

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

RICARDO CARNEIRO MONTES

ESTUDO FICOQUÍMICO DA ALGA MARINHA *Sargassum vulgare* var. *nanum* E. de PAULA (SARGASSACEAE) DO LITORAL PARAIBANO

**João Pessoa – PB
2012**

RICARDO CARNEIRO MONTES

ESTUDO FICOQUÍMICO DA ALGA MARINHA *Sargassum vulgare* var. *nanum* E. de PAULA (SARGASSACEAE) DO LITORAL PARAIBANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: FARMACOQUÍMICA.

ORIENTADORA

Prof^a. Dra. Celidarque da Silva Dias

**João Pessoa – PB
2012**

M779e Montes, Ricardo Carneiro.

Estudo ficoquímico da alga marinha *Sargassum vulgare* var.
nanum E. de Paula (Sargassaceae) do litoral paraibano /
Ricardo Carneiro Montes.-- João Pessoa, 2012.

114f. : il.

Orientadora: Celidarque da Silva Dias
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

1. Produtos Naturais. 2. *Sargassum* (algas pardas) –
metabólitos – atividades biológicas. 3. Esteróide. 4. Feofitinas.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

RICARDO CARNEIRO MONTES

**ESTUDO FICOQUÍMICO DA ALGA MARINHA *Sargassum vulgare*
var. *nanum* E. de PAULA (SARGASSACEAE) DO LITORAL
PARAIBANO**

Dissertação aprovada em ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. CELIDARQUE DA SILVA DIAS

Universidade Federal da Paraíba - Orientadora

Prof. Dr. JOÃO XAVIER DE ARAÚJO JÚNIOR

Universidade Federal de Alagoas – Examinador externo

Prof. Dr. LUÍS CEZAR RODRIGUES

Universidade Federal de Paraíba – Examinador interno

Depois disto olhei, e eis que vi uma porta aberta no céu, e a primeira voz que ouvi era como a trombeta que falava comigo, dizendo: sobe aqui, e mostrar-te-ei as coisas que devem acontecer depois destas.

Apocalipse, IV, 1

Provo.....
Que a mais alta expressão
da dor.....
Consiste essencialmente
na alegria.....
Augusto dos Anjos

Jeanne:
Je ne veux pas mourir! J'ai peur!
Il y a la joie qui est la plus forte!

(Oratório dramático de Paul Claudel para música de Honneger, Jeanne d'Arc na bucher.)

A minha mãe Severina Carneiro por ter me dado literalmente a vida, aos meus filhos Beatriz Lorily e Leonardo Carneiro e aos meus irmãos Guilherme e Nayara Carneiro os quais os amo muito e sempre farão parte da minha vida. E a minha esposa Kátia vitória e a professora Celidarque que foram peças chaves nesta dissertação

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força, coragem e iluminação para tentar seguir a vida feliz com compreensão e esperança.

A minha mãe Severina por ter sempre me incentivado a estudar e a qual me ensinou tantas coisas da vida. Para mim serás minha eterna guiaadora.

Aos meus irmãos Guilherme e Nayara pelo apoio e estímulo à dedicação dos meus propósitos.

A minha esposa Kátia e aos meus filhos a quem eu amo muito e que sempre me deram incentivo moral e apoio sentimental. A felicidade tem um significado que são vocês.

A todos os familiares os quais sempre se fizeram presentes em todo momento que precisei de apoio.

A Professora Celidarque pela confiança, amizade e dedicação em sua orientação, a qual eu posso dizer de coração que a considero como minha segunda mãe me guiando sempre com muito cuidado dentro da vida acadêmica.

A meu co-orientador Dr. José Maria Barbosa pela sua presença em todos os momentos da pesquisa científica e prestar seus conhecimento.

Ao Prof. Dr. George Miranda pela coleta e identificação do material de trabalho e por seu cuidado em poder colaborar muito com o seu conhecimento sobre a alga para este trabalho.

À Professora Maria de Fátima Agra pela dedicação como coordenadora exemplar na pós-graduação.

Aos professores do curso de Farmácia, especialmente a Regina, Rossana, Kaliandra, Bagnolia, Damião, Liana, Pablo, Fátima Vanderlei, Critiane por toda dedicação na minha formação como farmacêutico

Aos professores do curso de Farmácia Industrial, especialmente a professores Josean Tênio, Fábio e a professora Nubia que me mostraram um caminho vasto a percorrer dentro da indústria.

Aos Professores da Pós-Graduação, cujos ensinamentos me fizeram olhar um novo horizonte.

