (d, $J = 7,5$ Hz)	1,34 (m), 1,61 (m)
5	-	-
6	1,48 (m), 1,59 (m)	1,47 (m)
7	1,46 (m) e/ou 1,55 (m) e/ou 1,69 (m)	1,29 (m), 1,51 (m)
8	1,43 (m)	1,51 (m)
9	1,39 (m)	1,52 (m)
10	1,11 (m), 1,76 (m)	1,70 (t, d $J = 5,5$ Hz, $J = 2$ Hz)
11	1,46 (m) e/ou 1,55 (m) e/ou 1,69 (m)	1,86 (q, d, $J = 7$ Hz, $J = 2,5$ Hz)
12	0,89 (d, 3H, $J = 7,0$ Hz)	1,10 (s, 3H)
13	1,17 (s, 3H)	0,87 (d, 3H, $J = 6,0$ Hz)
14	1,11 (s, 3H)	1,07 (s, 3H)
15	0,92 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz)	0,97 (d, 3H, $J = 6,5$ Hz)

Tabela 11 - Dados de RMN de HMBC (^1H - ^{13}C) de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol e (-)-silfiperfolan-7 β -ol em CDCl_3 a 500 MHz.

Nº C	(-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol	(-)-silfiperfolan-7 β -ol
12	1,2,3	1,2,3
13	2,3,4	2,3,4
14	1,4,5,6	1,4,5,6
15	8,9,10	8,9,10

A análise por CG-EM dos dois sesquiterpenos isolados forneceu espectros de massas característicos (Figuras 19 e 20). Para ambas as moléculas observou-se o íon molecular $[\text{M}^+]$ de m/z 222 (2%). Outros íons característicos com m/z de 204 (10%), 189 (5%), 175 (20%), 164 (12%), 149 (10%), 136 (17%) 135 (100%), 122 (10%), 109 (20%), 107 (23%), 98 (90%), 95 (35%), 93 (15%), 91 (10%), 83 (30%), 81 (15%), 79 (12%), 67 (10%), 55 (15%) e 43 (42%) foram observados para (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol e 204 (1%), 189 (1%), 175 (1%), 165 (1%), 147 (1%), 137 (11%) 136 (11%), 135 (28%), 125 (5%), 121 (7%), 107 (9%), 95 (20%), 93 (8%), 91 (6%), 86 (100%), 85 (15%), 81 (28%), 79 (8%), 67 (7%), 55 (8%) e 43 (21%) para (-)-silfiperfolan-7 β -ol.

Figura 19 - Espectro de massas de baixa resolução (EIMS) obtido de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol.

Figura 20 - Espectro de massas de baixa resolução (EIMS) obtido de (-)-silfiperfolan-7 β -ol.

Estes dois sesquiterpenos, também são classificados como álcoois triquinânicos e já foram relatados em algas do gênero *Laurencia* (Coll e Wright, 1989; Wright *et al.*, 1990; Davyt *et al.*, 2006) e na espécie *Echinops giganteus*, espécie terrestre endêmica de Camarões e da Nigéria (Weyerstahl *et al.*, 1998).

Apesar de já serem encontrados na literatura, não há relatos sobre atividade biológica para (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol e (-)-silfiperfolan-7 β -ol. Davyt *et al.* (2006) testaram estas substâncias como drogas antihelmínticas, mas não observaram atividade.

5.2.2 *Laurencia intricata*

5.2.2.1 Análise de extratos, óleo essencial e compostos extraídos por HS-SPME por CG-EM

A Figura 21 compara os sete cromatogramas obtidos, e a Tabela 12 correlaciona os tempos de retenção de cada pico observado com os respectivos IK e estruturas identificadas, além de indicar sua proporção em cada amostra.

Figura 21 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM das amostras extraídas por HS-SPME (PDMS, PDMS/DVB, CAR,DVB e PA), óleo essencial (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) da espécie *Laurencia intricata*.

Tabela 12 - Compostos identificados por CG-EM das amostras extraídas por HS-SPME (PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA), óleo essencial (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) da espécie *Laurencia intricata*.

Nº	t _R (min)	IK _{ob}	IK _{lit}	Composto	%							Similaridade
					PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS	PA	OE	ED	EM	
1	6,4	942	946 ²	5,5-dimetil-2(5H)-furanona	-	-	-	-	0,15	-	-	91
2	7,0	966	967 ¹	glicerina	-	-	-	-	-	-	2,35	93
3	8,9	1024	1024 ³	2-etil-1-hexanol	-	-	0,47	-	-	-	-	94
4	11,8	1102	1100 ⁴	undecano	-	-	-	-	0,14	-	-	95
5	12,7	1127	1133 ⁵	N-formilmorfolina	-	-	-	-	-	0,14	-	87
6	12,8	1128	1128 ⁶	N-etil-benzenamina	-	0,55	-	0,50	-	-	-	97
7	12,9	1130	1088 ¹	4-acetil-1-metilciclohexeno	-	-	-	-	0,17	-	-	96
8	15,1	1184	1188 ⁷	o-acetiltolueno	-	-	-	0,27	-	-	-	94
9	16,0	1204	1236 ⁸	2-etil-6-metil-fenol	-	0,27	0,38	0,23	0,25	-	-	85
10	16,4	1214	1188 ¹	etil-4-morfolinacarboxilato	-	-	-	-	-	0,87	-	90
11	16,7	12201	1220 ⁹	β-ciclocitral	-	-	0,26	0,42	-	-	-	91
12	17,0	1227	1227 ¹⁰	benzotiazol	-	-	-	-	-	0,57	-	88
13	21,6	1335	1334 ¹¹	β-patchouleno	9,93	14,90	15,66	3,37	0,34	-	-	87
14	21,9	1342	1351 ¹	1,3,4,5,6,7-hexaidro-2,5,5-trimetil-2H-2,4a-etanonaftaleno	-	-	-	-	0,42	-	-	90
15	22,0	1345	1342 ¹²	ilangeno	-	-	-	-	0,35	-	-	85
16	23,1	1372	1373 ¹¹	α-gurjuneno	4,21	5,49	6,77	1,90	0,27	-	-	89
17	23,7	1385	1384 ¹	2,5-dimetil-tridecano	0,31	0,68	0,74	-	-	-	-	90
18	24,1	1394	1394 ¹	butil 3,4-dimetilfenil éter	0,27	0,48	0,53	-	-	-	-	91
19	26,1	1445	1440 ¹	(+/-)-cadineno	14,39	16,91	14,90	13,78	-	-	-	87
20	27,3	1473	1473 ¹³	1-dodecanol	1,04	5,21	1,17	0,63	0,26	0,24	-	85
21	27,9	1488	1488 ¹⁴	β-ionona	0,64	0,60	1,71	0,30	-	-	-	87
22	28,2	1497	1500 ⁴	pentadecano	1,87	0,56	1,42	-	0,52	-	-	85
23	28,9	1514	1513 ¹⁵	BHT	1,36	1,49	2,12	1,76	-	0,75	-	94
24	29,1	1519	-	LfAc1 e LfAc2 (ver item 5.2.1.3)	7,91	8,64	10,82	6,51	8,38	-	-	-
25	29,6	1532	1532 ¹⁶	diidro-actinidiolida	1,05	0,68	1,29	0,45	-	-	-	86
26	30,9	1566	1569 ¹⁷	germacreno	0,37	0,64	-	0,28	0,27	-	-	88
27	32,3	1602	1589 ^{6v}	2-(metiltio)-benzotiazol	-	-	-	-	-	0,74	-	90
28	32,7	1612	1611 ¹⁸	tetradecanal	0,41	0,18	-	-	0,19	-	-	93
29	35,1	1677	1676 ¹³	1-tetradecanol	0,74	-	-	0,39	-	-	-	94
30	35,6	1691	1696 ¹⁹	1-heptadeceno	2,69	10,53	0,58	1,45	0,96	0,14	-	95
31	36,0	1700	1700 ⁴	heptadecano	10,74	7,86	14,22	7,84	2,89	2,81	-	96

Continua

Tabela 12 - Continuação

Nº	t _R (min)	IK _{ob}	IK _{lit}	Composto	%							Similaridade
					PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS	PA	OE	CH ₂ Cl ₂	MeOH	
33	36,9	1727	1725 ¹³	metil tetradecanoato	-	-	-	-	-	-	0,21	90
34	38,2	1764	1763 ²¹	ácido tetradecanóico	-	-	-	-	-	0,74	0,34	90
35	38,3	1768	1791 ^{22*}	2-fenildodecano	0,42	0,24	-	-	-	0,11	-	87
36	39,3	1797	1816 ¹	4-ciclohexilcarbonil-1,3-dimetilbenzeno	-	-	-	-	0,23	-	-	91
37	40,8	1840	1834 ²³	hexadecanal	-	-	-	-	-	0,57	0,57	94
38	41,0	1845	1845 ²⁴	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	1,19	0,32	0,42	-	-	-	-	93
39	41,7	1865	1863 ¹	2-metil-7-octadecino	-	-	-	-	-	0,20	-	86
40	41,9	1873	1871 ²⁵	isobutilftalato	6,76	2,29	3,29	0,47	0,59	4,45	0,40	97
41	42,1	1878	1888 ¹	1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-2-propionamida	-	-	-	-	0,41	-	-	89
42	42,2	1881	1875 ²⁶	1-hexadecanol	0,82	-	-	-	-	0,52	0,32	94
43	43,7	1928	1928 ²⁷	metil hexadecanoato	-	-	-	-	-	-	1,43	93
44	44,4	1950	1954 ¹	heptadecanol	0,76	-	-	0,30	-	0,20	-	86
45	44,8	1961	1961 ²³	ácido hexadecanóico	1,06	0,23	0,45	-	-	16,49	2,97	91
46	45,0	1968	1965 ²⁵	dibutilftalato	4,94	0,25	0,26	-	16,30	18,97	1,05	97
47	45,6	1987	1998 ¹	2-propilditio-benzotiazol	-	-	-	-	0,56	0,37	-	86
48	46,1	2003	2007 ¹	1-bromo-heptadecano	0,76	-	-	0,48	-	-	0,17	90
49	48,3	2074	2066 ¹	ácido isoftálico, dineopentil éster	0,52	-	-	-	-	0,90	-	90
50	49,2	2102	2101 ^{28*}	metil oleato	-	-	-	-	-	-	0,16	94
51	49,5	2115	2114 ²⁹	fitol	-	-	-	-	0,18	0,46	0,71	96
52	50,3	2141	2141 ³⁰	ácido oléico	-	-	-	-	-	0,51	-	93
53	50,4	2145	2156 ³¹	n-nonadecanol	-	-	-	-	-	0,33	-	92
54	51,0	2165	2164 ³⁰	ácido octadecanóico	-	-	-	-	-	1,69	-	90
55	51,5	2181	2181 ⁶	bifenol A	-	-	-	-	-	-	0,42	85
56	52,0	2200	2200 ⁴	docosano	-	-	-	-	-	0,27	-	91
57	53,8	2262	2231 ^{32*}	metil araquidanato	-	-	-	-	-	-	0,46	92
58	54,0	2270	2316 ¹	cis-5,8,11,14,17-ácido eicosapentaenóico, metil éster	-	-	-	-	-	-	0,39	93
59	57,5	2400	2400 ⁴	tetracosano	-	-	-	-	-	0,81	-	91
60	60,1	2500	2500 ⁴	pentacosano	-	-	-	-	-	0,44	-	85
61	60,4	2512	2523 ¹	ácido octadecanodióico	-	-	-	-	-	0,15	1,41	92

Continua

Tabela 12 - Continuação

Nº	t _R (min)	IK _{ob}	IK _{lit}	Composto	%							Similaridade
					PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS	PA	OE	ED	EM	
62	60,8	2526	2524 ³³	diciclohexilftalato	-	-	-	0,11	-	2,61	1,00	97
63	61,5	2554	2546 ⁶	bis(2-etilhexil)ftalato	-	0,14	-	-	-	1,11	-	93
64	62,6	2600	2600 ⁴	hexacosano	-	-	-	-	-	0,42	-	90
65	65,0	2700	2700 ⁴	heptacosano	-	-	-	-	-	0,38	-	93
66	67,3	2800	2800 ⁴	octacosano	-	-	-	-	-	0,42	-	90
67	70,0	2899	2900 ⁴	nonacosano	-	-	-	-	-	0,86	0,21	89
68	78,0	3112	3110 ^{34*}	colesterol	-	-	-	-	-	12,11	4,89	89
Número total de picos analisados					52	53	49	53	88	66	28	-
Número de picos identificados					26	23	20	20	23	35	20	-
Total identificado (%)					75,22	79,14	77,46	41,44	33,83	72,35	19,46	-

¹ IK teórico; ² Habu *et al.*, 1985; ³ Dhanda *et al.*, 2003; ⁴ von Kováts, 1958; ⁵ Machiels *et al.*, 2003; ⁶ Yasuhara *et al.*, 1997; ⁷ Hamm *et al.*, 2004; ⁸ El-Ghorab *et al.*, 2002; ⁹ Beaulieu e Grimm, 2001; ¹⁰ Triqui e Reineccius, 1995; ¹¹ Marongiu *et al.*, 2001; ¹² Pitarokili *et al.*, 2002; ¹³ Rostad e Pereira, 1986; ¹⁴ Karagül-Yüceer *et al.*, 2001; ¹⁵ Berdague *et al.*, 1991; ¹⁶ Sing *et al.*, 1992; ¹⁷ Baranauskiene *et al.*, 2003a; ¹⁸ Svatoz *et al.*, 1999; ¹⁹ Zaikin e Borisov, 2002; ²⁰ Stojanovic *et al.*, 2000; ²¹ Sakho *et al.*, 1997; ²² Peng *et al.*, 1992; ²³ Lee *et al.*, 1991; ²⁴ Aligiannis *et al.*, 2001; ²⁵ Weber, 1986; ²⁶ Mahalwal e Ali, 2003; ²⁷ Ansorena *et al.*, 2001; ²⁸ Spiteller e Spiteller, 1979; ²⁹ Chaves *et al.*, 2003; ³⁰ Flamini *et al.*, 2002a; ³¹ Lazari *et al.*, 2000; ³² Golovnya e Kuzmenko, 1977; ³³ Lourici *et al.*, 1999; ³⁴ Japp *et al.*, 1987. * Coluna utilizada na literatura diferente da utilizada neste trabalho.

Para a espécie *L. intricata* verificou-se a presença de 217 compostos voláteis diferentes. O somatório de compostos identificados através da comparação dos IK e espectros de massas com compostos presentes nas bibliotecas NIST 08, NIST 21 e NIST 107 variaram de 19,46 (EM) a 79,14% (PDMS/DVB) nas amostras analisadas. Alguns compostos como LfAc1, LfAc2, metil tetradecanoato, fitol entre outros, presentes em *L. filiformis*, também foram identificados em *L. intricata*.

5.2.3 *Plocamium brasiliense*

5.2.3.1 Análise de extratos, óleo essencial e compostos extraídos por HS-SPME por CG-EM

A Figura 22 compara os sete cromatogramas obtidos, e a Tabela 13 correlaciona os tempos de retenção de cada pico observado com os respectivos IK e estruturas identificadas, além de indicar sua proporção em cada amostra.

Foram identificados 85 compostos dos 228 picos observados nos sete cromatogramas analisados de *P. brasiliense*. Com exceção da amostra extraída por HS-SPME utilizando fibra de PA, a proporção de substâncias identificadas foi significativa (mais de 50%). Dentre os compostos identificados, terpenos, álcoois, ácidos, compostos halogenados e sulfurados foram encontrados.

Figura 22 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM das amostras extraídas por HS-SPME (PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA), óleo essencial (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) da espécie *Plocamium brasiliense*.

Tabela 13 - Compostos identificados por CG-EM das amostras extraídas por HS-SPME (PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA), óleo essencial (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) da espécie *Plocamium brasiliense*.

Nº	t _R (min)	IK _{ob}	IK _{lit}	Composto	%							Similaridade
					PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS	PA	OE	ED	EM	
1	3,0	-	771 ²	tolueno	-	-	1,29	-	-	-	-	92
2	3,3	-	780 ³	hexanal	0,22	-	3,41	-	-	-	-	94
3	3,7	-	817 ¹	4-hidroxi-2-pentanona	-	-	-	-	2,49	-	-	92
4	3,8	-	831 ¹	furfural	-	1,50	-	-	-	-	-	96
5	4,1	-	852 ⁴	4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	-	-	-	-	37,56	-	-	92
6	4,2	-	852 ²	cloro-benzeno	-	-	-	-	-	0,82	-	95
7	4,6	-	976 ⁵	1-butanol, 3-metil-, acetato	-	-	-	-	-	0,69	-	95
8	5,0	-	932 ¹	1,3-dicloro-2-propanol	-	0,21	-	-	-	-	-	96
9	5,1	-	897 ²	ciclohexanona	-	-	-	-	-	0,28	-	92
10	5,2	902	909 ⁶	butilglicol	-	-	0,48	-	-	-	-	93
11	5,4	908	908 ⁷	1-(2-furanil)-etanona	-	0,31	-	-	-	-	-	98
12	5,6	915	914 ¹	4,5-diidro-2-metil-1H-imidazol	-	0,19	-	-	-	-	-	90
13	6,7	957	958 ⁸	benzaldeído	-	0,68	-	-	-	-	-	97
14	6,8	959	959 ⁹	5-metil-2-furancarboxaldeído	-	1,91	-	-	-	-	-	96
15	7,0	966	967 ¹	glicerina	-	-	-	-	-	-	5,25	94
16	7,2	973	973 ¹⁰	1-octen-3-ol	-	-	0,28	-	-	-	-	85
17	7,4	978	979 ²	fenol	-	0,26	-	-	-	-	-	91
18	7,6	987	987 ¹¹	2-pentil-furan	-	-	0,24	-	-	-	-	89
19	8,0	1001	1000 ⁵	octanal	-	-	0,30	-	-	-	-	90
20	8,3	1008	1008 ¹²	(E,E)-2,4-heptadienal	-	0,15	-	-	-	-	-	94
21	8,9	1024	1024 ¹³	2-etil-1-hexanol	-	-	0,38	-	-	-	-	95
22	9,5	1041	1041 ¹¹	benzenoacetaldeído	-	0,36	-	-	-	-	-	94
23	9,9	1054	1055 ¹³	(E)-2-octenal	-	0,23	0,21	-	-	-	-	90
24	10,4	1066	1066 ¹⁴	2-metil-benzaldeído	-	0,21	0,35	-	-	-	-	88
25	11,7	1102	1102 ¹⁵	nonanal	0,28	0,39	0,57	-	-	-	-	96
26	14,0	1157	1157 ¹⁶	(E)-2-nonenal	-	0,24	-	-	-	-	-	87
27	14,5	1169	1168 ¹⁷	(Z)-2-nonen-1-ol	0,40	0,12	0,34	-	-	-	-	85
28	15,0	1181	1188 ¹⁸	o-acetiltolueno	-	0,24	0,24	-	-	-	-	92
29	16,0	1203	1203 ¹⁹	decanal	0,45	0,37	0,35	-	-	-	-	92
30	18,4	1260	1259 ¹⁶	(Z)-2-decenal	-	0,25	-	-	-	-	-	86
31	20,3	1306	1306 ²⁰	undecanal	-	0,57	-	-	-	-	-	90
32	20,8	1316	1318 ²¹	(E,E)-2,4-decadial	0,50	1,05	0,27	-	-	-	-	85

Continua

Tabela 13 - Continuação

Nº	t _R (min)	IK _{ob}	IK _{lit}	Composto	%							Similaridade
					PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS	PA	OE	ED	EM	
33	22,3	1353	1354 ²²	1,2-diidro-1,1,6-trimetil-naftaleno	-	0,30	-	2,48	-	-	-	85
34	22,7	1363	1364 ²³	2-undecenal	0,29	0,41	-	-	-	-	-	91
35	23,3	1376	1386 ²⁴	1,3,4,5,6,7-hexahidro-1,1,5,5-tetrametil-(2S)-2H-2,4a-metanonaftaleno	0,90	-	-	-	-	-	-	89
36	24,0	1392	1392 ²⁵	β-elemeneno	-	0,45	0,27	-	-	-	-	88
37	24,5	1405	1410 ²⁶	2-dodecanone	-	0,25	-	-	-	-	-	91
38	24,6	1407	1408 ⁵	dodecanal	0,65	1,41	0,68	1,32	-	-	-	87
39	24,9	1414	1396 ²⁷	α-patchouleno	1,30	1,85	1,70	-	-	-	-	89
40	25,5	1428	1427 ²⁸	α-ionona	0,63	0,48	1,02	0,43	-	-	-	92
41	26,8	1462	1462 ²⁹	(-)-aloaromadendreno	4,16	1,10	4,32	0,77	-	-	-	95
42	27,3	1473	1473 ³⁰	1-dodecanol	2,39	2,79	2,54	3,02	-	-	-	90
43	27,9	1487	1485 ³¹	β-ioneno	0,56	-	0,75	-	0,44	-	-	85
44	28,2	1497	1500 ³²	pentadecano	1,39	1,21	2,37	1,06	-	-	-	95
45	28,7	1510	1512 ³³	tridecanal	0,99	1,50	0,38	0,49	-	-	-	89
46	28,9	1513	1513 ³⁴	BHT	0,86	0,60	1,04	0,63	0,66	-	-	88
47	29,3	1525	1525 ³⁵	δ-cadineno	1,67	0,30	1,13	0,34	-	-	-	87
48	29,6	1532	1537 ³⁶	(R)-5,6,7,7a-tetrahidro-4,4,7a-trimetil-2(4H)-benzofuranona	-	-	0,73	0,56	-	-	-	85
49	30,1	1545	1545 ³⁷	α-calacoreno	0,44	0,31	0,43	-	-	-	-	85
50	32,1	1597	1600 ³²	hexadecano	1,56	0,69	1,73	0,92	-	-	-	94
51	32,9	1618	1613 ³⁸	tetradecanal	1,37	0,95	3,14	3,04	-	-	-	93
52	33,9	1646	1646 ³⁹	(-)-δ-cadinol	0,42	0,33	0,69	0,65	-	-	-	87
53	34,5	1660	1661 ⁴⁰	τ-muurolol	-	-	-	-	2,87	-	-	86
54	35,0	1675	1674 ⁴¹	8-heptadeceno	1,24	2,24	0,55	-	-	-	-	88
55	35,6	1692	1696 ⁴²	1-heptadeceno	0,73	0,85	0,79	-	-	-	-	94
56	35,9	1699	1700 ³²	heptadecano	10,18	8,61	14,06	2,47	-	-	-	95
57	36,0	1702	1704 ⁴³	2,6,10,14-tetrametil-pentadecano	1,47	-	-	1,18	-	-	-	85
58	36,4	1714	1714 ¹⁶	pentadecanal	0,82	2,41	-	0,39	-	-	-	91
59	38,4	1769	1768 ¹⁶	ácido tetradecanóico	-	0,99	-	0,51	-	3,80	0,50	90
60	40,9	1844	1844 ⁴⁴	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	-	8,06	-	-	-	1,36	1,57	89
61	41,0	1846	-	PbF1 (ver item 5.2.3.2)	13,35	4,05	6,22	10,16	2,30	-	-	-

Continua

Tabela 13 - Continuação

Nº	t _R (min)	IK _{ob}	IK _{lit}	Composto	%							Similaridade
					PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS	PA	OE	ED	EM	
62	41,7	1868	1863 ⁴⁵	(Z)-9-hexadecen-1-ol	-	4,68	-	-	-	-	-	85
63	41,9	1873	1871 ⁴⁶	diisobutilftalato	-	0,75	1,82	1,85	2,07	0,31	1,73	85
64	43,7	1928	1929 ⁴⁷	ácido hexadecanóico, metil ester	-	-	-	-	-	-	4,53	89
65	44,4	1949	1949 ⁴⁸	isofitol	-	0,52	-	-	-	-	-	88
66	44,7	1958	-	PbF2 (ver item 5.2.3.2)	1,70	0,38	0,83	1,98	-	-	-	-
67	45,0	1967	1967 ⁴⁹	ácido n-hexadecanóico	-	1,23	-	0,49	0,80	13,64	6,48	91
68	46,8	2026	2017 ⁵⁰	isopropil palmitato	-	0,27	-	0,51	-	-	-	94
69	49,3	2107	-	PbF4 (ver item 5.2.3.2)	0,54	-	-	0,67	-	-	-	-
70	49,5	2114	2114 ⁵¹	fitol	-	-	-	-	5,74	3,31	0,42	95
71	50,2	2139	-	PbF3 (ver item 5.2.3.2)	0,33	0,11	-	0,33	-	-	-	-
72	50,3	2143	2141 ³⁵	ácido oléico	-	-	-	-	-	30,28	58,24	96
73	51,0	2166	2167 ¹	trifenilfosfina	-	-	-	-	1,25	-	-	94
74	51,0	2167	2168 ⁵²	ácido octadecanóico	-	0,26	-	-	-	0,66	-	92
75	60,8	2526	2524 ⁵³	diciclohexilftalato	-	-	-	0,15	-	0,45	-	88
76	60,9	2532	-	óxido de trifenilfosfina	-	-	-	-	22,03	-	-	93
77	61,4	2554	2563 ⁵⁴	bis(2-etilhexil)ftalato	-	0,22	-	-	1,38	-	-	85
78	63,5	2637	-	tifenilfosfina sulfito	-	-	-	-	0,88	-	-	96
79	65,1	2703	2703 ¹	1-bromo-tetracosano	-	-	-	-	-	0,47	-	87
80	67,4	2802	2800 ³²	octacosano	-	-	-	-	-	0,46	-	88
81	78,2	3115	3115 ⁵⁵	colesterol	-	-	-	-	-	17,73	-	92
Número total de picos analisados					65	109	87	80	34	25	21	-
Número de picos identificados					30	49	36	24	13	15	8	-
Total identificado (%)					51,79	59,14	55,90	36,40	80,47	74,26	78,72	-

¹ IK teórico; ² Xu *et al.*, 2003; ³ Spadone *et al.*, 1990; ⁴ Timón *et al.*, 1998; ⁵ Maia *et al.*, 2004; ⁶ Olson *et al.*, 1987; ⁷ Dallüge *et al.*, 2002; ⁸ Reverchon *et al.*, 1997; ⁹ Beal e Mottram, 1994; ¹⁰ Masotti *et al.*, 2003; ¹¹ Kovacevic *et al.*, 2002; ¹² Triqui e Reineccius, 1995; ¹³ Dhanda *et al.*, 2003; ¹⁴ Righezza *et al.*, 1996; ¹⁵ Adams, 2000. ¹⁶ Lazari *et al.*, 2000; ¹⁷ Um *et al.*, 1992; ¹⁸ Hamm *et al.*, 2004; ¹⁹ da Silva *et al.*, 1999; ²⁰ Pino *et al.*, 2003; ²¹ Jezussek *et al.*, 2002; ²² Demyttenaere *et al.*, 2003; ²³ Beaulieu e Grimm, 2001; ²⁴ Bougatsos *et al.*, 2003; ²⁵ Zrira *et al.*, 2003; ²⁶ Aaslyng *et al.*, 1998; ²⁷ Marongiu *et al.*, 2001; ²⁸ Tellez *et al.*, 2002; ²⁹ Sagrera-Nieves *et al.*, 1997; ³⁰ Rostad *et al.*, 1986; ³¹ Palmeira *et al.*, 2004; ³² von Kováts, 1958; ³³ Fokialakis *et al.*, 2003; ³⁴ Berdague *et al.*, 1991; ³⁵ Flamini *et al.*, 2002a; ³⁶ Ansorena *et al.*, 2000; ³⁷ Zoghbi *et al.*, 2003; ³⁸ Choi *et al.*, 2002; ³⁹ Tellez *et al.*, 1997; ⁴⁰ Yu *et al.*, 2004; ⁴¹ Soják *et al.*, 1980; ⁴² Zaikin e Borisov, 2002; ⁴³ King *et al.*, 1993; ⁴⁴ Flamini *et al.*, 2002b; ⁴⁵ Marques *et al.*, 2000; ⁴⁶ Weber, 1986; ⁴⁷ Palmeira *et al.*, 2001; ⁴⁸ Palic *et al.*, 2002; ⁴⁹ Javidnia *et al.*, 2003; ⁵⁰ Casoli *et al.*, 1996; ⁵¹ Chaves *et al.*, 2003; ⁵² Zoghbi *et al.*, 1999; ⁵³ Lourici *et al.*, 1999; ⁵⁴ Ramarathnam *et al.*, 1993b; ⁵⁵ Berninger e Möller, 1977. * Coluna utilizada na literatura diferente da utilizada neste trabalho.

5.2.3.2 Determinação estrutural de PbF1 a PbF4

Na busca por identificar um maior número de moléculas de *P. brasiliense*, optou-se por isolar metabólitos cujos espectros não estavam presentes nas bibliotecas NIST utilizadas como ferramenta de identificação por CG-EM. Quando se deseja isolar compostos por métodos tradicionais, devem-se selecionar substâncias com abundância considerável. Devido ao percentual relevante de compostos identificados nos extratos ED e EM, optou-se por realizar outro tipo de extração com um sistema de solvente diferenciado.

O extrato acetona/água (5,0418 g) foi analisado por CLAE ($\lambda = 254$ e $\lambda = 365$ nm) e observados quatro picos majoritários, os quais foram isolados segundo a metodologia descrita no item 4.2.4.4. Os compostos foram isolados nas quantidades de 7 mg, 4 mg, 7 mg e 5 mg para PbF1, PbF2, PbF3 e PbF4, respectivamente e se apresentaram na forma oleosa, levemente esbranquiçada. A pureza destes compostos foi avaliada por CLAE e os cromatogramas obtidos estão comparados na Figura 23.

Figura 23 - Cromatogramas obtidos em CLAE analítico para o extrato acetona/água e compostos isolados (detector de ultravioleta, $\lambda = 256$ nm). Condições cromatográficas: coluna Luna RP18 (25 cm x 2 μ m); fluxo de 0,8 mL/min; fase móvel gradiente 2-100% de acetonitrila em água (15 min), 100% acetonitrila (30 min).

As análises dos quatro componentes isolados de *P. brasiliense* (PbF1 a PbF4) mostraram que as moléculas são os monoterpenos halogenados: 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*E*)-octatrieno; 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*Z*)-octatrieno; 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-

3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*E*)-octatrieno e 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*Z*)-octatrieno, respectivamente (Figura 24). Estes compostos já foram isolados e identificados pelos autores Abreu e Galindro (1996), Mynderse e Faulkner (1975), Naylor *et al.* (1983) e Wessels *et al.* (2000).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos (a), (b) e (c) foram comparados com os apresentados na literatura, já para o composto (d), somente sinais de RMN de ^1H estavam disponíveis. A comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C está descrita na Tabela 14 (espectros de RMN utilizados na determinação estrutural destas moléculas estão apresentados no Anexo C a F).

Figura 24 - Estruturas dos compostos isolados de *Plocamium brasiliense*: (a) 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*E*)-octatrieno (PbF1); (b) 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*Z*)-octatrieno (PbF2); (c) 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*E*)-octatrieno (PbF3) e (d) 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*Z*)-octatrieno (PbF4).

Tabela 14 - Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos PbF1 a PbF4 (400 ou 500 MHz, δ em ppm relativos ao CDCl_3).

3,4-eritro-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(E),7(E)-octatrieno (PbF1)							
^1H	literatura ^a	obtido	calculado	^{13}C	literatura ^a	obtido	calculado
1a	5,41 (d, 1H, $J = 17,0$ Hz)	5,42 (d, $J = 17$ Hz)	5,60	1	116,5	116,8	112,1
1b	5,29 (d, 1H, $J = 10,5$ Hz)	5,29 (d, 1H, $J = 11$ Hz)	5,50	2	139,8	139,6	140,9
2	6,09 (dd, 1H, $J = 17,0$ Hz; $J = 10,6$ Hz)	6,10 (dd, 1H, $J = 17$ Hz; $J = 11$ Hz)	6,28	3	71,8	71,9	82,5
3	-	-	-	4	69,6	69,6	77,4
4	4,58 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz)	4,59 (dd, 1H, $J = 0,5$; $J = 8$ Hz)	4,44	5	124,3	132,1	126,3
5	6,47 (dd, 1H, $J = 16,3$; $J = 8,1$ Hz)	6,49 (dq, 1H, $J = 0,5$; $J = 8$; $J = 16,5$ Hz)	6,23	6	124,2	124,5	124,1
6	6,63 (d, 1H, $J = 16,3$ Hz)	6,63 (d, 1H, $J = 16,5$ Hz)	6,96	7	136,5	136,2	136,1
7	-	-	-	8	132,3	124,1	135,6
8	6,39 (s, 1H)	6,76 (s, 1H)	7,10	9	69,3	69,6	84,6
9	6,76 (s, 1H)	6,39 (s, 1H)	6,50	10	25,4	25,3	20,2
10	1,78 (s, 3H)	1,79 (s, 3H)	1,81				
3,4-eritro-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(E),7(Z)-octatrieno (PbF2)							
^1H	literatura ^b	obtido	calculado	^{13}C	literatura ^c	obtido	calculado
1a	5,38 (d, 1H, $J = 17,0$ Hz)	5,35 (d, 1H, $J = 16$ Hz)	5,51	1	116,4	116,5	112,3
1b	5,25 (d, 1H, $J = 10,5$ Hz)	5,23 (d, 1H, $J = 12$ Hz)	5,52	2	139,3	139,5	141,2
2	6,03 (dd, 1H, $J = 17,0$ Hz; $J = 10,5$ Hz)	6,01 (m)	6,15	3	71,7	71,8	82,5
3	-	-	-	4	68,7	68,8	77,8
4	4,48 (dd, 1H, $J = 7,5$ Hz)	4,48 (d, $J = 8$ Hz)	4,40	5	119,0	119,3	121,0
5	6,31 (m, 1H, $J = 16,6$ Hz; $J = 7,5$ Hz)	6,24	5,76	6	126,6	126,8	128,4
6	6,30 (m, 1H, $J = 16,6$ Hz)	6,29	6,00	7	137,6	137,7	138,3
7	-	-	-	8	130,3	130,4	139,8
8	6,27 (s, 1H)	6,28 (s, 1H)	6,55	9	65,5	65,6	79,0
9	6,90 (s, 1H)	6,90 (s, 1H)	6,51	10	25,1	25,1	19,9
10	1,73 (s, 3H)	1,71 (s, 3H)	1,73				

Continua

Tabela 14 - Continuação

3,4-eritro-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(E),5(E),7(E)-octatrieno (PbF3)							
¹ H	literatura ^b	obtido	calculado	¹³ C	literatura ^d	obtido	calculado
1	6,52 (d, 1H, <i>J</i> = 13,5 Hz)	6,51 (d, 1H, <i>J</i> = 12 Hz)	6,72	1	110,2	110,5	126,6
2	6,40 (d, 1H, <i>J</i> = 13,5 Hz)	6,40 (d, 1H, <i>J</i> = 12 Hz)	6,27	2	138,5	138,7	138,5
3	-	-	-	3	71,4	71,7	81,8
4	4,52 (d, 1H, <i>J</i> = 8,0 Hz)	4,52 (d, 1H, <i>J</i> = 8 Hz)	4,43	4	68,7	69,0	77,1
5	6,43 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,0 Hz; <i>J</i> = 16,5 Hz)	6,43 (dd, <i>J</i> = 8 Hz; <i>J</i> = 16 Hz)	6,17	5	131,3	131,4	125,4
6	6,58 (d, 1H, <i>J</i> = 16,5 Hz)	6,57 (d, <i>J</i> = 16 Hz)	6,99	6	124,5	124,6	124,9
7	-	-	-	7	135,9	136,1	136,2
8	6,33 (s, 1H)	6,70 (s, 1H)	7,18	8	69,5	124,7	136,1
9	6,74 (s, 1H)	6,33 (s, 1H)	6,46	9	124,4	69,7	84,5
10	1,74 (s, 3H)	1,71 (s, 3H)	1,72	10	25,3	25,5	21,1
3,4-eritro-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(E),5(E),7(Z)-octatrieno (PbF4)							
¹ H	literatura ^b	obtido	calculado	¹³ C	literatura	obtido	calculado
1	6,52 (d, 1H, <i>J</i> = 14,0 Hz)	6,51 (d, 1H, <i>J</i> = 12 Hz)	6,66	1	-	110,4	126,5
2	6,38 (d, 1H, <i>J</i> = 14,0 Hz)	6,38 (d, 1H, <i>J</i> = 12 Hz)	6,33	2	-	138,7	137,9
3	-	-	-	3	-	71,8	81,9
4	4,49 (dd, 1H, <i>J</i> = 7,4 Hz)	4,47 (d, 1H, <i>J</i> = 8 Hz)	4,36	4	-	68,5	77,6
5	6,29 (m, 1H, <i>J</i> = 15,6 Hz; <i>J</i> = 7,4 Hz)	6,27 (d, 1H, <i>J</i> = 8 Hz)	5,72	5	-	119,9	119,8
6	6,32 (m, 1H, <i>J</i> = 15,6 Hz)	6,27 (d, 1H, <i>J</i> = 16 Hz)	6,03	6	-	127,6	129,2
7	-	-	-	7	-	137,7	137,6
8	6,28 (s, 1H)	6,28 (s, 1H)	6,63	8	-	129,8	141,5
9	6,90 (s, 1H)	6,90 (s, 1H)	6,46	9	-	65,5	78,9
10	1,74 (s, 3H)	1,74 (s, 3H)	1,68	10	-	25,5	20,4

^a Abreu e Galindo, 1996.; ^b Mynderse e Faulkner, 1975.; ^c Naylor *et al.*, 1983.; ^d Wessels *et al.*, 2000.

* deslocamentos químicos atribuídos de forma trocana na literatura.

PbF1 - 500 MHz; PbF2 - 400 MHz; PbF3 - 400 MHz; PbF4 - 400 MHz.

Os dados de deslocamento químico obtidos para os carbonos das moléculas PbF1 e PbF2 a partir de cálculos computacionais, com algumas exceções, mostraram-se semelhantes aos obtidos experimentalmente e aos constantes na literatura. Para a molécula PbF3, os dados computacionais confirmaram alguns dos dados experimentais e também a representação errônea publicada por Wessels *et al.* (2000).

Com base nas correlações de hidrogênio e carbono apresentadas nos espectros de RMN de HSQC das moléculas PbF1 a PbF4 e também de dados de deslocamentos químicos calculados observou-se que Mynderse e Faulkner (1975) atribuíram erroneamente dois sinais de hidrogênio (H8 e H9) para as moléculas PbF1 e PbF3.

Para PbF1, conforme pode ser observado no espectro de RMN de HSQC (Figura 25), o carbono C9 (δ 69,6 ppm) se correlaciona com o sinal em δ 6,33 ppm e não com o sinal δ 6,70 ppm (literatura: δ 6,73 ppm) como proposto por Mynderse e Faulkner (1975). A mesma observação no espectro de RMN de HSQC de PbF3 (Figura 26) também mostrou a mesma correlação observada em PbF1, justificando a alteração dos deslocamentos químicos para H9.

Figura 25 - Espectro de RMN de HSQC de 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*E*)-octatrieno (PbF1) em CDCl_3 a 500 MHz.

Figura 26 - Espectro de RMN de HSQC de 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*E*)-octatrieno (PbF3) em CDCl₃ a 500 MHz.

Para as moléculas PbF1 e PbF3 a atribuição dos sinais de hidrogênio e carbono das posições 5, 6 e 8 foram mais complicadas. No espectro de RMN de ^1H - ^1H (COSY) de PbF1 observaram-se três correlações importantes entre hidrogênios vizinhos (H1-H2; H4-H5 e H5-H6), sendo estas importantes para a atribuição dos respectivos sinais (Figura 27). Desta forma foi possível observar que o sinal remanescente a δ 6,70 ppm se tratava do H8. Voltando ao espectro de HSQC, foi possível observar as correlações ^1H - ^{13}C e a atribuição dos respectivos carbonos adjacentes (C5, C6 e C8). Para a molécula PbF3, as mesmas correlações no espectro de RMN de COSY foram observadas (Figura 28).

Figura 27 - Espectro de RMN de COSY de 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*E*)-octatrieno (PbF1) em CDCl_3 a 500 MHz.

Figura 28 - Espectro de RMN de COSY de 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*E*)-octatrieno (PbF3) em CDCl_3 a 400 MHz.

Para as moléculas PbF2 e PbF4 as atribuições dos sinais de H9 concordaram com as propostas por Mynderse e Faulkner (1975). As Figuras 29 e 30 mostram os espectros de RMN de HSQC com as respectivas correlações. Os espectros de COSY não contribuíram para as atribuições dos sinais referentes aos H5, H6 e H8, visto que a diferença nos valores dos deslocamentos químicos é muito pequena, ocorrendo sobreposição de sinais (δ 6,24 a 6,29 ppm). A análise dos espectros de RMN de HSQC mostraram que o C5 se correlaciona com o sinal de menor deslocamento químico do sinal multipletto, sendo então atribuído este sinal como o referente a H5 (δ 6,24 ppm para PbF2 e δ 6,27 ppm para PbF4).

Figura 29 - Espectro de RMN de HSQC de 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*Z*)-octatrieno (PbF2) em CDCl_3 a 500 MHz.

Figura 30 - Espectro de RMN de HSQC de 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*Z*)-octatrieno (PbF4) em CDCl_3 a 500 MHz.

A diferença (inversão) nos deslocamentos químicos de δ 6,70 ppm (H8) e δ 6,33 ppm (H9) de PbF1, e de δ 6,28 ppm (H8) δ 6,90 ppm (H9) de PbF2 pode ser explicada de acordo com a configuração das moléculas. A presença de dois cloros ligados ao C9 confere a este carbono uma carga parcial positiva, que pode ser estabilizada pelo efeito de hiperconjugação e por ressonância.