A minha companheira de Laboratório, Jaciara pela sua disposição, cuidado, apoio e por sempre acreditar que este trabalho traria grandes frutos. Tenho um grande apreço pela sua amizade.

Ao Professor Vital, por me conceder realizar o mestrado ,estimulando a me capacitar cada vez mais.

Aos meus amigos de trabalho, Fátima, Aurenildo, Patrícia, Ricardo, Rafael, Herbert e Diego, por me dar incentivo e apoio na caminhada do mestrado.

Aos companheiros de laboratório, especialmente Jeane, Madalena, Jackeline, Ana Silva, Otemberg, Sara, Géssica, Daniele, Clécia, , Helane, Tiago, Raquel que eu pude contar nas horas tristes e alegres.

Aos amigos adquiridos durante a graduação, Caio, Jonh, Gilmar, Fabiola, Raquel pelas conversas alegres, conselhos e ajuda que puderam dar em minha caminhada.

A todos os colegas de pós-graduação que caminharam juntos comigo para concretização de um sonho.

Aos alunos de iniciação científica, Roseane, Yuri, Carla, Mariana e Demostenes pela amizade e positividade dentro do laboratório.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) atual Cbiotec pela competência e apoio, fundamentais para o bom andamento deste trabalho.

A Raimundo Nonato, o qual eu considero um professor por ensinar os ensinamentos básicos do laboratório sempre com boa vontade e perseverança.

À toda família do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) atual Cbiotec, onde, apesar das dificuldades, caminhei para a concretização de grandes realizações.

A todos aqueles que puderam contribuir de alguma forma com uma conversa, um conselho, uma compreensão ou um simples sorriso.

A todos vocês
Muito Obrigado!

RESUMO

ESTUDO FICOQUÍMICO DA ALGA MARINHA *Sargassum vulgare* var. *nanum* E. de PAULA (SARGASSACEAE) DO LITORAL PARAIBANO

Ricardo Carneiro Montes

Dissertação em produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (Farmacoquímica)
Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde - 2012

Sargassum é um gênero de algas pardas da família Sargassaceae representada por 150 espécies. A literatura relata a presença de alginatos, florotaninos, cumarinas, cromonas, quinonas, feofitinas e terpenóides. Os metabólitos produzidos por algas do gênero *Sargassum* mostram atividades biológicas, tais como: anticoagulantes, antioxidante, antipirético e analgésica. O objetivo deste estudo foi apresentar estudo ficoquímico da espécie *Sargassum vulgare* var. *nanum* E. de Paula. O material foi coletado na praia de Coqueirinho, Conde-PB, e depois lavado e liofilizado. O pó seco (841,19 g) foi extraído por maceração com etanol a 96 °G.L, obtendo o extrato etanólico bruto (56,96 g) que foi dissolvido em uma solução de H₂O-MeOH (7:3) e particionado com éter etílico, diclorometano e acetato de etila. O extrato etéreo (17,04 g) foi submetido a uma cromatografia em coluna de sílica gel, eluído com hexano, diclorometano e acetato de etila e MeOH puros ou em misturas binárias. As frações reunidas (75-93) foram submetidos a cromatografia em Sephadex LH-20 eluída com CH₂Cl₂-MeOH (1:1). A fração purificada *Sv-1* foi identificado como fucosterol relatada pela primeira vez na espécie. As frações 119-121 e 135.1 foram submetidas cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) em AcOEt-hexano (25:75) e AcOEt-Hex (40:60) das quais foram possível isolar duas feofitinas *Sv-2* e *Sv-3* identificada como a mistura de (13²)-(R) e (13²)-(S)-13²-hidroxi-feofitina-a e 15¹-hidroxi-(15¹-S)-porfirinolactona *a* respectivamente. O isômero *R* da 13²-hidroxi-feofitina-a é relatado pela primeira vez no gênero e o isômero *S* pela primeira vez na espécie, enquanto a porfirinolactona é relatada pela primeira vez na família Sargassaceae. As elucidações estruturais foram realizadas com base na análise de seus espectros de IV, RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais e bem como com base em dados da literatura.

Palavras-chave: Esteróide, feofitinas, *Sargassum*

ABSTRACT

PHYCOCHEMICAL STUDY OF MARINE ALGA *Sargassum vulgare* var. *nanum* E. de PAULA (SARGASSACEAE) from the coast of Paraíba

Ricardo Carneiro Montes

Sargassum is a genus of brown seaweeds from the family Sargassaceae and is represented by 150 species. The literature reports the presence of alginates, phlorotanins, coumarins, chromones, quinones, phaeophitins and terpenoids. The metabolites produced by algae of the genus *Sargassum* show biological activities such as anticoagulant, antioxidant, antipyretic and analgesic. The objective of this study was to present phycochemical study of the species *Sargassum vulgare* var. *nanum* E. de Paula. The material was collected on the beach in Coqueirinho, Conde- PB, then was washed and lyophilized. The dried powder (841.19 g) was extracted by maceration with ethanol 96 °G.L, obtaining the crude extract (56.96 g) was dissolved in a solution H₂O-MeOH (7:3) and partitioned with ethyl ether, dichloromethane and ethyl acetate. The ether extract (17.04 g) was subjected to silica gel chromatography column eluting with hexane, dichloromethane and ethyl and MeOH pure or in binary mixtures. The combined fractions (75-93) were subjected to chromatography with Sephadex LH-20 eluted with CH₂Cl₂-MeOH (1:1). The purified fraction Sv-1 was identified as fucosterol, the first reported in this specie. Other fractions (119-121 and 135.1) were subjected preparative thin layer chromatography (PTLC) with AcOEt-Hexane (25:75) and (40:60) to afford mixture -(13²)-(R) and (13²)-(S)-13²-hydroxy-phaeophytin-a encoded as Sv-2 and 15¹-hydroxy-(15¹-S)-porphyrin lactone encoded as Sv-3. The R isomer of 13²-hydroxy-phaeophytin-a is first reported in the genus and S isomer for the first time in this specie, while the porphyrin lactone is first reported in the family Sargassaceae. Structural elucidations were carried out based on the analysis of their ¹H NMR and ¹³C NMR spectra and on the basis of literature data.

Keywords: steroid, pheophytins, *Sargassum*

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Plantas medicinais utilizadas desde o início da medicina tradicional e seus respectivos princípios ativos.....	20
Figura 2. Mapa de distribuição do gênero <i>Sargassum</i> em regiões litorâneas do Oceano Atlântico, Pacífico, Índico e mar mediterrâneo (ZIPCODE ZOO, 2012)	30
Figura 3. (a) Desenho esquemático de uma planta <i>Sargassum</i> com três ramos laterais; (b) aspecto dos receptáculos masculinos; (c) Aspectos do receptáculos femininos; (d) vesículas; (e) aspecto do corte transversal na região do criostoma (Coimbra, 2006).	31
Figura 4. Estruturas químicas de diterpeno (a), uma cromona (b), um betacarotenóide (c), isoflavonóide (d), quinona (e) um esteróide (f) isolados de espécies do gênero <i>Sargassum</i>	34
Figura 5. Imagens da alga <i>Sargassum vulgare</i> var. <i>nanum</i> E. de Paula na praia de coquerinho (Conde-PB) (a) e (b) em seu habitat rochoso antes da coleta e (c) após a coleta.....	35
Figura 6. Representação gráfica dos maiores grupos de metabólitos secundários de acordo com Croteau et al. (2000).	37
Figura 7. Diferenças estruturais entre a unidade isoprênica e o composto isopreno.....	38
Figura 8. Biossíntese dos terpenos produzidas em seres uni e pluricelulares. (ROHDICH et al, 2003 e SIMÕES, 2010)	38
Figura 9. Biossíntese dos terpenos produzidas em seres uni e pluricelulares (continuação) (ROHDICH et al, 2003 e SIMÕES, 2010).	39
Figura 10. Ciclopentanoperidrofenantreno, núcleo básico de compostos esteroidais... ..	40
Figura 11. Degradção da clorofila e formação de derivados como o feoforbídeo.	42
Figura 12. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de <i>Sv-1</i>	55
Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C -APT de <i>Sv-1</i>	56
Figura 14. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de <i>Sv-1</i> na região de 75,0 – 175,0 ppm.	57
Figura 15. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de <i>Sv-1</i> na região de 10,0 – 80,0 ppm.	57
Figura 16. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Sv-1</i>	58
Figura 17. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Sv-1</i> na região de 3,2 – 6,2 ppm.	59
Figura 18. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Sv-1</i> na região de 0,4 – 2,8 ppm.	59
Figura 19. Espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>Sv-1</i>	60