No caso da molécula PbF1, que apresenta a geometria *E* na dupla ligação $\Delta^{7,8}$, a ligação C7-C9 movimenta-se livremente por rotação. Este movimento não é observado para o isômero *Z* (PbF2) devido ao impedimento estérico provocado pelo cloro localizado no mesmo lado do substituinte $-\text{CHCl}_2$ na dupla ligação. Ou seja, a molécula PbF1 apresenta um maior efeito de hiperconjugação para estabilizar a carga parcial positiva do C9 comparado com o efeito observado em PbF2. Além disso, a molécula PbF2, também devido ao impedimento estérico dos três átomos de cloro do mesmo lado da dupla ligação $\Delta^{7,8}$, a ligação π fica deslocada e, por

consequência, não consegue entrar em ressonância, impedindo a estabilização da carga parcial positiva do C9.

Os efeitos de hiperconjugação e de ressonância na estabilização da carga parcial positiva no C9 refletem na diminuição do deslocamento químico do H9 na molécula PbF1. Como estes efeitos são praticamente inexistentes em PbF2, o deslocamento químico de H9 de PbF2 é maior comparado com H9 de PbF1.

Esta mesma linha de raciocínio pode ser usada para explicar a diferença dos deslocamentos químicos de H8 e H9 das moléculas PbF3 e PbF4, uma vez que a única diferença entre as moléculas (PbF1/PbF2 e PbF3/PbF4) é a presença de um átomo de bromo no C1.

A diferença nos deslocamentos químicos do C9 de aproximadamente δ 69 ppm para PbF1 e PbF3, e de aproximadamente δ 65 ppm para PbF2 e PbF4, também pode ser explicada pela configuração da molécula. Segundo Silverstein e Webster (2000), carbonos diretamente ligados a grupos C=C (*Z*) são mais protegidos que aqueles ligados ao grupo estereoisomérico (*E*) por 4-6 ppm, ou seja, o carbono alílico de um (*Z*)-alqueno é observado usualmente em campo mais baixo do que o de um (*E*)-alqueno.

A identificação exata dos halogênios normalmente é a parte mais difícil na elucidação estrutural de monoterpenos marinhos (Naylor *et al.*, 1983). Muitos estudos comparando os deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e de carbono, obtidos por experimentos de RMN, sugeriram estratégias na determinação da estereoquímica de monoterpenos halogenados acíclicos. De acordo com Mynderse e Faulkner (1975) o deslocamento de δ 1,73 ppm em espectros de RMN de ^1H para os hidrogênios ligados ao C10 caracteriza a estereoquímica *R,S* para os carbonos C3-C4 enquanto que δ 1,79 ppm caracteriza *R,R*. A espectroscopia de RMN de ^{13}C tem sido bastante útil na determinação da regioquímica e estereoquímica, sendo melhor que a espectroscopia de RMN de ^1H para este propósito. Crews e Kho-Wiseman (1977) propuseram uma estratégia utilizando os deslocamentos químicos obtidos por RMN de ^{13}C para determinar a estereoquímica de monoterpenos halogenados. O deslocamento químico do C10 de δ 25 ppm é característico de uma configuração *R,S* dos carbonos C3 e C4, já o deslocamento químico de δ 28 ppm, de uma configuração *R,R*.

Mynderse e Faulkner (1975) mostraram que o deslocamento químico do hidrogênio ligado ao C9 pode determinar a configuração (*E*) ou (*Z*) dos substituintes dos C7 e C8. Os resultados dos autores mostraram que os deslocamentos químicos δ 6,73 ppm e δ 6,90 ppm são característicos das configurações (*E*) e (*Z*), respectivamente. De acordo com os resultados obtidos para as quatro moléculas deste trabalho, no qual provamos que o C9 apresenta deslocamento químico na região de δ 65 a 70 ppm, esta teoria apenas sofreria alteração quanto à mudança dos deslocamentos químicos dos hidrogênios H9, sendo o correto, então, valores de 6,33 ppm e δ 6,90 ppm para as configurações (*E*) e (*Z*), respectivamente.

Semelhante comparação dos dados de RMN de ^{13}C também foram propostas por Abreu e Galindro (1996) através da análise dos resultados mostrados por Naylor *et al.* (1983). Os autores concluíram que os carbonos olefínicos C5 e C6 apresentam deslocamentos químicos similares δ 124,3 e δ 124,2 ppm na geometria (*E*), enquanto que estes deslocamentos aparecem em δ 119,0 e δ 126,6 ppm no isômero (*Z*) correspondente. Através dos resultados obtidos nas análises de RMN de COSY e HSQC deste trabalho obteve-se uma nova atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C comparado com os dados de Abreu e Galindro (1996) e Wessels *et al.* (2000). Desta forma, a determinação da geometria (*E*) é observada quando sinais de aproximadamente δ 124 e δ 132 ppm são encontrados para C6 e C5, respectivamente. Já sinais de aproximadamente δ 119 e δ 127 ppm, respectivamente para C5 e C6, são característicos de uma geometria (*Z*).

Deslocamentos químicos semelhantes (δ 124 ppm) para ambos os carbonos C5 e C6 das moléculas com geometria *E*, atribuídos por Abreu e Galindro (1996), também não foram observados por Wessels *et al.* (2000), o qual também relata ter utilizado espectros de RMN de 2D. Os resultados de Wessels *et al.* (2000) dão suporte às observações feitas neste trabalho e à correção dos respectivos sinais de deslocamento químico de ^{13}C e ^1H das moléculas estudadas.

As regras propostas por Mynderse e Faulkner (1975) e Abreu e Galindro (1996), apesar de utilizarem deslocamentos químicos trocados, não promoveram uma determinação errada da regioquímica desta classe de moléculas, mas precisam ser corrigidas na literatura para evitar atribuições errôneas de deslocamentos químicos a outras moléculas com estruturas semelhantes.

Outra forma para a atribuição das geometrias (*Z*) e (*E*) pode ser feita considerando-se os sinais de RMN de ^{13}C do C9, o qual apresenta deslocamento químico de δ 69,6 ppm numa geometria (*Z*), enquanto que o deslocamento químico de C9, numa configuração (*E*), é de δ 65,5 ppm.

Juntamente com a comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos experimentalmente com os apresentados na literatura e com os obtidos por cálculos computacionais, todas as estratégias de RMN para a determinação da regioquímica e estereoquímica foram aplicadas para os compostos isolados (Figura 24). Estas estratégias foram muito úteis na determinação da estrutura de 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*E*)-octatrieno devido à inexistência de dados de RMN de ^{13}C deste composto na literatura.

Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) mostrou picos múltiplos na região do íon molecular, característico de compostos bromados e clorados. Esta multiplicidade de sinais é observada devido à presença de íons moleculares contendo os isótopos ^{37}Cl e/ou ^{31}Br .

O espectro de massas de alta resolução mostrou o mesmo m/z 382,83248 (calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{BrCl}_5$, Anexo G) para os compostos PbF3 a PbF4. Para os compostos PbF1 e PbF2 um m/z de 340,8986 e 340,8987, respectivamente, foi observado (Anexo H e I). Esta massa corresponde a um aduto de cloro calculado para $[\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{Cl}_5 + \text{Cl}]^+$, 340,8986, o qual pode ser observado neste tipo de molécula quando analisadas por HRMS no modo negativo.

A exatidão da massa é um parâmetro chave na eficiência da espectrometria de massas. Para os espectros de massas obtidos de PbF1 a PbF4 o erro em relação à exatidão da massa foi calculado conforme a fórmula descrita no item 4.2.5. Para resultados confiáveis, o erro deve ser entre +10 e -10 ppm (Clauser *et al.*, 1999; Olsen *et al.*, 2005). Neste trabalho, os erros obtidos foram de -0,09, 0,26, -2,85 ppm, para PbF1, PbF2 e PbF3/PbF4, respectivamente.

O espectro de massas de baixa resolução EIMS dos monoterpenos pentaclorados PbF1 e PbF2 mostraram picos base em m/z 89, 91 (3:1) correspondendo ao fragmento (a), ilustrado na Figura 31. Já os compostos PbF3 e PbF4 exibiram picos base em m/z 167, 169, 171 (3:4:1), atribuídos ao fragmento (b) da Figura 31.

Figura 31 - Estruturas dos fragmentos de massas (a) m/z 89, 91 e (b) m/z 167, 169, 171 observados para os compostos PbF1 a PbF4.

Após o isolamento e identificação dos compostos PbF1 a PbF4, compararam-se os respectivos cromatogramas com os das demais amostras (óleo essencial, extratos e HS-SPME). A Figura 32 mostrou que os quatro monoterpênicos halogenados isolados encontram-se presentes nas amostras extraídas por HS-SPME.

Figura 32 - Comparação dos perfis cromatográficos obtidos por cromatografia gasosa de PbF1 a PbF4 em relação a amostra de HS-SPME utilizando fibra de PA de *Plocamium brasiliense*.

5.2.4 *Ochtodes secundiramea*

5.2.4.1 Análise de extratos, óleo essencial e compostos extraídos por HS-SPME por CG-EM

A Figura 33 compara os sete cromatogramas obtidos e a Tabela 15 correlaciona os tempos de retenção de cada pico observado com os respectivos IK e estruturas identificadas, além de indicar sua proporção em cada amostra.

Foram identificados 84 compostos dos 259 picos observados nos sete cromatogramas analisados de *O. secundiramea*. Para esta espécie, o percentual de compostos identificados para cada amostra foi baixo, variando de 1,76 (EM) a

42,11% (OE). O extrato metanólico mostrou uma grande variedade de compostos halogenados, mas que não foram possíveis de serem identificados utilizando a biblioteca disponível no CG-EM. Sabe-se que estes compostos são halogenados, pois apresentaram fragmentação característica indicando perda de cloro e bromo nos respectivos espectros de massas (perdas de massas de 35 e 79). Além disso, foram observados sinais com diferença de duas unidades de massa/carga (m/z), também característico de moléculas com cloro e bromo referentes aos isótopos ^{35}Cl e ^{37}Cl e ^{79}Br e ^{81}Br .

Ainda para a espécie *O. secundiramea*, foram identificados também alcanos, álcoois, aldeídos, BHT, colesterol, entre outras moléculas anteriormente identificadas neste trabalho.

Figura 33 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM das amostras extraídas por HS-SPME (PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA), óleo essencial (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) da espécie *Ochtopes secundiramea*.

Tabela 15 - Compostos identificados por CG-EM das amostras extraídas por HS-SPME (PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS e PA), óleo essencial (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) da espécie *Ochtopes secundiramea*.

Nº	t _R (min)	IK _{ob}	IK _{lit}	Composto	%							Similaridade
					PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS	PA	OE	ED	EM	
1	3,0	-	771 ²	tolueno	-	-	1,98	-	-	-	-	98
2	3,3	-	802 ³	hexanal	-	-	0,39	-	-	-	-	85
3	4,4	-	868 ²	etilbenzeno	-	-	0,66	-	-	-	-	97
4	4,5	-	884 ⁴	<i>p</i> -xileno	-	-	1,10	-	-	-	-	96
5	5,2	902	903 ⁵	2-butoxi-etanol	-	-	0,34	-	-	-	-	93
6	5,9	926	926 ⁶	cumeno	-	-	-	-	-	0,10	-	92
7	6,3	940	961 ¹	2-etil-1-metil-3-propil- ciclobutano	-	-	-	-	2,91	-	-	87
8	6,5	948	946 ⁷	propil-benzeno	-	-	0,14	-	-	-	-	90
9	6,8	957	956 ^{8*}	1-etil-3-metil-benzeno	-	-	0,67	-	-	-	-	94
10	6,9	960	960 ⁹	benzaldeído	-	-	-	-	0,15	-	-	92
11	7,0	966	995 ¹	2-propil-1-pentanol	-	-	-	-	0,30	-	-	85
12	7,2	971	969 ¹⁰	1-butanol, 3-metil-, propanoato	-	-	-	-	2,26	-	-	85
13	7,3	974	954 ²	2-etil-hexanal	-	-	-	-	0,50	-	-	86
14	7,3	976	976 ¹¹	1-octen-3-ol	-	-	-	-	0,51	-	-	97
15	7,3	977	979 ²	fenol	-	-	0,24	-	-	-	-	85
16	7,7	990	958 ¹	β-mirceno	-	-	-	-	0,35	-	-	88
17	7,8	992	998 ¹²	1,2,3-trimetil-benzeno	-	-	0,37	-	-	-	-	94
18	8,3	1008	1003 ¹	2-ciclopentiletanol	-	-	-	-	0,24	-	-	85
19	8,4	1011	1011 ¹³	2,4-heptadienal	-	-	-	-	0,11	-	-	85
20	8,9	1024	1024 ⁵	2-etil-1-hexanol	-	0,24	0,86	-	-	-	-	96
21	9,0	1029	1030 ¹⁴	limoneno	-	-	-	-	0,24	-	-	91
22	9,7	1047	1056 ⁶	1,4-dietil-benzeno	-	-	-	-	0,15	-	-	87
23	10,1	1057	1058 ¹⁵	(<i>E</i>)-2-octenal	-	-	-	-	0,30	-	-	92
24	10,4	1066	1060 ¹⁶	(<i>E</i>)-2-octen-1-ol	-	-	-	-	0,16	-	-	93
25	10,6	1070	1105 ¹	3-ciclohexeno-1-etanol	-	-	-	-	0,15	-	-	85
26	10,7	1075	1077 ¹	2-octin-1-ol	-	0,28	-	-	0,25	-	-	85
27	11,0	1083	1096 ¹	7-octenil-oxirano	-	-	-	-	0,30	-	-	85
28	11,7	1102	1096 ¹⁷	nonanal	-	-	0,25	-	0,17	-	-	95
29	12,6	1123	1110 ¹	2-etenil-1,4-dimetil-benzeno	-	-	-	-	0,64	-	-	95
30	12,8	1128	1118 ^{18*}	2-etenil-1,3-dimetil-benzeno	-	0,22	2,51	-	3,77	0,35	-	95
31	12,9	1131	1136 ¹	<i>trans</i> -3-careen-2-ol	-	-	1,15	-	0,19	-	-	86

Continua

Tabela 15 - Continuação

Nº	t _R (min)	I _{Kob}	I _{Klit}	Composto	%							
					PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS	PA	OE	ED	EM	Similaridade
32	13,9	114	1153 ¹⁵	2,6-nonadienal	-	-	-	-	0,27	-	-	89
33	14,2	1161	1185 ¹	1,2,3,4,4a,5,6,7-octahidro-4a-metil-naftaleno	-	-	-	-	0,33	-	-	85
34	14,4	1166	1166 ¹⁶	<i>p</i> -menta-1,5-dien-8-ol	-	-	-	-	0,12	-	-	86
35	14,9	1178	1184 ¹	5-metileno-6-(1-metiletenil)-3-ciclohexen-1-ol	0,26	0,86	-	0,25	11,75	0,15	-	85
36	15,7	1197	1200 ¹⁹	dodecano	-	-	0,18	-	-	-	-	92
37	16,0	1204	1208 ¹	2,4-dimetil-benzaldeído	-	0,26	0,43	-	0,98	-	-	87
38	17,0	1227	1226 ²⁰	benzotiazol	-	-	-	-	-	0,69	-	94
39	17,4	1237	1236 ¹	4-fenil-3-buten-2-ona	0,26	0,38	-	0,36	0,89	-	-	85
40	18,0	1252	1282 ¹	(<i>E</i>)-1-bromo-3,7-dimetil-2,6-octadieno	-	-	-	-	0,13	-	-	87
41	18,8	1270	1261 ²¹	(<i>E</i>)-2-decenal	-	0,22	-	0,13	1,34	-	-	86
42	19,5	1286	1287 ⁴	<i>p</i> -cimen-7-ol	-	-	0,47	-	0,54	-	-	88
43	19,9	1297	1300 ¹⁹	tridecano	-	0,11	0,29	-	-	-	-	95
44	21,5	1333	1375 ^{22*}	β-maaliemo	1,02	1,09	1,15	0,30	-	-	-	86
45	23,1	1371	1373 ²³	(-)-α-gurjuneno	0,38	0,50	0,54	0,19	-	-	-	85
46	24,2	1397	1400 ¹⁹	tetradecano	-	0,13	0,23	-	-	-	-	96
47	24,6	1408	1408 ²⁴	dodecanal	-	-	0,16	-	-	-	-	95
48	25,5	1428	1427 ²⁵	α-ionona	0,13	-	-	-	-	-	-	85
49	25,9	1438	1453 ¹	bromodureno	2,19	1,53	3,00	2,46	1,67	0,14	-	89
50	26,1	1443	1438 ^{26*}	γ-selineno	2,02	3,03	2,18	2,14	-	0,26	-	86
51	27,3	1473	1473 ²⁷	1-dodecanol	0,14	0,39	0,52	0,20	-	0,60	-	85
52	27,8	1487	1486 ²⁸	β-ionona	0,11	-	0,15	0,10	-	-	-	85
53	28,2	1497	1500 ¹⁹	pentadecano	0,40	0,65	0,31	-	-	-	-	92
54	28,7	1509	1512 ¹⁶	tridecanal	0,18	0,26	-	0,14	-	-	-	90
55	28,9	1514	1518 ²⁹	BHT	-	0,14	-	-	10,09	-	-	96
56	30,4	1553	1580 ¹	ácido mesitilacético	0,43	-	0,82	0,64	-	-	-	86
57	31,3	1574	1570 ¹	1,4-bis(1-bromoetil)-benzeno	1,69	-	-	-	-	-	-	85
58	34,6	1663	1657 ^{30*}	octil éter	-	0,13	-	-	-	-	-	96
59	35,1	1676	1677 ³¹	1-tetradecanol	0,12	0,11	-	-	-	-	-	91
60	35,6	1691	1696 ³²	1-heptadeceno	0,25	0,35	-	-	-	-	-	93
61	35,8	1695	1675 ^{33*}	dodecil acrilato	-	-	-	-	-	0,22	-	86

Continua

Tabela 15 - Continuação

Nº	t _R (min)	IK _{ob}	IK _{lit}	Composto	%							
					PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS	PA	OE	ED	EM	Similaridade
62	35,9	1699	1700 ¹⁹	heptadecano	2,72	2,93	5,28	0,98	-	1,29	-	96
63	36,5	1715	1716 ¹³	pentadecanal	1,33	0,84	-	0,13	0,22	-	-	92
64	38,2	1765	1763 ³⁴	ácido tetradecanóico	0,22	-	-	-	-	0,40	-	93
65	39,4	1799	1800 ¹⁹	octadecano	0,23	0,23	-	-	-	-	-	86
66	40,8	1841	1863 ¹	2-metil-7-octadecino	0,67	0,49	-	-	-	0,61	-	85
67	41,1	1848	1848 ³⁵	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	0,53	-	-	-	-	0,55	-	91
68	41,9	1874	1871 ³⁶	diisobutilftalato	0,60	0,20	-	-	-	2,70	0,82	96
69	43,0	1905	1902 ¹	2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-(1-metilpropil)-fenol	-	-	0,45	-	-	-	-	85
70	45,0	1967	1965 ³⁶	dibutilftalato	-	0,13	-	-	0,13	4,65	-	94
71	45,0	1969	1973 ¹	ácido ftálico, 2-pentil propil éster	1,01	0,49	0,27	0,87	-	7,15	0,94	85
72	45,2	1976	1975 ³⁷	ácido hexadecanóico	2,74	-	-	0,58	-	-	-	93
73	48,9	2093	2094 ⁵	ácido hexadecanóico propil éster	-	-	-	-	-	1,05	-	91
74	49,5	2115	2114 ³⁸	fitol	0,90	-	-	0,14	-	-	-	97
75	51,0	2165	2164 ³⁹	ácido octadecanóico	-	-	-	-	-	0,54	-	90
76	52,0	2200	2200 ¹⁹	docosano	-	0,11	-	-	-	-	-	94
77	54,6	2294	2294 ⁶	propil octadecanoato	-	-	-	-	-	2,29	-	91
78	54,9	2305	2379 ¹	ácido undecanóico isopropil éster, 10-hidroxi-11-morfolin-4-il-	-	1,31	0,19	1,79	-	-	-	92
79	57,5	2401	2400 ¹⁹	tetracosano	-	0,11	-	-	-	0,87	-	94
80	60,4	2513	2511 ¹	4-octadecil-morfolina	-	-	-	1,09	-	-	-	98
81	60,8	2526	2524 ⁴⁰	diciclohexilftalato	-	-	-	0,12	-	1,47	-	97
82	78,0	3112	3110 ⁴¹	colesterol	-	-	-	-	-	1,04	-	91
Número total de picos analisados					88	97	75	71	85	66	10	-
Número de picos identificados					25	29	31	18	33	21	2	-
Total identificado (%)					20,53	17,72	27,28	12,61	42,11	27,12	1,76	-

¹ IK teórico; ² Xu *et al.*, 2003; ³ Yu *et al.*, 2004; ⁴ Pino *et al.*, 2003; ⁵ Dhanda *et al.*, 2003; ⁶ Isidorov *et al.*, 2001a; ⁷ Rembold *et al.*, 1989; ⁸ Gerasimenko e Nabivach, 1990; ⁹ Javidnia *et al.*, 2003; ¹⁰ Isidorov *et al.*, 2001b; ¹¹ Baranauskienė *et al.*, 2003b; ¹² Fernando e Grün, 2001; ¹³ Beaulieu e Grimm, 2001; ¹⁴ Mimica-Dukic *et al.*, 2003; ¹⁵ Kirchhoff e Schieberle, 2002; ¹⁶ Skaltsa *et al.*, 2003; ¹⁷ Zoghbi *et al.*, 2003; ¹⁸ Svob e Deur-Siftar, 1974; ¹⁹ von Kováts, 1958; ²⁰ Rostad e Pereira, 1986; ²¹ Boulanger *et al.*, 1999; ²² Bezerra *et al.*, 2002; ²³ Marongiu *et al.*, 2001; ²⁴ Maia *et al.*, 2004; ²⁵ Tellez *et al.*, 2002; ²⁶ Adedeji *et al.*, 1991; ²⁷ Javidnia *et al.*, 2002; ²⁸ Flamini *et al.*, 2003c; ²⁹ Ansorena *et al.*, 2001; ³⁰ Peng, 2000; ³¹ Demyttenaere *et al.*, 2003; ³² Zaikin e Borisov, 2002; ³³ Horna *et al.*, 1985; ³⁴ Sakho *et al.*, 1997; ³⁵ Fokialakis *et al.*, 2003; ³⁶ Weber, 1986; ³⁷ Boulanger e Crouzet, 2000; ³⁸ Chaves *et al.*, 2003; ³⁹ Flamini *et al.*, 2002a; ⁴⁰ Lourici *et al.*, 1999; ⁴¹ Japp *et al.*, 1987. * Coluna utilizada na literatura diferente da utilizada neste trabalho.

A identificação dos COV das espécies estudadas utilizando CG-EM mostrou a presença de ftalatos. Estes compostos são usados como plastificantes em vários produtos industriais, incluindo artigos de laboratório como reagentes, solventes e outros materiais (Staples *et al.*, 2000), fazendo-se pensar que tivesse havido uma contaminação durante os processos de extração e análise, ou absorção pelas algas destes compostos, supostamente presentes no ecossistema. Mas estudos realizados por Chen (2004), o qual cultivou a alga vermelha *Bangia atropurpurea* em água do mar artificial, livre de contaminações por solventes e de acúmulo de impurezas ambientais, mas na presença de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, mostraram que a alga incorporou ^{14}C como fonte de carbono, sintetizando ftalatos, provando que estes não são impurezas absorvidas do ambiente aquático.

A presença de ftalatos também foi observada nas espécies *Undaria pinnatifida*, *Laminaria japonica*, *Ulva sp.* (Namikoshi *et al.*, 2006), *Sargassum confusum* (Ganti *et al.*, 2006), *Sargassum wightii* (Sastry e Rao, 1995), *Corallina granifera* (Stefanov *et al.*, 1988) e *Corallina officinalis* (Awad *et al.*, 2003).

Além disso, eliminando a suspeita destes ftalatos serem oriundos de contaminação do processo de extração, principalmente nas amostras OE, ED e EM, todos os ftalatos observados nas espécies de estudo deste trabalho foram encontradas nas amostras extraídas por HS-SPME, ou seja, um processo de extração que não envolve a utilização de material plástico e solventes.

A presença de colesterol nas espécies *L. intricata*, *P. brasiliense* e *O. secundiramea* deste trabalho não chamou atenção, visto que já era conhecido que o colesterol e alguns de seus derivados são comuns na maioria das espécies pertencentes ao filo Rhodophyta (Fattorusso *et al.*, 1975; Gibbons *et al.*, 1967; Govindan *et al.*, 1993; Idler *et al.*, 1968; Idler e Wiseman, 1970).

Vários dos compostos identificados nas espécies deste trabalho já foram relatados anteriormente em algas. Dentre elas podem-se destacar alguns alcanos, benzaldeído, hexanal, octanal, nonanal, decanal, tridecanal, tetradecanal, pentadecanal, metil tetradecanoato, metil hexadecanoato, ácido tetradecanóico, ácido hexadecanóico, ácido oléico, ácido octadecanóico, fitol, isofitol, limoneno, β -elemeno, *p*-xileno, fenol, derivados do cadineno, do cadinol, do azuleno e da ionona (Gressler *et al.*, 2009).

Alguns compostos conhecidamente tóxicos como o dibutilftalato (TDL_0 140 mg/Kg oral, humanos; CETESB, 2001), bis-(2-etilhexil)ftalato (DL_{50} 15-31 mg/Kg, oral, rato; CETESB, 2001), fenol (TDL_0 5714 mg/Kg, oral, humanos; TOXNET-ChemIDplus Lite), benzaldeído (DL_{50} 1300 mg/Kg, oral, rato; TOXNET-ChemIDplus

Lite) foram identificados nas algas deste estudo. Mas considerando os rendimentos dos óleos essenciais e extratos obtidos em relação ao material *in natura*, o potencial tóxico promovido por estas substâncias presentes nas algas torna-se irrelevante.

Apesar de não ter sido utilizadas técnicas para a identificação do ácido domóico, ácido caínico e ácido *N*-metil-D-aspartico, segundo Sato *et al.* (1996) os mesmos encontram-se em baixas quantidades em algas vermelhas (ácido domóico 0,1 a 2,9 mg/Kg de massa seca; ácido caínico 1,0-276,0 mg/kg de massa seca; e *N*-metil-D-aspartico 1,0 mg/Kg de massa seca), portanto apresentam baixos riscos de intoxicação.

Os picos correspondentes a siloxanos foram considerados impurezas do processo de extração (septo utilizado para vedar os frascos de *headspace*) ou de análise (septo do injetor ou sílica da coluna cromatográfica), apesar de não terem sido observados em todas as amostras.

5.3 Avaliação do potencial biológico

5.3.1 Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de óleos, extratos e substâncias isoladas

5.3.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

5.3.1.1.1. Veículos de dissolução das amostras

Diferentes veículos (Tabela 16) foram testados de acordo com a necessidade de solubilização das amostras teste. Para isso, no lugar da amostra, colocou-se apenas o volume do sistema de solvente (50 µL) e avaliou-se o crescimento dos microrganismos. Ambos os sistemas de solventes não inibiram o crescimento das cepas utilizadas neste trabalho, sendo estes adequados para a realização dos testes.

Tabela 16 - Veículos possíveis para a realização dos testes de Concentração Inibitória Mínima.

Veículo	MeOH (%)	DMSO (%)	Tween 80 (%)	Água (%)
1	10	-	2	88
2	-	10	2	88
3	-	-	-	100
4	-	-	2	98

5.3.1.1.2 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, extratos e substâncias isoladas

Os óleos essenciais, extratos e as substâncias LfAc1 e LfAc2 foram avaliados quanto à sua atividade antimicrobiana nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,625 µg/mL, em triplicata. Para estas concentrações, nenhuma atividade

antibacteriana e antifúngica foi observada nas amostras testadas frente aos microrganismos disponíveis.

Os monoterpenos PbF1 a PbF4 não foram testados devido à pequena quantidade isolada. Dados de potencial antimicrobiano para a molécula PbF3 foram encontrados na literatura. Esta molécula proporciona uma inibição de 2 mm (50 µg) frente à bactéria *Bacillus mageterium* (Wessels *et al.*, 2000), indicando que esta série de compostos pode apresentar atividades antimicrobianas relevantes, sendo interessantes a continuidade dos estudos.

5.3.2 Determinação da atividade antioxidante *in vitro* de óleos, extratos e substâncias isoladas

5.3.2.1 Método do DPPH

O óleo essencial (OE) e os extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) das espécies coletadas foram testados. A Figura 34 mostra os gráficos comparativos dos percentuais de inibição dos óleos essenciais e dos extratos para cada espécie. Dados numéricos dos percentuais de atividade encontram-se no Anexo J.

Figura 34 - Atividade antioxidante do óleo essencial e dos extratos das algas *Laurencia filiformis*, *Laurencia intricata*, *Plocamium brasiliense* e *Ochtopes secundiramea*, comparados com a Vitamina E pelo método do DPPH.

Para o cálculo da Concentração Inibitória de 50% (IC₅₀) utilizou-se a fórmula obtida da regressão linear ($R^2 > 0,9$) das curvas de porcentagens de inibição. Os valores encontrados (< 500 µg/mL) e/ou estimados (> 500 µg/mL) de IC₅₀ estão dispostos na Tabela 17. Embora não seja usual estimar os valores de IC₅₀, estes dados foram usados apenas para facilitar a comparação dos resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 17 - Valores encontrados/calculados de IC₅₀ do potencial antioxidante dos óleos essenciais (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) pelo método do DPPH.

Espécie	Amostra	IC ₅₀ (µg/mL)
<i>Laurencia filiformis</i>	OE	3790,3
	ED	340,9
	EM	1585,3
<i>Laurencia intricata</i>	OE	1960,1
	ED	1241,4
	EM	1213,1
<i>Plocamium brasiliense</i>	OE	1592,9
	ED	1060,7
	EM	1549,1
<i>Ochtodes secundiramea</i>	OE	1896,4
	ED	775,2
	EM	1281,1

Os resultados obtidos mostraram que os OE são menos ativos que os extratos. Com exceção da espécie *L. intricata*, os ED apresentaram maior potencial antioxidante. No caso de *L. filiformis*, uma diferença acentuada de potencial foi observada entre as três amostras, sendo o ED aproximadamente quatro vezes mais potente que o EM e onze vezes mais potente que o OE. Os ED e EM da espécie *L. intricata* apresentaram atividade bastante semelhante. Já para *O. secundiramea*, o ED mostrou-se aproximadamente duas vezes mais potente que o EM e três vezes mais potente que o OE.

Para a espécie *L. filiformis*, enquanto o extrato mais ativo foi o diclorometano requerendo aproximadamente 0,341 mg/mL de extrato para inibição de 50% do radical DPPH, a vitamina E necessitou de apenas 0,0274 mg/mL, ou seja, aproximadamente doze vezes menos para inibir a mesma quantidade do radical. Este ensaio é frequentemente aplicado à análise de extratos provenientes das mais diversas fontes e se mostrou, mais uma vez, aplicável às amostras de algas deste trabalho.

Este teste de avaliação do potencial antioxidante também foi aplicado aos dois sesquiterpenos isolados (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6β-ol e (-)-silfiperfolan-7β-ol. A Figura 35 mostra o gráfico comparativo dos percentuais de inibição e a Tabela 18 mostra os dados numéricos destes potenciais.

Figura 35 - Atividade antioxidante de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol (LfAc1) e (-)-silfiperfolan-7 β -ol (LfAc2) isolados do óleo essencial de *Laurencia filiformis*, comparados com o respectivo óleo essencial e com a vitamina E, pelo método do DPPH.

Tabela 18 - Potenciais de inibição antioxidante encontrados ($\pm$ desvio padrão) para (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol (LfAc1) e (-)-silfiperfolan-7 β -ol (LfAc2) isolados de *Laurencia filiformis* comparados com o potencial do óleo essencial (OE) pelo método do DPPH.

Concentração (µg/mL)	OE	(-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol (LfAc1)	(-)-silfiperfolan-7 β -ol (LfAc2)
5	1,4 $\pm$ 0,7	8,0 $\pm$ 0,7	12,1 $\pm$ 0,5
50	2,5 $\pm$ 1,2	13,4 $\pm$ 0,3	16,2 $\pm$ 0,3
100	3,8 $\pm$ 1,2	15,6 $\pm$ 0,8	18,4 $\pm$ 0,3
250	4,9 $\pm$ 2,8	20,7 $\pm$ 0,0	22,7 $\pm$ 2,3
500	8,1 $\pm$ 0,4	27,5 $\pm$ 1,2	30,3 $\pm$ 0,7

Conforme esperado, devido à semelhança estrutural entre eles, os dois sesquiterpenos apresentaram uma IC₅₀ bastante similar. Comparando-se os valores de IC₅₀ do OE de *L. filiformis* (3790,3 µg/mL) e dos sesquiterpenos (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol (2171,3 µg/mL) e (-)-silfiperfolan-7 β -ol (2367,0 µg/mL), observou-se um potencial antioxidante aparentemente maior para as moléculas isoladas. Levando-se em consideração que estas moléculas representam 61,67% do OE, quando foram avaliadas isoladamente, o aumento observado da IC₅₀ foi de aproximadamente 40%. Desta forma, o aumento do potencial antioxidante deu-se apenas devido ao aumento da concentração da substância na amostra teste.

A metodologia aplicada mostra-se útil para a investigação de compostos capazes de capturar radicais livres. Entretanto, a formação de radicais livres intermediários de compostos oxidados, os quais podem se tornar importantes propagadores de reações radicalares em cadeia, não pode ser detectada por este método (Okawa *et al.*, 2001). Visando a corroborar estes dados, os óleos e extratos

foram ensaiados utilizando-se o modelo enzimático experimental (H_2O_2 /luminol/HRP) para análises antioxidantes.

5.3.2.2 Método de quimioluminescência

O óleo essencial (OE) e os extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) das quatro espécies coletadas foram testados. A Figura 36 mostra os gráficos comparativos dos percentuais de inibição dos OE e dos extratos. A Tabela 19 mostra os dados de IC_{50} ($R^2 > 0,9$) encontrados ($< 500 \mu\text{g/mL}$) e/ou estimados ($> 500 \mu\text{g/mL}$) para cada amostra testada. Dados numéricos dos percentuais de atividade encontram-se no Anexo K.

Figura 36 - Atividade antioxidante do óleo essencial e dos extratos das algas *Laurencia filiformis*, *Laurencia intricata*, *Plocamium brasiliense* e *Ochtodes secundiramea*, comparados com a N-acetil-L-cisteína, pelo método de quimioluminescência (H_2O_2 /luminol/HRP).

Tabela 19 - Valores encontrados/calculados de IC₅₀ do potencial antioxidante dos óleos essenciais (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) pelo método de quimioluminescência (H₂O₂/luminol/HRP).

Espécie	Amostra	IC ₅₀ (µg/mL)
<i>Laurencia filiformis</i>	OE	-
	ED	48,5
	EM	-
<i>Laurencia intricata</i>	OE	147,2
	ED	58,0
	EM	95,9
<i>Plocamium brasiliense</i>	OE	297,6
	ED	-
	EM	634,7
<i>Ochtodes secundiramea</i>	OE	296,6
	ED	153,7
	EM	519,4

Os resultados obtidos mostram que o OE das espécies *O. secundiramea* e *P. brasiliense* apresentam potenciais antioxidantes muito semelhantes (IC₅₀ de 296,6 e 297,6 µg/mL). Uma variação um pouco mais acentuada foi observada quando analisados pelo método do DPPH (1986,4 e 1692,9 µg/mL), mas ambos os métodos mostraram que estes óleos são mais ativos que o de *L. filiformis*.

Pelos dois métodos analisados, a espécie *L. intricata* apresentou um potencial antioxidante maior que a espécie *L. filiformis*. Estes resultados são aceitáveis, visto que a análise dos compostos por CG-EM mostrou que as duas espécies apresentam composições químicas bastante diferenciadas.

Para o OE de *P. brasiliense*, não foram encontradas evidências na literatura sobre potenciais antioxidantes das moléculas de maior abundância (22,03% de óxido de trifenilfosfina e 37,56% de 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona). Entretanto, sabe-se que o BHT (di-terc-butil-metil fenol), encontrado no OE desta espécie, é conhecido como um potente antioxidante sintético e natural (Gómez, 1993; Ito, 1986; Huang e Wang, 2004). Desta forma, o potencial de atividade antioxidante observado provavelmente se dá pela ação do BHT e outras moléculas menos abundantes do óleo. Já para o OE de *L. filiformis*, o potencial menor é atribuído à grande proporção (61,67%) das moléculas pouco ativas (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6β-ol e (-)-silfiperfolan-7β-ol.

Comparando os resultados obtidos entre os dois métodos de avaliação antioxidante, observou-se certa correlação entre eles, mostrando que ambos são aplicáveis para avaliações de potenciais em amostras complexas. O sistema H₂O₂/luminol/HRP, no entanto, por produzir alta emissão de luz, mostra-se mais

sensível e, desta forma, gera percentuais de inibição mais elevados (Hirayama *et al.*, 1997).

Os ED de todas as espécies testadas mostraram um maior potencial antioxidante frente aos dois métodos de análise utilizados. Para *L. filiformis*, apenas 17,11% da composição deste extrato foi identificada (Tabela 8). Estes resultados estimulam contínuos estudos com este extrato, pois são promissores na busca de substâncias com esta atividade. Analisando a composição do ED de *P. brasiliense*, um teor de aproximadamente 30% de ácido oléico e 13% de ácido hexadecanóico foi observado. Esta alta proporção de ácidos graxos concorda com o baixo potencial antioxidante observado para este extrato, visto que ácidos graxos aumentam a geração de espécies reativas de oxigênio e reduzem a atividade de enzimas antioxidantes (Azevedo-Martins e Curi, 2008). Para a espécie *O. secundiramea*, a baixa proporção de compostos identificados torna difícil a discussão sobre o potencial antioxidante observado. Pode-se inferir, no entanto, que o BHT (cuja proporção foi de 10% no ED) atua como antioxidante nos métodos testados. Já para o EM, cuja IC₅₀ estimada foi relativamente elevada para ambos os métodos de análise, parece não apresentar grandes proporções de compostos antioxidantes.

Levando em consideração os potenciais antioxidantes obtidos e as respectivas composições químicas das amostras analisadas, o OE e o ED de *L. intricata* mostram-se mais promissores na busca por novas substâncias antioxidantes.

A atividade antioxidante pelo método de quimioluminescência também foi avaliada nos dois sesquiterpenos isolados (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol e (-)-silfiperfolan-7 β -ol. A Figura 37 mostra o gráfico comparativo dos percentuais de inibição e a Tabela 20 mostra os dados numéricos destes potenciais.

Figura 37 - Atividade antioxidante de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol (LfAc1) e (-)-silfiperfolan-7 β -ol (LfAc2) isolados do óleo essencial de *Laurencia filiformis*, comparados com o respectivo óleo essencial e com a *N*-acetil-*L*-cisteína, pelo método de quimioluminescência (H₂O₂/luminol/HRP).

Tabela 20 - Potenciais de inibição antioxidante encontrados ($\pm$ desvio padrão) para (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol (LfAc1) e (-)-silfiperfolan-7 β -ol (LfAc2) isolados da alga *Laurencia filiformis* comparados com o potencial do óleo essencial (OE) pelo método de quimioluminescência (H₂O₂/luminol/HRP).

Concentração (µg/mL)	OE	(-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol (LfAc1)	(-)-silfiperfolan-7 β -ol (LfAc2)
5	2,1 $\pm$ 1,2	2,6 $\pm$ 1,6	2,9 $\pm$ 1,9
50	4,7 $\pm$ 3,4	5,5 $\pm$ 2,7	4,8 $\pm$ 3,8
100	8,2 $\pm$ 1,3	14,1 $\pm$ 6,8	7,6 $\pm$ 5,6
250	12,5 $\pm$ 1,9	25,3 $\pm$ 2,2	15,3 $\pm$ 4,8
500	14,9 $\pm$ 1,5	34,6 $\pm$ 5,7	22,4 $\pm$ 3,0
IC ₅₀	-	921,6	1494,1

Comparando-se os IC₅₀ do OE de *L. filiformis* e dos sesquiterpenos (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol (921,6 µg/mL) e (-)-silfiperfolan-7 β -ol (1494,1 µg/mL), observou-se, assim como no método do DPPH, um potencial antioxidante maior para as moléculas isoladas.

Os baixos potenciais antioxidantes observados (por ambos os métodos, DPPH e quimioluminescência) do OE de *L. filiformis* e das substâncias majoritárias do mesmo, (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol e (-)-silfiperfolan-7 β -ol, podem ser esperados devido às respectivas estruturas químicas apresentadas, as quais não possuem possibilidades de conjugação de elétrons, e apresentam apenas um grupo funcional (-OH) capaz de doar hidrogênio.

5.4 Lipídeos totais

Os conteúdos de lipídeos totais extraídos das quatro espécies estudadas, de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.8, estão apresentados na Figura 38.

Figura 38 - Percentual de lipídeos totais (peso seco, n=3) nas espécies *Laurencia filiformis* (L.f.), *Laurencia intricata* (L.i.), *Plocamium brasiliense* (P.b.) e *Ochtodes secundiramea* (O.s.).

A quantidade de gorduras extraídas variou entre as espécies, mostrando diferentes capacidades de acumular lipídeos. Com exceção da espécie *L. filiformis*, que mostrou um teor de lipídeos de 6,2%, as demais espécies mostraram baixo teor de gorduras (< 4%), quantidade normalmente encontrada para espécies de algas vermelhas na literatura (Herbreteau *et al.*, 1997; Robledo e Pelegrin, 1997; McDermid e Stuercke, 2003). Os dados obtidos para lipídeos totais apresentam certa semelhança de proporção com os resultados de extração de óleos essenciais e extratos diclorometano (frações gordurosas) obtidos.

5.5 Ácidos graxos

O ensaio de avaliação da composição de ácidos graxos foi realizado segundo metodologia descrita no item 4.2.9. *L. filiformis*, *L. intricata*, *P. brasiliense* e *O. secundiramea* foram testadas e os resultados das análises estão apresentados na Tabela 21.