Figura 20. Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>Sv-1</i> na região de (4,4 – 5,8 ppm) x (108,0 – 130,0 ppm).....	61
Figura 21. Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>Sv-1</i> na região de (0,5 – 1,7 ppm) x (9,0 – 26,0 ppm).....	61
Figura 22. Espectro bidimensional de ^1H X ^1H COSY de <i>Sv-1</i>	62
Figura 23. Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de <i>Sv-1</i> na região de (1,0 – 6,0 ppm) x (1,4 – 5,6 ppm).....	63
Figura 24. Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de <i>Sv-1</i>	64
Figura 25. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de <i>Sv-1</i> na região de (0,1 – 2,7 ppm) x (110,0 – 160,0 ppm).....	64
Figura 26. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de <i>Sv-1</i> na região de (-1,2 – 3,0 ppm) x (15,0 – 80,0 ppm).	65
Figura 27. Espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) de <i>Sv-1</i>	66
Figura 28. Expansão do espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) de <i>Sv-1</i> na região de (0,4 – 2,6 ppm) x (-2,0 – 2,8 ppm).....	66
Figura 29. Correlações bidimensionais de <i>Sv-1</i> observadas espectros de HMBC, COSY e NOESY.	67
Figura 30. Espectro de Infravermelho (KBr, cm^{-1}) de <i>Sv-2</i>	70
Figura 31. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Sv-2</i>	73
Figura 32. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Sv-2</i> na região de 4,0 – 10,0 ppm.....	73
Figura 33. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <i>Sv-2</i> na região de 0,5 – 4,5 ppm.	74
Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de <i>Sv-2</i>	76
Figura 35. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de <i>Sv-2</i> na região de 90,0 – 195,0 ppm	76
Figura 36. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de <i>Sv-2</i> na região de 5,0 – 80,0 ppm	77
Figura 37. Espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>Sv-2</i>	78
Figura 38. Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>Sv-2</i> na região de (3,5 – 10,0 ppm) x (90,0 – 125,0 ppm).....	78
Figura 39. Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de <i>Sv-2</i> na região de (-1,5 – 5,5 ppm) x (0,0 – 70,0 ppm).	79
Figura 40. Espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de <i>Sv-2</i>	80
Figura 41. Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de <i>Sv-2</i> na região de (5,5 – 8,5 ppm) x (5,5 – 8,5 ppm).	80

Figura 42. Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl ₃) de Sv-2 na região de (0,5 – 5,5 ppm) x (0,5 – 5,5 ppm).....	81
Figura 43. Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de Sv-2.....	82
Figura 44. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de Sv-2 na região de (1,00 – 9,50 ppm) x (155,0 – 180,0 ppm).....	83
Figura 45. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de Sv-2 na região de (1,00 – 9,50 ppm) x (155,0 – 180,0 ppm).....	83
Figura 46. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de Sv-2 na região de (3,95 – 4,80 ppm) x (20,0 – 38,0 ppm).....	84
Figura 47. Correlações bidimensionais de Sv-2 observadas espectros de HMBC, COSY e NOESY	84
Figura 48. Espectro de Infravermelho (KBr, cm ⁻¹) de Sv-3.	88
Figura 49. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de Sv-3.	89
Figura 50. Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de Sv-3 na região de 4,5 – 10,5 ppm.	89
Figura 51. Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de Sv-3 na região de 2,95 – 4,05 ppm.	90
Figura 52. Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de Sv-3 na região de 0,30 – 2,60 ppm.	90
Figura 53. Espectro de RMN ¹³ C - APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de Sv-3.	92
Figura 54. Expansão do espectro de RMN ¹³ C - APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de Sv-3 na região de 118,0 – 182,0 ppm.	92
Figura 55. Expansão do espectro de RMN ¹³ C - APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de Sv-3 na região de 88,0 – 130,0 ppm	93
Figura 56. Expansão do espectro de RMN ¹³ C - APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de Sv-3 na região de 53,0 – 82,0 ppm	93
Figura 57. Expansão do espectro de RMN ¹³ C - APT (CDCl ₃ , 125 MHz) de Sv-3 na região de 12,0 – 520,0 ppm.	94
Figura 58. Espectro HMQC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Sv-3.	95
Figura 59. Expansão do espectro HMQC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Sv-3 na região de (4,0 – 10,5 ppm) x (80,0 – 140,0 ppm).....	95
Figura 60. Expansão do espectro HMQC (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) de Sv-2 na região de (0,0 – 5,0 ppm) x (5,0 – 70,0 ppm).....	96
Figura 61. Espectro COSY (500 MHz, CDCl ₃) de Sv-3.	97
Figura 62. Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl ₃) de Sv-3 na região de (5,5 – 9,0 ppm) x (5,5 – 9,0 ppm).	97

Figura 63. Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Sv-3</i> na região de (-0,5 – 6,0 ppm) x (-0,5 – 5,5 ppm).....	98
Figura 64. Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Sv-3</i>	99
Figura 65. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Sv-3</i> na região de (0,5 – 10,5 ppm) x (110,0 – 210,0 ppm).....	99
Figura 66. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de <i>Sv-3</i> na região de (-0,5 – 9,0 ppm) x (10,0 – 90,0 ppm).	100
Figura 67. Espectro NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Sv-3</i>	102
Figura 68. Expansão do espectro NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Sv-3</i> na região de (3,0 – 11,0 ppm) x (3,0 – 11,0 ppm).....	103
Figura 69. Expansão do espectro NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de <i>Sv-3</i> na região de (3,5 – 6,5 ppm) x (5,9 – 8,1 ppm).....	103
Figura 70. Correlações bidimensionais de <i>Sv-3</i> observadas espectros de HMBC, COSY e NOESY.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para <i>Sv-1</i> , verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3	68
Tabela 2. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Sv-1</i> em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) do fucosterol (HAM et al) em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente).....	69
Tabela 3. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para <i>Sv-2</i> , verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3	85
Tabela 4. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de do isômero <i>S</i> de <i>Sv-2</i> com os valores da literatura.	86
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos dois isômeros <i>R</i> e <i>S</i> da 13 ² -hidroxi-feofitina-a.	87
Tabela 6. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para <i>Sv-3</i> verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3	104
Tabela 7. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de <i>Sv-3</i> em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) e da Porfirinolactona em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente).	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Relação de regiões de espécies do gênero <i>Sagassum</i> que apresentam estudos científicos.	30
Quadro 2. Produtos naturais isolados em espécies do gênero <i>Sargassum</i>	33

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto de <i>Sargassum vulgare</i> var. <i>nanum</i>	49
Esquema 2. Fracionamento da fase etérea do extrato etanólico bruto de <i>Sargassum vulgare</i> var. <i>nanum</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt: acetato de etila

APT: Attached Proton Test

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CCDP: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CDCl₃: Clorofórmio deuterado

CD₃OD: Metanol deuterado

CHCl₃: Clorofórmio

CH₃OH: Metanol

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CoA: Coenzima A

COSY: Correlation Spectroscopy

d: Duplet

dd: Duplo duplet

ddd: Duplo duplo duplet

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

dl: Duplet largo

EtOH: Etanol

g: Grama

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

HMG-CoA: hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA

Hz: Hertz

IV: Infravermelho

J: Constante de acoplamento

KBr: Brometo de Potássio

kg: Quilograma

L: Litro

m: Multipletos

mg: Miligrama

MHz: Megahertz

Na₂SO₄: Sulfato de Sódio

nm: Nanômetro

NOESY: Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

P.N.: Produtos naturais

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

s: Simpleto

sl: Simpleto largo

t: Triplete

u.m.a.: Unidade de Massa Atômica

UV: Ultravioleta

δ: Deslocamento Químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Aspectos gerais sobre os produtos naturais	19
1.2. Aspectos gerais sobre a farmacognosia marinha	23
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	28
3.1. Considerações da família Sargassaceae	28
3.2. Considerações sobre o gênero <i>Sargassum</i>	29
3.4. Metabólitos secundários estudados no gênero <i>Sargassum</i>	31
3.3 Considerações sobre a espécie <i>Sargassum vulgare</i> var. <i>nanum</i> E. de Paula	34
3.4 Considerações sobre a via do mevalonato	35
3.5. Considerações sobre esteroides	40
3.6. Considerações sobre derivados da clorofila.....	41
2. OBJETIVOS	44
2.1 Objetivo geral	44
2.2 Objetivo específico	44
4. METODOLOGIA.....	46
4.1. Método de análise	46
4.1.1 Métodos cromatográficos.....	46
4.1.2. Ponto de fusão	46
4.1.3. Pureza da amostra.....	46
4.2. Métodos espectroscópicos	47
4.2.1. Infravermelho	47
4.2.2. Ressonância Magnética Nuclear	47
4.3. Estudo ficoquímico	47
4.3.1. Coleta e identificação da alga marinha e pré-tratamento do material	47
4.3.2. Obtenção do extrato etanólico bruto (E.E.B.) da alga marinha <i>Sargassum vulgare</i> var. <i>nanum</i>	48
4.3.3. Partição do extrato etanólico bruto.....	48
4.3.4. Fracionamento cromatográfico da fase etérea.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1. Identificação estrutural de <i>Sv-1</i>	55
5.2. Identificação estrutural de <i>Sv-2a</i> e <i>Sv-2b</i>	70
5.3. Identificação estrutural de <i>Sv-3</i>	88
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	107
7. REFERÊNCIAS	109

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais sobre os produtos naturais