O ácido palmítico (C16:0) foi o ácido de maior abundância encontrado nas espécies testadas em uma quantidade de 49,52, 39,74, 50,53 e 50,41% para *L. filiformis*, *L. intricata*, *P. brasiliense* e *O. secundiramea*, respectivamente. O segundo ácido graxo mais abundante variou entre as espécies. Para *L. filiformis* e *P. brasiliense* o ácido graxo saturado C14:0 representou 10,84% da composição de *L. filiformis* e 18,27% de *P. brasiliense*. A espécie *L. intricata*, apresentou como segundo ácido graxo majoritário o C20:5 (21,79%) e a espécie *O. secundiramea* apresentou o ácido graxo *trans*, C18:1c, com 20,66%.

O composto majoritário varia entre as espécies do gênero *Laurencia* (Li *et al.*, 2002; Wahbeh, 1997). Os resultados obtidos para *L. filiformis* e *L. intricata* estão de acordo com os apresentados por Li *et al.* (2002), sendo o ácido palmítico como o ácido graxo saturado mais abundante. Já para os ácidos graxos poliinsaturados, os resultados obtidos são coerentes com os apresentados por Wahbeh (1997), sendo o ácido eicosapentanoico como o de maior abundância nas algas testadas *L. filiformis* (9,64%) e *L. intricata* (21,79%).

Comparando-se os resultados obtidos e os resultados apresentados na literatura para o gênero *Plocamium*, observaram-se algumas diferenças significativas. Khotimchenko *et al.* (2002) relatam como majoritários os ácidos graxos C18:1 (12,5%), C20:4 (10,4%) e C20:5 (37,2%) para a espécie *P. violaceum*, e Guest *et al.* (2009) comentam uma maior abundância de C14:0 (9,5%), C16:1n-7 (2,6%) e C20:3n-3 (3,4%) para *P. angustum*. Já a espécie brasileira, *P. brasiliense*, não apresentou o ácido graxo C20:3n-3, e quantidades inferiores de C18:1, C20:4, C20:5 e C16:1n-7 (3,2, 6,5, 8,6 e 1,1%, respectivamente). Para a espécie *O. secundiramea* nenhum dado da composição de ácidos graxos foi encontrado na literatura.

As algas marinhas são ricas em ácidos graxos essenciais ($\omega 3$ e $\omega 6$), também chamados de PUFA's (polyunsaturated fatty acids) (Connor, 2000). Os PUFA's são importantes para a saúde humana e animal e, por não serem biossintetizados pelos mamíferos, devem ser obtidos através da alimentação (Darcy-Vrillon, 1993; Khotimchenko, 2005).

Para as espécies estudadas, as proporções $\omega 3/\omega 6$ encontradas foram: 1,1 (*L. filiformis*), 1,1 (*L. intricata*) e 4,0 (*O. secundiramea*). Já a espécie *P. brasiliense* apresentou quantidades de ácidos graxos $\omega 3$ inferiores ao de $\omega 6$, resultando numa proporção $\omega 3/\omega 6$ de 0,7, não sendo, portanto, uma boa escolha como fonte nutricional.

Tabela 21 - Composição de ácidos graxos de *Laurencia filiformis* (L.f.), *Laurencia intricata* (L.i.), *Plocamium brasiliense* (P.b.) e *Ochtodes secundiramea* (O.s.) (mg/g de peso seco, n=3).

Ácidos graxos (AG)	L.f.	L.i.	P.b.	O.s.
Ácidos graxos (mg/g)				
Saturados				
4:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8:0	0,8 ± 0,1	n.d.	n.d.	n.d.
10:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
11:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12:0	0,1 ± 0,0	n.d.	0,1 ± 0,0	n.d.
14:0	0,9 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,1 ± 0,0
15:0	n.d.	n.d.	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0
16:0	4,1 ± 0,1	3,1 ± 0,2	4,7 ± 0,1	6,1 ± 0,1
17:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18:0	0,1 ± 0,0	n.d.	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1
20:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
23:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total	6,0 ± 0,1	3,7 ± 0,2	6,9 ± 0,1	8,0 ± 0,0
Monoinsaturados				
14:1 (ω5)	0,1 ± 0,0	n.d.	n.d.	n.d.
15:1 (ω5)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16:1 (ω7)	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
17:1 (ω7)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18:1c (ω9)	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,0	2,5 ± 0,1
20:1 (ω9)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22:1 (ω9)	0,1 ± 0,0	n.d.	n.d.	n.d.
24:1 (ω9)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,4 ± 0,0	2,6 ± 0,1
Poliinsaturados				
18:2c (ω6)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
18:3 (ω3)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18:4 (ω3)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20:2 (ω6)	n.d.	n.d.	0,1 ± 0,0	n.d.
20:3 (ω3)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20:3 (ω6)	0,2 ± 0,0	n.d.	0,3 ± 0,2	n.d.
20:4 (ω6)	0,4 ± 0,1	1,5 ± 0,2	0,6 ± 0,3	n.d.
20:5 (ω3)	0,8 ± 0,2	1,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0
22:2 (ω6)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22:6 (ω3)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total	1,4 ± 0,3	3,3 ± 0,3	1,9 ± 0,5	1,0 ± 0,0
Trans				
18:1t (ω9)	0,2 ± 0,1	n.d.	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,1
18:2t (ω6)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total AG	8,3 ± 0,1	7,8 ± 0,5	9,3 ± 0,6	12,1 ± 0,3
ω3/ω6 (mg/g)	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,1	0,7 ± 0,1	4,0 ± 0,0
% saturados	72,3 ± 2,9	50,6 ± 0,5	74,1 ± 4,1	66,1 ± 1,3
% monoinsaturados	8,5 ± 0,2	10,5 ± 0,1	4,3 ± 0,1	21,5 ± 0,1
% poliinsaturados	16,7 ± 2,0	38,9 ± 0,6	20,4 ± 4,4	8,3 ± 0,1
% trans	2,4 ± 0,8	-	1,1 ± 0,2	4,1 ± 0,1

n.d. não detectado

5.6 Proteínas

O método de determinação do teor de proteínas solúveis utilizado envolve a adição de um corante acidificado (Coomassie® brilliant blue, G-250) à solução de proteína. A interação entre a proteína e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em $\lambda = 595 \text{ nm}$. A comparação dos dados de absorvância das amostras (medida espectrofotometricamente em $\lambda = 595 \text{ nm}$) com a curva padrão promoveu a determinação relativa da concentração de proteínas.

A curva padrão obtida para as concentrações de 2 a 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Albumina Sérica Bovina (BSA) mostrou uma linearidade significativa ($R^2 = 0,9671$), Figura 39. Os resultados da determinação de proteína das quatro espécies estudadas estão apresentados na Tabela 22.

Figura 39 - Curva padrão de Albumina Sérica Bovina (BSA) utilizada na determinação da concentração relativa de proteínas.

Tabela 22 - Percentual de proteína (peso seco, $n=3$) nas espécies estudadas, $\pm$ desvio padrão.

Espécie	Proteínas (%)
<i>Laurencia filiformis</i>	$18,3 \pm 0,4$
<i>Laurencia intricata</i>	$4,6 \pm 0,0$
<i>Plocamium brasiliense</i>	$15,7 \pm 0,3$
<i>Ochtodes secundiramea</i>	$10,1 \pm 0,0$

O teor de proteínas variou consideravelmente entre as espécies (4,6 a 18,3%). Estes resultados estão de acordo com a literatura (McDermid *et al.*, 2003; Dawczynski *et al.*, 2007), que relata frações de 2,7 a 47% (em relação ao peso seco) para algumas algas vermelhas. Para as espécies do gênero *Laurencia*, observou-se uma variação acentuada da fração protéica, compatível com dados já apresentados

na literatura (McDermid *et al.*, 2003; Renauld *et al.*, 2006; Wahbeh, 1997). Esta diferença pode ser esperada devido ao gênero apresentar grande variedade morfológica e química (Erickson, 1983, in Scheuer, 1983).

L. filiformis e *P. brasiliense* apresentaram valores relativamente altos de proteínas (18,3 e 15,7%, respectivamente, em relação ao peso seco) e, desta forma, podem ser consideradas como fonte potencial de proteínas para os mais diversos fins. Mas, a qualidade como fonte de proteínas também deve levar em consideração a composição de aminoácidos.

5.7 Aminoácidos

Os níveis de aminoácidos encontrados nas espécies estudadas variaram entre 6,7 e 12,8%. A composição de aminoácidos está ilustrada na tabela a seguir (Tabela 23).

A composição de aminoácidos de algas tem sido frequentemente estudada e comparada com outros alimentos. Para a maioria das algas, os ácidos aspártico e glutâmico juntos, constituem a maior parte da fração de aminoácidos. Munda (1977) descreve que estes dois aminoácidos podem representar de 22 a 44% do total de aminoácidos.

Nas quatro espécies estudadas, as quantidades de ácido aspártico e glutâmico foram expressivas, 25,7, 28,4, 24,2 e 23,4% para *L. filiformis*, *L. intricata*, *P. brasiliense* e *O. secundiramea*, respectivamente. Estudos anteriores descritos por Lewis (1975) mostraram conteúdos de ácido aspártico e glutâmico similares aos obtidos para espécies do gênero *Laurencia* (15,1 a 27,3%).

Todos os aminoácidos, essenciais (metionina, leucina, isoleucina, lisina, fenilalanina, tirosina, arginina, cisteína, treonina e valina) e não essenciais (triptofano, histidina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, prolina, glicina e alanina) estiveram presentes nas algas. A razão aminoácidos essenciais/total de aminoácidos para as espécies foi em torno de 0,5, mostrando que aproximadamente 50% dos aminoácidos presentes nas algas de estudo são aminoácidos essenciais.

Tabela 23 - Composição de aminoácidos de *Laurencia filiformis* (L.f.), *Laurencia intricata* (L.i.), *Plocamium brasiliense* (P.b.) e *Ochtodes secundiramea* (O.s.) (% em peso seco, $\pm$ desvio padrão, n=3).

Aminoácidos		L.f.	L.i.	P.b.	O.s.
% de Aminoácido (peso seco, n=3)					
Aminoácidos essenciais	Metionina	0,3 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0
	Leucina	0,8 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0
	Isoleucina	0,5 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0
	Lisina	1,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0
	Fenilalanina	0,5 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0
	Tirosina	0,6 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0
	Arginina	0,6 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0
	Cisteína	0,1 $\pm$ 0,0	0,04 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
	Treonina	0,6 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,0
	Valina	0,5 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0
Aminoácidos não essenciais	Triptofano	0,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0
	Histidina	0,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0
	Ácido aspártico	1,5 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	1,6 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0
	Ácido glutâmico	1,4 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0
	Serina	0,6 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0
	Prolina	0,5 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0
	Glicina	0,7 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0
	Alanina	0,7 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,0
Total		11,3 $\pm$ 0,0	6,7 $\pm$ 0,0	12,8 $\pm$ 0,0	9,4 $\pm$ 0,0
Aminoácidos essenciais (A)		5,5	2,9	5,9	4,4
Aminoácidos não essenciais (B)		5,8	3,8	6,9	5,0
A/B		0,9	0,8	0,9	0,9
A/total		0,5	0,4	0,5	0,5

As espécies *L. filiformis*, *L. intricata*, *P. brasiliense* e *O. secundiramea* apresentaram elevadas concentrações de aminoácidos essenciais comparados com proteína de soja, por exemplo, que apresenta 36,0% do total de aminoácidos (Galland-Irmouli *et al.*, 1999), mostrando que as espécies deste estudo podem ser consideradas como importante fonte destas substâncias.

6. CONCLUSÕES

Considerando-se os objetivos propostos para a realização deste trabalho com as espécies de algas vermelhas *L. filiformis*, *L. intricata*, *P. brasiliense* e *O. secundiramea* e, analisando-se os resultados obtidos, pode-se concluir que:

1) A presença de óleos essenciais não é comumente observada em macroalgas marinhas. As espécies estudadas apresentaram apenas 0,05 a 0,08% de OE em relação ao seu peso fresco.

2) A deficiência de informações de compostos de origem marinha nas bibliotecas NIST utilizadas para identificação dos compostos voláteis por CG-EM contribuiu para o baixo percentual de compostos identificados em várias amostras testadas (HS-SPME, ED e EM de *L. filiformis*; HS-SPME utilizando fibra de PA, OE e EM de *L. intricata*; HS-SPME de *P. brasiliense*; e HS-SPME, OE, ED e EM de *O. secundiramea*).

3) Devido às poucas informações sobre a composição química de algas em bibliotecas de CG-EM, ainda há a necessidade de isolar e identificar compostos pelos métodos tradicionais. Neste trabalho foram isolados seis terpenos, sendo destes, dois sesquiterpenos, (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol e (-)-silfiperfolan-7 β -ol do OE de *L. filiformis* e quatro monoterpenos 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*E*)-octatrieno; 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*Z*)-octatrieno; 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*E*)-octatrieno e 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*Z*)-octatrieno do extrato acetona/água de *P. brasiliense* com provável ação antimicrobiana. Estes metabólitos isolados, já foram descritos na literatura, mas são relatados pela primeira vez nas espécies estudadas.

4) Para se obter um perfil informativo sobre a composição química de um vegetal, seja terrestre ou aquático, é interessante empregar várias técnicas de extração, pois permite observar uma maior diversidade de substâncias em cada amostra. Os métodos de extração escolhidos neste trabalho mostraram-se complementares uns

aos outros e permitiram uma ampla avaliação dos compostos voláteis das espécies de macroalgas. O emprego de diferentes técnicas de análise também foi relevante, pois em alguns casos a utilização de uma única ferramenta não ofereceu informações suficientes para elucidação estrutural de algumas moléculas.

5) Os OE e os ED e EM foram avaliados quanto aos seus potenciais biológicos. A ação antimicrobiana dos OE, extratos e das substâncias isoladas (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol e (-)-silfiperfolan-7 β -ol foram analisadas, mas estes não apresentaram atividade contra os microrganismos testados nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,625 μ g/mL. Já quando avaliados os potenciais antioxidantes, a espécie *L. filiformis* apresentou maior potencial doador de hidrogênio (IC₅₀ de 48,5 μ g/mL para o ED).

6) De forma geral, os dados apresentados de atividade antioxidante para os óleos, extratos e para as substâncias isoladas das espécies de algas vermelhas estudadas mostram que esses organismos se apresentam como possíveis candidatos para uso medicinal, evidência que também é descrita na literatura. Desta forma, as algas brasileiras podem se tornar cada vez mais atraentes para pesquisas e talvez futura aplicação em medicina.

7) De acordo com as análises realizadas, o conteúdo total de lipídeos nas quatro espécies variou de 1,1% a 6,2%; de ácidos graxos de 0,8% a 1,2%; de proteína solúvel de 4,6% a 18,3% e de aminoácidos de 6,7% a 12,8%. Os resultados mostraram que aproximadamente 50% dos aminoácidos presentes nestas espécies são aminoácidos essenciais e também que as algas são ricas em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) das séries ω 3 e ω 6, os quais são considerados ácidos graxos essenciais. Estes resultados servem de estímulo para futuros estudos, principalmente das espécies *L. filiformis*, *L. intricata* e *O. secundiramea*, para a aplicação também na indústria alimentícia.

7. RECOMENDAÇÕES

1) É muito mais comum encontrar estudos de identificação de compostos voláteis de plantas terrestres do que de algas. E, assim, é de se esperar que as bibliotecas disponíveis para identificação de metabólitos por CG-EM contenham poucas informações sobre compostos característicos do ambiente marinho, como compostos polihalogenados, por exemplo. Por isso reforça-se a necessidade de incrementar os bancos de dados (bibliotecas) de espectros de massas com substâncias de origem marinha a fim de facilitar os estudos e reduzir esforços de pesquisadores da área.

2) Produtos de algas têm sido mundialmente utilizados como alimento e na indústria farmacêutica. Mas, embora o Brasil disponha de uma grande extensão litorânea, os investimentos da iniciativa privada e/ou do Governo no cultivo de algas e sua exploração comercial são escassos. Portanto, é importante encontrar saídas para a sustentabilidade de algumas regiões litorâneas do Brasil, devido à baixa renda observada nas comunidades locais, e incentivar a busca por alternativas de uso de algas marinhas da costa brasileira. A expansão do mercado, a exploração racional e o cultivo de algas marinhas brasileiras tornam-se fatores importantes para o progresso econômico, por se tornar uma fonte alternativa de renda para populações litorâneas, que geralmente vivem do turismo e da pesca.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASLYNG, M. D.; ELMORE, J. S.; MOTTRAM, D. S. Comparison of the aroma characteristics of acid-hydrolyzed and enzyme-hydrolyzed vegetable proteins produced from soy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 5225-5231, 1998.

ABREU, P. M.; GALINDRO, J. M. Polyhalogenated monoterpenes from *Plocamium cartilagineum* from the Portuguese coast. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 1159-1162, 1996.

ACCORINTI, J. **Algas, fuente potencial de nuevos farmacos**. Buenos Aires: Instituto Antártico Argentino, 1987. 131p.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007. 804p.

ADEDEJI, J.; HARTMAN, T. G.; ROSEN, R. T.; HO, C. -T. Free and glycosidically bound aroma compounds in hog plum (*Spondias mombins* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 1494-1497, 1991.

AFOLAYAN, A. F.; MANN, M. G. A.; LATEGAN, C. A.; SMITH, P. J.; BOLTON, J. J.; BEUKES, D. R. Antiplasmodial halogenated monoterpenes from the marine red alga *Plocamium cornutum*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 597-600, 2009.

AGUILERA-MORALES, M.; CASAS-VALDEZ, M.; CARRILLO-DOMINGUEZ, S.; GONZÁLES-ACOSTA, B.; PÉREZ-GIL, F. Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha spp.* As a potential food source. **Journal of Food Composition and analysis**, v. 18, p. 79-88, 2005.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; CHINOU, I. B.; MITAKU, S.; GIKAS, E.; TSARBOPOULOS, A. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of Sideritis from Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 811-815, 2001.

ANGGADIREDJA, J.; ANDYANI, R.; HAYATI; MUAWANAH. Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 477-479, 1997.

ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. Influence of the simultaneous addition of the protease flavourzyme and the lipase novozyme 677BG on dry fermented sausage compounds extracted by SDE and analyzed by GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2395-2400, 2000.

ANSORENA, D.; GIMENO, O.; AATIASARÁN, 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.

AOAC Official Method 996.06, Fat (total, saturated, and unsaturated) in foods. Hydrolytic extraction gas chromatography method. Approved in 1996. Revised in 2001.

AOCS Official Method Ce 1h-05, Determination of *cis*-, *trans*-, saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in vegetable or non-ruminant animal oils and fats by capillary GLC. Approved in 2005. Revised in 2005.

ARESTA, M.; DIBENEDETTO, A.; CARONE, M.; COLONNA, T.; FRAGALE, C. Production of biodiesel from macroalgae by supercritical CO₂ extraction and thermochemical liquefaction. **Environmental Chemistry Letters**, v. 3, p. 136-139, 2005.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145-2148, 1990.

AWAD, N. E.; SELIM, M. A.; SALEH, M. M.; MATLOUB, A. A. Seasonal variation of the lipoidal matters and hypolipidaemic activity of the red alga *Corallina Officinalis* L. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 19-25, 2003.

AZEVEDO-MARTINS, A. K.; CURI, R. Fatty acids decrease catalase activity in human leukaemia cell lines. **Cell Biochemistry and Function**, v. 26, p. 87-94, 2008.

BALOGH, M. P. Debating resolution and mass accuracy. **LCGC North America**, v. 22, n. 2, p. 118, 120, 122-124, 126, 128, 130, 2004.

BANSEMIR, A.; JUST, N.; MICHALIK, M.; LINDEQUIST, U.; LALK, M. Extracts and sesquiterpene derivatives from the red alga *Laurencia chondrioides* with antibacterial activity against fish and human pathogenic bacteria. **Chemistry & Biodiversity**, v. 1, p. 463-467, 2004.

BARAHONA, L. F.; RORRER, G. L. Isolation of halogenated monoterpenes from bioreactor-cultured microplantlets of the macrophytic red algae *Ochtodes secundiramea* and *Portieria hornemannii*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 743-751, 2003.

BARANAUSKIENE, R.; VENSKUTONIS, R. P.; DEMYTTENAERE, J. C. R. Sensory and instrumental evaluation of catnip (*Nepeta cataria* L.) aroma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3840-3848, 2003a.

BARANAUSKIENE, R.; VENSKUTONIS, P. R.; VISKELIS, P.; DAMBRAUSKIENE, E. Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7751-7758, 2003b.

BARONE, V.; COSSI, M.; TOMASI, J. Geometry optimization of molecular structures in solution by the polarizable continuum model. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 404-417, 1998.

BARRE, S. L. L.; WEINBERGER, F.; KERVAREC, N.; POTIN, P. Monitoring defensive responses in macroalgae - limitations and perspectives. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p. 371-379, 2004.

BEAL, A. D.; MOTTRAM, D. S. Compounds contributing to the characteristic aroma of malted barley. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 12, p. 2880-2884, 1994.

BEAUCHÊNE, D.; GRUA-PRIOL, J.; LAMER, T.; DEMAIMAY, M.; QUÉMENEUR, F. Concentration by pervaporation of aroma compounds from *Fucus serratus*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 75, p. 451-458, 2000.

BEAULIEU, J. C.; GRIMM, C. C. Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1345-1352, 2001.

BECKE, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. **Physical Review A: Atomic, Molecular, and Optical Physics**, v. 38, n. 6, p. 3098-3100, 1988.

BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 7, p. 5648-5652, 1993.

BENAMARA, A.; ABOURRICHE, A.; BERRADA, M.; CHARROUF, M.; CHAIB, N.; BOUDOUMA, M.; GARNEAU, F. X. Methoxybifurcarenone: an antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 37-40, 1999.

BERDAGUE, J. -L.; DENOYER, C.; LE QUÉRÉ, J. -L.; SEMON, E. Volatile components of dry-cured ham. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 7, p. 1257-1261, 1991.

BERNINGER, H.; MÖLLER, M. R. Retentionsindices zur gaschromatographischen Identifizierung von Arzneimitteln. **Archive of Toxicology**, v. 37, p. 295-305, 1977.

BEZERRA, M. Z. B.; ANDRADE-NETO, M.; de FREITAS, R. M. The essential oil of *Porophyllum ruderale* Cass (Asteraceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 1, p. 14-15, 2002.

BIANCHIN, M.; SPANIOS, M.; ROESLER, C.; McGAUGH, R.; IZQUIERDO, I. (±)- α -Methyl-4-carboxyphenylglycine, a metabotropic glutamate receptor blocker, impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats when infused into the basolateral nucleus of the amygdala. **Brain Research**, v. 852, p. 436-443, 2000.

BICCHI, C.; CORDERP, C.; LIBERTO, E.; SGORBINI, B.; RUBIOLO, P. Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 220-233, 2008.

BOLAND, W.; MÜLLER, D. G. On the odor of the mediterranean seaweed *Dictyopteris membranacea*; New C11 hydrocarbons from marine brown algae - III. **Tetrahedron Letters**, v. 28, n. 3, p. 307-310, 1987.

BOUGATSOS, C.; MEYER, J. J. M.; MAGIATIS, P.; VAGIAS, C.; CHINOUE, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Helichrysum kraussii* Sch. Bip. and *H. rugulosum* Less. from south Africa. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 48-51, 2003.

BOULANGER, R.; CHASSAGNE, D.; CROUZET, J. Free and bound flavour components of amazonian fruits. 1: Bacuri. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, p. 303-311, 1999.

BOULANGER, R.; CROUZET, J. Free and bound flavour components of Amazonian fruits: 2. cupuacu volatile compounds. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, p. 251-257, 2000.

BOULANGER, R.; CROUZET, J. Identification of the aroma components of acerola (*Malpighia glabra* L.): free and bound flavor compounds. **Food Chemistry**, v. 74, p. 209-216, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAUGHLER, J. M.; DUNCAN, L. A.; CHASE, R. L. The involvement of iron in lipid peroxidation. Importance of ferric to ferrous ratios in initiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 22, p. 10282-10289, 1986.

BRITISH Pharmacopoeia, 1988. Inglaterra: The Stationery Office, 1988. v. 2, p. A137-A138.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S. **Carotenoids. V.1A: Isolation and Analysis**. Basel: Birkhäuser, 1995. v. 1B, p. 13-62.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CARDOZO, K. H. M.; CARVALHO, V. M.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P. Fragmentation of mycosporine-like amino acids by hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM**, v. 20, p. 253-258, 2006.

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**, v. 146, p. 60-78, 2007.

CARVALHO, L. R.; ROQUE, N. F. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 757-764, 2000.

CASOLI, A.; MUSINI, P. C.; PALLA, G. Gas chromatographic-mass spectrometric approach to the problem of characterizing binding media in paintings. **Journal of Chromatography A**, v. 731, p. 237-246, 1996.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo- http://www.cetesb.sp.gov.br/Emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=DIBUTILFTALATO&cod=. Acesso em: 14 setembro 2010.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - http://www.cetesb.sp.gov.br/Emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=DIOCTILFTALATO&cod=. Acesso em: 14 setembro 2010.

CHAVES, M. H.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Macrocarpane, a new sesquiterpene skeleton from the leaves of *Porcelia macrocarpa*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 1, p. 16-19, 2003.

CHEN, C. Y. Biosynthesis of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) from red alga - *Bangia atropurpurea*. **Water Research**, v. 38, p. 1014-1018, 2004.

CHOI, H. -S.; KIM, M. -S. L.; SAWAMURA, M. Constituents of the essential oil of *Cnidium officinale* Makino, a Korean medicinal plant. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 49-53, 2002.

CHUNG, H. Y.; MA, W. C. J.; ANG, P. O. Jr.; KIM, J-S.; CHEN, F. Seasonal variations of bromophenols in brown algae (*Padina arborescens*, *Sargassum siliquastrum*, and *Lobophora variegata*) collected in Hong Kong. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2619-2624, 2003.

CLAUSER, K. R.; BAKER, P.; BURLINGAME, A. L. Role of accurate mass measurement (± 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2871-2882, 1999.

COLL, J. C.; WRIGHT, A. D. Tropical marine algae. III New sesquiterpenes from *Laurencia majuscula* (Rhodophyta, Rhodophyceae, Ceramiales, Rhodomelaceae). **Australian Journal of Chemistry**, v. 42, p. 1591-1603, 1989.

COMUNIDADE EUROPÉIA: Guidelines 98/64/EC of the commission of September 3rd, 1998 for the specification of common analysis methods for the regulation of amino acids, raw greases and Olaquinox in feedstuffs and for the change of the guideline 71/393/EEC: L257/14-L257/23.

CONNOR, W. E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71 (supl), p. 171S-5S, 2000.

CRESPO, M. O. P.; YUSTY, M. A. L. Determination of aliphatic hydrocarbons in the alga *Himanthalia elongata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 226-230, 2004.

CREWS, P.; KHO-WISEMAN, E. Acyclic polyhalogenated monoterpenes from the red algae *Plocamium violaceum*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 17, 2812-2815, 1977.

da SILVA, M. H. L.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. The essential oils of *Peperomia pellucida* Kunth and *P. circinnata* link var. *Circinnata*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, p. 312-314, 1999.

DALLÜGE, J.; van STEE, L. L. P.; XU, X.; WILLIAMS, J.; BEENS, J.; VREULS, R. J. J.; BRINKMAN, U. A. Th. Unravelling the composition of very complex samples by

comprehensive gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. Cigarette smoke. **Journal of Chromatography A**, v. 974, p. 169-184, 2002.

DARCY-VRILLON, B. Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 23-35, 1993.

DAVIS, B. D.; DUBECCO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. S. **Microbiology**. 3. ed. Nova Iorque: Harper & Row, 1980. 1355p.

DAVYT, D.; FERNANDEZ, R.; SUESCUN, L.; MOMBRÚ, A. W.; SALDAÑA, J.; DOMÍNGUEZ, L. D.; FUJII, M. T.; MANTA, E. Bisabolanes from the red alga *Laurencia scoparia*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1113-1116, 2006.

DAWCZYNSKI, C.; SCHUBERT, R.; JAHREIS, G. Amino acids, fatty acids and dietary fibre in edible seaweeds products. **Food Chemistry**, v. 103, p. 891-899, 2007.

DEMBITSKY, V. M.; SREBNIK, M. Use of serially coupled capillary columns with different polarity of stationary phases for the separation of the natural complex volatile mixture of the marine red alga *Corallina elongata*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 67, n. 9, p. 1069-1074, 2002.

DEMYTTENAERE, J. C. R.; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J. I.; VERHÉ, R.; SANDRA, P.; de KIMPE, N. Analysis of volatiles of malt whisky by solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 985, p. 221-232, 2003.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: A biosynthetic approach**. 2. ed. LTD: John Wiley & Sons, p. 6-7.

DHANDA, J. S.; PEGG, R. B.; SHAND, P. J. *Saskatchewan specialty livestock value-added program - Saskatchewan agri-food innovation fund (AFIF) Projeto #98000016* 2003.

DITCHFIELD, R.; HEHRE, W. J.; POPLÉ, J. A. Self-consistent molecular-orbital methods. IX. Extended Gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules. **Journal of Chemical Physics**, v. 54, n. 2, p. 724-728, 1971.

DITCHFIELD, R. Self-consistent perturbation theory of diamagnetism. I. A gauge-invariant LCAO (linear combination of atomic orbitals) method for NMR chemical shifts. **Molecular Physics**, v. 27, n. 4, p. 789-807, 1974.

DODEIGENE, C.; THUNUS, L.; LEJEUNE, R. Chemiluminescence as a diagnostic tool. A review. **Talanta**, v. 51, p. 415-439, 2000.

DOUCETTE, T.; STRAIN, S.; ALLEN, G.; RYAN, C.; TASKER, R. Comparative behavioral toxicity of domoic acid and kainic acid in neonatal rat. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 22, p. 863-869, 2000.

DUDAVERA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D. A.; ORLOVA, I. Plant Volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, p. 417-440, 2006.

DUNLAP, W. C.; YAMAMOTO, Y. Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 112B, p. 105-114, 1995.

EL-GHORAB, A. H.; FADEL, H. M.; EL-MASSRY, K. F. The Egyptian *Eucalyptus camaldulensis* var. *brevirostris*: chemical compositions of the fruit volatile oil and antioxidant activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 306-312, 2002.

ELENKOV, I.; GEORGIEVA, T.; HADJIEVA, P.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.; POPOV, S. Terpenoids and sterols in *Cladophora vagabunda*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 2, p. 457-459, 1995.

ELIAS, V. O.; SIMONEIT, B. R. T.; CARDOSO, J. N. Analysis of volatile sesquiterpenoids in environmental and geological samples. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 20, p. 305-309, 1997.

ERICKSON, K. L. Constituents of *Laurencia*. In SCHEUER, P. J. **Marine natural products: chemical and biological perspectives**. Nova Iorque: Academic Press, v. 5, cap. 4, 1983. p. 131-257.

ERICKSON, M. C. Lipid extraction from channel catfish muscle: comparison of solvent systems. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 1, 84-89, 1993.

ESMAEILI, A.; RUSTAIYAN, A.; NADIMI, M.; LARIJANI, K.; NADJAFI, F.; TABRI, L.; CHALABIAN, F.; AMIRI, H. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from leaves, stems and flowers of *Salvia reuterana* Boiss. grown in Iran. **Natural Product Research**, v. 22, n. 6, p. 516-520, 2008.

ESTEBAN, J.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; VARGAS, P.; SANZ, J. Chemosystematic study on leaf volatile compounds of *Saxifraga* L. series *Ceratophyllae* (Saxifragaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 255-268, 1999.

FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; SANTACROCE, C.; SICA, D.; IMPELLIZZERI, G.; MANGIAFICO, S.; ORIENTE, G.; PIATTELLI, M.; SCIUTO, S. Constituents of red algae. II. Sterols of some red algae. **Phytochemistry**, v. 14, n. 7, p. 1579-1582, 1975.

FENICAL, W.; SIMS, J. J. Zonarene, a sesquiterpene from the brown seaweed *Dictyopteris zonarioides*. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1161-1163, 1972.

FERNANDO, L. N.; GRÜN, I. U. Headspace-SPME analysis of volatiles of the ridge gourd (*Luffa acutangula*) and bitter melon (*Momordica charantia*) flowers. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, p. 289-293, 2001.

FERRERES, F.; SOUSA, C.; VRCHOVSK, V.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J. A.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B. Chemical composition and antioxidant activity of tronchuda cabbage internal leaves. **European Food Research and Technology**, v. 222, p. 88-98, 2006.

FINDLAY, J. A., PATIL, A. D. Antibacterial constituents of the diatom *Navicula delognei*. **Journal of Natatura Products**, v. 47, p. 815-818, 1984.

FINK, P. Ecological functions of volatile organic compounds in aquatic systems. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 40, n. 3, p. 155-168, 2007.

FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. Differences in the fragrances of pollen and different floral parts of male and female flowers of *Laurus nobilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4647-4652, 2002a.

FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. Analysis of the essential oil of the aerial parts of *Viola etrusca* from Monte Labbro (South Tuscany, Italy) and in vivo analysis of flower volatiles using SPME. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 147-149, 2002b.

FLAMINI, G.; LUIGI CIONI, P.; MORELLI, I. Use of solid-phase micro-extraction as a sampling technique in the determination of volatiles emitted by flowers, isolated flower parts and pollen. **Journal of Chromatography A**, v. 998, p. 229-233, 2003a.

FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I.; CECCARINI, L.; ANDOLFI, L.; MACCHIA, M. Composition of the essential oil of *Medicago marina* L. from the coastal dunes of Tuscany, Italy. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 460-462, 2003b.

FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. Volatiles from leaves, fruits, and virgin oil from *Olea europaea* Cv. Olivastra Seggianese from Italy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1382-1386, 2003c.

FOKIALAKIS, N.; MELLIOU, E.; MAGIATIS, P.; HARVALA, C.; MITAKU, S. Composition of the steam volatiles of six *Euphorbia spp.* from Greece. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 39-42, 2003.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY, J. A. Jr.; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUFUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A. Gaussian 03, Gaussian, Pittsburgh, PA, 2003.

FUJII, M. T.; BARATA, D.; CHIRACAVA, S.; GUIMARÃES, S. M. P. B. **Cenário brasileiro da diversidade de algas marinhas bentônicas e sua contribuição para a política de conservação dos recursos naturais e do meio ambiente.** In: 59° Congresso Nacional de Botânica, 59, Natal, 2008. Anais. 2008. p. 376-377.

FUJIMURA, T.; KAWAI, T.; SHIGA, M.; KAJIWARA, T.; HATANAKA, A. Long-chain aldehyde production in thalli culture of the marine green alga *Ulva pertusa*. **Phytochemistry**, v. 29(3), p. 745-747, 1990.

FUKUI, H.; NAGASE, M.; ONO, Y.; KAWAGOSHI, Y.; BABA, K.; NOMA, Y. Determination of organic components in leachates from hazardous waste disposal sites in Japan by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 774, p. 321-332, 1997.

GALLAND-IRMOULI, A. -V.; FLEURENCE, J.; LANGHARI, R. Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse). **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, p. 353-359, 1999.

GANTI, V. S.; KIM, K. H.; BHATTARAI, H. D.; SHIN, H. W. Isolation and characterisation of some antifouling agents from the brown alga *Sargassum confusum*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 8, n. 4, p. 309-315, 2006.

GANZLER, K.; SALGO, A.; VALKO, K.; Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 371, p. 299-306, 1986.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; MAMBRO, V. M. D.; AZZOLINI, A. E. C. S.; FONSECA, M. J. V. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. **AAPS PharmSci**, v. 5, n. 2, artigo 20, 2003.

GERASIMENKO, V. A.; NABIVACH, V. M. Relationships between gas chromatographic retention indices and molecular structure of aromatic hydrocarbons. **Journal of Chromatography**, v. 498, p. 357-366, 1990.

GERWICK, W. H. 2-Chloro-1,6(S*),8-tribromo-3-(8)(2)-octodene: a metabolite of the tropical red seaweed *Ochtodes secundiramea*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 6, p. 1323-1324, 1984.

GIBBONS, G. F.; GOAD, L. J.; GOODWIN, T. W., Sterols of some marine red lgaes. **Phytochemistry**, v. 6, n. 5, p. 677-683, 1967.

GOLMAKANI, M-T.; REZAEI, K. Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from *Zataria multiflora* Boiss. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 448-454, 2008.

GOLOVNYA, R. V.; KUZMENKO, T. E. Thermodynamic evaluation of the interaction of fatty acid methyl esters with polar and non-polar stationary phases, based on their retention indices. **Chromatographia**, v. 10, n. 9, p. 545-548, 1977.

GÓMEZ, E.; LEDBETTER, C. A.; HARTSELL, P. L. Volatile compounds in apricot, plum, and their interspecific hybrids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 10, p. 1669-1676, 1993.

GOVINDAN, M.; HODGE, J. D.; BROWN, K. A.; NUNEZ-SMITH, M. Distribution of cholesterol in Caribbean marine algae. **Steroids**, v. 58, n. 4, p. 178-180, 1993.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W., **Algae**. Upper Saddler River (Bergen): Prince Hall, 2000. p. 343-396.

GRESSLER, V.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Useful strategies to algal volatile analysis. **Current Analytical Chemistry**, v. 5, p. 271-292, 2009.

GRIBBLE, G. W. Naturally occurring organohalogen compounds - A comprehensive survey. In HERZ, W.; KIRBY, G. W.; MOORE, R. E.; STEGLICH, W.; TAMM Ch. **Progress in the chemistry of organic natural products**. v. 68. Nova Iorque: Springer, 1996. 268p.

GUEST, M. A.; NICHOLS, P. D.; FRUSHER, S. D.; HIRST, A. J. Evidence of abalone (*Haliotis rubra*) diet from combined fatty acid and stable isotope analyses. **Marine Biology**, v. 153, p. 579-588, 2008.

GUO, F-Q.; HUANG, L-F.; ZHOU, S-Y.; ZHANG, T-M.; LIANG, Y-Z. Comparison of the volatile compounds of *Atractylodes medicinal* plants by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 570, p. 73-78, 2006.

GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. **Free radical research communications**, v. 19, n. 3, p. 141-158, 1993.

GUZMÁN, S.; GATO, A.; CALLEJA, J. M. Anti-inflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 224-230, 2001.

GUZMÁN, S.; GATO, A.; LAMELA, M.; FREIRE-GARABAL, M.; CALLEJA, J. M. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 665-670, 2003.

HABU, T.; FLATH, R. A.; MON, T. R.; MORTON, J. F. Volatile components of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 249-254, 1985.

HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 12, p. 536-544, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; **Free radicals in biology and medicine**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 1989. p. 1-20.

HAMM, S.; BLETON, J.; TCHAPLA, A. Headspace solid phase microextraction for screening for the presence of resins in Egyptian archaeological samples. **Journal of Separation Science**, v. 27, p. 235-243, 2004.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**, 5. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2001. p. 456.

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

HEINRICH, G.; PFEIFHOFER, H. W.; STABENTHEINER, E.; SAWIDIS, T. Glandular hairs of *Sigesbeckia jorullensis* Kunth (Asteraceae): morphology, histochemistry and composition of essential oil. **Annals of Botany**, v. 89, n. 4, p. 459-469, 2002.

HERBRETEAU, F.; COIFFARD, L. J. M.; DERRIEN, A.; De ROECK-HOLTZHAUER, Y. The fatty acid composition of five species of macroalgae. **Botanica Marina**, v. 40, p. 25-27, 1997.

HIGA, T. Phenolic substances. In SCHEUER, P. J. **Marine natural products. Chemical and biological perspectives**. Nova Iorque: Academic Press, 1981 cap. 3, v. 4. p. 93-145.

HIRAYAMA, O.; TAKAGI, M.; HUKUMOTO, K.; KATOH, S. Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. **Analytical Biochemistry**, v. 247, p. 237-241, 1997.

HORNA, A.; TÁBORSKÝ, J.; DUFKA, O.; MATOUSEK, P.; CHURÁČEK, J. Chromatography of monomers. II. Glass capillary gas chromatography of C₁-C₁₈ alkyl esters of acrylic and methacrylic acids. **Journal of Chromatography**, v. 325, p. 367-378, 1985.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: Série de textos da Escola de Verão em Química, 5, UFSCar, 2003. 152p.

HOUCK, R. K.; KOEBLER, D. J.; WILLIAMS, G.; KATO, K. J.; PARKS, R. D.; BAUER, P. A. Jr. Automated supercritical fluid extraction system. PCT Int. Appl., 1994, WO9408683.

HOWARD, B. J.; KLASS, J.; RUBIN, S. J. **Clinical and pathogenic microbiology**, 2. ed. Saint Louis: Mosby, 1994. p. 247-250, 267, 323, 324, 361.

HOYER, K.; KARSTEN, U.; SAWALL, T.; WIENCKE, C. Photoprotective substances in Antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and developmental stages. **Marine Ecology-Progress Series**, v. 211, p. 117-129, 2001.

HUANG, H-L.; WANG, B. G. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the Qingdao Coastline. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4993-4997, 2004.

HUOVINEN, P.; GOMEZ, I.; FIGUEROA, F. L.; ULLOA, N.; MORALES, V.; LOVENGREEN, C. Ultraviolet-absorbing mycosporine-like amino acids in red macroalgae from Chile. **Botanica Marina**, v. 47, p. 21-29, 2004.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. http://www.ibge.gov.br/confest_e_confega/pesquisa_trabalhos/arquivosPDF/M559_01.pdf. Acesso em: 16 novembro 2009.

IDLER, D. R.; SAITO, A.; WISEMAN, P. Sterols in red algae (Rhodophyceae). **Steroids**, v. 11, n. 4, p. 465-473, 1968.

IDLER, D. R.; WISEWAN, P. Sterols in red algae (Rhodophyceae): variation in the desmosterol content of dulce (*Rhodymenia palmata*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 35, n. 3, p. 679-687, 1970.

IRIE, T.; YAMAMOTO, K.; MASAMUNE, T. Sesquiterpenes from *Dictyopteris divaricata*. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 37, n. 7, p. 1053-1055, 1964.