As plantas produzem metabólitos primários e secundários que abrangem uma ampla gama de funções (CROTEAU, KUTCHAN; LEWIS, 2000). Metabólitos primários, que incluem aminoácidos, açúcares simples, ácidos nucléicos e lipídios, são necessários para os processos celulares vitais. Metabólitos secundários incluem compostos produzidos em resposta a um estresse, funcionando como arma biológica para a defesa contra parasitas ou predadores (KEELING & BOHLMANN, 2006). Pode-se dizer que é uma pesquisa realizada a partir de conhecimentos em química orgânica, farmacoquímica, farmacologia e relação-estrutura-atividade (SAR) aplicadas a produtos naturais de origem vegetal, animal ou microbiana. Uma vez que novas ferramentas de separação de maior acurácia, como CLAE, bem como ferramentas de espectroscopia de UV, IV e RMN de ^1H e ^{13}C são usados na identificação destes compostos, o desenvolvimento de estudos químicos revelam o que há por trás dos seres vivos e o que pode ser feito com essas substâncias no campo da saúde, do meio ambiente, ou das indústrias químicas e farmacêuticas (BROSS-WALCH et al., 2005; LAMBERT et al., 2007).

Desde séculos atrás, a medicina tradicional e os produtos naturais caminham lado a lado na cura de doenças por medicamentos ou na descoberta de venenos naturais. Na atualidade, os produtos naturais ainda fornecem produtos para novas drogas candidatos ao tratamento em terapias clínicas. Drogas derivadas de produtos naturais estão sendo bem representadas nas vendas de medicamentos de 2000, 2001 e 2002. A percentagem de drogas derivadas de produtos naturais foi de 40% em 2000 e manteve-se constante em 24% em 2001 e 26% em 2002 (BUTLER, 2004).

A linha de desenvolvimento de novos medicamentos a partir de produtos naturais se deu ao longo da história de diversas maneiras. As primeiras drogas conhecidas pelo homem foram introduzidas ao acaso pelo modo de vida, ou tradição cultural de acordo com a cultura da região. Exemplos dessa constatação são: o ópio presente nos bulbos de *Papaver somniferum* (**figura 1**) conhecido pelas suas propriedades analgésicas e soporíferas (que provoca sono por enfadamento) desde a época dos Súmerios (4000 A.C.); a cichona ou *Cinchona officinalis* (Köhler) (**figura 1**) utilizada pelos jesuítas para o tratamento de alguns tipos de febre durante a colonização

espanhola no Peru, em 1630 (VIEGAS & BOLZANI, 2006). Na América, têm-se os registros históricos do uso de plantas alucinógenas pelos ameríndios que as empregavam em rituais pagãos e do envenenamento com curare que usavam na ponta das flechas para caçar e pescar. O princípio ativo mais importante do curare é um alcalóide bisbenziltetrahidroquinólico (**figura 1**) na forma de um sal quaternário, solúvel denominado (+) tubocurarina (BARREIRO & FRAGA, 2008).