ISIDOROV, V. A.; KRAJEWSKA, U.; DUBIS, E. N.; JDANOVA, M. A. Partition coefficients of alkyl aromatic hydrocarbons and esters in a hexane-acetonitrile system. **Journal of Chromatography A** v. 923, p. 127-136, 2001a.

ISIDOROV, V. A.; ZENKEVICH, I. G.; KRAJEWSKA, U.; DUBIS, E. N.; JAROSZYNSKA, J.; BAL, K. Gas chromatographic analysis of essential oils with preliminary partition of components. **Phytochemical Analysis**, v. 12, p. 87-90, 2001b.

ITO, N.; HIROSE, M.; FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H.; SHIRAI, T.; TATEMATSU, M. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 10/11, p. 1071-1082, 1986.

JAENICKE, L.; MÜLLER, D. G.; MOORE, R. E. Multifidene and Aucantene, C11 hydrocarbons in the male-attracting essential oil from the gynogametes of *Cutleria multifida* (Smith) Grev. (Phaeophyta). **Journal of the American Chemical Society**, v. 96, n. 10, p. 3324-3325, 1974.

JAPP, M.; GILL, R.; OSSELTON, M. D. Comparison of drug retention indices determined on packed, wide bore capillary and narrow bore capillary columns. **Journal of Forensic Science**, v. 32, n. 6, p. 1574-1586, 1987.

JAVIDNIA, K.; MIRI, R.; KAMALINEJAD, M.; NASIRI, A. Composition of the essential oil of *Salvia mirzayanii* Rech. f. & Esfand from Iran. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 465-467, 2002.

JAVIDNIA, K.; MIRI, R.; AZARPIRA, A.; TABAEI, S. M. H. Composition of the essential oil of *Stachys setifera* C.A. Mey ssp. *iranica* growing in Iran. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 299-300, 2003.

JEZUSSEK, M.; JULIANO, B. O.; SCHIEBERLE, P. Comparison of key aroma compounds in cooked brown rice varieties based on aroma extract dilution analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1101-1105, 2002.

JIMÉNEZ-CARMONA, M. M.; UBERA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of marjoram essential oil. **Journal of Chromatography A**, v. 855, p. 625-632, 1999.

KAJIWARA, T.; HATANAKA, A.; TANAKA, Y.; KAWAI, T.; ISHIHARA, M.; TSUNEYA, T.; FUJIMURA, T. Volatile constituents from marine brown algae of Japanese *Dictyopteris*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 636-639, 1989.

KAJIWARA, T.; KASHIBE, M.; MATSUI, K.; HATANAKA, A. Volatile compounds and long-chain aldehydes formation in conchocelis filaments of a red alga, *Porphyra tenera*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2193-2195, 1990.

KAJIWARA, T.; AKAKABE, Y.; MATSUI, K.; KODAMA, K.; KOGA, H.; NAGAKURA, T. (+)-(3*S*,4*S*)-3-butyl-4-vinylcyclopentene in brown algae of the genus *Dictyopteris*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 3, p. 529-532, 1997.

KALDA, A.; KAASIK, A.; VASSILJEV, V.; POKK, P.; ZHARKOVSKY, A. Neuroprotective action of group I metabotropic glutamate receptor agonists against oxygen-glucose deprivation-induced neuronal death. **Brain Research**, v. 853, p. 370-373, 2000.

KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M.; GONO-BWALYA, A. B.; van ZYL, R. L.; van VUUREN, S. F.; LOURENS, A. C. U.; BASER, K. H. C.; DEMIRCI, B.; LINDSEY, K. L.; van STADEN, J.; STEENKAMP, P. The *in vitro* pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 382-390, 2005.

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

KAMIDATE, T.; KIDA, N.; ICHIHASHI, H.; WATANABE, H. Role of amino thiols as radical quenchers in chemiluminescence of luminol catalyzed by horseradish peroxidase. **Analytical Sciences**, v. 11, p. 169-173, 1995.

KARABAY-YAVASOGLU, N. U.; SUKATAR, A.; OZDEMIR, G.; HORZUM, Z. Antimicrobial activity of volatile components and various extracts of the red alga *Jania rubens*. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 153-156, 2007.

KARAGÜL-YÜCEER, Y.; DRAKE, M.; CADWALLADER, K. R. Aroma-active components of nonfat dry milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2948-2953, 2001.

KAWASAKI, W.; MATSUI, K.; AKAKABE, Y.; ITAI, N.; KAJIWARA, T. Volatiles from *Zostera marina*. **Phytochemistry**, v. 47(1), p. 27-29, 1998.

KHOTIMCHENKO, S. V.; VASKOVSKY, V. E.; TITLYANOVA, T. V. Fatty acids of marine algae from the Pacific coast of north California. **Botanica Marina**, v. 45, p. 17-22, 2002.

KHOTIMCHENKO, S. V. Lipids from the marine alga *Gracilaria verrucosa*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, n. 3, p. 285-288, 2005.

KING, M. -F.; HAMILTON, B. L.; MATTHEWS, M. A.; RULE, D. C.; FIELD, R. A. Isolation and identification of volatiles and condensable material in raw beef with supercritical carbon dioxide extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 11, p. 1974-1981, 1993.

KIRCHHOFF, E.; SCHIEBERLE, P. Quantitation of odor-active compounds in rye flour and rye sourdough using stable isotope dilution assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5378-5385, 2002.

KLADI, M.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. Volatile halogenated metabolites from marine red algae. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p. 337-366, 2004.

KLADI, M.; XENAKI, H.; VAGIAS, C.; PAPAZAFIRI, O.; ROUSSIS, V. New cytotoxic sesquiterpenes from the red algae *Laurencia obtusa* and *Laurencia microcladia*. **Tetrahedron**, v. 62, p. 182-189, 2006.

KOBAYASHI, J. Pharmacologically active metabolites from symbiotic microalgae in Okinawan marine invertebrates. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 2, p. 225-238, 1989.

KOLB, B. Headspace sampling with capillary columns. **Journal of Chromatography A**, v. 842, p. 163-205, 1999.

KONEMAN, E. W. **Disgnóstico microbiológico**. 5^a Ed. Editora Medsi, 2001.

KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; STICHER, O. A new polyhalogenated monoterpene from the red alga *Plocamium cartilagineum*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 6, p. 1615-1618, 1990.

KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; de NYS, R. Halogenated monoterpenes from *Plocamium costatum* and their biological activity. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 383-385, 1999a.

KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; LINDEN, A. *Plocamium hamatum* and its monoterpenes: chemical and biological investigations of the tropical marine red alga. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1047-1053, 1999b.

KOVACEVIC, N.; PAVLOVIC, M.; MENKOVIC, N.; TZAKOU, O.; COULADIS, M. Composition of the essential oil from roots and rhizomes of *Valeriana pancicii* Halácsy & Bald. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 355-357, 2002.

KROL, W.; CZUBA, Z.; SCHELER, S.; GABRYS, J.; GRABIEC, S.; SHANI, J. Antioxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting

the chemiluminescence oxidation of luminol. **Biochemistry International**, v. 21, p. 593-597, 1990.

KROL, W.; CZUBAA, Z.; SCHELLARA, S.; PARADOWSKI, Z.; SHANITB, J. Structure-activity relationship in the ability of flavonols to inhibit chemiluminescence. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, p. 121-126, 1994.

LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C. A simple method for collection of volatile metabolites from fungi based on diffusive sampling from Petri dishes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 19, p. 297-305, 1994.

LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C. Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium taxa*. **Mycological Research**, v. 99, n. 10, p. 1153-1166, 1995.

LAZARI, D. M.; SKALTSA, H. D.; CONSTANTINIDIS, T. Volatile constituents of *Centaurea pelia* DC., *C. thessala* Hausskn. subsp. *drakiensis* (Freyn & Sint.) Georg. and *C. zuccariniana* DC. from Greece. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, p. 7-11, 2000.

LE QUERE, J. -L.; LATRASSE, A. Composition of the essential oils of Blackcurrant Buds (*Ribes nigrum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 3-10, 1990.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B: Condensed Matter and Materials Physics**, v. 37, n. 2, p. 785-789, 1988.

LEE, S. -R.; MACKU, C.; SHINABAMOTO, T. Isolation and identification of headspace volatiles formed in heated butter. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 1972-1975, 1991.

LEWIS, E. J. Protein, peptide, and free amino acid composition in some species of *Laurencia* from Saurashtra coast. **Proceedings of the Indian National Science Academy, Part B: Biological Sciences**, v. 40, n. 1, p. 38-43, 1974.

LI, X.; FAN, X.; HAN, L.; LOU, Q. Fatty acids of some algae from the Bohai Sea. **Phytochemistry**, v. 59, p. 157-161, 2002.

LIEBERMAN, M. M.; PATTERSON, G. M. L.; MOORE, R. E. *In vitro* bioassays for anticancer drug screening: effects of cell concentration and other assay parameters on growth inhibitory activity. **Cancer Letters**, v. 173, n. 1, p. 21-29, 2001.

LOURICI, L.; SOUCI, M. -L.; REBBANI, N.; MESSADI, D. Independent of local properties mathematical models for the calculation of retention indices in programmed temperature gas chromatography. **Analysis**, v. 27, p. 249-254, 1999.

LOYA, S.; RESHEF, V.; MIZRRACHI, E.; SILBERSTEIN, C.; RACHAMIM, Y.; CARMELI, S.; HIZI, A. The inhibition of the reverse transcriptase of HIV-1 by the natural sulfoglycolipids from cyanobacteria: contribution of different moieties to their high potency. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 891-895, 1998.

LUCAS, B.; SOTELO, A. Effect of different alkalies, temperature, and hydrolises times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. **Analytical Biochemistry**, v. 109, n. 1, p. 192-197, 1980.

LUESCH, H.; YOSHIDA, W. Y.; MOORE, R. E.; PAUL, V. J.; CORBETT, T. H. Total structure determination of apratoxin A, a potent novel cytotoxin from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of American Chemical Society**, v. 123, p. 5418-5423, 2001.

MACHIELS, D.; van RUTH, S. M.; POSTHUMUS, M. A.; ISTASSE, L. Gas chromatography-olfactometry analysis of the volatile compounds of two commercial Irish beef meats. **Talanta**, v. 60, p. 755-764, 2003.

MAHALWAL, V. S.; ALI, M. Volatile constituents of *Cymbopogon nardus* (Linn.) rendle. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 73-76, 2003.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B. Aroma volatiles from two fruit varieties of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) **Food Chemistry**, v. 85, p. 195-197, 2004.

MALIAKAL, S.; CHENEY, D. P. Halogenated monoterpene production in regenerated plantlet cultures of *Ochtodes secundiramea* (Rhodophyta, Cryptonemiales). **Journal of Phycology**, v. 37, p. 1010-1019, 2001.

MARONGIU, B.; PORCEDDA, S.; PORTA, G. D.; REVERCHON, E. Extraction and isolation of *Salvia desoleana* and *Mentha spicata* subsp. *insularis* essential oils by supercritical CO₂. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, p. 384-388, 2001.

MARONGIU, B.; PIRAS, A.; PORCEDDA, S.; TUVARI, E.; SANJUST, E.; MELI, M.; SOLLAI, F.; ZECCA, P.; RESCIGNO, A. Supercritical CO₂ extract of *Cinnamomum zeylanicum*: chemical characterization and antityrosinase activity. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 55, p. 10022-10027, 2007.

MARQUES, F. A.; McELFRESH, J. S.; MILLAR, J. G. Kováts retention indexes of monounsaturated C₁₂, C₁₄, and C₁₆ alcohols, acetates and aldehydes commonly found in lepidopteran pheromone blends. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 6, p. 592-599, 2000.

MASAKI, Y.; HASHIMOTO, K.; SAKUMA, K.; KAJI, K. New ochtodane syntheses from myrcen. **Tetrahedron Letters**, v. 23, n. 14, p. 1481-1484, 1982.

MASOTTI, V.; JUTEAU, F.; BESSIÈRE, J. M.; VIANO, J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7115-7121, 2003.

McCONNELL, O. J.; FENICAL, W. Polyhalogenated 1-octene-3-ones, antibacterial metabolites from the red seaweed *Bonnemaisonia asparagoides*. **Tetrahedron Letters**, v. 18, p. 1851-1854, 1977.

McCONNELL, O. J.; FENICAL, W. Ochtodene and ochtodiol: novel polyhalogenated cyclic monoterpenes from the red seaweed *Ochtodes secundiramea*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 21, p. 4238-4241, 1978.

McDERMID, K. J.; STUERCKE, B. Nutritional composition of edible Hawaiian seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, n. 6, p. 513-524, 2003.

MERCK, E. **Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel**. [s.l.] Alemanha: Merck, 1970. 183 p.

MESTRES, M.; BUSTO, O.; GUASCH, J. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 569-581, 2000.

MIMICA-DUKIC, N.; KUJUNDZIC, S.; SOKOVIC, M.; COULADIS, M. Essential oil composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. obtained by different distillation conditions. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 368-371, 2003.

MOLINEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2003.

MOORE, S.; SPACKMAN, D. H.; STEIN, W. H. Chromatography of amino acid on sulfonated polystyrene resins. **Analytical Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 1185-1190, 1958.

MOORE, R. E.; YOST, G. Dihydrotropones from *Dictyopteris*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 937-938, 1973.

MOORE, R. E.; PETTUS, J. A.; MISTYSYN, J. Odoriferous C11 hydrocarbons from Hawaiian *Dictyopteris*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 39, n. 15, p. 2201-2207, 1974.

MOSHONAS, M. G.; SHAW, P. E. Dynamic headspace gas chromatography combined with multivariate analysis to classify fresh and processed orange juices. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, p. 133-139, 1997.

MUNDA, I. M. Differences in amino acid composition of estuarine and marine fucoids. **Aquatic Botany**, v. 3, p. 273-280, 1977.

MURAKAMI, M.; MATSUDA, H.; MAKABE, K.; YAMAGUCHI, K. Oscillariolide, a novel macrolide from a blue-green alga *Oscillatoria* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 32, n. 21, p. 2391-2394, 1991.

MYNDERSE, J. S.; FAULKNER, D. J. Polyhalogenated monoterpenes from the red alga *Plocamium cartilagineum*. **Tetrahedron**, v. 31, p. 1963-1967, 1975.

NAMIKOSHI, M.; FUJIWARA, T.; NISHIKAWA, T.; UKAI, K. Natural abundance ¹⁴C content of dibutyl phthalate (DBP) from three marine algae. **Marine Drugs**, v. 4, p. 290-297, 2006.

NAYLOR, S.; HANKE, F. J.; MANES, L. V.; CREWS, P. Chemical and biological aspects of marine monoterpenes. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v. 44, p. 189-241, 1983.

NCCLS, National Committee of Clinical Laboratory Standards, Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada. M38-A, Vol. 22 No. 16. Substitui a Norma M38-P, Vol. 18 No. 3, 2002.

NCCLS, National Committee of Clinical Laboratory Standards, Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15^o Suplemento Informativo. M100-S15, Vol. 25 No. 1. Substitui a Norma M100-S14 Vol. 24, 2005.

NOGLE, L. M.; WILLIAMSON, R. T.; GERWIG, W. H. Somamides A and B, two new depsipeptide analogues of dolostatin 13 from a Fijian cyanobacterial assemblage of *Lyngbya majuscula* and *Schizothrix* species. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 716-719, 2001.

NONGONIERMA, A.; CAYOT, P.; QUÉRÉ, J-L. L.; SPRINGETT, M.; VOILLEY, A.; Mechanisms of extraction of aroma compounds from foods, using adsorbents. Effect of various parameters. **Food Reviews International**, v. 22, p. 51-94, 2006.

OKAWA, M.; KINJO, J.; NOHARA, T.; ONO, M. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 10, p. 1202-1205, 2001.

OLIVEIRA FILHO, E. C. **Algas marinhas bentônicas do Brasil**. São Paulo, 1977. 407p. Tese de Livre Docência, Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo.

OLOYEDE, O. I. Chemical profile and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* leaves. **Journal of Natural Products**, v. 2, p. 98-103, 2009.

OLSEN, J. V.; GODOY, L. M. F.; LI, G.; MACEK, B.; MORTENSEN, P.; PESCH, R.; MAKAROV, A.; LANGE, O.; HORNING, S.; MANN, M. Parts per million mass accuracy on an orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 2010-2021, 2005.

OLSON, K. L.; WONG, C. A.; FLECK, L. L.; LAZAR, D. F. Qualitative and quantitative determination of solvent formulations in automotive paints. **Journal of Chromatographic Science**, v. 25, p. 418-423, 1987.

O'REILLY, J.; WANG, Q.; SETKOVA, L.; HUTCHINSON, J. P.; CHEN, Y.; LORD, H. L.; LINTON, C. M. Automation of solid-phase microextraction. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 15, p. 2010-2022, 2005.

ORTIZ, J.; ROMERO, N.; ROBERT, P.; ARAYA, J.; LOPEZ-HERNÁNDEZ, J.; BOZZO, C.; NAVARRETE, E.; OSORIO, A.; RION, A. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva latuca* and *Durvillaea antarctica*. **Food Chemistry**, v. 99, p. 98-104, 2006.

OZDEMIR, G.; HORZUM, Z.; SUKATAR, A.; KARABAY-YAVASOGLU, N. U. Antimicrobial activities of volatile components and various extracts of *Dictyopteris membranacea* and *Cystoseira barbata* from the coast of Izmir, Turkey. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 3, p. 183-188, 2006.

PALIC, R.; STOJANVIC, G.; ALAGIC, S.; NIKOLIC, M.; LEPOJEVIC, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil and CO₂ extracts of the oriental tobacco, Prilep. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 323-326, 2002.

PALMEIRA, S. F., Jr.; CONSERVA, L. M.; AANDRADE, E. H. A.; GUILHON, G. M. S. P. Analysis by GC-MS of the hexane extract of the aerial parts of *Aristolochia acutifolia* Duchtr. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, p. 85-88, 2001.

PALMEIRA, S. F., Jr.; MOURA, F. S.; ALVES, V. L.; de OLIVEIRA, F. M.; BENTO, E. S.; CONSERVA, L. M.; ANDRADE, E. H. A. Neutral components from hexane extracts of *Croton sellowii*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, p. 69-71, 2004.

PAPE, M-A. L.; GRUA-PRIOLI, J.; PROST, C.; DEMAIMAY, M. Optimization of dynamic headspace extraction of the edible red algae *Palmaria palmata* and identification of the volatile components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 550-556, 2004.

PAUL, V. J.; McCONNELL, O. J.; FENICAL, W. Cyclic monoterpenoid feeding deterrents from the red marine alga *Ochtodes crockery*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 45, p. 3401-3407, 1980.

PAUL, V. J.; HAY, M. E.; DUFFY, J. E.; FENICAL, W.; GUSTAFSON, K. Chemical defense in the seaweed *Ochtodes secundiramea* (Montagne) Howe (Rhodophyta): effects of its monoterpenoid components upon diverse coral-reef herbivores. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 114, p. 249-260, 1987.

PELLATI, F.; BENVENUTI, S.; MAGRO, L.; MELEGARI, M.; SORAGNI, F. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 289-301, 2004.

PENG, C. T.; HUA, R. L.; MALTBY, D. Prediction of retention indexes. IV. Chain branching in alkylbenzene isomers with C₁₀₋₁₃ alkyl chains identified in a scintillator solvent. **Journal of Chromatography**, v. 589, p. 231-239, 1992.

PENG, C. T. Prediction of retention indices. V. Influence of electronic effects and column polarity on retention index. **Journal of Chromatography A**, v. 903, p. 117-143, 2000.

PEREIRA, R. C.; TEIXEIRA, V. L. Sesquiterpenos das algas marinhas *Laurencia Lamouroux* (Ceramiales, Rhodophyta) 1. Significado ecológico. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 369-374, 1999.

PINO, J. A.; MARBOT, R.; FUENTES, V. Characterization of volatiles in Bullock's heart (*Annona reticulata* L.) fruit cultivars from Cuba. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3836-3839, 2003.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PITAROKILI, D.; COULADIS, M.; PETSIKOS-PANAYOTAROU, N.; TZAKOU, O. Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6688-6691, 2002.

PLOUTNO, A.; CARMELI, S. Nostocyclone A, a novel antimicrobial cyclophane from the cyanobacterium *Nostoc* sp. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1524-1526, 2000.

POHNERT, G.; BOLAND, W. The oxylipin chemistry of attraction and defense in brown algae and diatoms. **Natural Product Reports**, v. 19, p. 108-122, 2002.

POLZIN, J. P.; RORRER, G. L. Halogenated monoterpene production by microplantlets of the marine red alga *Ochtodes secundiramea* within an airlift photobioreactor under nutrient medium perfusion. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 4, p. 415-428, 2003.

PRINSEP, M. R.; THOMPSON, R. A.; WEST, M. L.; WYLIE, B. L. Tolypodiol, an antiinflammatory diterpenoid from the cyanobacterium *Tolypothrix nodosa*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 786-788, 1996.

PÜTTMANN, W. Thermodesorption-gas chromatography-mass spectrometric analysis of biological materials for potential molecular precursors of the constituents of the crude oils. **Journal of Chromatography**, v. 552, p. 325-336, 1991.

RAGAN, M. A., GUTTEL, R. R. Are red algae plants? **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 178, p. 81-105, 1995.

RAMARATHNAM, N.; RUBIN, L. J.; DIOSADY, L. L. Studies on meat flavor. 4. Fractionation, characterization, and quantitation of volatiles from uncured and cured beef and chicken. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 6, p. 939-945, 1993a.

RAMARATHNAM, N.; RUBIN, L. J.; DIOSADY, L. L. Studies on meat flavor. 3. A novel method for trapping volatile components from uncured and cured pork. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 6, p. 933-938, 1993b.

RASHID, M. A.; GUSTAFSON, K. R.; CARDELLINA, J. H.; BOYD, M. R. Brominated chamigrane sesquiterpenes produce a novel profile of differential cytotoxicity in the NCI *in vitro* screen. **Natural Product Letters**, v. 6, n. 4, p. 255-259, 1995.

REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M.; SHERWOOD, T. K. **Properties of gases and liquids**, 3. ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 1977. 688p.

REID, K. A.; JÄGER, A. K.; LIGHT, M. E.; MULHOLLAND, D. A.; VAN STADEN, J. Phytochemical and pharmacological screening of Sterculiaceae species and isolation of antibacterial compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 285-291, 2005.

REMBOLD, H.; WALLNER, P.; NITZ, S.; KOLLMANN, H.; DRAWERT, F. Volatile components of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 3, p. 659-662, 1989.

RENAULD, S. M.; LUONG-VAN, J. Y. Seasonal variation in chemical composition of tropical Australian marine macroalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 18, p. 381-387, 2006.

REVERCHON, E.; PORTA, G. D.; GORGOLIONE, D. Supercritical CO₂ extraction of volatile oil from rose concrete. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 12, p. 37-41, 1997.

RIGHEZZA, M.; HASSANI, A.; MAKLATI, B. Y.; CHERÁTIEN, J. R. Quantitative structure-retention relationships (QSRR) of congeneric aromatics series studied on phenyl OV phases in gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 723, p. 77-91, 1996.

RIZVI, S. S. H.; BENADO, A. L.; ZOLLWEG, J. A.; DSNIELS, J. A. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. **Food Technology**, v. 40, n. 6, 55-64, 1986.

ROBERFROID, M.; COLDERON, P. B. **Free radicals and oxidation phenomena in biological systems**. University of Catholique de Louvain Brussels: Nova Iorque, 1995. p. 11-32.

ROBLEDO, D.; PELEGRIN, Y. F. Chemical and mineral composition of six potentially edible seaweed species of Yucatan. **Botanica Marina**, v. 44, p. 301-306, 1997.

ROITT, M. P.; WILLIAMS, W. **Medical microbiology**. 2. ed. Saint Louis: Mosby, 1998. p. 254 e 523.

ROSCIGNO, G. **Estrazione supercritica di principi farmaceutici e biopesticidi**. Salerno, 1998. 121p. Tese de Doutorado, Università degli Studi di Salerno.

ROSTAD, C. E.; PEREIRA, W. E. Kovats and Lee retention indices determined by gas chromatography/mass spectrometry for organic compounds of environmental interest. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**, v. 9, p. 328-334, 1986.

ROZAS, E. E.; FREITAS, J. C. Intracellular increase of glutamate in neuroblastoma cells induced by polar substances of *Galaxaura marginata* (Rhodophyta, Nemaliales). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 53-62, 2008.

SAGRERO-NIEVES, L.; BARTLEY, J. P.; GRISELDA-ESPINOSA, B.; DOMINGUEZ, X. A.; JULIA VERDE, S. Essential oil composition of *Aristolochia brevipes* Benth. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 12, p. 401-403, 1997.

SAKHO, M.; CHASSAGNE, D.; CROUZET, J. African mango glycosidically bound volatile compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 883-888, 1997.

SALEH, M. A.; ABDEL-MOEIN, N. M.; IBRAHIM, N. A. Insect antifeeding azulene derivative from the brown alga *Dictyota dichotoma*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p. 1432-1434, 1984.

SANTELICES, B.; DOTY, M. S. A Review of *Gracilaria* Farming. **Aquaculture**, v. 78, p. 95-133, 1989.

SANTOS, M. G. M.; LAGROTAI, M. H. C.; MIRANDAI, M. M. F. S.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; WIGG, M. D. A screening for the antiviral effect of extracts from Brazilian marine algae against acyclovir resistant herpes simplex virus type 1. **Botanica Marina**, v. 42, p. 227-230, 1999.

SASTRY, V. M. V. S.; RAO, G. R. K. Dioctyl phthalate, an antibacterial compound from the marine brown alga *Sargassum wightii*. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, p. 185-186, 1995.

SATO, M.; NAKANO, T.; TAKEUCHI, M.; KANNO, N.; NAGAHISAE, E.; SATO, Y. Distribution of neuroexcitatory amino acids in marine algae. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1595-1597, 1996.

SAUNDERS, G. V.; LEHMKUHL, K. V. Molecular divergence and morphological diversity among four cryptic species of *Plocamium* (Plocamiales, Florideophyceae) in northern Europe. **European Journal of Phycology**, v. 40, n. 3, p. 293-312, 2005.

SAVOVA, M.; BART, H.; SEIKOVA, I.; Enhancement of mass transfer in solid-liquid extraction by pulsed field. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 40, n. 4, p. 329-34, 2005.

SCHAEFFER, D. J.; KRYLOV, V. S. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, p. 208-227, 2000.

SENATORE, F.; URRUNAGA SORIA, E.; URRUNAGA SORIA, R.; PORTA, G. D.; de FEO, V. Essential oil from two peruvian *Satureja* species. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 1-4, 1998.

SHAI, L. J.; MCGAW, L. J.; ADEROGBA, M. A.; MDEE, L. K.; ELOFF, J. N. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 238-244, 2008.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. JANITHA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHICK, J. M.; DUNAP, W. C. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: Biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. **Annual Review of Physiology**, v. 64, p. 223-262, 2002.

SIGMA-ALDRICH www.sigmaaldrich.com. Acesso em: 24 outubro 2009.

SILVA, C. H. P. M. **Bacteriologia: um texto ilustrado**. Teresópolis: Eventos, 1999. 531 p.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2000. 460 p.

SIMS, J. J.; DONNEL, M. S.; LEARY, J. V.; LACY, G. H. Antimicrobial agents from marine algae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 7, n. 3, p. 320-321, 1975.

SING, A. S. C.; SMADJA, J.; BREVARD, H.; MAIGNIAL, L.; CHAINTREAU, A.; MARION, J. -P. Volatile constituents of faham (*Jumellea fragrans* (Thou.) Schltr.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 642-646, 1992.

SINHA, R. P.; KLISCH, M.; GRÖNIGER, A.; HÄDER, D. -P. Mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Gracilaria cornea* - effects of UV and heat. **Environmental and Experimental Botany**, v. 43, p. 33-43, 2000.

SKALTSA, 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.

SOJÁK, L.; KRUPCÍK, J.; JANÁK, J. Gas chromatography of all C₁₅-C₁₈ linear alkenes on capillary columns with very high resolution power. **Journal of Chromatography**, v. 195, p. 43-64, 1980.

SPADONE, J. -C.; TAKEOKA, G.; LIARDON, R. Analytical investigation of Rio off-flavor in green coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 226-233, 1990.

SPIPELLER, M.; SPIPELLER, G. Trennung und charakterisierung saurer harnbest and- teile. **Journal of Chromatography**, v. 164, p. 253-317, 1979.

STAHL, E.; GERARD, D. Solubility behaviour and fractionation of essential oils in dense carbon dioxide. **Perfumer & Flavorist**, v. 10, n. 2, p. 29-37, 1985.

STAPLES, C. A.; PARKERTON, T. F.; PETERSON, D. R. A risk assessment of selected phthalate esters in North American and Western European surface waters. **Chemosphere**, v. 40, p. 885- 891, 2000.

STEFANOV, K.; KONAKLIEVA, M.; BRECHANY, E. Y.; CHRISTIE, W. W. Fatty acid composition of some algae from the Black Sea. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3495-3497, 1988.

STEIN, J. R.; BORDEN, C. A. Causative and beneficial algae in human disease conditions: a review. **Phycologia**, v. 23, p. 485-501, 1984.

STIERLE, D. B.; SIMS, J. J. Marine natural products - XV: Polyhalogenated cyclic monoterpenes from the red alga *Plocamium cartilagenium* of Antarctica. **Tetrahedron**, v. 35, p. 1261-1265, 1979.

STIERLE, D. B.; WING, R. M.; SIMS, J. J. Marine natural products - XVI: Polyhalogenated acyclic monoterpenes from the red alga *Plocamium* of Antarctica. **Tetrahedron**, v. 35, p. 2855-2859, 1979.

STOJANOVIC, G.; PALIC, R.; ALAGIC, S.; 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.

SVATOZ, A.; KALINOVÁ, B.; HOSKOVEC, M.; KINDL, J.; HOVORKA, O.; HRDÝ, I. Identification of a new lepidopteran sex pheromone in picogram quantities using an antennal biodeceptor: (8E,10Z)-tetradeca-8,10-dienal from *Cameraria ohridella*. **Tetrahedron Letters**, v. 40, p. 7011-7014, 1999.

SVOB, V.; DEUR-SIFTAR, D. Kovats retention indices in the identification of alkylbenzene degradation products. **Journal of Chromatography**, v. 91, p. 677-689, 1974.

TALYSHINSKY, M. M.; SOUPRUM, Y. Y.; HULEIHEL, M. M. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses. **Cancer Cell International**, v. 2, n. 8, p. 1-7, 2002.

TELLEZ, M. R.; ESTELL, R. E.; FREDRICKSON, E. L.; HAVSTAD, K. M. Essential oil of *Dyssodia acerosa* DC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3276-3278, 1997.

TELLEZ, M. R.; KHAN, I. A.; KOBASISY, M.; SCHRADER, K. K.; DAYAN, F. E.; OSBRINK, W. Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp.). **Phytochemistry**, v. 61, p. 149-155, 2002.

THOLL, D.; BOLAND, W.; HANSEL, A.; LORETO, F.; RÖSE, U. S. R.; SCHNITZLER, J-P. Practical approaches to plant volatile analysis. **Plant Journal**, v. 45, p. 540-560, 2006.

TIMÓN, M. L.; VENTANAS, J.; MARTIN, L.; TEJEDA, J. F.; GARCÍA, C. Volatile compounds in supercritical carbon dioxide extracts of Iberian ham. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 5143-5150, 1998.

TOXNET - ChemIDplus Lite – <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/jsp/common/Toxicity.jsp?calledFrom=lite>. Acesso em: 14 setembro 2010.

TOXNET - ChemIDplus Lite – <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/jsp/common/Toxicity.jsp?calledFrom=lite>. Acesso em: 14 setembro 2010.

TRINGALI, C. Bioactive metabolites from marine algae: recent results. **Current Organic Chemistry**, v. 1, p. 375-394, 1997.

TRIQUI, R.; REINECCIUS, G. A. Changes in flavor profiles with ripening of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1883-1889, 1995.

TUDOR, E. Temperature dependence of the retention index for perfumery compounds on a SE-30 glass capillary column. I. Linear equations. **Journal of Chromatography A**, v. 779, p. 287-297, 1997.

TZAKOU, O.; HARVALA, C.; GALATI, E. M.; SANOGO, R. Essential oil composition of *Nepeta argolica* Borey et Chaub. subsp. *Argolica*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, p. 115-118, 2000.

UM, K. W.; BAILEY, M. E.; CLARKE, A. D.; CHAO, R. R. Concentration and identification of volatile compounds from heated beef fat using supercritical CO₂ extraction-gas liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1641-1646, 1992.

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

VITENBERG, A. G. Equilibrium model in the description of gas extraction and headspace analysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 2-15, 2003.

VLADIMIROV, I. A. Free radicals and antioxidants. **Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk**, v. 7, p. 43-51, 1998.

von KOVÁTS, E. Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. **Helvetica Chimica Acta**, v. 41, n. 7, p. 1915-1932, 1958.

WAHBEH, M. I. Amino acid macroalgae and fatty acid profiles of four species of from Aqaba and their suitability for use in fish diets. **Aquaculture**, v. 159, p. 101-109, 1997.

WANG, Z.; FINGLAS, M.; LI, K. Fractionation of a light crude oil and identification and quantitation of aliphatic, aromatic, and biomarker compounds by GC-FID and GC-MS, Part II. **Journal of Chromatographic Science**, v. 32, p. 367-382, 1994.

WEBER, L. Utilization of the Sadtler standard RI system in micropollution analyses **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**, v. 9, p. 446-451, 1986.

WEIMER, D. F.; IDLER, D. D.; FENICAL, W. Vidalols A and B, new anti-inflammatory bromophenols from the Caribbean marine red alga *Vidalia obtusiloba*. **Experientia**, v. 47, n. 8, p. 851-853, 1991.

WESSELS, M.; KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. New natural product isolation and comparison of the secondary metabolite content of three distinct samples of the sea hare *Aplysia dactylomela* from Tenerife. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 920-928, 2000.

WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL, H.; SELLMANN, I., JAKUPOVIC, J. Cameroonane, prenoprane and noprane, three new tricyclic sesquiterpene skeletons. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 1205-1212, 1998.

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.

WISE, M. L.; RORRER, G. L.; POLZIN, J. J.; CROTEAU, R. Biosynthesis of marine natural products: isolation and characterization of a myrcene synthase from cultured tissues of the marine red alga *Ochtodes secundiramea*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 400, n. 1, p. 125-132, 2002.

WOOLARD, F. X.; BURRESON, B. J.; MOORE, R. E. Isolation of (3S)-*cis*-Octa-1,5-dien-3-ol from *Chondrococcus hornemanni* (Rhodophyta). **Journal of the Chemical Society, Chemical Communication**, v. 12, p. 486-487, 1975.

WRIGHT, A. D.; COLL, J. C.; PRICE, I. R. Tropical marine algae, VII The chemical composition of marine algae from north queensland waters. **Journal of Natural Products**, v. 33, n. 4, p. 845-861, 1990.

WYNNE, M. J. **A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: second revision**. Stuttgart: Nova Hedwigia Beiheft, 2005. 129: 152p.

XIONG, F.; KOPECKY, J.; NEDBAL, L. The occurrence of UV-B absorbing mycosporine-like amino acids in freshwater and terrestrial microalgae (Chlorophyta). **Aquatic Botany**, v. 63, p. 37-49, 1999.

XU, X.; van STEE, L. L. P.; WILLIAMS, J.; BEENS, J.; ADAHCHOUR, M.; VREULS, R. J. J.; BRINKMAN, U. A. Th.; LELIEVED, J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC) measurements of volatile organic compounds in the atmosphere. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 3, p. 665-682, 2003.

YAMADA, K.; TAN, H.; TATEMATSU, H.; OJIVA, M. Dictyoprolene and neodictyoprolene, two new odoriferous compounds from the brown alga *Dictyopteris prolifera*: structures and synthesis. **Tetrahedron**, v. 42, n. 14, p. 3775-3780, 1986.

YASAEI, P. M.; YANG, G. C.; WARNER, C. R.; DANIELS, D. H., KAU, Y. Singlet oxygen oxidation of lipids resulting from photochemical sensitizers in presence of antioxidants. **JAACS**, v. 73, p. 1177-1181, 1996.

YASUHARA, A.; SHIRAISHI, H.; NISHIKAWA, M.; YAMAMOTO, T.; UEHIRO, T.; NAKASUGI, O.; OKUMURA, T.; KENMOTSU, K.; FUKUI, H.; NAGASE, M.; ONO, Y.; KAWAGOSHI, Y.; BABA, K.; NOMA, Y. Determination of organic components in leachates from hazardous waste disposal sites in Japan by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 774, p. 321-332, 1997.

YILDIZ, G.; DEMIRYUREK, A. T. Ferrous iron-induced luminol chemiluminescence: a method for hydroxyl radical study. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 39, p. 179-184, 1998.

YILDIZ, G.; DEMIRYUREK, A. T.; SAHIN-ERDEMLI, I.; KANZIK, I. Comparison of antioxidant activities of aminoguanidine, methylguanidine and guanidine by luminol-enhanced chemiluminescence. **British Journal of Pharmacology**, v. 124, p. 905-910, 1998.

YOKOZAWA, T.; CHEN, C. P.; DONG, E.; TANAKA, T.; NONAKA, G. I., NISHIOKA, I. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, p. 213-222, 1998.

YU, E. J.; KIM, T. H.; KIM, K. H.; LEE, H. J. Characterization of aroma-active compounds of *Abies nephrolepis* (Khingan fir) needles using aroma extract dilution analysis. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, p. 74-79, 2004.

ZAIKIN, V. G.; BORISOV, R. S. Chromatographic-mass spectrometric analysis of Fishcer-Tropsch synthesis products. **Journal of Analytical Chemistry, USSR (Engl. Transl.)**, v. 57, n. 6, p. 544-551, 2002.

ZEGARSKI, J. HOWAED, B. M. Syntheses of marine octodane antifeedants via hydrolytic dehalogenation. **Tetrahedron Letters**, v. 26, n. 2, p. 1363-1366, 1985.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Volatile constituents from leaves and flowers of *Alpinia speciosa* K. Schum. and *A. purpurata* (Viell.) Schum. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, p. 411-414, 1999.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; da SILVA, M. H.; CARREIRA, L. M. M.; MAIA, J. G. S. Essential oils from three *Myrcia* species. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 421-424, 2003.

ZRIRA, S.; ELAMRANI, A.; BENJILALI, B. Chemical composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Morocco - a seasonal variation. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 475-480, 2003.

ZUNINO, M. P.; NOVILLO-NEWTON, M.; MAESTRI, D. M.; ZYGADLO, J. A. Composition of the essential oil of *Baccharis crispa* Spreng. and *Baccharis salicifolia* Pers. grown in Cordoba (Argentina). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 12, p. 405-407, 1997.

ANEXO A

Espectros de RMN de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol (LfAc1)

Espectro de RMN de ^1H de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol, em CDCl_3 a 500 MHz.

Vanessa lfAc1 T=298K 04/07/2008 (30 horas)

168

Espectro de RMN de ^{13}C de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol, em CDCl_3 a 500 MHz.

Vanessa LfAc1 T=298K 04/07/2008 (26 horas)

Current Data Parameters
NAME Vanessa
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20080706
Time 23.42
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG dept135
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 20720
DS 4
SWH 22679.728 Hz
FIDRES 0.498653 Hz
AQ 1.0027500 sec
RG 21768
DOW 15.300 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
CMT2 145.0000000
D1 2.0000000 sec
d2 0.00344828 sec
d12 0.00002000 sec
DELTA 0.00001262 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 10.70 usec
p2 21.40 usec
PL1 2.00 dB
SFO1 125.7716224 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
P2 12.00 usec
p4 24.00 usec
PCPD2 92.00 usec
PL2 -5.00 dB
PL12 12.63 dB
SFO2 500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
SI 21768
SF 125.7577888 MHz
WDW EM
SSE 0
LB 2.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Espectro de RMN de ^{13}C DEPT de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol, em CDCl_3 a 500 MHz.

Espectro de RMN de COSY de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol, em CDCl₃ a 500 MHz.

Vanessa LfAc1 T=298K 02/07/2008

Espectro de RMN de ^1H - ^{13}C HSQC de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol, em CDCl_3 a 500 MHz.

Espectro de RMN de ^1H - ^{13}C HMBC de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol, em CDCl_3 a 500 MHz.

ANEXO B

Espectros de RMN de (-)-silfiperfolan-7 β -ol (LfAc2)

Espectro de RMN de ^1H de (-)-silfiperfolan-7 β -ol, em CDCl_3 a 500 MHz.

Espectro de RMN de ¹³C de (-)-silfiperfolan-7β-ol, em CDCl₃ a 500 MHz.

```

Current Data Parameters
NAME      Vanessa Gressler
EXPNO     2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20080708
Time      7.36
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm Dual 13C/
PULPROG   dept135
TD         65536
SOLVENT   CDCl3
NS         10240
DS         4
SOLH      32679.738 Hz
FIDRES    0.498653 Hz
AQ         1.0027508 sec
RG         32768
DO         15.300 usec
DE         6.00 usec
TE         298.0 K
CST2      145.0000000
DL         2.0000000 sec
d2         0.00344828 sec
d12        0.00002000 sec
DELTA     0.00001362 sec
TD0        1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
P1         10.70 usec
P2         21.40 usec
PL1        2.00 dB
PL2        125.7716224 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2    waltz16
NUC2       1H
P3         12.00 usec
P4         24.00 usec
PCPD2      92.00 usec
PL2        -5.00 dB
PL12       12.69 dB
SF02       500.1320005 MHz

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         125.7577482 MHz
ODD0       EM
SSB        0
LB         2.00 Hz
GB         0
PC         1.40

```

Espectro de RMN de ^{13}C DEPT de (-)-silfiperfolan-7 β -ol, em CDCl_3 a 500 MHz.

Espectro de RMN de COSY de (-)-silfiperfolan-7 β -ol, em CDCl₃ a 500 MHz.

```

Current Data Parameters
NAME          Vanessa
EXPNO         3
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20080702
Time          19.24
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm TXI 1H-13
PULPROG       zgpg30
TD            1024
SOLVENT       CDCl3
NS            64
DS            16
SWH           6648.926 Hz
FIDRES        6.492102 Hz
AQ            0.0770548 sec
RG            18290.4
DQ            75.200 user
DE            6.00 user
TE            298.0 K
CMST2         145.000000 sec
d0            0.00000200 sec
d1            1.50000000 sec
d4            0.00172414 sec
d11           0.03000000 sec
d13           0.00000400 sec
d16           0.00010000 sec
d24           0.00086207 sec
DELTA         0.00117520 sec
DELTA1        0.00110800 sec
DELTA2        0.00018207 sec
DELTA3        0.00062414 sec
IN0           0.00001655 sec
STICNT        128
ZGPG30

===== CHANNEL f1 =====
NUC1          1H
P1            9.60 user
P2            19.20 user
P28           1000.00 user
PL1           0.00 dB
SFO1          500.1320069 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2       gcp
NUC2          13C
P3            13.80 user
P4            25.60 user
PCPD2         68.00 user
PL2           -2.50 dB
PL12          12.01 dB
SFO2          125.7702648 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNM1         SINE.100
GPNM2         SINE.100
GPNM3         SINE.100
GPNM4         SINE.100
GP21          80.00 %
GP22          20.10 %
GP23          11.00 %
GP24          -5.00 %

```

Espectro de RMN de ^1H - ^{13}C HSQC de (-)-siliperfolan-7 β -ol, em CDCl_3 a 500 MHz.

```

Current Data Parameters
NAME          Vanessa
EXPNO         4
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20080702
Time          1.06
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm TXI 1H-13
PULPROG       hmcgplprdgf
TD            4096
SOLVENT       CDCl3
NS            64
DS            16
SOLH          6510.417 Hz
FIDRES        1.589457 Hz
AQ            0.32146228 sec
RG            16384
DO            76.800 usec
DE            6.00 usec
TE            298.0 K
CNST2         145.000000
CNST13        7.000000
d0            0.00000300 sec
d1            1.50000000 sec
d2            0.00244828 sec
d6            0.07142857 sec
DL6           0.00020000 sec
IN0           0.00001520 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1          1H
P1            9.60 usec
P2            19.20 usec
PL1           -2.00 dB
PL2           -2.00 dB
SFO1          500.1321508 MHz

===== CHANNEL f2 =====
NUC2          13C
P3            9.60 usec
PL3           0.00 dB
SFO2          125.7703442 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPM1          SINE.100
GPM2          SINE.100
GPM3          SINE.100
GPZ1          50.00 +
GPZ2          20.00 +
GPZ3          40.10 +
PL6           1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
MD0           2
TD            200
SFO1          125.7702 MHz
FIDRES        162.298697 Hz
SFO2          259.827 ppm
PnMODE        QF

F2 - Processing parameters
SI            2048
SF            500.1300085 MHz
WDW           SINE

```

Espectro de RMN de ^1H - ^{13}C HMBC de (-)-silfiperfolan-7 β -ol, em CDCl_3 a 500 MHz.

ANEXO C

Espectros de RMN de PbF1

Current Data Parameters
 NAME Vanessa
 EXPNO 9
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20090305
 Time_ 15.35
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm TXI 1H-13
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 128
 L 2
 SWH 6510.417 Hz
 FIDRES 0.099341 Hz
 AQ 5.0332146 sec
 RG 512
 DW 76.800 usec
 DE 6.00 usec
 TE 298.0 K
 D1 2.00000000 sec
 TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 9.60 usec
 PL1 0.00 dB
 SFO1 500.1323656 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 500.1300126 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Espectro de RMN de ^1H de 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*E*)-octatrieno (PbF1) em CDCl_3 , 500 MHz.

Espectro de RMN de ^1H de 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*E*)-octatrieno (PbF1) em CDCl_3 , 500 MHz.

Current Data Parameters
NAME Vanessa
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20090304
Time 10.34
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Dual 13C/
PULPROG zgpg30
TD 66560
SOLVENT CDCl3
NS 4858
DS 4
SWH 32679.738 H
FIDRES 0.490982 H
AQ 1.0184180 s
RG 3649.1
DW 15.300 u
DE 6.00 u
TE 298.0 K
D1 2.00000000 s
d11 0.03000000 s
DELTA 1.89999998 s
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 10.70 u
PL1 2.00 d
SFO1 125.7716224 M

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 92.00 u
PL2 -5.00 d
PL12 12.69 d
PL13 17.00 d
SFO2 500.1320005 M

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 125.7577874 M
WDW EM
SSB 0
LB 2.00 H
GB 0
PC 1.40

Espectro de RMN de ^{13}C de 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*E*)-octatrieno (PbF1) em CDCl_3 , 500 MHz.

Espectro de RMN de ^1H - ^1H (COSY) de 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*E*)-octatrieno (PbF1) em CDCl_3 , 500 MHz.

Espectro de RMN de DEPT 135 de 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*E*)-octatrieno (PbF1) em CDCl₃, 500 MHz.

Espectro de RMN de HSQC de 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*E*)-octatrieno (PbF1) em CDCl₃, 500 MHz.

Espectro de RMN de HMBC de 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*E*)-octatrieno (PbF1) em CDCl₃, 500 MHz.

ANEXO D

Espectros de RMN de PbF_2

Espectro de RMN de ^1H de 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*Z*)-octatrieno (PbF2) em CDCl_3 , 400 MHz.

Espectro de RMN de ^{13}C de 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*Z*)-octatrieno (PbF_2) em CDCl_3 , 500 MHz.

```

Current Data Parameters
NAME          Vanessa
EXPNO         2
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20090609
Time          8.35
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm TXI LH-13
PULPROG       hsqcetppr12
TD            2048
SOLVENT       CDCl3
AQ            64
FQ            16
NUC1          5648.936 Hz
FIDRES        3.246561 Hz
AQ            0.1540596 sec
RG            18290.4
DO            75.200 usec
DE            6.00 usec
TE            298.0 K
INSTR         145.000000 sec
AQ            0.00000200 sec
AQ            1.50000000 sec
AQ            0.00172414 sec
AQ            0.03000000 sec
AQ            0.00000400 sec
AQ            0.00010000 sec
AQ            0.00066207 sec
DELTA         0.00117520 sec
DELTA1        0.00110800 sec
DELTA2        0.00016207 sec
DELTA3        0.00062414 sec
AQ            0.00001805 sec
AQ            100
AQ            2000000
===== CHANNEL f1 =====
NUC1          1H
AQ            9.60 usec
AQ            19.20 usec
AQ            1000.00 usec
PL            0.00 dB
RF01          500.1330069 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2       gcp
NUC2          13C
AQ            12.80 usec
AQ            25.60 usec
AQ            68.00 usec
PL            -2.50 dB
PL12          12.01 dB
RF02          125.7631072 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====
P1P1M1        SINE 1.00
P1P1M2        SINE 1.00
P1P1M3        SINE 1.00
P1P1M4        SINE 1.00
P2P1          30.00 %
P2P2          20.10 %
P2P3          11.00 %
P2P4          -5.00 %

```

Espectro de RMN de HSQC de 3,4-*eritro*-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1,5(*E*),7(*Z*)-octatrieno (PbF₂) em CDCl₃, 500 MHz.

ANEXO E

Espectros de RMN de PbF_3

Espectro de RMN de ^1H de 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*E*)-octatrieno (PbF3) em CDCl_3 , 400 MHz.

Espectro de RMN de ^{13}C de 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*E*)-octatrieno (PbF3) em CDCl_3 , 400 MHz.

gre12PbF3B, Gressler
STANDARD 1H OBSERVE

Automation directory: /export/home/vnmr1/data/autorundata/d051208r02
File : 0504

Pulse Sequence: gCOSY

Solvent: cdc13
Temp. 23.0 C / 296.1 K
Sample #5
File: 0503
Mercury-400BB "m400"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.139 sec
Width 3676.5 Hz
2D Width 3676.5 Hz
8 repetitions
200 increments
OBSERVE H1, 400.3310973 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.070 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.054 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 33 min, 25 sec

Espectro de RMN de ^1H - ^1H (COSY) de 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*E*)-octatrieno (PbF3) em CDCl_3 , 400 MHz.

Espectro de RMN de HSQC de 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*E*)-octatrieno (PbF3) em CDCl₃, 500 MHz.

ANEXO F

Espectros de RMN de PbF_4

Espectro de RMN de ^1H de 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*Z*)-octatrieno (PbF₄) em CDCl_3 , 400 MHz.

Espectro de RMN de ^{13}C de 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*Z*)-octatrieno (PbF4) em CDCl_3 , 400 MHz.

gre12PbF4B, Gressler
STANDARD 1H OBSERVE

Automation directory: /export/home/vnmr1/data/autorundata/d051208r02
File : 0604

Pulse Sequence: gCOSY

Solvent: cdcl3
Temp. 23.0 C / 296.1 K
Sample #6
File: 0603
Mercury-400BB "m400"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.135 sec
Width 3787.9 Hz
2D Width 3787.9 Hz
8 repetitions
200 increments
OBSERVE H1, 400.3310977 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.068 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.053 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 33 min, 17 sec

Espectro de RMN de ^1H - ^1H (COSY) de 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*Z*)-octatrieno (PbF4) em CDCl_3 , 400 MHz.

Espectro de RMN de HSQC de 3,4-*eritro*-1-bromo-7-diclorometil-3-metil-3,4,8-tricloro-1(*E*),5(*E*),7(*Z*)-octatrieno (PbF4) em CDCl₃, 500 MHz.

ANEXO G

Espectros de massas de alta resolução de PbF_3 e PbF_4

Medidas de massas de alta resolução (HRMS) realizadas em Orbitrap LTQ XLTM, no modo negativo, com ionização por *nanospray* de PbF3 e PbF4.

ANEXO H

Espectros de massas de alta resolução de PbF1

Medidas de massas de alta resolução (HRMS) realizadas em Orbitrap LTQ XLTM, no modo negativo, com ionização por *nanospray* de PbF1.

ANEXO I

Espectros de massas de alta resolução de PbF_2

Medidas de massas de alta resolução (HRMS) realizadas em Orbitrap LTQ XLTM, no modo negativo, com ionização por *nanospray* de PbF₂.

ANEXO J

Dados numéricos dos percentuais de atividade antioxidante pelo método do DPPH

Tabela - Potenciais de inibição antioxidante encontrados dos óleos essenciais (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) das espécies de algas pelo método do DPPH.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	OE	ED	EM
<i>Laurencia filiformis</i> - % Inibição			
5	$1,4 \pm 0,7$	$14,7 \pm 3,0$	$11,0 \pm 1,5$
50	$2,5 \pm 1,2$	$19,0 \pm 0,2$	$11,7 \pm 0,8$
100	$3,8 \pm 1,2$	$25,5 \pm 0,2$	$13,1 \pm 0,6$
250	$4,9 \pm 2,8$	$44,5 \pm 2,1$	$21,8 \pm 0,6$
500	$8,1 \pm 0,4$	$65,4 \pm 2,4$	$32,7 \pm 1,1$
<i>Laurencia intricata</i> - % Inibição			
5	$3,4 \pm 0,8$	$7,2 \pm 2,9$	$7,0 \pm 1,4$
50	$10,6 \pm 3,0$	$9,9 \pm 1,3$	$9,7 \pm 0,9$
100	$11,1 \pm 1,7$	$12,3 \pm 1,3$	$11,3 \pm 2,9$
250	$12,7 \pm 1,0$	$15,4 \pm 2,5$	$16,7 \pm 0,7$
500	$20,1 \pm 0,6$	$25,2 \pm 1,2$	$25,0 \pm 1,3$
<i>Plocamium brasiliense</i> - % Inibição			
5	$2,1 \pm 1,4$	$7,1 \pm 1,2$	$15,0 \pm 1,6$
50	$3,5 \pm 2,3$	$8,6 \pm 0,4$	$16,4 \pm 0,4$
100	$8,1 \pm 0,7$	$10,4 \pm 0,4$	$17,8 \pm 0,8$
250	$11,3 \pm 3,5$	$15,6 \pm 0,7$	$21,8 \pm 1,9$
500	$17,3 \pm 1,4$	$27,4 \pm 1,6$	$26,4 \pm 2,5$
<i>Ochtodes secundiramea</i> - % Inibição			
5	$8,1 \pm 1,2$	$17,4 \pm 1,7$	$16,4 \pm 1,0$
50	$12,9 \pm 1,2$	$21,3 \pm 1,2$	$20,0 \pm 3,1$
100	$16,1 \pm 1,2$	$22,2 \pm 1,2$	$21,2 \pm 1,7$
250	$17,9 \pm 1,0$	$29,7 \pm 2,9$	$26,4 \pm 0,8$
500	$23,8 \pm 0,6$	$38,2 \pm 0,8$	$29,4 \pm 2,2$
Controle			
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Vitamina E	Ácido gálico	N-acetil-L-cisteína
5	$22,8 \pm 1,2$	$94,2 \pm 0,4$	$22,5 \pm 1,9$
50	$91,4 \pm 7,6$	$95,8 \pm 0,4$	$68,7 \pm 2,0$
100	$96,1 \pm 0,4$	$95,1 \pm 0,0$	$87,2 \pm 2,0$
250	$96,8 \pm 0,5$	$95,8 \pm 0,0$	$96,0 \pm 0,0$
500	$97,0 \pm 0,2$	$96,6 \pm 0,4$	$96,7 \pm 0,5$

ANEXO K

Dados numéricos dos percentuais de atividade antioxidante pelo método de quimioluminescência (H_2O_2 /luminol/HRP)

Tabela - Potenciais de inibição antioxidante encontrados dos óleos essenciais (OE) e extratos diclorometano (ED) e metanólico (EM) das espécies de algas pelo método de quimioluminescência.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	OE	ED	EM
<i>Laurencia filiformis</i> - % Inibição			
5	$2,1 \pm 1,2$	$6,7 \pm 2,0$	$6,6 \pm 1,0$
50	$4,7 \pm 3,4$	$51,5 \pm 0,8$	$13,1 \pm 1,8$
100	$8,2 \pm 1,3$	$70,2 \pm 0,3$	$19,4 \pm 1,3$
250	$12,5 \pm 1,9$	$98,2 \pm 3,3$	$21,4 \pm 3,3$
500	$14,9 \pm 1,5$	$99,8 \pm 0,1$	$25,9 \pm 1,2$
<i>Laurencia intricata</i> - % Inibição			
5	$4,4 \pm 0,8$	$13,3 \pm 2,2$	$30,2 \pm 0,8$
50	$35,5 \pm 10,3$	$48,1 \pm 5,4$	$45,5 \pm 3,4$
100	$45,6 \pm 0,6$	$60,1 \pm 2,1$	$50,5 \pm 2,7$
250	$60,1 \pm 1,6$	$78,5 \pm 0,3$	$56,2 \pm 3,1$
500	$68,9 \pm 1,0$	$88,2 \pm 0,2$	$62,9 \pm 2,4$
<i>Plocamium brasiliense</i> - % Inibição			
5	$4,3 \pm 2,5$	$0,1 \pm 2,8$	$4,5 \pm 2,1$
50	$8,7 \pm 2,7$	$3,6 \pm 2,9$	$6,4 \pm 1,9$
100	$17,7 \pm 3,9$	$6,2 \pm 3,7$	$11,1 \pm 1,1$
250	$40,0 \pm 5,5$	$8,7 \pm 3,2$	$19,4 \pm 1,7$
500	$92,3 \pm 2,8$	$14,2 \pm 2,5$	$41,6 \pm 3,8$
<i>Ochtodes secundiramea</i> - % Inibição			
5	$1,4 \pm 1,3$	$0,2 \pm 1,5$	$5,2 \pm 2,3$
50	$13,2 \pm 2,9$	$7,7 \pm 3,7$	$9,9 \pm 2,9$
100	$23,8 \pm 2,3$	$31,7 \pm 1,4$	$16,2 \pm 1,1$
250	$42,5 \pm 3,8$	$82,8 \pm 1,4$	$23,9 \pm 1,3$
500	$82,7 \pm 3,0$	$99,4 \pm 1,2$	$49,3 \pm 1,6$
Controle			
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	<i>N</i>-acetil-<i>L</i>-cisteína		
5	$12,0 \pm 3,2$		
50	$98,8 \pm 1,8$		
100	$99,9 \pm 0,9$		
250	$100,0 \pm 0,4$		
500	$100,0 \pm 0,8$		

ANEXO L

Review publicado

“Useful strategies for algae volatile analysis”

Useful Strategies for Algal Volatile Analysis

Vanessa Gressler^a, Pio Colepicolo^b and Ernani Pinto^{a,*}

^aUniversidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, São Paulo, Brazil; ^bUniversidade de São Paulo, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, São Paulo, Brazil

Abstract: The production of volatile organic compounds (VOC) by plants is well known. However, few scientific groups have studied VOC produced by green, brown and red algae. Headspace collection of volatiles and solid phase micro-extraction, as well as the traditional extraction by hydrodistillation combined with analytical chromatographic techniques (i.e., GC-MS), have significantly improved the investigation of VOC from plants and algae. The major volatile compounds found in seaweeds are hydrocarbons, terpenes, phenols, alcohols, aldehydes, ketones, esters, fatty acids and halogen or sulfur-containing compounds. This article presents an overview of VOC isolated from and identified in marine macro-algae. Focus is given to non-halogenated and non-sulfur volatile compounds, as well as strategies to analyze and identify algal VOC by GC-MS.

Keywords: Volatile organic compounds, Algae, Extraction methods, GC-MS, Analysis.

1. INTRODUCTION

Oceans cover 71% of the earth's surface and Earth's life was originated in this habitat [1]. The evolution in the sea resulted in a biodiversity of approximately 200.000 marine species including algae, marine invertebrates and thousands of microorganisms [2]. Due to this immense diversity, in the last decade, the natural products derived from marine species, principally from algae, have particularly been investigated [3].

Volatile organic compounds (VOC) are small-molecule compounds with low to moderate hydrophilicity [4] and high vapor pressure, and can cross cell membranes to be released freely into the atmosphere [5]. VOCs act as a language used by plants for communication and interaction with the surrounding environment [5], such as a defense system [5, 6] or to enable reproduction [7]. It is also known that some groups of compounds identified in algal species play important parts in relationships between higher plants and insects [7].

The production of the VOC is closely related to the physiology of the species. Algae are vegetative organisms [8] and must adapt to abiotic stresses (humidity, mineral composition and the temperature of the sea water) during their life cycle. Thus, different growth conditions of the same species are implied by different compositions and properties of the VOC [9].

The volatile components of marine algae have been studied for a long time due to their ability to produce a wide range of secondary metabolites that are of interest for therapeutic drugs [10]. Hydrocarbons, terpenes, fatty acids, esters, alcohols, aldehydes, ketones [7, 9, 11-13], polyphenols [14],

halogenated [15] and sulfur compounds [10] are distributed among the seaweeds. Most of algal secondary metabolites act against some bacteria and herbivores [13].

2. EXTRACTION OF VOLATILE COMPOUNDS

There are several processes to extract volatile compounds from micro and macroalgae. The basic aim of these processes is to obtain the maximum yield of these substances with the highest quality. Different extraction techniques, such as solvent extraction, hydrodistillation, focused microwave-assisted hydrodistillation, supercritical fluid extraction and headspace extraction (Fig. (1)), are commonly used for the extraction of volatile analytes from samples of algae.

2.1. Hydrodistillation

Hydrodistillation (HD) is the most commonly used method of VOC extraction, utilizing a number of different apparatus, such as Clevenger [13] and Dean-Stark [11]. HD uses heated water to promote volatilization of the VOC by steam drag, typically done for 4 h [13, 16, 17]. HD is not a sophisticated method of extraction; it is a time-consuming procedure and presents some disadvantages including losses of volatile compounds and low extraction efficiency. Furthermore, elevated temperatures and the use of water can cause partial or full degradation of natural constituents [16].

2.2. Focused Microwave-Assisted Hydrodistillation

Focused Microwave-Assisted Hydrodistillation (FMA-HD) has recently gained attention for the extraction of essential oils. The use of microwaves as an alternate extraction technique was first reported by Ganzler *et al.* in 1986 [18].

A focused microwave oven equipped with a modulator of power and an infrared temperature capture is used for FMAHD. The algae or the solvent extract are mixed with

*Address correspondence to this author at the Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Professor Lineu Prestes, 580 Bloco 13B, 05508900 Cidade Universitária, Brazil; Tel: +55 (11) 3091-1505; Fax: +55 (11) 3031-9055; E-mail: ernani@usp.br

water in the Clevenger or Dean-Stark apparatus coupled with a microwave oven, and the microwave energy causes the VOC to volatilize much faster than simple HD [16]. The process involves vibration of hydrogen bonds, as a result of microwave-induced dipole rotation of molecules, and migration of ions, which enhance the penetration of solvent into matrix, allowing the dissolution of components to be extracted [19]. The chemical composition of VOC is believed theoretically to be similar; however this has not been totally clarified. Using microwaves in an extraction process can lead to a higher extraction rate in a shorter extraction time resulting in a lower cost of operation. On the other hand, a concern with the use of FMAHD is the possibility of sample deterioration during the extended exposure to microwave irradiation [16].

Irradiation power and time extraction need to be controlled in order to obtain good essential oil yields. The optimal conditions, proposed by Hattab *et al.* [13], are: 56 mg of diethyl ether extract added to 50 mL of water, distilled at 180 W for 10 min.

2.3. Solvent Extraction (SE)

Solvent extraction is divided in three categories: solid-liquid, liquid-liquid and gas-liquid systems. In the case of VOC extraction of plant materials, the solid-liquid is the most common system. The solid-liquid extraction is characterized by the dependence of the solid matrix disintegration and by an intense contact with the chosen solvent which influences the amount of the compounds released into the solvent [20].

Solvent/sample ratio, type of solvent, time and temperature of extraction are the variables investigated in this type of extraction. The effect of the solvent/sample ratio has been investigated by many authors for different raw materials. The authors were in agreement that the higher the ratio, the higher the total amount of solids obtained, despite the solvent used, according to mass transfer principles [21-23]. Type of solvent has been the most investigated factor. Many solvent parameters, including hydrogen bond acceptor propensity, hydrogen bond donor propensity, polarity/dipolarity, dipole moment, dielectric constant, viscosity, surface tension and cohesive energy density (equal to square of solubility parameter) interferes in the extraction. Gu *et al.* 2004 collected the properties of 96 solvents giving a good overview of the most used solvents [24]. Time and temperature of extraction are important parameter to be optimized even in order to minimize energy cost of the process. Many authors agree in the fact that an increase in the working temperature favours extraction enhancing both the solubility of solute and the diffusion coefficient, but also that beyond a certain compounds can be denatured [25-27].

However, there are many disadvantages for SE, including losses of VOC during the different extraction steps, the need for an additional concentration of the extracts, the deterioration of the sample leading to the formation of artifacts and environmental pollution [28].

Many different nonpolar solvents and their mixtures are used for SE method, with the most common being hexane, ethyl ether and dichloromethane [13, 17, 29, 30]. The most

common system used is the soxhlet, operated for 4 h; nevertheless, room temperature extractions are also been used [17].

2.4. Supercritical Fluid Extraction (SFE)

Supercritical fluid extraction (SFE) was introduced by Zosel only in the 1960s. Since then, the method can be performed in a microscale or as an industrial-scale extraction technique [31-33]. The basis of SFE is that a fluid, such as carbon dioxide (CO_2), is held at a specific pressure, temperature and flow rate, which is above its critical temperature and pressure and thus is a supercritical fluid. The supercritical fluid is pumped to an extraction vessel where the sample matrix is. The supercritical fluid passed through the sample matrix, solubilizes the analytes of interest (in this case, the VOC) then carries them away from the matrix to a collection device, so that the analytes can be analyzed by some further analytical technique, such as chromatography [34].

Supercritical fluids have favorable diffusivities and viscosities providing for good mass transfer characteristics. Compared to liquid solvents, compressed fluids under supercritical conditions have a high diffusivity and a low viscosity, which permit more rapid and effective extraction and phase separation [35]. Their solvent strength can be easily controlled by changing fluid pressure or temperature which is some of the advantages of supercritical fluid extraction. The primary supercritical fluid used in SFE is carbon dioxide (99.999% purity) due to its low pressure and temperature critical points (P_c 71 atm, T_c 31°C, respectively), high volatility and diffusibility, low viscosity, non-toxicity, non-reactivity, non-flammability, easy and ready availability, relative cheapness and it is able to solubilize nonpolar or moderately polar analytes [34, 36] and oxygenated mono- and sesquiterpenes, the main essential oil constituents [17, 37]. When it is desired to extract a polar analyte, then it is well known in the art to employ a co-solvent with the carbon dioxide. These co-solvents are typically a liquid organic solvent such as methanol, ethanol, propylene carbonate, acetone, tetrahydrofuran, fomic acid, etc [34].

The separation of the extractant is easy, hydrolysis and thermal degradation are practically absent, and the extract retains the organoleptic features of the starting material. Possible residues do not cause a risk for human health [17]. This method has more advantages, like: (i) requires less solvent; (ii) has a short extraction time and (iii) has the capability to extract thermally labile compounds under mild conditions [17]. SFE is a good technique for the production of flavors and fragrances from natural materials and can constitute a valid alternative of extraction.

Since various parameters potentially affect the extraction process, optimization of the experimental conditions would represent a critical step in the development of an SFE method. Pressure, temperature and extraction time need to be optimized to give a high yield extraction. Hattab *et al.* [13] have used the following conditions: CO_2 density = 0.6 g/mL, CO_2 flow = 1 mL/min, equilibrium time = 5 min, experimental temperature = 40°C, trap temperature = 0°C, extraction time = 30 min, pressure = 91-104 bar.

2.5. Headspace Extraction (HS)

Headspace extraction is a non-destructive method of collecting volatiles, thus giving a more realistic picture of the volatile profile emitted by algae [38]. In this method the volatile sample constituents are first transferred into a gas with subsequent analysis by gas capillary columns [39]. HS utilizes less material mass and no solvents [40] and is able to extract the low-abundant VOC [38]. Optimization of HS parameters may include tests with different temperatures, equilibrium and extraction periods. The HS sampling techniques comprises static headspace (SHS), dynamic headspace (DHS) and solid phase microextraction (SPME).

2.5.1. Static Headspace

Static headspace analysis is suitable for determining substances with low and medium partition coefficients. These materials include, e.g., ecologically important aqueous solutions of volatile aromatic and halogenated hydrocarbons, terpenes, lower mercaptans, sulfides, disulfides, carbonyl compounds and ethers, as well as dissolved gases. This extraction method considers mass exchange between the two phases and requires knowledge of the diffusion constants, which determine the distribution parameters of a compound in a heterogeneous system [41].

The procedure of single-step gas extraction is extremely simple. In this method, the materials are placed in a septum-closed vial and in most cases the vial is placed in an oven with temperature controller. In this system, the emitted VOC are trapped and when phase equilibrium is established under isothermal conditions, part of the VOC saturated atmosphere is removed with a syringe and injected into the GC-MS for analysis [39, 41].

This is a simple solvent-free technique in which sample handling is minimal. However, due to the absence of a concentration step, its sensitivity is low [42]. Syringe shows to be adequate for manual sampling, but is hard to automate and is possible to lose some headspace sample during the passage from the extracted system to the GC column injection [39]. Another disadvantage of this system is its limited utility in the analytical applications of gas extraction [41].

2.5.2. Dynamic Headspace Extraction

Dynamic headspace is probably the most widely-used vapour phase sampling approach. It can be used in researches scale and in the plant field because of its flexibility. On the other hand, this flexibility requires more complex instrumentation and sampling procedures, high standardization of several parameters to obtain good sampling reproducibility, and complex procedures for quantitative analysis [43].

The dynamic headspace technique separates the volatile constituents from the sample by a continuous flow of an inert gas (usually He) either through or above a solid or liquid sample which is placed in a container. While the analytes are trapped on adsorbents of varying materials, e.g. Tenax [38, 44] concentrating the VOC, the carrier gas circulates through or is purged out of the container, allowing for collection of the amounts of VOC needed for detection. After this process, a desorption step is required, which is, in general, a thermal desorption step [38].

Quantitative analysis requires an exhaustive gas extraction and this needs more or less time, depending on sample properties (size, viscosity, diffusion, possibility of shaking, etc.) [39] and good sensitivity and selectivity are achieved when a suitable sampling time and an appropriate trap are applied [42].

2.5.3. Headspace Solid-phase Microextraction

Solid-phase microextraction (SPME) was invented by Pawliszyn and co-workers [45, 46] and an alternative to traditional headspace sampling is headspace solid-phase microextraction (HSSPME). Since the introduction of SPME different types of adsorbent have been used to extract different groups of analytes. Polar coatings, e.g. Polyacrylate and Carbowax, retain easily phenols and carboxylic acids, whereas non-polar coatings, e.g. polydimethylsiloxane, concentrate hydrocarbons [47]. Polyacrylate, Polydimethylsiloxane, Divinylbenzene and Carboxen with 7 to 100 μm of thickness are the most used fiber [39] and the influence of the affinity of the adsorbent for the analytes (adsorption capacity, easy desorption, no chemical reactivity and thermal stability) are used as a key for extraction optimizing of the interest VOC or to improve the detection of trace organic compounds in various samples [28]. Mills and Walker, 2000 present a list of several commercial fiber coatings for the extraction of volatile and semivolatile compounds [48]. This sampling method of HSSPME integrates extraction and concentration into a single step, leading to a high analytic performance and less sample manipulation [46, 49]. The extraction is based on an adsorption/desorption of volatiles on an inert fiber coated like a needle. In the HSSPME extraction, the fiber is exposed to the vapor of the VOC in a hermetically closed flask for a pre-established period of time. Subsequently, the SPME syringe is removed and the fiber is inserted into the injector of the GC. The VOC are thermally desorbed and introduced to the chromatographic column. The thermal desorption of VOC from the fiber eliminates the need for solvents; however, no repeated injections of the sample are possible.

The SPME fiber does not require a sophisticated coating system to be a useful technique [46]. But optimization of the time and adsorption temperature is required to achieve good performance in the extraction and results of high reproducibility. The use of an internal standard is recommended in several quantitative methods [50].

3. METHODS USED FOR VOLATILE COMPOUND IDENTIFICATION

An analytical procedure for volatile compounds from micro and macroalgae comprises mainly two steps: extraction and analysis. The most popular strategy for characterization of VOC is the coupling of a powerful separation technique, such as capillary gas chromatography (GC), with a sensitive detection method. Usually, the determination of VOC has been performed in the past by coupling GC with EI-MS (electron impact mass spectrometry) [51].

Because of the variety of chemical functions present in the mixture of VOC in algae, the GC-MS must be able to cover a wide spectrum of constituents, from non-polar to polar. The analysis is performed by comparison of mass

Fig. (1). Extraction methods for VOC in algae; **a)** hydrodistillation by Clevenger apparatus, **b)** hydrodistillation by Dean-Stark apparatus, **c)** microwave-assisted hydrodistillation, **d)** supercritical fluid extraction, **e)** static headspace, **f)** headspace-solid phase microextraction.

spectra with literature data (Wiley; NBS; NIST and Mass Finder 3), by comparison of their retention indices (RI) relative to an n-alkene mixture, and by co-injection of standard compounds.

Semi-volatile compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons, substituted phenols and sulfur compounds are difficult to volatilize, and HPLC separation is required [52, 53]. This technique, coupled with MS, is used for many different applications, but it is not commonly applied to VOC analysis.

Nuclear magnetic resonance (NMR) is a spectroscopic method for probing a wide variety of materials [54], and it is one of the principal techniques used to obtain physical, chemical, electronic, and structural information about a molecule [55]. One-dimensional ^1H NMR and ^{13}C NMR (DEPT 45, DEPT 90 and DEPT 135) and two-dimensional homo- and hetero-nuclear ^1H - ^1H (COSY), ^1H - ^{13}C (HMQC) and ^{13}C - ^{13}C (HMBC) techniques have been applied to the identification of unknown seaweed metabolites.

4. VOLATILE COMPOUNDS IDENTIFIED IN ALGAE

Different groups of compounds have been identified in the volatiles from algae, as presented in Table 1.

In addition, Phonert *et al.* [75] describes a compilation of 12 volatile pheromones found in more than 61 brown algae: ectocarpene, desmarestene, dictyotene, lamoxirene, cystophorene, fucoserratene, pre-ectocarpene, hormosirene, multifidene, viridiene, caudoxirene and finavarrene. In 2002, Dembitsky and Srebnik reported a well separation of VOC (nearly 200 molecules) from the marine red alga *Corallina elongata* (compounds not mentioned in Table 1) using a serially coupled capillary column with different polarity phases by GC-MS [29]. The procedure used demonstrates a successful separation of hydrocarbons, halogen compounds, fatty acids, aldehydes, ketones and alcohols from low to high molecular weights.

Halogenated secondary metabolites are rare in terrestrial plants but are quite common in marine algae due to the high concentration of chlorine and bromine ions in seawater. Of all marine seaweed, the Rhodophyta possesses the highest abundance of organohalogen compounds, which are found as phenols, fatty acid derived metabolites, terpenoids and carbonyl compounds [15]. A previous review by Kladi *et al.* [15] presents a compilation of volatile halogenated metabolites from marine red algae.

Table 1. Volatile Non-Halogenated Organic Compounds Found in Algae, and their Respective Methods of Extraction and Analysis

Metabolite	Algae	Extraction Method	Identification Method	Reference
Hydrocarbons				
Heptane	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>C. barbata</i>	HD	GC-MS	[13]
Octane	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>C. barbata</i>	HD	GC-MS	[13]
	<i>F. serratus</i>	DHS	GC-MS	[56]
Undecane	<i>B. fuscopurpurea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>C. barbata</i>	HD	GC-MS	[13]
Dodecane	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Tridecane	<i>B. fuscopurpurea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
	<i>C. barbata</i>	HD	GC-MS	[13]
	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
Tetradecane	<i>B. fuscopurpurea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papillosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]
Pentadecane	<i>B. fuscopurpurea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papillosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
	<i>C. barbata</i>	HD	GC-MS	[13]
	<i>F. serratus</i>	DHS	GC-MS	[56]
	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
Hexadecane	<i>B. fuscopurpurea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papillosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]

(Table 1) contd....

Metabolite	Algae	Extraction Method	Identification Method	Reference
	<i>C. barbata</i> <i>P. tenera</i>	HD Solvents	GC-MS GC and GC-MS	[13] [57]
Heptadecane	<i>C. granifera</i> <i>C. mediterranea</i> <i>G. latifolium</i> <i>C. elegans</i> <i>P. denudata</i> <i>P. denudata f. fragilis</i> <i>L. papillosa</i> <i>L. coronopus</i> <i>J. rubens</i> <i>D. membranacea</i> <i>Z. marina</i> <i>C. barbata</i> <i>P. tenera</i> <i>T. minimum</i>	Solvents Solvents Solvents Solvents Solvents Solvents Solvents Solvents HD HD, SFE Solvents HD Solvents HS	GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS KI and GC-MS GC-MS GC and GC-MS GC-MS	[7] [7] [7] [7] [7] [7] [7] [7] [10] [11] [12] [13] [57] [59]
Octadecane	<i>B. fuscopurpurea</i> <i>C. mediterranea</i> <i>G. latifolium</i> <i>P. denudata</i> <i>P. denudata f. fragilis</i> <i>L. coronopus</i> <i>J. rubens</i> <i>Z. marina</i> <i>C. barbata</i> <i>H. elongata</i> <i>P. tenera</i>	Solvents Solvents Solvents Solvents Solvents Solvents HD Solvents HD Solvents Solvents	GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS KI and GC-MS GC-MS GC-MS GC and GC-MS	[7] [7] [7] [7] [7] [7] [10] [12] [13] [30] [57]
Nonadecane	<i>B. fuscopurpurea</i> <i>C. granifera</i> <i>C. mediterranea</i> <i>G. latifolium</i> <i>L. coronopus</i> <i>J. rubens</i> <i>Z. marina</i> <i>C. barbata</i> <i>H. elongata</i> <i>P. tenera</i>	Solvents Solvents Solvents Solvents Solvents HD Solvents HD Solvents Solvents	GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS KI and GC-MS GC-MS GC-MS GC and GC-MS	[7] [7] [7] [7] [7] [10] [12] [13] [30] [57]
Eicosane	<i>B. fuscopurpurea</i> <i>G. latifolium</i> <i>P. denudata</i> <i>L. coronopus</i> <i>J. rubens</i> <i>C. barbata</i> <i>H. elongata</i> <i>P. tenera</i>	Solvents Solvents Solvents Solvents HD HD Solvents Solvents	GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC and GC-MS	[7] [7] [7] [7] [10] [13] [30] [57]
Heneicosane	<i>G. latifolium</i> <i>J. rubens</i> <i>C. barbata</i>	Solvents HD HD	GC-MS GC-MS GC-MS	[7] [10] [13]
Docosane	<i>C. mediterranea</i> <i>G. latifolium</i> <i>L. coronopus</i> <i>J. rubens</i> <i>C. barbata</i> <i>H. elongata</i>	Solvents Solvents Solvents HD HD Solvents	GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS	[7] [7] [7] [10] [13] [30]

(Table 1) contd....

Metabolite	Algae	Extraction Method	Identification Method	Reference
Tricosane	<i>C. mediterranea</i>	Solvent	GC-MS	[7]
	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>H. elongata</i>	Solvents	GC-MS	[30]
	<i>T. minimum</i>	HS	GC-MS	[59]
Tetracosane	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>C. barbata</i>	HD	GC-MS	[13]
	<i>H. elongata</i>	Solvents	GC-MS	[30]
Pentacosane	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>C. barbata</i>	HD	GC-MS	[13]
Hexacosane	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>C. barbata</i>	HD	GC-MS	[13]
Heptacosane	<i>G. latifolium</i>	Solvent	GC-MS	[7]
	<i>C. granulosum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Octacosane	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>C. barbata</i>	HD	GC-MS	[13]
	<i>H. elongata</i>	Solvents	GC-MS	[30]
Nonacosane	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>C. barbata</i>	HD	GC-MS	[13]
Triacontane	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>C. barbata</i>	HD	GC-MS	[13]
Hentriacontane	<i>G. latifolium</i>	Solvent	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Dotriacontane	<i>G. latifolium</i>	Solvent	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>H. elongata</i>	Solvents	GC-MS	[30]
Tritriacontane	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>C. barbata</i>	HD	GC-MS	[13]
Tetratriacontane	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>C. barbata</i>	HD	GC-MS	[13]
Pentatriacontane	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>C. barbata</i>	HD	GC-MS	[13]
Hexatriacontane	<i>H. elongata</i>	Solvents	GC-MS	[30]

(Table 1) contd....

Metabolite	Algae	Extraction Method	Identification Method	Reference
3-ethyl-3-methylheptane	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
2,6,10,14-tetramethylpentadecane	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
2,6,10,14-tetramethylhexadecane	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Oct-1-ene	<i>J. rubens</i> <i>C. barbata</i>	HD HD	GC-MS GC-MS	[10] [13]
Dodecene*	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Tetradecene*	<i>B. fuscopurpurea</i> <i>C. mediterranea</i> <i>C. granulatum</i>	Solvents Solvents Solvents	GC-MS GC-MS GC-MS	[7] [7] [7]
Hexadec-1-ene	<i>B. fuscopurpurea</i> <i>C. mediterranea</i> <i>P. denudata</i> <i>L. coronopus</i>	Solvents Solvents Solvents Solvents	GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS	[7] [7] [7] [7]
(Z)-heptadec-7-ene	<i>B. fuscopurpurea</i> <i>P. denudata</i> <i>P. denudata f. fragilis</i> <i>L. papillosa</i> <i>L. coronopus</i> <i>U. pertusa</i>	Solvents Solvents Solvents Solvents Solvents HD and Solvents	GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC and GC-MS	[7] [7] [7] [7] [7] [58]
Octadec-1-ene	<i>B. fuscopurpurea</i> <i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents Solvents	GC-MS GC-MS	[7] [7]
Octadec-5-ene	<i>D. membranacea</i>	HD, SFE	GC-MS	[11]
Nonadec-5-ene	<i>B. fuscopurpurea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
2,4-dimethylhept-1-ene	<i>J. rubens</i> <i>C. barbata</i>	HD HD	GC-MS GC-MS	[10] [13]
3E,5Z-octa-1,3,5-triene	<i>P. palmata</i>	DHS	GC-MS	[60]
Undeca-2,4,6-triene	<i>D. membranacea</i>	HD, SFE	GC-MS	[11]
Undeca-1,3,5-triene	<i>D. membranacea</i> <i>D. membranacea</i>	HD, SFE HD	GC-MS GC-MS	[11] [61]
(3E,5Z)-undeca-1,3,5-triene	<i>D. plagiogramma</i> <i>D. australis</i>	HD HD	UV, NMR, MS UV, NMR, MS	[62] [62]
(3E,5E)-undeca-1,3,5-triene	<i>D. plagiogramma</i> <i>D. australis</i>	HD HD	UV, NMR, MS UV, NMR, MS	[62] [62]
(3E,5Z)-undeca-1,3,5-triene	<i>D. plagiogramma</i> <i>D. australis</i>	HD HD	UV, NMR, MS UV, NMR, MS	[62] [62]
(2E,4E,6E)-undeca-2,4,6-triene	<i>D. plagiogramma</i> <i>D. australis</i>	HD HD	UV, NMR, MS UV, NMR, MS	[62] [62]
(3E,5Z,8Z)-undeca-1,3,5,8-tetraene	<i>D. prolifera</i> <i>D. plagiogramma</i> <i>D. australis</i> <i>D. sp.</i>	HD HD HD HD	RI and GC-MS UV, NMR, MS UV, NMR, MS NMR and MS	[9] [62] [62] [63]
(3E,5E,8Z)-undeca-1,3,5,8-tetraene	<i>D. membranacea</i> <i>D. plagiogramma</i> <i>D. australis</i>	HD HD HD	GC-MS UV, NMR, MS UV, NMR, MS	[61] [62] [62]

(Table 1) contd....