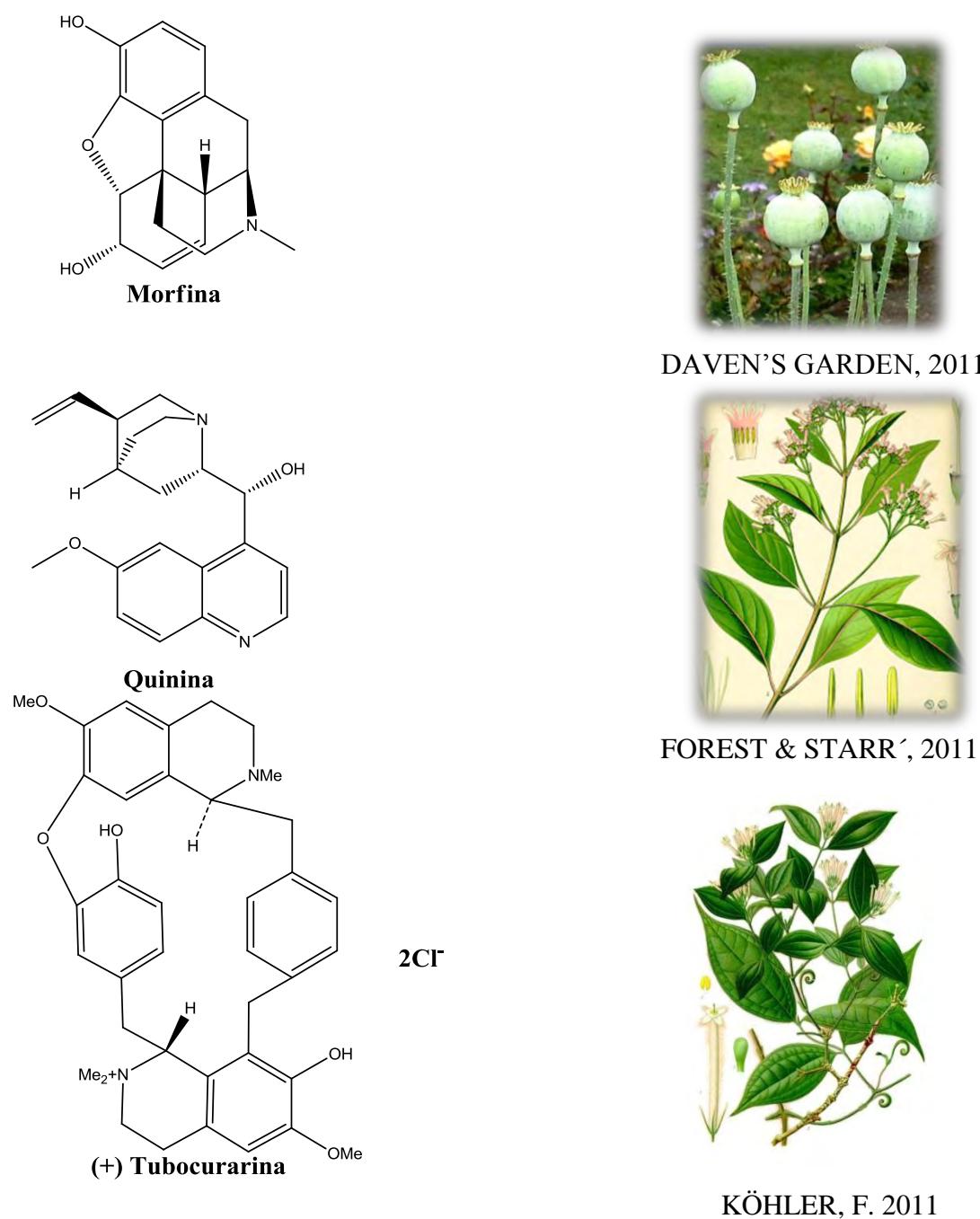


Figura 1. Plantas medicinais utilizadas desde o início da medicina tradicional e seus respectivos princípios ativos.

Na primeira revolução industrial, os pesquisadores buscavam novas drogas, mas com intuições diferentes dos anteriores. Os metabólitos secundários passaram a ter maior importância como possivelmente fármacos após o descobrimento dos salicilatos obtidos da *Salix alba*. A busca para novos medicamentos agora não é mais ao acaso, a tecnologia se intensifica para colocar no mercado novos lançamentos a partir de produtos naturais que passam por um processo de semi-síntese ou síntese total. Com isso, surgiu o barbital (ácido 5,5-dietilbarbitúrico), em 1903, indicado como agente hipnótico; a epinefrina em 1904 e em seguida a procaína e a benzocaína, todos esses agentes são da classe dos ésteres do ácido *para*-aminobenzóicos e foram sintetizados, baseando-se na estrutura da cocaína (VIEGAS & BOLZANI, 2006).

Embora o planejamento de fármacos passa a consolidar a indústria farmacêutica, outros modos de planejamento viriam a ser abordados. Com o tempo, o planejamento racional de fármacos baseado no metabolismo passou ser um requisito implementar nas linhas de pesquisas farmacêuticas. A oxamniquina é um fármaco esquistossomicida originado da hicantona, desenvolvida em pesquisa de metabolismo de um precursor chamado lucatona (VIEGAS & BOLZANI, 2006).

A síntese de fármacos marcou o início de uma nova etapa nos programas de pesquisas de novas drogas, porém à medida que o tempo passava, a síntese química ficou dispendiosa demais, uma vez que muitos protótipos não ultrapassam as etapas pré-clínicas e clínicas. Neste momento, a indústria farmacêutica voltou seus olhos para uma pesquisa que possa aliar tempo com dinheiro e começa a investir pesadamente na química combinatória. Havia um pensamento de que a química combinatória acoplada ao conhecimento da estrutura básica iminente do genoma humano traria um avanço muito rápido nas pesquisas. Acreditava-se que as informações mais relevantes seriam entregues em tempo mais rápido e em maior número para todas as áreas terapêuticas em relação aos métodos tradicionais de descoberta de drogas. Entretanto, em meados da década de 90, os resultados da busca em bibliotecas de química combinatória não chegaram a ser tão promissora quanto se dizia (BUTLER, 2004).