Metabolite	Algae	Extraction Method	Identification Method	Reference
(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> , <i>Z</i>)-1-(hex-1-enyl)-2-vinylcyclopropane	<i>D. prolifera</i>	HD	GC and GC-MS	[9]
(<i>E</i>)-5-ethylidene-2-methylcyclopenta-1,3-diene	<i>P. palmata</i>	DHS	GC-MS	[60]
(<i>Z</i>)-3-(hex-1-enyl)cyclopent-1-ene	<i>D. membranacea</i>	HD, SFE, FMAHD	GC-MS	[11]
Heptadecylcyclohexane	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
Trimethylcyclopenta-1,3-diene	<i>P. palmata</i>	DHS	GC-MS	[60]
Bicyclo[2,2,1]heptadiene	<i>D. membranacea</i>	HD	GC-MS	[13]
6-butylcyclohepta-1,4-diene	<i>D. membranacea</i>	HD	GC-MS	[13]
Multifidene	<i>C. multifida</i>	HD	GC, MS, NMR	[64]
Aucantene	<i>C. multifida</i>	HD	GC, MS, NMR	[64]
(<i>R</i> ,2 <i>Z</i> ,6 <i>Z</i>)-4-butylcyclohepta-2,6-dienone	<i>D. plagiogramma</i> <i>D. australis</i>	Solvents Solvents	MS, NMR MS, NMR	[65] [65]
4-((<i>E</i>)-hex-1-enyl)cyclopent-1-ene	<i>D. membranacea</i>	HD	GC-MS	[61]
4-((<i>Z</i>)-hex-1-enyl)cyclopent-1-ene	<i>D. prolifera</i>	HD	RI and GC-MS	[8]
6-((<i>Z</i>)-but-1-enyl)cyclohepta-1,4-diene	<i>D. membranacea</i>	HD	GC-MS	[61]
6-((<i>E</i>)-but-1-enyl)cyclohepta-1,4-diene	<i>D. prolifera</i> <i>D. membranacea</i>	HD HD, SFE, FMAHD	RI and GC-MS GC-MS	[9] [11]
(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-3-butyl-4-vinylcyclopentene	<i>D. prolifera</i> <i>D. membranacea</i> <i>D. membranacea</i>	HD HD, SFE, FMAHD HD	RI and GC-MS GC-MS GC-MS	[8] [11] [61]
Dictyopterene A	<i>D. prolifera</i> <i>D. undulata</i> <i>D. membranacea</i> <i>D. membranacea</i> <i>D. plagiogramma</i> <i>D. australis</i> <i>S. lomentaria</i>	HD HD HD, SFE, FMAHD HD HD HD HD	RI and GC-MS RI and GC-MS GC-MS GC-MS Preparative GC, NMR and MS GC and GC-MS	[8] [8] [11] [61] [66] [67]
Dictyopterene B	<i>D. prolifera</i> <i>D. membranacea</i> <i>S. lomentaria</i> <i>Dictyopteris</i> sp.	HD HD HD N.M.	RI and GC-MS GC-MS GC and GC-MS Preparative GC	[9] [61] [67] [68]
Dictyopterene C'	<i>D. prolifera</i> <i>D. undulata</i> <i>D. membranacea</i> <i>S. lomentaria</i> <i>Dictyopteris</i> sp.	HD HD HD HD N.M.	RI and GC-MS RI and GC-MS GC-MS GC and GC-MS Preparative GC	[8] [8] [61] [67] [68]
Dictyopterene D' or Ectocarpene	<i>D. prolifera</i> <i>D. undulata</i> <i>D. membranacea</i> <i>S. lomentaria</i> <i>Dictyopteris</i> sp.	HD HD HD HD N.M.	RI and GC-MS RI and GC-MS GC-MS GC and GC-MS GC	[8] [8] [61] [67] [68]
C ₁₁ H ₁₆	<i>D. prolifera</i> <i>D. membranacea</i>	HD HD	RI and GC-MS GC-MS	[9] [61]
Alcohols				
Butan-1-ol	<i>P. palmata</i>	DHS	GC-MS	[60]

(Table 1) contd....

Metabolite	Algae	Extraction Method	Identification Method	Reference
Pentan-1-ol	<i>F. serratus</i>	DHS	GC-MS	[56]
Pentan-2-ol	<i>C. granifera</i> <i>Z. marina</i>	Solvents Solvents	GC-MS KI and GC-MS	[7] [12]
Pent-3-en-2-ol	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
Hexan-1-ol	<i>F. serratus</i>	DHS	GC-MS	[56]
Octan-1-ol	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Tridecan-1-ol	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
Tetradecan-1-ol	<i>J. rubens</i> <i>P. tenera</i>	HD Solvents	GC-MS GC and GC-MS	[10] [57]
Pentadecan-1-ol	<i>J. rubens</i> <i>Z. marina</i> <i>P. tenera</i>	HD Solvents Solvents	GC-MS KI and GC-MS GC and GC-MS	[10] [12] [57]
Octadecan-1-ol	<i>J. rubens</i> <i>U. pertusa</i>	HD HD and Solvents	GC-MS GC and GC-MS	[10] [58]
Nonadecan-1-ol	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
2-propylpentan-1-ol	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Butane-1,3-diol	<i>C. granifera</i> <i>C. mediterranea</i>	Solvents Solvents	GC-MS GC-MS	[7] [7]
Butane-2,3-diol	<i>B. fuscopurpurea</i> <i>C. mediterranea</i>	Solvents Solvents	GC-MS GC-MS	[7] [7]
3-methyl-butanol	<i>P. palmata</i>	DHS	GC-MS	[60]
2-methylbut-3-en-2-ol	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
2-ethylhexan-1-ol	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]
Pent-1-en-3-ol	<i>F. serratus</i> <i>P. palmata</i>	DHS DHS	GC-MS GC-MS	[56] [60]
Pent-2-en-1-ol	<i>F. serratus</i>	DHS	GC-MS	[56]
2-pentenol	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
Hex-3-en-1-ol	<i>F. serratus</i>	DHS	GC-MS	[56]
(Z)-oct-3-en-1-ol	<i>Z. marina</i> <i>F. serratus</i>	Solvents DHS	KI and GC-MS GC-MS	[12] [56]
(S,Z)-octa-1,5-dien-3-ol	<i>C. hornemanni</i>	N.M.	NMR	[69]
Octadeca-9,12,15-trien-1-ol	<i>L. papillosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Cyclopentanol	<i>F. serratus</i>	DHS	GC-MS	[56]
Phenylmethanol	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
6,6-dimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene-2-carbaldehyde	<i>C. vagabunda</i>	Solvent and HD	GC-MS	[70]
Dictyopterol or Selinen-1 β -ol	<i>D. divaricata</i>	Solvents and HD	NMR, IR	[71]
Phenols				
Phenol	<i>C. mediterranea</i> <i>P. denudata</i> f. <i>fragilis</i>	Solvents Solvents	GC-MS GC-MS	[7] [7]
4-nonylphenol	<i>B. fuscopurpurea</i>	Solvents	GC-MS	[7]

(Table 1) contd....

Metabolite	Algae	Extraction Method	Identification Method	Reference
2,4-di- <i>tert</i> -butylphenol	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>C. barbata</i>	HD	GC-MS	[13]
Aldehydes				
Hexanal	<i>B. fuscopurpurea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
	<i>F. serratus</i>	DHS	GC-MS	[56]
	<i>P. palmata</i>	DHS	GC-MS	[60]
Heptanal	<i>P. palmata</i>	DHS	GC-MS	[60]
Octanal	<i>F. serratus</i>	DHS	GC-MS	[56]
	<i>P. palmata</i>	DHS	GC-MS	[60]
Nonanal	<i>P. palmata</i>	DHS	GC-MS	[60]
Decanal	<i>B. fuscopurpurea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Tridecanal	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]
Tetradecanal	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]
Pentadecanal	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]
3-methylbutanal	<i>P. palmata</i>	DHS	GC-MS	[60]
2,2-dimethylpropanal	<i>P. palmata</i>	DHS	GC-MS	[60]
Butenal	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Hex-2-enal	<i>B. fuscopurpurea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>F. serratus</i>	DHS	GC-MS	[56]
(<i>E</i>)-hex-2-enal	<i>P. palmata</i>	DHS	GC-MS	[60]
(<i>Z</i>)-hex-2-enal	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
Heptenal	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Hept-2-enal	<i>D. membranacea</i>	HD, SFE, FMAHD	GC-MS	[11]
	<i>F. serratus</i>	DHS	GC-MS	[56]
(<i>E</i>)-oct-2-enal	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]
(<i>E</i>)-non-2-enal	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]
(<i>Z</i>)-hexadec-7-enal	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
(Z)-heptadec-8-enal	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]
Hepta-2,4-dienal	<i>B. fuscopurpurea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-octa-2,4-dienal	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
(2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i>)-nona-2,6-dienal	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]

(Table 1) contd....

Metabolite	Algae	Extraction Method	Identification Method	Reference
(2E,4Z)-deca-2,4-dienal	<i>P. denudata f. fragilis</i> <i>P. tenera</i>	Solvents Solvents	GC-MS GC and GC-MS	[7] [57]
(2E,4E)-deca-2,4-dienal	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
(7Z,10Z)-hexadeca-7,10-dienal	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
(8Z,11Z)-heptadeca-8,11-dienal	<i>Z. marina</i> <i>P. tenera</i> <i>U. pertusa</i>	Solvents Solvents HD and Solvents	KI and GC-MS GC and GC-MS GC and GC-MS	[12] [57] [58]
(9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dienal	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
(6Z,9Z,12Z)-pentadeca-6,9,12-trienal	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]
(7Z,10Z,13Z)-hexadeca-7,10,13-trienal	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]
(8Z,11Z,14Z)-heptadeca-8,11,14-trienal	<i>Z. marina</i> <i>U. pertusa</i>	Solvents HD and Solvents	KI and GC-MS GC and GC-MS	[12] [58]
(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienal	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
Phenylacetaldehyde	<i>P. denudata f. Fragilis</i> <i>D. membranacea</i>	Solvents FMAHD	GC-MS GC-MS	[7] [11]
Benzaldehyde	<i>C. granulatam</i> <i>P. denudata</i> <i>P. denudata f. Fragilis</i> <i>F. serratus</i>	Solvents Solvents Solvents DHS	GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS	[7] [7] [7] [56]
3,4-dihydrobenzaldehyde	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
2-tridecyl-2-hetadecanal	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
Ketones				
3-methylpentan-2-one	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Octan-3-one	<i>F. serratus</i> <i>P. palmata</i>	DHS DHS	GC-MS GC-MS	[56] [60]
Nonan-2-one	<i>C. vagabunda</i>	Solvent and HD	GC-MS	[70]
Undecan-3-one	<i>D. membranacea</i> <i>D. membranacea</i>	HD, SFE, FMAHD HD	GC-MS GC-MS	[11] [61]
Dodecan-3-one	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
Nonadecan-2-one	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
Heptadecan-2-one	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
Heptacosan-2-one	<i>T. minimum</i>	HS	GC-MS	[59]
Nonacosan-2-one	<i>T. minimum</i>	HS	GC-MS	[59]
Undeca-1,4-dien-3-one	<i>D. membranacea</i>	HD, SFE, FMAHD	GC-MS	[11]
4-methoxy-4-methyl-2-pentenone	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
6-methylhepta-3,5-dien-2-one	<i>C. mediterranea</i> <i>L. coronopus</i>	Solvents Solvents	GC-MS GC-MS	[7] [7]
2,3 -butanedione ou biacetyl	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
Pentane-2,3-dione	<i>P. palmata</i>	DHS	GC-MS	[60]
Pent-1-en-3-one	<i>F. serratus</i>	DHS	GC-MS	[56]
Undec-1-en-3-one	<i>D. membranacea</i>	HD, SFE, FMAHD	GC-MS	[11]

(Table 1) contd....

Metabolite	Algae	Extraction Method	Identification Method	Reference
6-methyl-5-hepten-2-one	<i>F. serratus</i>	DHS	GC-MS	[56]
6,10,14-trimethylpentadecan-2-one	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]
4-hydroxypentan-2-one	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
4-hydroxy-4-methylpentan-2-one	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
2,6-bis-(1,1-dimethyl)-2,5-cyclohexadiene-1,4-dione	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
		Solvents	GC-MS	[7]
4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexene-1-yl)-3-butene-2-one	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Geranylacetone or 6,10-dimethylundeca-5,9-dien-2-one	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
		Solvents	KI and GC-MS	[12]
(+)6-butylcyclohepta-2,4-dienone	<i>D. plagiogramma</i>	Solvents	MS, NMR	[65]
	<i>D. australis</i>	Solvents	MS, NMR	[65]
Dictyoprolene or Selinen-1-one	<i>D. prolifera</i>	HD	RI and GC-MS	[9]
	<i>D. membranacea</i>	HD, SFE, FMAHD HD	GC-MS	[11]
	<i>D. membranacea</i>	Solvents and HD	GC-MS	[61]
	<i>D. divaricata</i>	Solvents	NMR, IR	[71]
	<i>D. prolifera</i>		Preparative GLC, IR, NMR	[72]
Acids				
Propionic acid	<i>B. fuscopurpurea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Butyric acid	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Pentanoic acid	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Hexanoic acid	<i>B. fuscopurpurea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
Octanoic acid	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Nonanoic acid	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
Decanoic acid	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
Dodecanoic acid	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>D. membranacea</i>	HD, SFE	GC-MS	[11]
Tetradecanoic acid	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papillosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]

(Table 1) contd....

Metabolite	Algae	Extraction Method	Identification Method	Reference
	<i>L. coronopus</i> <i>D. membranacea</i> <i>Z. marina</i>	Solvents HD, SFE, FMAHD Solvents	GC-MS GC-MS KI and GC-MS	[7] [11] [12]
Pentadecanoic acid	<i>C. granulatum</i> <i>C. elegans</i> <i>P. tenera</i>	Solvents Solvents Solvents	GC-MS GC and GC-MS GC and GC-MS	[7] [57] [57]
Hexadecanoic acid	<i>B. fuscopurpurea</i> <i>C. granifera</i> <i>G. latifolium</i> <i>C. granulatum</i> <i>P. denudata</i> <i>P. denudata f. fragilis</i> <i>L. papillosa</i> <i>D. membranacea</i> <i>Z. marina</i> <i>T. minimum</i>	Solvents Solvents Solvents Solvents Solvents Solvents Solvents HD, SFE, FMAHD Solvents HS	GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS KI and GC-MS GC-MS	[7] [7] [7] [7] [7] [7] [7] [11] [12] [59]
Octadecanoic acid	<i>B. fuscopurpurea</i> <i>C. granifera</i>	Solvents Solvents	GC-MS GC-MS	[7] [7]
2-methylbutanoic acid	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
3-methylbutanoic acid	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
4-methylpentanoic acid	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Octadec-9-enoic acid	<i>D. membranacea</i>	HD, SFE, FMAHD	GC-MS	[11]
Lauric acid or Dodecanoic acid	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
Myristic acid or Tetradecanoic acid	<i>P. tenera</i> <i>U. pertusa</i>	Solvents HD and Solvents	GC and GC-MS GC and GC-MS	[57] [58]
Palmitic acid	<i>P. tenera</i> <i>U. pertusa</i>	Solvents HD and Solvents	GC and GC-MS GC and GC-MS	[57] [58]
Oleic acid	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
Pyruvic acid or 2-oxopropanoic acid	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Benzoic acid	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
2-hydroxy-2-phenylacetic acid	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Esters				
Methyl 3-oxopentanoate	<i>C. granifera</i> <i>P. denudate f. fragilis</i>	Solvents Solvents	GC-MS GC-MS	[7] [7]
Methyl-9-oxopentanoate	<i>C. elegans</i> <i>P. denudate f. fragilis</i> <i>L. coronopus</i>	Solvents Solvents Solvents	GC-MS GC-MS GC-MS	[7] [7] [7]
Methyl 3-hydroxydecanoate	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Methyl decanoate	<i>C. granifera</i> <i>C. granulatum</i>	Solvents Solvents	GC-MS GC-MS	[7] [7]
Methyl dodecanoate	<i>C. granifera</i> <i>C. granulatum</i> <i>P. denudate f. fragilis</i>	Solvents Solvents Solvents	GC-MS GC-MS GC-MS	[7] [7] [7]
Methyl tridecanoate	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]

(Table 1) contd....

Metabolite	Algae	Extraction Method	Identification Method	Reference
Methyl tetradecanoate	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papilosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Methyl 12-methyltridecanoate	<i>P. denudata</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Isopropyl myristate or Isopropyl tetradecanoate	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Methyl 2-methyltetradecanoate	<i>B. fuscopupurea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Methyl pentadecanoate*	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papilosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Methyl hexadecanoate or Methyl palmitate	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papilosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
Methyl hexadecadienoate*	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papilosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Methyl hexadecenoate*	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papilosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Methyl 14-methylpentadecanoate	<i>P. denudata</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Methyl 14-methylhexadecanoate	<i>L. papilosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Methyl heptadecanoate	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Methyl octadecatrienoate	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papilosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Methyl octadecadienoate	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papilosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]

(Table 1) contd....

Metabolite	Algae	Extraction Method	Identification Method	Reference
Methyl octadecanoate	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papilosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>J. rubens</i>	HD	GC-MS	[10]
Methyl octadecenoate*	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papilosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>T. minimum</i>	HS	GC-MS	[7]
Methyl linoleate	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
Methyl eicosatrienoate	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Methyl eicosatetraenoate	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papilosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Methyl eicosapentaenoate	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatum</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papilosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Methyl hexacosanoate	<i>T. minimum</i>	HS	GC-MS	[59]
Methyl phenylacetate	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Ethyl acetate	<i>F. serratus</i>	DHS	GC-MS	[56]
Ethyl tetradecanoate	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Ethyl pentadecanoate	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>D. membranacea</i>	HD, SFE	GC-MS	[11]
Ethyl hexadecanoate	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>D. membranacea</i>	HD, SFE	GC-MS	[11]
Ethyl octadecadienoate	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Ethyl octadecenoate*	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Ethyl 15-methylheptadecanoate	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Ethyl icosatetraenoate	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Ethyl icosapentaenoate	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Dimethyl glutarate	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Dimethyl heptanedioate	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]

(Table 1) contd....

Metabolite	Algae	Extraction Method	Identification Method	Reference
Dimethyl octanedioate	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Dimethyl nonanedioate	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Sec-butyl acetate	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Butyl metacrylate	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Benzilbenzoate	<i>P. denudata</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Eicosa-5,8,11,14-methyltetraenoate	<i>D. membranacea</i>	HD, SFE, FMAHD	GC-MS	[11]
Eicosa-5,8,11,14,17-methyl-pentaenoate	<i>D. membranacea</i>	HD, SFE, FMAHD	GC-MS	[11]
9,12,15-methyloctadecatrienoate	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
9,12-methyloctadecadienoate	<i>D. membranacea</i>	HD, SFE	GC-MS	[11]
Terpenes				
Albicanol	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
α -amorphene	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
Aromadendrene	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
Axenol	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
Azulene	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
β -bourbonene	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
Cadalene	<i>D. divaricata</i>	Solvents and HD	N.M.	[73]
γ -cadinene	<i>D. divaricata</i>	Solvents and HD	N.M.	[73]
δ -cadinene	<i>D. membranacea</i> <i>Z. marina</i>	FMAHD Solvents	GC-MS KI and GC-MS	[11] [12]
α -cadinol	<i>P. tenera</i> <i>U. pertusa</i>	Solvents HD and Solvents	GC and GC-MS GC and GC-MS	[57] [58]
δ -cadinol	<i>Z. marina</i> <i>D. divaricata</i>	Solvents Solvents and HD	KI and GC-MS N.M.	[12] [73]
α -calacorene	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
α -copaene	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
(-)-copaene	<i>D. divaricata</i>	Solvents and HD	N.M.	[73]
α -cubebene	<i>D. membranacea</i>	HD, SFE, FMAHD	GC-MS	[11]
β -cubebene	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
1,10-di- <i>epi</i> -cubebol	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
Cubenol	<i>D. divaricata</i> <i>D. prolifera</i> <i>P. tenera</i> <i>U. pertusa</i>	HD HD Solvents HD and Solvents	GC and GC-MS GC and GC-MS GC and GC-MS GC and GC-MS	[9] [9] [57] [58]
<i>Epi</i> -cubenol	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
β -elemene	<i>D. divaricata</i> <i>D. divaricata</i>	HD Solvents and HD	GC and GC-MS IV, NMR	[9] [73]
Dihydroactinidiolide	<i>B. fuscopurpurea</i> <i>C. granifera</i> <i>C. mediterranea</i>	Solvents Solvents Solvents	GC-MS GC-MS GC-MS	[7] [7] [7]

(Table 1) contd....

Metabolite	Algae	Extraction Method	Identification Method	Reference
	<i>C. granulatam</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata f. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papillosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
	<i>U. Pertusa</i>	HD and solvents	GC and GC-MS	[58]
	<i>C. vagabunda</i>	Solvent and HD	GC-MS	[70]
Eucalyptol	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
(E)-farnesene	<i>D. membranacea</i>	HD	GC-MS	[13]
Germacrene D	<i>D. divaricata</i>	HD	GC and GC-MS	[9]
	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
Hexahydrofarnesylacetone	<i>B. fuscopurpurea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>G. latifolium</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatam</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>P. denudata</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papillosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. vagabunda</i>	Solvent and HD	GC-MS	[70]
Isophytol	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
	<i>P. denudata</i>	Solvents	GC-MS	[7]
α -ionone	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]
β -ionone	<i>P. denudate F. fragilis</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papillosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]
Limonene	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]
Phytol	<i>C. granifera</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. mediterranea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. granulatam</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. papillosa</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>D. membranacea</i>	HD, SFE	GC-MS	[11]
	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]
	<i>T. minimum</i>	HS	GC-MS	[59]
Sativene	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
Squalene	<i>C. granulatam</i>	Solvents	GC-MS	[7]
	<i>T. minimum</i>	HS	GC-MS	[59]
α -terpineol	<i>P. tenera</i>	Solvents	GC and GC-MS	[57]
	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]

(Table 1) contd....

Metabolite	Algae	Extraction Method	Identification Method	Reference
Zonarene	<i>D. membranacea</i> <i>D. zonarioides</i>	FMAHD Solvents	GC-MS NMR, MS	[11] [72]
N-Compounds				
Palmitamide	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
Stearamide	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
Heptadecan-1-amide	<i>J. rubens</i> <i>C. barbata</i>	HD HD	GC-MS GC-MS	[10] [13]
2-ethyl-1,6-dihydro-1-methylpyridine	<i>C. elegans</i>	Solvents	GC-MS	[7]
4-methylpyridine	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
1-pyrroline ou 3,4-dihydro-2H-pyrrole	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
Nicotine	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
N-ethyl-N-propylformamide	<i>B. fuscopupurea</i>	Solvents	GC-MS	[7]
Others				
(S)-3-Acetoxy-1,5-undecadiene	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]
3-allylcyclobutane ou allylcyclobutane	<i>D. membranacea</i>	HD	GC-MS	[13]
<i>Epi</i> -bicyclosesquiphellandrene	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
(+)-6-butylcyclohepta-2,4-dienone	<i>D. plagiogramma</i> <i>D. australis</i>	Solvents Solvents	MS, NMR MS, NMR	[65] [65]
2,3-dimethyl-2-nonen-4-olide	<i>U. pertusa</i>	HD and Solvents	GC and GC-MS	[58]
Ergost-7-en-2-ol	<i>T. minimum</i>	HS	GC-MS	[59]
1,2,3,4,4a,7-hexahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)naphthalene or 4-(1-isopropyl)-1,6-dimethyl-1,2,3,4,4a,7-hexahydronaphthalene	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
4,4a,5,6,7,8-hexahydro-5-methyl-8-(1-methylethyl)-2(3H)naphthalenone	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
1-(1,3,4,5,6,7-hexahydro-4-hydroxy-3,8-dimethyl-5-azulenyl)ethanon	<i>D. dichotoma</i>	HD	GC-MS	[74]
γ -muurolene	<i>Z. marina</i>	Solvents	KI and GC-MS	[12]
Neodictyoprolene	<i>D. prolifera</i>	Solvents	Preparative GLC, IR, NMR	[72]
Phenantrene	<i>B. fuscopurpurea</i> <i>P. denudata</i> <i>P. denudata f. fragilis</i> <i>L. papillosa</i> <i>L. coronopus</i>	Solvents Solvents Solvents Solvents Solvents	GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS	[7] [7] [7] [7] [7]
Stigmas-7,22-dien-3-ol	<i>T. minimum</i>	HS	GC-MS	[59]
Sigmas-7-en-3-ol	<i>T. minimum</i>	HS	GC-MS	[59]
α -tocopherol	<i>T. minimum</i>	HS	GC-MS	[59]
γ -tocopherol	<i>T. minimum</i>	HS	GC-MS	[59]
α -tocopherolquinol	<i>T. minimum</i>	HS	GC-MS	[59]

(Table 1) contd....

Metabolite	Algae	Extraction Method	Identification Method	Reference
3,5,5-trimethylfuran-2(5H)-one	<i>C. mediterranea</i> <i>L. coronopus</i>	Solvents	GC-MS	[7]
		Solvents	GC-MS	[7]
1,2,4-trimethylbenzene	<i>P. palmate</i>	DHS	GC-MS	[60]
5,6,7,7a-trimethyl-2-(4H)benzofuranone	<i>D. membranacea</i>	HD, SFE	GC-MS	[11]
Vulgarol B	<i>D. membranacea</i>	FMAHD	GC-MS	[11]
<i>p</i> -xylene	<i>F. serratus</i>	DHS	GC-MS	[56]

HD - Hydrodistillation; SFE - Supercritical Fluid Extraction; FMAHD - Focused Microwave-Assisted Hydrodistillation; DHS - Dynamic Headspace; RI - Retention Indices; KI - Kovat's Index; N.M. - Not Mentioned; * more than one isomer.

5. CONCLUSIONS

To date, only a small number of marine algae have been examined in any detail for volatile compounds. In this work we reviewed the VOC (total of 295 molecules) analyzed by 31 algal species. Different profiles were sometimes observed for the same species, likely due to differences in their physiology, growth conditions [8] and the extraction method used [14]. It was also observed that, in some cases, there are accentuated differences in chemical composition in species from the same genus.

Various extraction methods are proposed for the analysis of VOC of different sample matrices, but it is generally admitted that none of them are suitable for all samples in all situations. In FMAHD, the heat transfer is performed in three ways: radiation, conduction and convection; in contrast, in HD, the heat transfer is mainly performed by conduction and convection only [16] and when we compare HD with FMAHD the amounts of essential oils obtained in 30 min with FMAHD were comparable, both from qualitative and quantitative points of view, to those obtained after 4.5 h of HD [16] demonstrating that the radiation energy can diminish approximately 90% of extraction time resulting in a lower cost of operation principally in large scale. Solvent extraction was widely used as a VOC extraction method. In the last years, because of the large volume of toxic organic solvents needed, this process has been disapproved by researchers and by the community in general. Much attention is being paid to the development of more efficient environmentally friendlier techniques for the rapid analytical-scale extraction from solid matrices and in this way SFE, SHS, DHS and HSSPME are in advantage. The SHS is a simple and green method of VOC extraction, but it can be only used as a screening tool in laboratory scale. Another disadvantage of SHS is the internal pressure in the headspace vial generated during thermostating by the sum of partial vapour pressures from all volatile sample constituents [39] and its limited sensitivity [76]. On the other hand, DHS and HSSPME can be applied in industrial plants but the different solubilities of volatile compounds in the cartridge (in DHS) or in the fiber coating (in SPME) introduces an additional selectivity into the whole procedure. In DHS and SPME a desorption time is required and this step can result in a band broadening making the analysis of the compounds more difficult because of peak resolution loss [39].

The study done by Dembintsky *et al.* [29] demonstrated the most successful separation of a complex mixture of VOC using a serial capillary column system. The resolution of many co-eluting compounds, principally positional isomers, was shown. This method can be applied to various biological samples. In cases where there is an interest in a preferred chemical class of compounds, one method should be chosen and optimized according to its physicochemical parameters. The application of serially capillary column system to the analysis of complex mixtures has not been widely applied [29] and should be more investigated not only to algae VOC but also to biochemical investigations for the study of organic metabolites and/or lipid content of different biological matrices.

Further studies of biological activity are necessary to reveal the ecological significance of the VOC mixtures or of main active component(s), such as sex pheromones, defense functions or as of yet undescribed functions. It is likely, because of the variety of new and exotic molecules found in marine organisms, that a large number of biological substances may be the source of new medicines for many human diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

- [1] Haefner, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov. Today*, **2003**, 8(12), 536-44.
- [2] Pinto, A.C.; Silva, D.H.S.; Bolzani, V. da S. Lopes, N.P.; Epifanio, R. de A. Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. *Quím. Nova*, **2002**, 25(1), 45-61.
- [3] Hill, R.A. Marine natural products. *Ann. Rep. Prog. Chem., Sec. B: Org. Chem.*, **2004**, 100, 169-89.
- [4] Fink, P. Ecological functions of volatile organic compounds in aquatic systems. *Mar. Freshw. Behav. Phy.*, **2007**, 40(3), 155-68.
- [5] Dudavera, N.; Negre, F.; Nagegowda, D.A.; Orlova, I. Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **2006**, 25, 417-40.
- [6] 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. *Aquat. Sci.*, **2007**, 69, 403-12.

- [7] 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. *Bot. Mar.*, **2006**, 49, 47-56.
- [8] Kajiwar, T.; Akakabe, Y.; Matsui, K.; Kodama, K.; Koga, H.; Nagakura, T. (+)-(3S, 4S)-3-butyl-4-vinylcyclopentene in brown algae of the genus *Dictyopteris*. *Phytochemistry*, **1997**, 45(3), 529-32.
- [9] Kajiwar, T.; Hatanaka, A.; Tanaka, Y.; Kawai, T.; Ishihara, M.; Tsuneya, T.; Fujimura, T. Specificity of the enzyme system producing long chain aldehydes in the green alga, *Ulva pertusa*. *Phytochemistry*, **1989**, 28(2), 636-39.
- [10] Karabay-Yavasoglu, N.U.; Sukatar, A.; Ozdemir, G.; Horzum, Z. Antimicrobial activity of volatile components and various extracts of the red alga *Jania rubens*. *Phytother. Res.*, **2007**, 21, 153-56.
- [11] Hattab, M.E.; Culioli, G.; Piovetti, L.; Chitour, S.E.; Valls, R. Comparison of various extraction methods for identification and determination of volatile metabolites from the brown alga *Dictyopteris membranacea*. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1143, 1-7.
- [12] Kawasaki, W.; Matsui, K.; Akakabe, Y.; Itai, N.; Kajiwar, T. Volatiles from *Zostera marina*. *Phytochemistry*, **1998**, 47(1), 27-29.
- [13] Ozdemir, G.; Horzum, Z.; Sukatar, A.; Karabay-Yavasoglu, N.U. Antimicrobial activities of volatile components and various extracts of *Dictyopteris membranacea* and *Cystoseira barbata* from the coast of Izmir, Turkey. *Pharm. Biol.*, **2006**, 44(3), 183-88.
- [14] Carvalho, L. R.; Roque, N. F.; Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. *Quim. Nova*, **2000**, 23(6), 757-64.
- [15] Kladi, M.; Vagias, C.; Roussis, V. Volatile halogenated metabolites from marine red algae. *Phytochem. Rev.*, **2004**, 3, 337-66.
- [16] Golmakani, M.-T.; Rezaei, K. Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from *Zataria multiflora* Boiss. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **2008**, 110, 448-54.
- [17] Marongui, B.; Piras, A.; Porcedda, S.; Tuveri, E.; Sanjust, E.; Meli, M.; Sollai, F.; Zucca, P.; Rescigno, A. Supercritical CO₂ extract of *Cinnamomum zeylanicum*: Chemical characterization and antityrosinase activity. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 10022-27.
- [18] Ganzler, K.; Salgo, A.; Valko, K.; Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1986**, 371, 299-306.
- [19] Ganzler, K.; Szinai, I.; Salgo, A. Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique. *J. Chromatogr.*, **1990**, 520, 257-62.
- [20] Savova, M.; Bart, H.; Seikova, I.; Enhancement of mass transfer in solid-liquid extraction by pulsed field. *J. Univ. Chem. Technol. Metall.*, **2005**, 40(4), 329-34.
- [21] Pinelo, M.; Del Fabbro, P.; Marzocco, L.; Nunez, M.J.; Vicoli, M.C. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chem.*, **2005**, 92, 109-17.
- [22] Herodez, S.S.; Hadolin, M.; Skerget, M.; Knez, Z. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chem.*, **2003**, 80(2), 275-82.
- [23] Cacace, J.E.; Mazza, G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *J. Food Sci.*, **2003**, 68(1), 240-48.
- [24] Gu, C.-H.; Li, H.; Gandhi, R.B.; Raghavan, K. Grouping solvents by statistical analysis of solvent property parameters: implication to polymorph screening. *Int. J. Pharm.*, **2004**, 283, 117-25.
- [25] Spigno, G.; De Faveri, D.M. Antioxidants from grape stalks and marc: influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *J. Food Eng.*, **2007**, 78, 793-801.
- [26] Pinelo, M.; Rubilar, M.; Jerez, M.; Sineiro, J.; Nunez, M. J. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 2111-17.
- [27] Yilmaz, Y.; Toledo, R.T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *J. Food Comp. An.*, **2006**, 19, 41-44.
- [28] Nongonierma, A.; Cayot, P.; Quéré, J.-L.L.; Springett, M.; Voilley, A.; Mechanisms of extraction of aroma compounds from foods, using adsorbents. Effect of various parameters. *Food Rev. Int.*, **2006**, 22, 51-94.
- [29] Dembitsky, V.M.; Srebnic, M. Use of serially coupled capillary columns with different polarity of stationary phases for the separation of the natural complex volatile mixture of the marine red alga *Corallina elongata*. *Biochemistry (Moscow)*, **2002**, 67(9), 1069-74.
- [30] Crespo, M.O.P.; Yusty, M.A.L. Determination of aliphatic hydrocarbons in the alga *Himanthalia elongata*. *Ecotox. Environ. Saf.*, **2004**, 57, 226-30.
- [31] Sugiyaman, K.; Saito, M. Simple microscale supercritical fluid extraction system and its application to gas chromatography-mass spectrometry of lemon peel oil. *J. Chromatogr.*, **1988**, 442, 121-31.
- [32] Williams, D.F. Extraction with supercritical gases. *Chem. Eng. Sci.*, **1981**, 36(11), 1769-88.
- [33] Stahl, E.; Schuetz, E. Extraction of labile natural substances with supercritical gases. Part 4. Extraction of valepotriates from *Valeriana wallichii*. *Planta Med.*, **1980**, 40(3), 262-70.
- [34] Houck, R.K.; Koebler, D.J.; Williams, G.; Kato, K.J.; Parks, R.D.; Bauer, P.A.Jr. Automated supercritical fluid extraction system. PCT Int. Appl., 1994, WO9408683.
- [35] Reid, R.C.; Prausnitz, J.M.; Shenvood, T.K. *Properties of Liquids and Gases*, 3rd ed.; McGraw-Hill, New York, **1977**.
- [36] Rizvi, S.S.H.; Benado, A.L.; Zollweg, J.A.; Daniels, J.A. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. *Food Techn.*, **1986**, 40(6), 55-64.
- [37] Sthal, E.; Gerard, D. Solubility behaviour and fractionation of essential oils in dense carbon dioxide. *Perf. Flav.*, **1985**, 10, 29-37.
- [38] Tholl, D.; Boland, W.; Hansel, A.; Loreto, F.; Röse, U.S.R.; Schnitzler, J.-P. Practical approaches to plant volatile analysis. *Plant J.*, **2006**, 45, 540-60.
- [39] Kolb, B. Headspace sampling with capillary columns. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 842, 163-205.
- [40] Moshonas, M.G.; Shaw, P.E. Dynamic headspace gas chromatography combined with multivariate analysis to classify fresh and processed orange juices. *J. Essent. Oil Res.*, **1997**, 9, 133-39.
- [41] Vitenberg, A.G. Equilibrium model in the description of gas extraction and headspace analysis. *J. Anal. Chem.*, **2003**, 58(1), 2-15.
- [42] Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 881, 569-81.
- [43] Bicch, C.; Cordero, C.; Liberto, E.; Sgorbini, B.; Rubiolo, P. Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1184, 220-33.
- [44] Cornu, A.; Kondjoyan, N.; Martin, B.; Verdier-Metz, I.; Pradel, P.; Berdague, J.-L.; Coulon, J.-B. Terpene profiles in Cantal and Saint-Nectairetype cheese made from raw or pasteurized milk. *J. Sci. Food Agric.*, **2005**, 85, 2040-46.
- [45] Belardi, R.P.; Pawliszyn, J.B. The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Water Poll. Res. J. Canada*, **1989**, 24(1), 179-91.
- [46] Arthur, C.L.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, **1990**, 62(19), 2145-48.
- [47] Zhang, Z.; Yang, M.J.; Pawliszyn, J. Solid-phase microextraction. A solvent-free alternative for sample preparation. *Anal. Chem.*, **1994**, 66(17), 844-54.
- [48] Mills, G.A.; Walker, V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 902, 267-87.
- [49] O'Reilly, J.; Wang, Q.; Setkova, L.; Hutchinson, J.P.; Chen, Y.; Lord, H.L.; Linton, C.M. Automation of solid-phase microextraction. *J. Sep. Sci.*, **2005**, 28(15), 2010-22.
- [50] Diaz-Maroto, M.C.; Pérez-Coello, M.S.; Cabezucto, M.D. Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile components of spices. *Chromatographia*, **2002**, 55, 729-35.
- [51] Barre, S.L.L.; Weinberger, F.; Kervarec, N.; Potin, P. Monitoring defensive responses in macroalgae - limitations and perspectives. *Phytochem. Rev.*, **2004**, 3, 371-79.
- [52] Guo, X.; Mitra, S. On-line membrane extraction liquid chromatography for monitoring semi-volatile organics in aqueous matrices. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 904, 189-96.
- [53] Caboni, P.; Sarais, G.; Cabras, M.; Angioni, A. Determination of 4-ethylphenol and 4-ethylguaicol in wines by LC-MS-MS and HPLC-DAD-Fluorescence. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 7288-93.
- [54] Kuehn, S.; Hickman, S.A.; Marohn, J.A. Advances in mechanical detection of magnetic resonance. *J. Chem. Phys.*, **2008**, 128, 052208.

- [55] Darbeau, R.W. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: a review and a look at its use as a probative tool in deamination chemistry. *Appl. Spectrosc. Rev.*, **2006**, *41*, 401-25.
- [56] Beauchêne, D.; Grua-Priol, J.; Lamer, T.; Demaimay, M.; Quéme-
neur, F. Concentration by pervaporation of aroma compounds from
Fucus serratus. *J. Chem. Tech. Biotech.*, **2000**, *75*, 451-58.
- [57] Kajiwar, T.; Kashibe, M.; Matsui, K.; Hatanaka, A. Volatile com-
pounds and long-chain aldehydes formation in conchocelis-
filaments of a red alga, *Porphyra tenera*. *Phytochemistry*, **1990**,
29(7), 2193-95.
- [58] Fujimura, T.; Kawai, T.; Shiga, M.; Kajiwar, T.; Hatanaka, A. Long-chain aldehyde production in thalli culture of the marine green alga *Ulva pertusa*. *Phytochemistry*, **1990**, *29*(3), 745-47.
- [59] Püttmann, W. Thermodesorption-gas chromatography-mass spec-
trometric analysis of biological materials for potential molecular
precursors of the constituents of the crude oils. *J. Chromatogr.*,
1991, *552*, 325-36.
- [60] Pape, M.-A.L.; Grua-Priol, J.; Prost, C.; Demaimay, M. Optimiza-
tion of dynamic headspace extraction of the edible red algae *Pal-
maria palmata* and identification of the volatile components. *J. Ag-
ric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 550-56.
- [61] Boland, W.; Müller, D.G. On the odor of the mediterranean sea-
weed *Dictyopteris membranacea*; New C11 hydrocarbons from ma-
rine brown algae - III. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*(3), 307-10.
- [62] Moore, R.E.; Pettus, J.A.; Mistysyn, J. Odoriferous C11 hydrocar-
bons from Hawaiian *Dictyopteris*. *J. Org. Chem. Soc.*, **1974**,
39(15), 2201-07.
- [63] Pettus, J.A.; Moore, R.E. Isolation and structure determination of
an undeca-1,3,5,8-tetraene and Dictyopterene B from algae of the
genus *Dictyopteris*. *Chem. Comm.*, **1970**, 1093-94.
- [64] Jaenicke, L.; Müller, D.G.; Moore, R.E. Multifidene and Aucan-
tene, C11 hydrocarbons in the male-attracting essential oil from the
gynogametes of *Cutleria multifida* (Smith) Grev. (Phaeophyta). *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, *96*(10), 3324-25.
- [65] Moore, R.E.; Yost, G. Dihydrotropone from *Dictyopteris*. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1973**, 937-38.
- [66] Moore, R.E.; Pettus, J.A. Dictyopterene A, an odoriferous constitu-
ent from algae of the genus *Dictyopteris*. *Tetrahedron Lett.*, **1968**,
46, 4787-90.
- [67] Kajiwar, T.; Hatanaka, A.; Kodama, K.; Ochi, S.; Fujimura, T. Dictyopterenes from three japanese brown algae. *Phytochemistry*, **1991**, *30*(6), 1805-07.
- [68] Pettus, J.A.; Moore, R. E. The isolation and structure determination
of Dictyopterenes C' and D' from *Dictyopteris*. Stereospecificity in
the cope rearrangement of Dictyopterenes A and B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*(12), 3087-88.
- [69] Woolard, F.X.; Burreson, B.J.; Moore, R.E. Isolation of (3*S*)-cis-
Octa-1,5-dien-3-ol from *Chondrococcus homemanni* (Rhodo-
phyta). *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1975**, 486-87.
- [70] Elenkov, I.; Georgieva, T.; Hadjieva, P.; Dimitrova-Konaklieva, S.;
Popov, S. Terpenoids and sterols in *Cladophora vagabunda*. *Phy-
tochemistry*, **1995**, *38*(2), 457-59.
- [71] Irie, T.; Yamamoto, K.; Masamune, D. Sesquiterpenes from *Dicty-
opteris divaricata*. *Bull. Chem. Soc Jpn.*, **1964**, *37*, 1053.
- [72] Fenical, W.; Sims, J.J. Zonarene, a sesquiterpene from the brown
seaweed *Dictyopteris zonarioides*. *Phytochemistry*, **1972**, *11*, 1161-
63.
- [73] Yamada, K.; Tan, H.; Tatematsu, H.; Ojiva, M. Dictyoprolene and
neodictyoprolene, two new odoriferous compounds from the brown
alga *Dictyopteris prolifera*: structures and synthesis. *Tetrahedron*,
1986, *42*(14), 3775-80.
- [74] Saleh, M.A.; Abdel-Moein, N.M.; Ibrahim, N.A. Insect antifeeding
azulene derivative from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *J. Ag-
ric. Food Chem.*, **1984**, *32*, 1432-34.
- [75] Pohnert, G.; Boland, W. The oxylipin chemistry of attraction and
defense in brown algae and diatoms. *Nat. Prod. Rep.*, **2002**, *19*,
108-22.
- [76] Wang, Y.; McCaffrey, J.; Norwood, D.L. Recent advances in head-
space gas chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*,
2008, *31*, 1823-51.

ANEXO M

Artigo publicado

"Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash in four Brazilian red algae species"

Analytical Methods

Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species

Vanessa Gressler^a, Nair Sumie Yokoya^b, Mutue Toyota Fujii^b, Pio Colepicolo^c, Jorge Mancini Filho^d, Rosangela Pavan Torres^d, Ernani Pinto^{a,*}

^a Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, São Paulo, Brazil

^b Instituto de Botânica, Departamento de Ficologia, São Paulo, Brazil

^c Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, São Paulo, Brazil

^d Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 September 2008

Received in revised form 29 August 2009

Accepted 13 October 2009

Keywords:

Marine red algae

Ash

Lipid

Fatty acid

Protein

Amino acid

ABSTRACT

Four species of marine benthic algae (*Laurencia filiformis*, *L. intricata*, *Gracilaria domingensis* and *G. birdiae*) that belong to the phylum Rhodophyta were collected in Espírito Santo State, Brazil and investigated concerning their biochemical composition (fatty acid, total lipid, soluble proteins, amino acid and ash). The total content of lipid (% dry weight) ranged from 1.1% to 6.2%; fatty acid from 0.7% to 1.0%; soluble protein from 4.6% to 18.3%, amino acid from 6.7% to 11.3% and ash from 22.5% to 38.4%. Judging from their composition, the four species of algae appear to be potential sources of dietary proteins, amino acids, lipids and essential fatty acids for humans and animals.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The ocean is responsible for 70% of the earth surface and it is the natural habitat of many plants, animals and microorganisms. Marine algae comprising a few thousands of species represent a considerable part of the littoral biomass and they are classified as red (Rhodophyta), brown (Phaeophyta) or green algae (Chlorophyta) depending on their nutrient and chemical composition (Dawczynski, Schubert, & Jahreis, 2007). Many algae species have been used in the industry principally for the extraction of phyco-colloids (algin, carrageenan, and agar) and as a source of pharmaceutical substances. They are also been used as herbal medicine, fertilizer, fungicides, herbicides and for direct use in human nutrition too (Aguilera-Morales, Casas-Valdez, Carrillo-Dominguez, Gonzáles-Acosta, & Pérez-Gil, 2005; Cardozo et al., 2007; Ortiz et al., 2006).

Sea plants are known as a highly nutritive food regarding vitamin, protein, mineral, fibre contents and essential fatty acids (Ortiz et al., 2006) and they can be eaten in raw salads, soups, cookies, meals and condiments (Aguilera-Morales et al., 2005). Red and brown algae are mainly used as human food sources and they

are traditionally used in Chinese, Japanese and Korean diet since ancient times (Dawczynski et al., 2007).

Fatty acids are important for human and animal health and they are of interested because they are precursors in the eicosanoids biosynthesis, which are viewed as important bioregulators of many cellular processes (Khotimchenko, 2005). Studies on fatty acids in the genus *Gracilaria* and *Laurencia* showed that these species are rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAS) mainly C20:4 (ω6) and C20:5 (ω3) for *Gracilaria*, and C16:2 (ω6), C20:2 and C20:5 (ω3) for *Laurencia*. Moreover other saturated and unsaturated fatty acids were described, but in less amounts (Khotimchenko, Vaskovsky, & Titlyanova, 2002; Li, Fan, Han, & Lou, 2002; Wahbeh, 1997).

Proteins are composed of different amino acids and hence the nutritional quality can be determined basically by the content, proportion and availability of its amino acids. Analyses of total protein in algae are often done in order to search new sources of protein supplements. In *Gracilaria* and *Laurencia* species the protein contents found ranged from 5.6% to 24% and 2.7% to 24.5%, respectively (Marinho-Soriano, Câmara, Cabral, & Carneiro, 2007; Marrion et al., 2005; McDermid & Stuercke, 2003; Renaud & Luong-Van, 2006; Wahbeh, 1997; Wen et al., 2006).

The amino acid composition of seaweeds has been frequently studied and compared to that of other foods. For most seaweeds, aspartic and glutamic acids constitute together a large part of the amino acid fraction. Munda (1977) reported that these two

* Corresponding author. Address: Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13B, CEP 05508900, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 30911505; fax: +55 11 30919055.

E-mail address: ernani@usp.br (E. Pinto).

aminoacids can represent between 22% and 44% of the total amino acids.

Some species of *Gracilaria* are known to be a source of food. *G. verrucosa* (called “Ogonori”) is a commonly used edible red alga in Japan. People mix ‘sashimi’ (raw fish) with commercial ogonori (Noguchi et al., 1994) and it has been consumed as a food in coastal regions as well (Wen et al., 2006). There are some reports about studies with *Laurencia* species as human food supply, however there are not conclusions about the feasibility of the use of this alga (McDermid & Stuercke, 2003).

The genus *Gracilaria* and *Laurencia* are very abundant in Brazilian coast. Therefore, the purpose of the present investigation was to study the nutritional value of four Brazilian red algae species *G. domingensis*, *G. birdiae*, *L. filiformis* and *L. intricata* in order to determine if these algae may be of nutritional value and, if warranted, to recommend its use for human consumption.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Four representative red macroalgae in Brazilian coast were collected manually from the intertidal zone, at depths between 30 cm and 1.20 m in various locations of Ubú beach, Anchieta, Espírito Santo State, Brazil (20°48'S–40°38'W), in 2007. Samples were rinsed with fresh water to eliminate foreign materials such as sand, shells, etc. The species *G. domingensis*, *G. birdiae*, *L. filiformis* and *L. intricata*, were grinded with liquid nitrogen and then lyophilised (giving dried material). The material was stored in plastic bags at –20 °C temperature and in the dark. All determinations were performed with triplicates collected in at least three different locations of Parati beach.

2.2. Ash determination

The determination of the ash content was done according to AOAC, 1995 procedure. Dried algae material was ashed in an electric oven (Robertshaw, Divisão Pyrotec) for 5 h by heating at 525 °C and the content was determined gravimetrically.

2.3. Total lipid content

Lipids were extracted using a modified method based on Erickson, 1993. To determine total lipid content a 14 mL of a mixture of chloroform and methanol 2:1 were added to a 2 g of lyophilised algae into a Pyrex® tube. The tube was closed, mixed in a vortex mixer for 2 min and the extract was filtered through Whatman 41 paper. The residue was re-extracted with 5 mL with the same solvent mixture in a vortex mixer during 30 s. The resulting extract was filtered through Whatman 41 paper and the two filtrates were pooled and concentrate to dryness under N_{2(g)}. Total lipids were gravimetrically determined on triplicate aliquots of each lipid extract.

2.4. Extraction and analysis of fatty acid composition

To verify the fatty acids, the AOAC 996.06 and AOCS Ce 1h-05 method were used, only the C13:0 standard was used in place of C11:0. A 1 g of each homogenised seaweed was weighted and 50 mg of pyrogalic acid (Sinth®, São Paulo) to minimised fatty acid degradation, 0.5 mL of the triglyceride C13:0 standard solution (5 mg/mL in chloroform, Sigma) and 1 mL of ethanol was added. The acid hydrolysis was done with HCl 8.3 M (5 mL) and mixed in shaker (70–80 °C, 40 min, Marconi®) followed by shaken in vortex (Scientific Instruments®, Genie 2) each 10 min. At room tempera-

ture, the lipids were extracted with ethylic ether (12 mL, mixer in vortex for 1 min) and petroleum ether (12 mL, mixer in vortex for 1 min). Each sample was centrifuged (Eppendorf®, 5804R), the ether phase was transferred into a Pyrex® tube 9826 (30 mL) and the solvent was evaporated until dryness in a temperature lower than 40 °C under N_{2(g)}. The fatty acids in the extracted lipid were methylated to fatty acids methyl esters (FAMES) with boron trifluoride/methanol (7%, Sigma) followed by heating in 0.5 mL of toluene at 100 °C for 45 min with gentle mix at each 10 min. After the end of the reaction, at room temperature, 2.5 mL of water were added and the FAMES were extracted with 1 mL of hexane. The hexane fraction was transferred into the auto-injector vial, dried in N_{2(g)} and resuspended in 100 µL of hexane to GC–FID analysis.

Fatty acid composition was determined by GC-17 A (Shimadzu/Class GC 10) with flame ion detector, and a 100 m fused silica SP 2560 capillary column 0.25 µm film (Supelco Park, Bellefonte, PA, USA). The temperature condition was 100 °C for 5 min, 100–240 °C in a rate of 3 °C/min, and at 240 °C for 20 min. Injector temperature: 225 °C; detector temperature: 285 °C; carrier gas: helium (linear flow 20 cm s⁻¹); split 1:50. The reference fatty acids methyl esters (FAMES) were 189.19 and 189.15 from Sigma.

2.5. Total protein analysis

Soluble protein determination was done according to the Bio-Rad® Protein Assay method based on Bradford's method (Bradford, 1976). To 1 g of fresh powdered material, 9.9 mL of phosphate buffer (0.2 M, pH 8.0), 100 µL of EDTA 0.5 M and 20 µL of dithiothreitol DTT (0.5, pH 5.2, GibcoBRL) were added in order to extract the soluble protein and then centrifuged (15 min, 4 °C and 12,000 rpm). To the supernatant, 760 µL of distilled water and 200 µL of Bio-Rad® dye (BioRad) were added in order to acquire a concentration of 4 µg µL⁻¹. A 100 µL of this solution was transferred to a 96 wells plate and then the measure of the absorbance was done in λ = 595 nm.

To obtain the standard curve, BSA (bovine serum albumin, Bio-Rad®) standard was used in the final concentrations of 2, 4, 5, 7 and 10 µg µL⁻¹. All tests were performed in triplicate.

2.6. Amino acid analysis with post-column derivatization

2.6.1. Acid hydrolysis

The protein and peptides acid hydrolysis is carried out in order to quantify the following amino acids: lysine, histidine, arginine, aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, cysteine, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine and phenylalanine.

Sample aliquots containing around 5.0–50.0 nmol of protein (or 5–10 mg of solids without fat) were transferred to 10 × 150 mm (Pyrex®) borosilicate ampoules previously pyrolysed at 400 °C for 8 h. To each ampoule, 0.5 mL of HCl 6 M with 0.1% of phenol (m/v) was added. Vacuum was applied before to seal the ampoules and then they were put into an oven at 110 °C for 22 h (Moore, Spackman, & Stein, 1958).

2.6.2. Alkaline hydrolysis

For the tryptophan amino acid analysis, samples containing approximately 40–80 nmol of protein (or 10–20 mg of solid) were necessary. The samples were transferred to a 10 × 150 mm (Pyrex®) borosilicate ampoules previously pyrolysed at 400 °C for 8 h. To each ampoule 0.5 mL of LiOH 4N was added, sealed in vacuum and put in an oven at 110 °C for 24 h (Lucas & Sotelo, 1980).

2.6.3. Amino acid analysis

The hydrolysed samples were analysed according to the guidelines of the European Community (98/64/EG). Amino acid samples

Table 1Ash, lipid, protein and fatty acid content average (% in dry weight, $n = 3$) in the studied algae.

Specie	Ash	Total lipid	Soluble protein	Amino acid	Fatty acid
<i>G. domingensis</i>	23.8 ± 0.1	1.3 ± 0.1	6.2 ± 0.1	7.6 ± 0.0	0.8 ± 0.0
<i>G. birdiae</i>	22.5 ± 0.3	1.3 ± 0.1	7.1 ± 0.2	9.1 ± 0.0	1.0 ± 0.0
<i>L. filiformis</i>	38.4 ± 0.1	6.2 ± 0.2	18.3 ± 0.4	11.3 ± 0.0	0.8 ± 0.0
<i>L. intricata</i>	33.5 ± 1.0	1.1 ± 0.0	4.6 ± 0.0	6.7 ± 0.0	0.7 ± 0.1

were separated by ion exchange chromatography and determined by reaction with ninhydrin with photometric detection at 570 nm (440 nm for proline) using the automatic amino acid analyser LC-3000 (Eppendorf-Bio-tronik; Germany). Amino acid standard solution (A9781 from Sigma–Aldrich®, Germany) (0.5 µmol/mL) was injected to calibrate the analyser and to calculate the amount of amino acid in the samples.

3. Results and discussion

In some red algae, the protein fraction can represent between 2.7% and 47.0% (dry weight) of the plant (Dawczynski et al., 2007; McDermid & Stuercke, 2003). In this study the protein content of the species tested were 6.2% to *G. domingensis*, 7.1% to *G. birdiae*, 18.3% to *L. filiformis* and 4.6% to *L. intricata*. The protein content of the *Gracilaria* species was of the same order as reported for *G. salicornia* (C. Agardh) Dawson (6.0%) and *Gracilaria* sp. (7.0%) (Renaud & Luong-Van, 2006) and the result obtained to *G. birdiae* is in concordance with the *G. birdiae* collected in Ceará State, Brazil (Maciel et al., 2008). Among the two *Laurencia* species studied, the protein fraction did not show similar amount. *L. filiformis* content was much higher than *L. intricata*, but lower than *L. obtusa* described by Wahbeh (1997). This large variation is described between species in the literature (McDermid & Stuercke, 2003; Renaud & Luong-Van, 2006; Wahbeh, 1997).

The four species showed large amounts of aspartic and glutamic acids, 25.0%, 24.2%, 25.7% and 28.4% for *G. domingensis*, *G. birdiae*, *L. filiformis* and *L. intricata*, respectively. Previous experiments described by Lewis (1974) with *Laurencia* species showed similar

contents of aspartic and glutamic acids (15.1–27.4%) when compared to our data. Munda (1977) also reported amounts from 22% to 44%. The essential amino acids (EAAs) methionine, leucine, isoleucine, lysine, phenylalanine, tyrosine, arginine, cysteine, threonine, and valine and non-EAA, tryptophan, histidine, aspartic acid,

Table 3Fatty acids composition of *G. domingensis*, *G. birdiae*, *L. filiformis* and *L. intricata* (mg/g dry weight, $n = 3$).

Fatty acids	Fatty acid content (mg/g)			
	<i>G. domingensis</i>	<i>G. birdiae</i>	<i>L. filiformis</i>	<i>L. intricata</i>
<i>Saturated</i>				
4:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8:0	n.d.	n.d.	0.8 ± 0.1	n.d.
10:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
11:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12:0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	n.d.
14:0	0.8 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.6 ± 0.0
15:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16:0	5.3 ± 0.0	5.8 ± 0.2	4.1 ± 0.1	3.1 ± 0.2
17:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18:0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	n.d.
20:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
21:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
23:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total	6.3 ± 0.1	6.5 ± 0.2	6.0 ± 0.1	3.7 ± 0.2
<i>Monounsaturated</i>				
14:1 (ω5)	n.d.	n.d.	0.1 ± 0.0	n.d.
15:1 (ω5)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16:1 (ω7)	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0
17:1 (ω7)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18:1c (ω9)	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.1
20:1 (ω9)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22:1 (ω9)	n.d.	n.d.	0.1 ± 0.0	n.d.
24:1 (ω9)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.8 ± 0.0
<i>Polyunsaturated</i>				
18:2c (ω6)	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
18:3 (ω3)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18:4 (ω3)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20:2 (ω6)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20:3 (ω3)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20:3 (ω6)	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	n.d.
20:4 (ω6)	1.0 ± 0.0	2.8 ± 0.1	0.4 ± 0.1	1.5 ± 0.2
20:5 (ω3)	n.d.	n.d.	0.8 ± 0.2	1.7 ± 0.1
22:2 (ω8)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22:6 (ω3)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total	1.2 ± 0.0	3.0 ± 0.1	1.4 ± 0.3	3.3 ± 0.3
<i>Trans</i>				
18:1t (ω9)	n.d.	n.d.	0.2 ± 0.1	n.d.
18:2t (ω6)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Total FA	8.1 ± 0.1	10.2 ± 0.2	8.3 ± 0.1	7.8 ± 0.5
Ratio ω3/ω6 (mg/g)	–	–	1.1 ± 0.0	1.1 ± 0.0
% of saturated FA	77.7 ± 0.2	63.5 ± 1.2	72.3 ± 2.9	50.6 ± 0.5
% of monounsaturated FA	7.5 ± 0.1	6.6 ± 0.1	8.5 ± 0.2	10.5 ± 0.1
% of polyunsaturated FA	14.8 ± 0.1	29.9 ± 1.2	16.7 ± 2.0	38.9 ± 0.6
% trans FA	0.00	0.00	2.4 ± 0.8	0.00

n.d. Not detected.

Table 2Amino acids composition of *G. domingensis*, *G. birdiae*, *L. filiformis* and *L. intricata* (% of dry weight, $n = 3$).

Amino acids	Amino acid content (mg/100 mg of dry weight)			
	<i>G. domingensis</i>	<i>G. birdiae</i>	<i>L. filiformis</i>	<i>L. intricata</i>
Tryptophan	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Lysine	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.5 ± 0.0
Histidine	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Arginine	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.2 ± 0.0
Aspartic acid	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.5 ± 0.0	1.0 ± 0.0
Threonine	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.0
Serine	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.0
Glutamic acid	0.9 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.4 ± 0.0	0.9 ± 0.0
Proline	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Glicine	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.5 ± 0.0
Alanine	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.5 ± 0.0
Cysteine	0.03 ± 0.0	0.04 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.04 ± 0.0
Valine	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Methionine	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Isoleucine	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Leucine	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.5 ± 0.0
Tyrosine	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Phenylalanine	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Total AA	7.6 ± 0.0	9.1 ± 0.0	11.3 ± 0.0	6.7 ± 0.0
EAA	3.5	4.2	5.5	2.9
Non-EAA	4.1	4.9	5.8	3.8
EAA/non-EAA	0.9	0.9	0.9	0.8
EAA/total AA	0.5	0.5	0.5	0.4

EAA: Essential amino acid.

glutamic acid, serine, proline, glycine and alanine were present in relatively high levels, except for methionine and cysteine, which showed low amounts, less than 0.3% and 0.1%, respectively for both algae. The amino acid composition (% of dried weight) is illustrated in Table 2. Amino acids levels ranged from 6.7% to 11.3% in the studied species. The ratio of essential amino acids to the total amino acid for *Gracilaria* and *Laurencia* species were almost 0.5. Therefore, around 50% of the amino acids are EAA. The results also indicated a good ratio of EAA to non-EAA for all species (0.8–0.9).

The literature data show that the ash content of *Gracilaria* and *Laurencia* species ranged from 22.7% to 53.4% and 31.0% to 42.2%, respectively (McDermid & Stuercke, 2003; Norziah & Ching, 2000; Renaud & Luong-Van, 2006). The ash content determined in *G. birdiae* was a little lower but had no significant difference with those described in some reports. To *G. domingensis*, *L. filiformis* and *L. intricata* our results were consistent with previous studies.

The lipid contents of the four Brazilian algae species are listed in Table 1, where as summarised therein the total lipid contents vary

Fig. 1. Chromatograms of the FAMES of the four red algae species tested. (a) Standard 189.19; (b) Standard 189.15; (c) *G. domingensis*; (d) *G. birdiae*; (e) *L. filiformis*; (f) *L. intricata*. Where: 1-C4:0; 2-C6:0; 3-C8:0; 4-C10:0; 5-C11:0; 6-C12:0; 7-C13:0; 8-C14:0; 9-C14:1; 10-C15:0; 11-C15:1; 12-C16:0; 13-C16:1; 14-C17:0; 15-C17:1; 16-C18:0; 17-C18:1t; 18-C18:1c; 19-C18:2t; 20-C18:2c; 21-C20:0; 22-18:3 g; 23-C20:1; 24-C18:3; 25-C21:0; 26-C20:2; 27-C22:0; 28-C20:3n6; 29-C22:1; 30-C20:3n3; 31-C23:0; 32-C20:4; 33-C22:2; 34-C24:0; 35-C20:5; 36-C24:1; 37-C22:6; 38-C18:4.

with algal species. These results thus may reflect the difference capability of accumulating lipids.

Dates presented in the literature show that the lipid content in marine algae are less than 4% (Herbreteau, Coiffard, Derrien, & De Roeck-Holtzhauer, 1997; McDermid & Stuercke, 2003). To *G. domingensis* and *G. birdiae*, the lipid amount ranged between this content and it was in same order as reports for *G. cortica* (2.1%), *G. canaliculata* (1.4%), *G. foliifera* (0.7%), *G. textorii* (0.9%), *G. verrucosa* (1.6%), *G. coronopifolia* (2.1%), *G. parvispora* (2.8%) and *G. salicornia* (2.4%) (McDermid & Stuercke, 2003; Robledo & Pelegrin, 1997). To *L. filiformis*, in contrast, our results showed that *L. filiformis* has about 6.2% of fat, which is comparable with *L. majuscula* (Harv.) Lucas (5.1%) (Renaud & Luong-Van, 2006). There was significantly lower percentage of lipid in the other *Laurencia* species (1.1%) but this result shows a similarity with the lipid content of *L. dotyi* (2.2%), *L. mcdermidiae* (2.1%) and *L. nidifica* (3.4%) (McDermid & Stuercke, 2003).

In Table 3, we summarised our results of fatty acids analysis of the four algae species and a typical chromatogram of fatty acids composition in *G. domingensis*, *G. birdiae*, *L. filiformis* and *L. intricata* is given in Fig. 1. Palmitic acid was the major acid in all species tested. It accounted more than a half of the total acid content for *G. domingensis* (65.4%) and *G. birdiae* (56.9%) and for *L. filiformis* and *L. intricata* the content was 49.4% and 39.7%, respectively. The second major fatty acid varied in the four species, to *G. domingensis* and *G. birdiae* was the arachidonic acid with 12.4% and 27.6%, respectively, to *L. filiformis* was the tetradecanoic acid with 11.4% and to *L. intricata* was the *cis*-5,8,11,14,17 eicosapentaenoic acid with 23.0%.

According to the literature, the genus *Gracilaria* has as the highest amount of saturated FA the palmitic acid (Khotimchenko, 2005; Norziah & Ching, 2000; Vaskowsky, Khotimchenko, Xia, & Hefang, 1996; Wen et al., 2006), however the authors found less quantities comparing with our results. Small quantities of C12:0, C14:0, and 18:0 (Table 3). Previous published data show higher composition of unsaturated fatty acids, predominantly linoleic and oleic acid and in our results, only *G. domingensis* presented the first one. For polyunsaturated FA it was found in the literature mostly arachidonic (Wen et al., 2006) and eicosapentaenoic acids (Norziah & Ching, 2000) and we found 12.3% of the arachidonic acid in *G. domingensis* and 27.5% in *G. birdiae*. Others unsaturated FA, like C16:1, C18:1c and C18:2c and no one *trans* FA were found in the two *Gracilaria* species (Table 3).

Our results for the genus *Laurencia* concerning the content of the major saturated compound presented some discrepancies when compared to the literature (Li et al., 2002; Wahbeh, 1997). The amount of palmitic acid was similar to data previously described for this genus (Li et al., 2002). As we can see in Table 3, *L. filiformis* presents five different saturated FA (C8:0, C12:0, C14:0, C16:0, and C18:0) comparing with two (C14:0 and C16:0) in *L. intricata* and the amount in the alga *L. filiformis* is almost two times higher than in *L. intricata*. The profile of monounsaturated FA in these two species was quite similar. Only *L. filiformis* presented others two FA (C14:1 and C22:1) but in small amount comparing with *L. intricata*. For PUFA, our results are only consistent with Wahbeh, 1997. The most abundant PUFA was C20:5 but smaller quantities of C20:3, C18:2c and C20:4 were found to *G. domingensis* and C18:2c and C20:4 to *G. birdiae* (Table 3).

Interestingly, marine algae are rich in PUFAs of the ω 3 and ω 6 series which are considered essential fatty acids since they are not biosynthesized by mammal and must be taken via food chain. Seaweeds are not used as a conventional energy source because of the low level of lipids, however, seaweeds contain significantly higher levels of polyunsaturated fatty acids than land vegetables (Darcy-Vrillon, 1993). Studies have suggested that an increase of dietary ω 3/ ω 6 ratio is beneficial to human health (Horrocks &

Yeo, 1999) and cardiovascular health benefits of increased ω 3 PUFA consumption have been demonstrated (Moreno & Mitjavila, 2003). The ω 3/ ω 6 ratio was at most 1.1 mg/g to *L. filiformis* and *L. intricata*, so that the seaweeds studied here may be of use for the increase of this proportion.

4. Conclusion

The seaweeds *G. domingensis* and *G. birdiae*, examined in this study have the same amount of total lipids and a little variation in the total amino acid and total fatty acid contents. The difference between these two species is in the amount of each amino acid and fatty acid. A small variation was observed in the soluble protein of these two species, however it is in the range described in the literature. In contrast, the two species of the genus *Laurencia* showed a large variation on the lipid, protein content and amino acid composition. At the same time that *L. filiformis* showed the highest amount of total lipid, the content of fatty acid among the two species tested was of same order. In addition, *L. filiformis* was the unique specie that contained *trans* fatty acids (2.4%). Moreover, *L. filiformis* appeared to be an interesting potential source of food protein and essential amino acids. For the *Gracilaria* and *Laurencia* species tested, the ash content was the most abundant component of the dried material.

Our data for protein, amino acid, ash, lipid and fatty acid also contents may also be dependent of seasonal period, geographical location and environmental growth conditions. The composition variety of the algal content was also reported for various species (Khotimchenko et al., 2002; Renaud & Luong-Van, 2006).

The economic, cultural and scientific development of our society has changed the food habits and life-style requiring expansion in food production as it can be observed with the increase of seaweed products' consumption in European countries (Dawczynski et al., 2007). In this concept, aquaculture of *Gracilaria* and *Laurencia* species in tropical and subtropical countries can be an alternative source of food and resources to the coastal communities, mostly in-between fishing season.

Acknowledgements

The authors thank for the kind support of Aline Martins, and Gabriela M. Machado. This research was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and VG fellowship from FAPESP.

References

- Aguilera-Morales, M., Casas-Valdez, M., Carrillo-Dominguez, S., Gonzáles-Acosta, B., & Pérez-Gil, F. (2005). Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha* spp. as a potential food source. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 79–88.
- AOAC Official Method 996.06. Fat (total, saturated, and unsaturated) in foods. Hydrolytic extraction gas chromatography method. Approved in 1996. Revised in 2001.
- AOCS Official Method Ce 1h-05. Determination of *cis*-, *trans*-, saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in vegetable or non-ruminant animal oils and fats by capillary GLC. Approved in 2005. Revised in 2005.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., et al. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Toxicology and Pharmacology*, 146, 60–78.
- Darcy-Vrillon, B. (1993). Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 44, 23–35.
- Dawczynski, C., Schubert, R., & Jahreis, G. (2007). Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry*, 103, 891–899.

- Erickson, M. C. (1993). Lipid extraction from channel catfish muscle: Comparison of solvent systems. *Journal of Food Science*, 58(1), 84–89.
- Guideline of the European communities: Guideline 98/64/EC of the commission of September 3rd, 1998 for the specification of common analysis methods for the regulation of amino acids, raw greases and Olaquinox in feedstuffs and for the change of the guideline 71/393/EEC: L257/14-L257/23.
- Herbreteau, F., Coiffard, L. J. M., Derrien, A., & De Roeck-Holtzhauer, Y. (1997). The fatty acid composition of five species of macroalgae. *Botanica Marina*, 40, 25–27.
- Horrocks, L. A., & Yeo, Y. K. (1999). Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacological Research*, 40(3), 211–225.
- Khotimchenko, S. V. (2005). Lipids from the marine alga *Gracilaria verrucosa*. *Chemistry of Natural Compounds*, 41(3), 285–288.
- Khotimchenko, S. V., Vaskovsky, V. E., & Titlyanova, T. V. (2002). Fatty acids of marine algae from the Pacific coast of north California. *Botanica Marina*, 45, 17–22.
- Lewis, E. J. (1974). Protein, peptide, and free amino acid composition in some species of *Laurencia* from Saurashtra coast. *Proceedings of the Indian National Science Academy, Part B: Biological Sciences*, 40(1), 38–43.
- Li, X., Fan, X., Han, L., & Lou, Q. (2002). Fatty acids of some algae from the Bohai Sea. *Phytochemistry*, 59, 157–161.
- Lucas, B., & Sotelo, A. (1980). Effect of different alkalies, temperature, and hydrolyses times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. *Analytical Biochemistry*, 109(1), 192–197.
- Maciel, J. S., Chaves, L. S., Souza, B. W. S., Teixeira, D. I. A., Freitas, A. L. P., Feitosa, J. P. A., et al. (2008). Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Carbohydrate Polymers*, 71, 559–565.
- Marinho-Soriano, E., Câmara, M. R., Cabral, T. M., & Carneiro, M. A. A. (2007). Preliminary evaluation of the seaweed *Gracilaria cervicornis* (Rhodophyta) as a partial substitute for the industrial feeds used in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming. *Aquaculture Research*, 38, 182–187.
- Marrion, O., Fleurence, J., Schwartz, A., Guéant, J.-L., Mamelouk, L., Ksouri, J., et al. (2005). Evaluation of protein *in vitro* digestibility of *Palmaria palmata* and *Gracilaria verrucosa*. *Journal of Applied Phycology*, 17, 99–102.
- McDermid, K. J., & Stuercke, B. (2003). Nutritional composition of edible Hawaiian seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 15, 513–524.
- Moore, S., Spackman, D. H., & Stein, W. H. (1958). Chromatography of amino acid on sulfonated polystyrene resins. *Analytical Chemistry*, 30(7), 1185–1190.
- Moreno, J. J., & Mitjavila, M. T. (2003). The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (Review). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14, 182–195.
- Munda, I. M. (1977). Differences in amino acid composition of estuarine and marine fucoids. *Aquatic Botany*, 3, 273–280.
- Noguchi, T., Matsui, T., Miyazawa, K., Asakawa, M., Iijima, N., Shida, Y., et al. (1994). Poisoning by the red alga 'ogonori' (*Gracilaria verrucosa*) on the Nojima coast, Yokohama, Kanagawa Prefecture, Japan. *Toxicon*, 32(12), 1533–1538.
- Norziah, M. H., & Ching, C. Y. (2000). Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. *Food Chemistry*, 68, 69–76.
- Ortiz, J., Romero, N., Robert, P., Araya, J., Lopez-Hernández, J., Bozzo, C., et al. (2006). Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chemistry*, 99, 98–104.
- Renaud, S. M., & Luong-Van, J. T. (2006). Seasonal variation in the chemical composition of tropical Australian marine macroalgae. *Journal of Applied Phycology*, 18, 381–387.
- Robledo, D., & Pelegrin, Y. F. (1997). Chemical and mineral composition of six potentially edible seaweed species of Yucatan. *Botanica Marina*, 44, 301–306.
- Vaskovsky, V. E., Khotimchenko, S. V., Xia, B., & Hefang, L. (1996). Polar lipids and fatty acids of some marine macrophytes from the Yellow sea. *Phytochemistry*, 42(5), 1347–1356.
- Wahbeh, M. I. (1997). Amino acid macroalgae and fatty acid profiles of four species of from Aqaba and their suitability for use in fish diets. *Aquaculture*, 159, 101–109.
- Wen, X., Peng, C., Zhou, H., Lin, Z., Lin, G., Chen, S., et al. (2006). Nutritional composition and assessment of *Gracilaria lemaneiformis* Bory. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(9), 1047–1053.

ANEXO N

Artigo publicado em colaboração

“Antioxidant and antimicrobial properties of 2-(4,5-Dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-
pyrimidine and 1-Carboxamidino-1H-pyrazole derivatives”

Antioxidant and Antimicrobial Properties of 2-(4,5-Dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-pyrimidine and 1-Carboxamidino-1H-pyrazole Derivatives

Vanessa Gressler,^{*a} Sidnei Moura,^a Alex F. C. Flores,^c Darlene C. Flores,^c
Pio Colepicolo^b and Ernani Pinto^a

^aFaculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580,
Bloco 13B, 05508-900 São Paulo-SP, Brazil

^bInstituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, Bloco 9,
05508-900 São Paulo-SP, Brazil

^cDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000,
97105-900 Santa Maria-RS, Brazil

Cinco derivados de 4-trifluorometil-2-(5-aryl-3-stiril-1H-pirazol-1il)-pirimidinas e seis 5-aryl-3-estiril-1-carboxamidino-1H-pirazois previamente sintetizados foram avaliados de acordo com suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Estas atividades foram avaliadas por ensaios de DPPH e HRP/luminol/H₂O₂ quimioluminescência e suas atividades antimicrobianas (CIM). Os resultados foram bons para alguns compostos da série em certas concentrações em comparação direta com padrões.

Five previously synthesized 4-trifluoromethyl-2-(5-aryl-3-styryl-1H-pyrazol-1yl)-pyrimidines and six 5-aryl-3-styryl-1-carboxamidino-1H-pyrazole derivatives were screened for their antioxidant proprieties. The antioxidant activities were evaluated by using the DPPH and the HRP/luminol/H₂O₂ chemiluminescence assay systems and for their antimicrobial activity (MIC). The results were good for those series in some concentration in comparison with the standards.

Keywords: heterocycles, 4,5-dihydropyrazoles, antioxidant activity, antimicrobial activity

Introduction

Pyrazole derivatives represent a class of compounds of great importance in heterocyclic chemistry, primarily due to the fact that many 1H-pyrazoles are subunits of pharmaceutical and agrochemical agents.¹ Structurally novel 2-(1H-pyrazol-1-yl)-pyrimidine derivatives have been reported to have interesting biological activity. Epirazole is a nonsteroidal anti-inflammatory and analgesic agent therapeutically applied in Japan. In addition, many 2-(1H-pyrazol-1-yl)-pyrimidine derivatives show potent inhibition of induced ulcers in rats, as well as herbicidal, fungicidal and cardiotoxic activities.² Moreover, the 1,3,5-triaryl-4,5-dihydropyrazole and 5-aryl-3-styryl-4,5-dihydropyrazole derivatives are well-known fluorescent compounds with high emission quantum yields and are widely used as optical brighteners, and as fluorescence

probes in chemosensors.³ Also, polycyclic heterocycles have been reported to be antioxidant and antimicrobial agents.⁴⁻⁶

Reactive oxygen species (ROS) and free radicals *in vivo* are involved in a wide range of human diseases.⁷ ROS, including superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical are by-products of a variety of pathways of aerobic metabolism. They are unstable and react readily with a wide range of biological substrates, such as lipids, DNA, and proteins, resulting in cell damage.⁸⁻¹⁰ Therefore, antioxidants may prevent damage and death of cells.

The use of antimicrobial drugs to treat public health is growing and it is possible to see an emergence of bacterial resistance. To maintain the efficiency of the treatment of disease caused by bacteria, new active compounds are always being searched for.¹¹

The aim of this work is to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of a series of five 2-(4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)pyrimidines and six 1-carboxamidino-

*e-mail: vgressler@usp.br

Figure 1. Chemical structures of evaluated compounds.

1H-pyrazoles (Figure 1) that were previously synthesized.³ These new heterocyclic systems were of interest principally for antioxidant properties due to the presence of a conjugated π -system. Thus, some of these molecules might be important in preventing for the treatment of diseases related to the imbalance between formation and detoxification.

Antioxidants may be classified according to their mode of action as free radical scavengers, chelators of metal ions involved in catalyzing lipid oxidation, or oxygen scavengers that react with oxygen in closed systems.¹² Several different methods are available and have been used to assess the total antioxidant capacity of numerous molecules. Two commonly used antioxidant evaluation methods, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging and chemiluminescence determination in the presence of HRP, were applied to determine the antioxidant capacity. The target compounds were compared with vitamin E and *N*-acetyl-*L*-cysteine, respectively, as reference compounds.

Experimental

Synthesis

The 5-aryl-1-carboxamidino-3-styryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles **1a-e** were synthesized by the reactions of 1,5-diarylpenta-1,4-dien-3-ones with aminoguanidine hydrochloride in the presence of triethylamine in ethanol, under reflux for **24 hours**.

Reactions of 1-carboxamidino-4,5-dihydro-1H-pyrazole compounds with 4-alkoxy-1,1,1-trifluoro-alk-3-en-2-ones were carried out in refluxing ethanol (2-72 h) with a catalytic amount of BF₃·OEt₂ or Ti(O-*i*Pr)₄, affording the 2-(5-aryl-3-styryl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-4-(trifluoromethyl) pyrimidines **2a-e**.

DPPH radical scavenging assay

The DPPH radical scavenging model is extensively used to evaluate antioxidant activities faster than with

other methods. Radical scavenging activity of solutions at several concentrations of the compounds (**1a-f** and **2a-e**) were evaluated against stable DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate) spectrophotometrically according to Yen and Chan,¹³ with some modifications. The absorbance decrease was measured at 517 nm (10 min) on a UV-Visible spectrophotometer (Spectrum Power Wave X 340, Bio-Tec Instruments, INC). The DPPH solution (1×10^{-3} mol L⁻¹ in methanol) was freshly prepared. 10 µL of this solution were mixed with 100 µL of solutions of final concentrations of 500, 250, 100, 50 and 5 µg mL⁻¹ in a 96-well plate. The samples were kept in the dark for 20 min at room temperature and then the decay of absorption was followed. Vitamin E was used as a positive control. The experiment was carried out in triplicate. Radical scavenging activity was calculated as follows:

$$\text{Inhibition \%} = \frac{(\text{Abs}_{\text{DPPH}} - \text{Abs}_{\text{sample}})}{\text{Abs}_{\text{DPPH}}} \times 100$$

where Abs_{DPPH} – absorption of blank sample (MeOH + DPPH) and Abs_{sample} – absorption of tested solution + DPPH (t = 30 min).

Chemiluminescence determination in the presence of HRP

This method is based on light emission and, for antioxidant determination, solutions of 1 mg mL⁻¹ of the test sample in phosphate buffer 5% DMSO were mixed with H₂O₂, yielding a final concentration of 5×10^{-5} mol L⁻¹. Then luminol (5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione, in DMSO) was added to a final concentration of 1.13×10^{-4} mol L⁻¹. The 96-well plate was incubated for 3 min at 30 °C and then HRP at a final concentration of 0.2 IU mL⁻¹ was added to initiate the chemiluminescence reaction.¹⁴ Phosphate buffer / 5% DMSO was used as a blank for the maximum luminescence and *N*-acetyl-*L*-cysteine was used as the positive control. Chemiluminescence was measured for 15 min at 25 °C with a microplate reader (Tecan-infinite®M200). Final concentrations of 500, 250, 100, 50 and 5 µL mL⁻¹ of the solutions were analyzed and the experiment was carried out in triplicate. The antioxidant activity was calculated by the following formula:

$$\text{Inhibition \%} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

where A_{control} is the area under the curve of the blank (phosphate buffer / 5% DMSO + H₂O₂ + luminol + HRP) during 15 min and A_{sample} is the area under the curve of the sample (sample + H₂O₂ + luminol + HRP) during 15 min.

Antimicrobial testing (MIC)

In vitro antimicrobial studies were carried out against eight bacterial strains (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), and one yeast strain (*Candida albicans* ATCC 10231). The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined in 96-well culture plates by a micro-dilution method using a microorganism suspension with a density of 10⁵ CFU mL⁻¹ in Mueller Hinton broth (MHB) incubated for 24 h at 35 ± 1 °C for bacteria, and Sabouraud broth (SB) incubated for 72 h at 35 ± 1 °C for yeast, as recommended by NCCLS for determination of the MIC (NCCLS M100-S15 and M38-A).^{15,16} Proper blanks were assayed simultaneously with samples tested in triplicate. The concentrations tested were 500, 250, 125, 62.5, 31.25 and 16.125 µg mL⁻¹. The minimum lethal concentration (MLC) was carried out by inoculating the suspension of the concentrations tested in a Petri plate with Nutrient agar and incubated 24 h at 35 ± 1 °C for bacteria and Sabouraud agar dextrose for 72 h at 35 ± 1 °C for yeast. After the incubation period, the MLC was determined by the absence of microorganism growth.

Results and Discussion

The DPPH antioxidant assay measures the hydrogen donating capacity of the molecules in the sample.^{13,17} When the free radical DPPH is reduced by the sample, its colour changes from violet to yellow. This absorbance decline is measured and the antioxidant capacity can be determined. On the other hand, the chemiluminescence method is based on the light emission produced by a chemical reaction. In this case, the chemiluminescence oxidation of luminol involves the formation of a complex between the oxidant (H₂O₂) and the HRP enzyme, oxidized HRP leading to luminol radical production. The native enzyme (+3) reacts with H₂O₂ and, in this way, catalyzes the luminol oxidation (LH⁻) through the enzymatic cycle. Luminol reacts with the HRP intermediates [complex I (+5) and II (+4)] producing the luminol radical (L⁻), which then reacts with oxygen resulting in the formation of an endoperoxide (LO²⁻). This endoperoxide decomposes to a excited electronically 3-aminophthalate dianion (AP*²⁻), which returns to its ground state with emission of light. In the presence of antioxidant molecules (RH), the luminol radical reacts more quickly with these molecules than with oxygen, preventing the luminol radical from oxidation to 3-aminophthalate and

inhibiting light emission. This light emission reduction is considered to be a measure of the antioxidant activity.¹⁸

The samples **2a**, **2c** and **2e** were not totally soluble in the DMSO/phosphate buffer system and, because of the lack of stability of HRP to higher levels of DMSO, the concentrations tested were ten times lower (50, 25, 10 and 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in the chemiluminescence antioxidant assay. The higher concentrations (100, 250 and 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were estimated according to each curve profile in order to compare the results with those obtained in the DPPH assay.

The evaluation *via* more than one assay is interesting for comparison between possible mechanisms of action for antioxidant properties. Profiles of the antioxidant potentials of the tested compounds are shown in Figure 2 and in Table 1. Overall, DPPH assay was fairly consistent with the chemiluminescence assay. Thus, the compounds in series 1 (**1a-f**) shown in Figure 2A have higher potency of radical scavenging with good IC_{50} (Table 1). However, the compounds of series 2 (**2a-e**) were inactive or showed low activity in both tests, not being potent enough to cause 50% inhibition (Figure 2B). All the samples presented a better

sensitivity in the chemiluminescence method. This method is known to be more sensitive because of the high light emission produced by the H_2O_2 /luminol/HRP system.¹⁹

This result might also indicate that both series of compounds have higher antioxidant action in a mechanism different of electron scavenging. For the two methods tested, an increase of the activity was observed with increasing concentration. For compounds **1a** to **1f**, the antioxidant profile appears to follow the Michaelis-Menten curve.

Considering these results, an explanation for the potent antioxidant activity of compounds of series **1a-f** might be found in the possible stabilization of the radical that is formed after hydrogen abstraction. Figure 3 shows the antioxidant reaction and the hydrogens that can be abstracted in the molecules. For the series **2a-e**, resonance stabilization is not possible because the molecules do not have chain flexibility.

Some differences in antioxidant activity for the series are related to the substituents present. In this case, for example, when we look at **1c** and **1d**, the presence of thienyl exerts a significant influence on the radical

Figure 2. Comparative graphs of the antioxidant activity of the compounds in: a) series 1; b) series 2.

Table 1. Assay results for compounds **1a-f** and **2a-e**

DPPH radical scavenging assay								
Compounds	5 µg mL ⁻¹	50 µg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹	250 µg mL ⁻¹	500 µg mL ⁻¹	IC ₅₀ /(µg mL ⁻¹)	Absorbance	λ max/ nm
1a	14.18 (± 1.9)	19.45 (± 3.6)	24.24 (± 1.1)	77.21 (± 2.5)	89.82 (± 1.1)	172.96	0.83	319.10
1b	9.70 (± 1.3)	16.12 (± 1.3)	22.55 (± 1.8)	61.82 (± 1.5)	93.94 (± 0.6)	204.88	0.75	341.20
1c	15.27 (± 1.0)	24.12 (± 3.3)	40.55 (± 3.4)	95.15 (± 0.2)	93.45 (± 0.4)	125.99	0.47	317.70
1d	15.82 (± 0.9)	54.11 (± 1.1)	91.32 (± 1.4)	94.60 (± 0.4)	96.40 (± 2.1)	45.17	0.89	353.00
1e	12.60 (± 1.2)	23.91 (± 2.6)	47.94 (± 3.7)	93.96 (± 1.5)	94.86 (± 0.2)	106.69	0.81	343.60
1f	4.95 (± 2.5)	14.65 (± 1.8)	21.47 (± 1.8)	57.97 (± 1.8)	69.02 (± 2.4)	217.22	0.84	344.00
2a	14.43 (± 0.7)	15.31 (± 0.5)	17.20 (± 0.9)	27.55 (± 1.3)	30.03 (± 0.1)	-	0.95	351.40
2b	11.31 (± 1.9)	12.01 (± 1.3)	14.49 (± 0.6)	19.55 (± 1.2)	24.38 (± 4.3)	-	0.87	357.60
2c	12.97 (± 0.8)	15.16 (± 2.3)	15.01 (± 1.4)	17.78 (± 1.2)	18.22 (± 0.1)	-	0.84	351.20
2d	6.71 (± 0.1)	7.24 (± 0.2)	9.54 (± 0.0)	25.91 (± 7.0)	49.12 (± 3.1)	-	0.93	358.60
2e	14.87(± 1.5)	15.60(± 4.4)	17.93(± 2.4)	25.22(± 1.2)	49.27(± 0.6)	-	0.90	351.20
Vit. E	12.60 (± 2.6)	88.24 (± 4.1)	94.73 (± 0.2)	95.76 (± 0.1)	95.95 (± 0.3)	27.25		
Chemiluminescence determination in the presence of HRP								
1a	2.82 (± 0.2)	50.97 (± 2.9)	76.63 (± 2.3)	99.34 (± 0.4)	99.95 (± 0.0)	49.09	0.83	319.10
1b	1.28 (± 0.2)	30.62 (± 1.6)	77.03 (± 1.9)	99.66 (± 0.2)	99.96 (± 0.0)	70.88	0.75	341.20
1c	1.19 (± 0.1)	56.90 (± 1.6)	78.82 (± 2.5)	98.81 (± 0.9)	99.98 (± 0.0)	32.79	0.47	317.70
1d	4.54 (± 0.7)	78.16 (± 2.0)	99.42 (± 0.3)	99.93 (± 0.0)	99.96 (± 0.0)	44.43	0.89	353.00
1e	78.84 (± 2.6)	99.92 (± 0.0)	99.96 (± 0.0)	99.89 (± 0.0)	99.99 (± 0.0)	3.17	0.81	343.60
1f	1.96 (± 0.1)	36.40 (± 1.4)	93.76 (± 0.6)	99.3 (± 0.2)	99.83 (± 0.1)	61.85	0.84	344.00
2a	1.59 (± 0.8)	6.96 (± 0.8)	17.41 (± 1.6)	21.82 (± 1.4)	28.81 ^b	-	0.95	351.40
2b	5.69 (± 0.9)	6.34 ^b	8.29 ^b	11.53 (± 0.7)	16.91 (± 1.4)	-	0.87	357.60
2c	1.77 (± 1.7)	17.40 (± 3.1)	29.42 (± 0.8)	37.31 (± 2.4)	48.36 ^b	105.54	0.84	351.20
2d	6.12 (± 1.1)	7.36 ^b	11.07 ^b	17.26 (± 1.8)	22.15 (± 0.4)	-	0.93	358.60
2e	3.70 (± 0.5)	19.30 (± 1.2)	30.31 (± 0.9)	34.72 (± 2.3)	46.49 ^b	130.28	0.90	351.20
Control ^a	11.98 (± 1.1)	21.62 (± 0.0)	50.55 (± 0.0)	98.76 (± 1.1)	99.89 (± 0.0)	24.72		

^aN-acetyl-L-cysteine; ^bestimated value.

stability in both methods of analysis. On the other hand, the presence of chlorine substituents does not appear to affect significant the antioxidant potency in comparison with the other compounds of the series. Another correlation with substituents can be seen with **1b** and **1f**. These two molecules have the same W substituent, but **1b** is more potent in the DPPH method, probably because **1b** has six –OCH₃ substituents in the aromatic ring in contrast with only two in **1f**. But when we compare **1b**, **1e** and **1f**, although **1e** has a weak donating group in R¹ and R² in comparison with **1b**, **1e** shows stronger activity because of the presence of the –SH group at the W position.

The results of the chemiluminescence method for **1e**, with good antioxidant activity (78.85%) even at the lower concentration (5 µg mL⁻¹), show that the –SH group exerts a strong influence in this system. This activity could reflect the rapidity of the reaction that consumes the luminol radical, preventing formation of 3-aminophthalate.

The DPPH and chemiluminescence methods have been extensively used for antioxidant activity determination for pure molecules and extracts, but, when we compare our results by both methods, is not possible to see a clear correlation between them. It denotes that the molecules tested may act by different mechanisms, principally when we consider the complex system present in the chemiluminescence method in comparison with the simple redox reaction in the DPPH method.

The antibacterial and antifungal activities of the eleven pyrazole derivatives were evaluated. Only four molecules were active against some of the microorganisms (Table 2) The compounds showed only a weak effect toward *C. albicans*. The bacteria *S. typhi*, *S. aureus* and *S. pneumoniae* were the most susceptible strains inhibited between 1.95 to 15.625 µg mL⁻¹ by **1a**, **1c** and **1f**. This potent antibacterial activity is only observed for compounds **1a**, **1c** and **1f** and not for the other closely related molecules

Figure 3. Antioxidant reaction and indication of the hydrogens that are probably abstracted in the reaction.

Table 2. Antimicrobial potency of the active molecules **1a**, **1c**, **1e** and **1f** (concentrations are given in $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Microorganisms	1a		1c		1e		1f	
	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC
<i>E. faecalis</i>	n.a.	ND	n.a.	ND	n.a.	ND	n.a.	ND
<i>K. pneumoniae</i>	500	500	125	ND	n.a.	ND	250	ND
<i>S. typhi</i>	15.625	ND	15.625	15.625	n.a.	ND	15.625	15.625
<i>S. aureus</i>	1.95	3.90	3.90	7.81	n.a.	ND	15.625	ND
<i>S. pneumoniae</i>	1.95	7.81	7.81	ND	n.a.	ND	15.625	ND
<i>B. subtilis</i>	n.a.	ND	n.a.	ND	n.a.	ND	n.a.	ND
<i>E. coli</i>	250	ND	250	ND	n.a.	ND	250	ND
<i>P. aeruginosa</i>	500	ND	n.a.	ND	n.a.	ND	n.a.	ND
<i>C. albicans</i>	62.5	125	500	ND	500	ND	125	250

n.a. not active. ND: not detected. Positive control: tetracycline (8 to 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for bacteria and fuconazole (0.125 to 65 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for yeast.

(**1b**, **1d** and **1e**), suggesting a mode of action that is structure specific. The presence of chlorine appears to affect the activity, but when the thienyl group is present, no cell inhibitory effect can be seen. The substituent –SH in the W position probably is responsible for the weak activity of **1e** against the fungus *C. albicans*. We also note that only small substituents can affect antimicrobial potency. Comparing **1b** and **1f**, when there are more –OCH₃ substituents in the aromatic ring, the antimicrobial activity is lost.

For the antimicrobial active compounds, we also tested the Minimum Lethal Concentration (MLC). As shown in Table 2, most of the compounds were able to kill the strains at concentrations not much higher than the MIC.

Conclusions

In summary, we tested two different series of heterocycles at several concentrations to evaluate their antioxidant and antimicrobial activity. Our results have shown that 1-carboxyamidino-1H-pyrazole derivatives exhibit good antioxidant properties in both tests. These activities are related to the concentration and type of substituents present in each compound and resonance stabilization (Figure 3) may be the determining factor. In the antimicrobial test, we also observed a substituent dependence of the activity.

Acknowledgments

The authors thank the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

References

1. Meegalla, S. K.; Doller, D.; Sha, DeYou, Soll, R.; Wisnewski, N.; Silver, G. M.; Dhanoa, D.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4949 and references therein.
2. Bairwa, R.; Degani, M. S.; *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 943 and references therein.
3. Flores, D. C.; Fiss, G. F.; Wbatuba, L. S.; Martins, M. A. P.; Burrow, R.; Flores, A. F. C.; *Synthesis* **2006**, 2349 and references therein.
4. Kale, S. B.; Karale, B. K.; *J. Heterocycl. Chem.* **2007**, *44*, 289.
5. Foti, M. C.; Sharma, S. K.; Shakya, G.; Prasad, A. K.; Nicolosi, G.; Bovicelli, P.; Ghosh, B.; Raj, H. G.; Rastogi, R. C.; Parmar, V.S.; *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 91.
6. Al-Omar, M. A.; Youssef, K. M.; El-Sherbeny, M. A.; Awadalla, S. A. A.; El-Subbagh, H. I.; *Archiv der Pharmazie* **2005**, *338*, 175.
7. Gutteridge, J. M.; *Free Radic. Res. Commun.* **1993**, *19*, 141.
8. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; *Free Radicals in Biology and Medicine*; 2nd ed., Oxford University Press, Clarendon: Oxford, 1989, pp. 1-20.
9. Roberfroid, M.; Colderon, P. B.; *Free Radicals and Oxidation Phenomena in Biological Systems*; University of Catholique de Louvain Brussels: New York, 1995, pp. 11-32.
10. Braugher, J. M.; Duncan, L. A.; Chase, R. L.; *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 10282.
11. Kelesidis, T.; Kelesidis, I.; Rafailidis, P. I.; Falagas, M. E.; *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 214.
12. Vladimirov, I. A.; *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* **1998**, *7*, 43.
13. Yen, G. C.; Chen, H. Y.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 27.
14. Krol, W.; Czuba, Z.; Scheller, S.; Paradowski, Z.; Shani, J.; *J. Ethnopharmacol.* **1994**, *41*, 121.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA. Portuguese version of these guideline can be downloaded on the web site http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/biblioteca/clsi_OPAS1M38-A.pdf.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards 2005. Antimicrobial Susceptibility Testing. Proposed standart M100-S15. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA. Portuguese version of these guideline can be downloaded on the web site http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/manuais/clsi/clsi_OPASM100S15.pdf.
17. Ozgen, M.; Reese, R. N.; Tulio, A. Z., Jr.; Scheerens, J. C.; Miller, A. R.; *J. Agric. Food. Chem.* **2006**, *54*, 1151.
18. Kamidate, T.; Kida, N.; Ichihashi, H.; Watanabe, H.; *Anal. Sci.* **1995**, *11*, 169.
19. Hirayama, O.; Takagi, M.; Hukumoto, K.; Katoh, S.; *Anal. Biochem.* **1997**, *247*, 237.

Received: September 24, 2009

Web Release Date: April 8, 2010

FAPESP helped in meeting the publication costs of this article.

ANEXO O

Artigo publicado em colaboração

“Ultrasound irradiation promoted large-scale preparation in aqueous media and antioxidant activity of azoles”

Ultrasound Irradiation Promoted Large-Scale Preparation in Aqueous Media and Antioxidant Activity of Azoles

F.A.N. Silva^{a,b,c}, M.P. Galluzzi^a, B. Albuquerque^a, L. Pizzuti^a, V. Gressler^c, D.P. Rivelli^{*,b}, S.B.M. Barros^{*,b} and C.M.P. Pereira^{*,a,c,d,e}

^a*Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA-USP), Universidade de São Paulo, 11573-000, Cubatão, SP, Brazil*

^b*Laboratório de Patologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 055083-000, São Paulo, SP, Brazil*

^c*Laboratório de Análises Toxicológicas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 055083-000, São Paulo, SP, Brazil*

^d*Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05513-970, São Paulo, SP, Brazil*

^e*Departamento de Química e Geociências, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas, RS, Brazil*

Received February 01, 2009; Revised March 25, 2009; Accepted March 30, 2009

Abstract: The scaled-up preparation of 1H-pyrazole, 1-phenylpyrazole and isoxazole *via* sonocatalysis is reported. The products were isolated in good yields in short time reaction. These compounds had been assayed for antioxidant activity by ORAC and DPPH methodologies. The results showed that only 1-phenylpyrazole presented good antioxidant activity compared with Trolox[®].

Keywords: Green chemistry, Isoxazole, Pyrazole, Sonocatalysis, ORAC, DPPH.

INTRODUCTION

Azoles and derivatives constitute an interesting class of organic compounds with diverse chemical and pharmaceutical applications [1]. Several methods developed for the synthesis of isoxazole and pyrazole derivatives have been reported, including the use of microwaves and solid-supported or organic catalysts [2-4]. Recently, we described the synthesis of a variety of heterocycles under non-traditional conditions employing microwaves [5,6] and sonocatalysis methods [7-10]. The beneficial effects of ultrasonic irradiation are playing a significant role in process chemistry [11], including large-scale synthesis [12]. Reactions that are performed in water have gained increased interest in synthetic chemistry over the past decade not only for the advantages that result from avoiding extensive drying of reactants, catalysts and solvents, but also for the development of environmentally friendly processes [13-15]. As part of our program to investigate organic reactions amenable to sonocatalysis, we address here the scaled-up synthesis of 1H-pyrazole, 1-phenylpyrazole and isoxazole under mild conditions, with ultrasonic irradiation using water as the reaction solvent.

Antioxidants have become a topic of increasing interest. A literature search revealed that the number of publications on antioxidants and oxidative stress has nearly quadrupled in

the past decade (1684 in 1993; 6510 in 2003). It is of great interest to the general public, medical, nutritional experts, health and food science researchers to know the antioxidant capacity [16]. Therefore, it is very appealing to researchers to have a convenient method for the quick quantitation of antioxidant effectiveness. A total antioxidant capacity assay using one chemical reaction seems to be rather unrealistic and not easy to realize, yet there are numerous published methods claiming to measure total antioxidant capacity *in vitro* [16]. Between these methods, DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl) and ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) were chosen because they join different kinds of free radicals and reaction medium. In the ORAC method there is a peroxide radical in an aqueous reaction medium and in the DPPH method, there is a nitrogen radical in organic medium. In the DPPH[°] method, the samples are allowed to react with a stable free radical. The reduction of DPPH[°] is followed by monitoring the decrease in its absorbance at a characteristic wavelength during the reaction [17]. In the ORAC method reaction the FL (*fluorescein*) is consumed decreasing the fluorescence intensity. In the presence of antioxidant, the FL decay is inhibited. It uses the following components: (a) AAPH (*an azo radical initiator*); (b) a molecular probe FL (*fluorescein*) for monitoring reaction progress; (c) antioxidant. The advantage of the ORAC approach is that it applies kinetics parameters (area under the curve) equally well for both antioxidants that exhibit distinct lag phases and those samples that have no lag phases. In fact, an antioxidant database has been generated applying the ORAC assay in combination with the total phenols assay [16]. Then we decided to use both methods to evaluate the same activity, to obtain more consistent results.

*Address correspondence to these authors at the Laboratório de Patologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 055083-000, São Paulo, SP, Brazil; E-mails: smbarros@usp.br, diogopineda@gmail.com
Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05513-970, São Paulo, SP, Brazil; E-mail: claudio.martin@pq.cnpq.br

RESULTS AND DISCUSSION

Recently, we described the practice of biorenewable solvents in heterocyclic synthesis [8,14,18,19]. In the present work, we develop an environmentally friendly procedure for the synthesis of 3,5-dimethyl-1*H*-pyrazole (**2**), 3,5-dimethyl-1-phenyl-1*H*-pyrazole (**3**) and 3,5-dimethylisoxazole (**4**) by the reaction of 2,4-pentanedione (**1**) with 1,2-dinucleophiles such as hydrazine hydrate, phenyl hydrazine and hydroxylamine hydrochloride, under ultrasound irradiation and aqueous media (Scheme 1). Our methodology is very simple and does not require a catalyst, acid or long reaction times. In addition, our method furnished the isoxazole (**4**) in one pot instead of the 4,5-dihydroisoxazole intermediate usually obtained in such reactions.

Scheme 1. Scaled-up preparation of azoles **2-4**.

The reactants were mixed and sonicated until the condensation reaction had been completed. Using an ultrasonicator of 500 W with a frequency of 20 KHz at 25°C, the reactions were completed in 10 minutes. The comparative results with conventional conditions are shown in Table 1.

The progress of the reactions was monitored by CG. The products were extracted with ethyl acetate and obtained in high purity. Here are presented the advantages of the method *via* sonocatalysis: (i) the reaction is simple to execute; (ii) the products are isolated in good yields (70-99%); (iii) the work-up is very simple; (iv) the reaction time is short (10 min); (v) the isoxazole was obtained in one pot and (vi) the products are obtained in good purity. The products were identified by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy and confirmed by mass spectrometry. Extension of this reaction to other substrates and organic species is currently in progress and will be reported in due course.

ORAC Method

The automatic ORAC assay was described by Ou *et al.* [16]. In this method, an azo initiator (AAPH) at 37°C to get hydrogen from the sodium fluorescein reduced the fluorescence measured by the time using a 485/20 nm excitation filter and 528/20 nm emission filter. If an antioxidant compound was added, the fluorescein was saved and kept constant until the end of the antioxidant action. It was made a preliminary ORAC assay to determine which of the three compounds presented antioxidant activity. Only the 3,5-dimethyl-1-phenyl-1*H*-pyrazole (**3**) was elected to be submitted to quantification, because it was the only one that showed significant qualitative activity. Briefly, the antioxidant solutions were solubilized in methanol and diluted in phosphate buffer 75 mM pH 7.0. The appropriate dilutions of the samples were prepared, thereafter 25 µL of these solutions were transferred to microplates in triplicate, so was added 150 µL of fluorescein 40 nM diluted in phosphate buffer 75mM pH 7.0 was added. In the same microplate was made, a control (25 µL solvent + 150 µL fluorescein 40 nM) and a Trolox[®] (standard) curve (150 µL fluorescein 40 nM +

Table 1. Comparison Between Classical and Sonocatalytic Methodologies

Compound	Classical Methodology		Ultrasound Probe	
	Time (h)	Yields (%) ^a	Time (min)	Yields (%) ^a
 2	12	80	10	99
 3	12	77	10	76
 4	24 ^b	60	10	70

^aProducts isolated.

^bUnder reflux.

25 μL from appropriate Trolox[®] dilution). To maintain the temperature in the plate, 300 μL water was added around the wells that would be read. After incubation (37°C/30 min) 25 μL AAPH (153 mM in phosphate buffer 75 mM pH 7.0) was added and the plate was shaken during 10 seconds at maximum intensity.

The plate reader (Multi-detection microplate reader Synergy – BIOTEK, Winooski, VT) was programmed to record the fluorescence of each cycle of 1 minute after addition of AAPH until 60 minutes and the area under the curve of the fluorescence decay was integrated using a Gen5 software. All area values were subtracted from the control (25 μL solvent + 150 μL fluorescein 40 nM + 25 μL AAPH). This difference corresponded to the net area under the curve (net AUC) for each sample (Fig. 1). By the Trolox[®] calibration curve, expressed in its net area under the curve against its μM concentration, the antioxidant activity of the sample can be expressed as Trolox[®] equivalent (TE). This procedure was made for each sample at each concentration. Thus, higher values of TE meant higher antioxidant activity of the sample.

Fig. (1). Relation between sample concentration and net AUC.

DPPH Method

Sample solutions were prepared in methanol and DPPH solution was made in methanol 80% (v/v). Briefly, 50 μL of each sample dilution (determined in the preliminary assay) was added to 150 μL of DPPH solution (100 μM). The decrease in absorbance was determined at 517 nm after 2 hours of incubation in darkness at room temperature (Fig. 2). Trolox[®] was used as standard.

Fig. (2). Relation between absorbance and sample concentration.

The value of antioxidant activity of 3,5-dimethyl-1-phenyl-1H-pyrazole (3) was $41.01 \pm 2.49\%$ TE to ORAC method and 21.35% to DPPH method. Nevertheless, the dif-

ference between the results, the “*in vitro*” antioxidant assays represent only the activity expected in specific reaction medium. It means that the value of antioxidant activity can be different because there is variable chemical interaction between the free radical used in the assay and the substance being tested. In concern with our experiments, the antioxidant activity of azoles (2) and (4) was insignificant.

EXPERIMENTAL

NMR spectra were recorded on a Bruker DPX 500 spectrometer (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C) at 300 K. Low resolution mass spectra were obtained on a Varian Saturn 2200 GC/MS spectrometer operating at 70 eV. Melting points were uncorrected. The progress of reactions was monitored on a Thermo Trace GC Ultra chromatograph. The reactions were carried out in a microtip probe connected to a Sonics Vibracell ultrasonic processor of 500 W operating at 20 KHz at 25% of the maximum power output.

General Procedure for the Synthesis of Azoles (2-4) in Water Under Ultrasound Irradiation

In a 250 mL beaker, 2,4-pentanedione (1) (100 mmol, 10 g) and appropriated dinucleophile (110 mmol) were added in water (100 mL), at 0°C. The mixtures were then sonicated by an ultrasonic probe with a frequency of 20 KHz at room temperature (25°C). The complete consumption of 2,4-pentanedione occurred after the time indicated (see the Table 1). After consumption of the starting material, the organic phase was extracted with ethyl acetate (2 $\times$ 40 mL) and washed with cold water (2 $\times$ 40 mL). The organic extract was dried (MgSO₄) and the solvent removed under reduced pressure to give the pure azoles without further purification.

Synthesis of Pyrazoles (2,3) in Water by Conventional Conditions

The 2,4-pentanedione (1) (100 mmol, 10 g) and appropriated hydrazines (110 mmol) were added in water (100 mL), at 0°C. The mixture was stirred at room temperature until the complete consumption of 2,4-pentanedione. The progress of the reaction was followed by GC. After 12 h, the organic phase was extracted with ethyl acetate (2 $\times$ 40 mL) and washed with cold water (2 $\times$ 40 mL). The organic extract was dried (MgSO₄) and the solvent removed under reduced pressure to give the pure azoles without further purification.

Synthesis of 3,5-Dimethylisoxazole (4) in Water by Conventional Conditions

The 2,4-pentanedione (1) (100 mmol, 10 g) and hydroxylamine hydrochloride (150 mmol) were added in water (100 mL), at 0°C. The mixture was stirred, under reflux, until the complete consumption of 2,4-pentanedione. The progress of the reaction was followed by GC. After 24 h, the organic phase was extracted with ethyl acetate (2 $\times$ 40 mL) and washed with cold water (2 $\times$ 40 mL). The organic extract was dried (MgSO₄) and the solvent removed under reduced pressure to give the pure 3,5-dimethylisoxazole without further purification.

3,5-Dimethyl-1H-pyrazole (2)

C₅H₈N₂, mw 96.13; mp 106–109°C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 2.12 (s, 6H, 2CH₃), 5.72 (s, 1H, H4); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 12.0, (2 CH₃), 101.7 (C4), 142.0 (C3, C5); MS (m/z, %): 96 (M⁺, 100).

3,5-Dimethyl-1-phenyl-1H-pyrazole (3)

C₁₁H₁₂N₂, mw 172.23; Oil; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 2.12 (s, 6H, 2CH₃), 5.98 (s, 1H, H4), 7.30–7.59 (m, 5H, Ph); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 13.3, 12.2 (2 CH₃), 106.7 (C4), 124.6, 127.1, 128.8, 139.2 (6C, Ph), 139.7, 148 (C3, C5); MS (m/z, %): 172 (M⁺, 100), 130 (45), 77 (80).

3,5-Dimethylisoxazole (4)

C₅H₇NO, mw 97.12; Oil; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 2.14, 2.43 (2s, 6H, 2CH₃), 5.99 (s, 1H, H4); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ 11.8, 11.1 (2 CH₃), 102.8 (C4), 159.8, 169.2 (C3, C5); MS (m/z, %): 98 (M⁺+1, 100).

CONCLUSIONS

In conclusion, we have described a greener and convenient procedure for the preparation of 3,5-dimethylpyrazoles (**2,3**) and 3,5-dimethylisoxazole (**4**) in large-scale, which gets completed 10 minutes at room temperature and may provide an useful method for rapid drug discovery. Our procedure in ultrasound is facile and does not require a catalyst and the water as reaction medium is an additional eco-friendly attribute of this synthetic protocol. Furthermore, 3,5-Dimethyl-1-phenyl-1H-pyrazole (**3**) showed satisfactory antioxidant activity compared with Trolox[®] in both methods used.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to FAPESP (06/58124-3, 06/56315-6), CEPMA-USP (Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio-ambiente), CNPq (310472/2007-5), Programm INCT-CNPq, and CAPES for financial support. Authors also thank Professor Frank H. Quina for valuable contributions on the preparation of this manuscript.

REFERENCES

- [1] Elguero, J.; Goya, P.; Jagerovic, N.; Silva, A. M. S. In *Targets in Heterocyclic System*; Italian Society of Chemistry: Roma, **2002**; Vol. 6, pp. 167-203.
- [2] De Luca, L.; Giacomelli, G.; Porcheddu, A.; Salaris, M.; Taddei, M. Cellulose beads: a new versatile solid support for microwave-assisted synthesis. Preparation of pyrazole and isoxazole libraries. *J. Comb. Chem.*, **2003**, *5*, 465-471.
- [3] Martins, M. A. P.; Cunico, W.; Pereira, C. M. P.; Sinhorin, A. P.; Flores, A. F. C.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N. 4-Alkoxy-1,1,1-trichloro-3-alken-2-ones: preparation and applications in heterocyclic synthesis. *Curr. Org. Synth.*, **2004**, *1*, 391-403.
- [4] Shi, C.-L.; Shi, D.-Q.; Kim, S. H.; Huang, Z.-B.; Ji, S.-J.; Ji, M. A novel and efficient one-pot synthesis of furo[3',4':5,6]pyrido[2,3-c]pyrazole derivatives using organocatalysts. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 2425-2432.
- [5] Martins, M. A. P.; Pereira, C. M. P.; Beck, P.; Machado, P.; Moura, S.; Teixeira, M. V. M.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N. Microwave-assisted synthesis of 5-trichloromethyl substituted 1-phenyl-1H-pyrazoles and 1,2-dimethylpyrazolium chlorides. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 6669-6672.
- [6] Martins, M. A. P.; Pereira, C. M. P.; Moura, S.; Frizzo, C. P.; Beck, P.; Zanatta, N.; Bonacorso, H. G.; Flores, A. F. C. Microwave assisted regiospecific synthesis of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydropyrazoles and pyrazoles. *J. Heterocycl. Chem.*, **2007**, *44*, 1195-1199.
- [7] Stefani, H. A.; Pereira, C. M. P.; Almeida, R. B.; Braga, R. C.; Guzen, K. P.; Cella, R. A mild and efficient method for halogenation of 3,5-dimethyl pyrazoles by ultrasound irradiation using N-halosuccinimides. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 6833-6837.
- [8] Martins, M. A. P.; Pereira, C. M. P.; Cunico, W.; Moura, S.; Rosa, F. A.; Peres, R. L.; Machado, P.; Zanatta, N.; Boanacorso, H. G. Ultrasound promoted synthesis of 5-hydroxy-5-trihalomethyl-4,5-dihydroisoxazoles and beta-enamino trihalomethyl ketones in water. *Ultrason. Sonochem.*, **2006**, *13*, 364-370.
- [9] Stefani, H. A.; Oliveira, C. B.; Almeida, R. B.; Pereira, C. M. P.; Braga, R. C.; Cella, R.; Borges, V. C.; Savegnago, L.; Nogueira, C. W. Dihydropyrimidin-(2H)-ones obtained by ultrasound irradiation: a new class of potential antioxidant agents. *Eur. J. Med. Chem.*, **2006**, *41*, 513-518.
- [10] Pereira, C. M. P.; Stefani, H. A.; Guzen, K. P.; Órfão, A. T. G. Improved synthesis of benzotriazoles and 1-acylbenzotriazoles by ultrasound irradiation. *Lett. Org. Chem.*, **2007**, *4*, 43-46.
- [11] Mason, T. J. Ultrasound in synthetic organic chemistry. *Chem. Soc. Rev.*, **1997**, *26*, 443-451.
- [12] Cravotto, G.; Cintas, P. Power ultrasound in organic synthesis: moving cavitation chemistry from academia to innovative and large-scale applications. *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, *35*, 180-196.
- [13] Andrade, C. K. Z.; Alves, L. M. Environmentally benign solvents in organic synthesis: current topics. *Curr. Org. Chem.*, **2005**, *9*, 195-218.
- [14] Stefani, H. A.; Pereira, C. M. P.; Dörr, F. A.; Cella, R. Synthesis of trifluoroacetylketene O,N-acetals in water. *Arkivoc*, **2005**, *vi*, 19-24.
- [15] Li, C. J.; Chan, T. H. *Organic Reactions in Aqueous Media*, Wiley: New York, **1997**.
- [16] Huang, D. J.; Ou, B. X.; Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 1841-1856.
- [17] Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, **1995**, *28*, 25-30.
- [18] Martins, M. A. P.; Blanco, R. F.; Pereira, C. M. P.; Beck, P.; Brondani, S.; Cunico, W.; Zimmermann, N. E. K.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N. 5-trifluoromethyl-1,2-dimethyl-1H-pyrazolium chlorides: synthesis and H-1, C-13, F-19 and Cl-35 NMR chemical shifts. *J. Fluorine Chem.*, **2002**, *118*, 69-72.
- [19] Pereira, C. M. P.; Quina, F. H.; Silva, F. A. N.; Emmerich, D. J.; Machulek, A. Synthesis of 4-iodopyrazoles: a brief review. *Mini-Rev. Org. Chem.*, **2008**, *5*, 331-335.

ANEXO P

**Reportagem publicada no web site da Agência USP de Notícias
(<http://www.usp.br/agen/?p=25132>)**

“FCF estuda potencial alimentar de algas do Sudeste do Brasil”

FCF estuda potencial alimentar de algas do Sudeste do Brasil

Publicado por [Antonio Carlos Quinto](#) em 26 de maio de 2010 - 17:21 - Categoria: [Ciências](#)

Cientistas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da USP estudaram quatro espécies de algas marinhas coletadas no litoral do estado do Espírito Santo. Segundo o estudo, as espécies possuem moléculas como fonte de proteínas, aminoácidos, lipídeos e ácidos graxos – essenciais para seres humanos e animais. “As análises bioquímicas mostram que as algas podem ser utilizadas na indústria alimentícia e de cosméticos”, aponta o professor Ernani Pinto, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF.

[1]
L. intricata, uma das quatro espécies coletadas no litoral do Espírito Santo

As espécies de algas bentônicas *Laurência filiformis*, *L. intricata*, *Gracilaria domingensis* e *G. birdiae* – pertencentes à classe *Rhodophyta*, conhecidas como algas vermelhas – foram coletadas em 2008 como parte de um projeto de doutorado apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), orientado por Ernani Pinto e realizado pela química Vanessa Gressler. “O projeto ainda está em andamento, mas já obtivemos resultados interessantes quanto à composição bioquímica das algas”, revela o professor. Segundo ele, no Brasil há poucos grupos que se dedicam a estudar estas espécies.

Os estudos com as algas, de acordo com o docente, foram todos encaminhados com a devida autorização do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA). “Apesar de no Brasil haver pouco extrativismo de algas, no Nordeste, onde algumas empresas fazem o cultivo, ainda há a extração irracional. Há um projeto piloto interessante em Ubatuba, no litoral Norte de São Paulo, conduzido pelo Instituto de Pesca local”, lembra Ernani Pinto.

Incentivo à indústria

As quatro espécies coletadas, de acordo com o professor, ocorrem em maior número justamente na região Sudeste, nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. Contudo, nestes locais ainda não existe um grande incentivo à produção ou extração do produto.

Ernani descreve que entre os principais compostos encontrados nas algas está o ágar, que pode ser usado tanto na indústria alimentar quanto de cosmético. “Essas espécies também produzem a carragenana, um agente espessante usado na composição de gelatinas e que também serve para consumo medicinal”, lembra o professor. Segundo ele, tanto a carragenana quanto o ágar são polímeros de açúcares encontrados nas algas. Além disso, elas apresentam compostos fotoprotetores, como os aminoácidos tipo micoporinas (chinorina, palitina, asterina e palitino), que podem ser aplicados na produção de bloqueadores solares, além de compostos antioxidantes.

De acordo com as análises realizadas, o conteúdo total de lipídeos nas quatro espécies variou de 1,1% para 6,2%; de ácidos graxos de 0,7% para 1,0%; proteína solúvel de 4,6% para 18,3% e aminoácidos de 6,7% para 11,3%. Os resultados mostraram que aproximadamente 50% dos aminoácidos presentes nestas espécies são aminoácidos essenciais e também que as algas são ricas em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) das séries $\omega 3$ e $\omega 6$, os quais são considerados ácidos graxos essenciais. Os percentuais, segundo o pesquisador, indicam que as quatro espécies são potenciais fontes de proteínas dietéticas, aminoácidos e ácidos graxos essenciais para seres humanos e animais.

Para o professor, a identificação bioquímica das quatro espécies é mais um incentivo para a implantação de cultivos racionais de algas no Brasil. “São iniciativas que poderiam envolver pescadores locais, principalmente em períodos de entre safra da pesca”, sugere o pesquisador.

Os resultados das análises bioquímicas das algas foram recentemente publicados na revista internacional *Food Chemistry* com o título *Lipídeos, ácidos graxos, proteínas, aminoácidos e cinzas em quatro espécies brasileiras de algas vermelhas*.

Imagem cedida pelo pesquisador

Mais informações:, com o prof. Ernani Pinto; email ernani@usp.br ^[2]

Artigo impresso de Agência USP de Notícias: <http://www.usp.br/agen>

URL do artigo: <http://www.usp.br/agen/?p=25132>

ANEXO Q

Reportagem publicada no Jornal Correio Braziliense de 29/06/2010

“Plantas multiuso”

Ciência

26 • CORREIO BRAZILIENSE • Brasília, terça-feira, 29 de junho de 2010

Editora: Ana Paula Macedo //
anapaula.d@daabr.com.br
3214-1195 • 3214-1172 / fax: 3214-1155

Espécies de algas encontradas na costa brasileira são ricas em substâncias que podem ser usadas para fins alimentares, medicinais e cosméticos, aponta estudo da USP

Mayim Cygal/ANP - G/400

Plantas multiuso

» GISELA CABRAL

As algas são consideradas elementos fundamentais para o ciclo de vida do ambiente marinho, pois fazem parte do primeiro nível da cadeia alimentar do mar, sustentando todos os animais herbívoros que vivem no oceano. Um estudo brasileiro acaba de mostrar que quatro espécies desses vegetais muito comuns na costa brasileira podem beneficiar também o homem, sendo utilizadas para fins nutritivos, medicinais e cosméticos.

O estudo, realizado por pesquisadores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) e publicado na revista internacional *Food Chemistry*, descobriu que as algas vermelhas das espécies *Laurencia filiformis*, *Laurencia intricata*, *Gracilaria dominicensis* e *Gracilaria birdiae* são verdadeiras fontes de proteínas, aminoácidos, lipídeos e ácidos graxos, essenciais para seres humanos e animais.

“As pesquisas revelaram baixas quantidades de gorduras, sendo que a pouca gordura encontrada é rica em ômega 3 e ômega 6, ou seja, ácidos graxos essenciais para o homem. O teor de proteínas encontrado foi relativamente alto e a composição de aminoácidos revelou que aproximadamente 50% são aminoácidos essenciais”, destaca o professor Ernani Pinto, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

As amostras analisadas foram todas colhidas na praia de Ubu, em Anchieta (ES). Entre os principais compostos encontrados está o ágar, um tipo de polímero de açúcares que pode ser usado na indústria alimentar para a fabricação de sucos e balas, entre outros produtos. Já na indústria farmacêutica, a substância costuma ser empregada na fabricação de supositórios, cápsulas e laxantes.

Constatou-se ainda que as espécies estudadas pela USP produzem a carragenana, um agente espessante usado na composição de gelatinas. Ele também serve para consumo medicinal, pois apresenta potencial anticoagulante, antitumoral e antiviral. “As algas ainda apresentam compostos fotoprotetores, como os aminoácidos tipo micosporinas (chinorina, palitina, asterina e palitina), que podem ser aplicados na produção de bloqueadores solares, além de compostos antioxidantes”, afirma a pesquisadora Vanessa Gressler.

Culinária

As algas são conhecidas como alimentos altamente nutritivos, graças aos teores de vitaminas, proteínas, minerais e fibras, entre outros componentes. “Elas podem ser usadas em saladas, sopas, biscoitos e condimentos diversos. Em países como China, Japão e Coreia, as algas (principalmente as vermelhas e as pardas), são utilizadas tradicionalmente como alimento desde a antiguidade”, destaca a pesquisadora.

Vanessa Gressler/Divulgação

Alga vermelha estudada pelos pesquisadores da USP: substâncias que podem se transformar em doces, remédios e protetores solares

Segundo Vanessa, a espécie *Gracilaria verrucosa*, também chamada de ogonori, é comestível e bastante conhecida no Japão, onde geralmente é misturada ao sashimi. “Considerando também o desenvolvimento econômico, cultural e científico da

sociedade, os hábitos alimentares e estilos de vida têm mudado, requerendo cada vez mais a expansão da produção de alimentos. Esses dados estimularam os estudos com algas marinhas que habitam o litoral brasileiro”, enfatiza a especialista.

De acordo com os pesquisadores, no Brasil há poucos grupos que se dedicam ao estudo de tais espécies. Os estudos realizados pelo departamento da USP, segundo o professor Ernani Pinto, foram executados com a autorização do Instituto Brasileiro de

Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (Ibama). “Há registros de ocorrências dessas algas desde o litoral do Ceará até o Espírito Santo. As espécies do gênero *Laurencia*, por exemplo, são abundantes também no estado de São Paulo”, afirma Vanessa.

Diversidade

O Brasil é um país que possui uma grande diversidade de macroalgas marinhas. Segundo Mutue Toyota Fujii, especialista do Instituto de Botânica de São Paulo, existem hoje cerca de 700 espécies, incluindo alguns gêneros de importância econômica, como a *Gracilaria*, *Gelidium*, *Hypnea*, *Porphyr*, *Pterocladia* e *Sargassum*. “As algas destinadas à produção de ficolóides (substâncias encontradas na parede celular das algas e empregadas por indústrias) devem receber tratamentos para retirada de impurezas e algas epífitas. Processos como o da clarificação (retirada de pigmentos) também costumam ser feitos”, explica.

De acordo com ela, o Instituto de Botânica desenvolve pesquisas voltadas para a taxonomia e a filogenia molecular, além da ecologia de comunidades e da fisiologia das espécies de interesse comercial. “Isso quer dizer que desenvolvemos pesquisas para saber quais espécies ocorrem no Brasil, onde e de que forma elas se interrelacionam com a comunidade na qual compartilham o mesmo ambiente”, explica Mutue.