A razão para que esses resultados fossem insatisfatórios estava na diferença da estrutura química entre um composto sintético e um produto natural. Compostos de origem natural ocupam um tipo de espaço que se conectam com naturalidade a outras moléculas de um organismo, algo que influenciou muito na síntese de novas

substâncias. As bibliotecas começaram a utilizar modelos de produtos naturais para novas combinações sintéticas. Desta maneira, alguns grupos de pesquisa e algumas indústrias farmacêuticas começaram a sintetizar estruturas mais complexas para se adequar ao espaço ocupado por metabólitos naturais. Nesse sentido, os erros da pesquisa demonstraram que os produtos naturais deveriam ser incorporados como modelos nos programas de descobrimento de novas drogas (BUTLER, 2004) e que é interessante notar que os produtos naturais ou compostos derivados de plantas, são responsáveis por mais de 40% dos novos lançamentos de novas drogas em programa de pesquisa (EXARCHOU et al, 2005).

Os desafios enfrentados no desenvolvimento de novos medicamentos a partir de produtos naturais são inúmeros. Entre os problemas, podem se elencar: o screening farmacológico de novas substâncias, o rastreamento de novos produtos naturais, a imcompatibilidade de extratos de drogas com novos métodos de triagem farmacológica como *high throughput screening*, o isolamento e elucidação estrutural e desenvolvimento do composto através do método de screening pelo *high throughput screening*, o qual se realiza a análise de mais de cem mil amostras em um único ensaio cuja etapa pode ser completada em apenas uma semana, usando cerca de 384 poços, um sistema de manuseio de dados e tecnologia robótica acoplada a um software avançado (BUTLER, 2004). De acordo com as pesquisas feitas, demonstra-se que os screenings de plantas são mais problemáticos do que o screening de produtos sintéticos, uma vez que podem surgir problemas ocasionados por compostos que, em extratos, podem se autoflorecer ou ter absorções no UV que interferem na leitura do screening. Outro problema comum é que os compostos interferentes podem mascarar a atividade biológica de compostos de interesse ou a presença de famílias de composto ou grupos de compostos no extrato, que podem interferir nos resultados de maneira não-específica (BUTLER, 2004). O fracionamento biomonitorado usado para identificar produtos naturais bioativos é percebido como racionamento limitado e uso intensivo dos recursos. Entretanto, o desenvolvimento da instrumentação e da robótica usado para revolucionar outros aspectos do descobrimento pode também ser usado para acelerar o isolamento e a elucidação estrutural dos produtos naturais (BUTLER, 2004; EXARCHOU, 2005).

Um exemplo de intensa pesquisa é a busca de produtos naturais com propriedades antitumorais. Em 1950, o National Cancer Institute (NCI) iniciou essas

buscas no laboratório de Produtos Naturais do Research Triangle, na Carolina do Norte, Estados Unidos. Esses estudos resultaram na descoberta do paclitaxel, isolado da árvore *Taxus brevifolia* Nutt. que atua de forma a promover a polimerização de tubulinas e a estabilização dos microtúbulos formados, representando um novo mecanismo farmacológico de intervenção na proliferação celular. Mas nem sempre os programas de pesquisas de novas drogas chegam aos seus objetivos como foi o caso da descoberta da camptotecina. Essa substância bioativa foi descoberta ao acaso em um programa de pesquisas do Departamento de Agricultura dos EUA, iniciado em 1985. O objetivo deste programa visava a descoberta de substâncias esteroidais de extratos vegetais para a síntese da cortisona. As propriedades antitumorais da camptotecina ensaiados em adrenocarcinomas chamaram a atenção e permitiram identificar um novo mecanismo de controle da proliferação celular, através da inibição da enzima topoisomerase-I, não antes explorado (BARREIRO & FRAGA, 2008).

O desenvolvimento da tecnologia vem trazendo novas descobertas no campo da farmacoquímica, algo que não poderia ser explorado antes. Nas últimas décadas, começaram a surgir técnicas hifenadas que combina técnicas de separação com espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massa (MS). A CLAE é uma técnica bem desenvolvida e amplamente utilizada para a separação de misturas complexas. É importante observar que o modo clássico de estudo de produtos naturais que inclue o fracionamento do extrato bruto ou fase do extrato, a separação e o isolamento de componentes individuais, usando métodos clássicos de cromatografia e elucidação estrutural (UV, IR, NMR, MS), leva a um consumo de tempo e mão de obra. Em vez disso, o acoplamento de cromatografia líquida ao RMN pode economizar horas e horas de trabalho, sendo uma das melhores escolhas propostas há 20 anos. A primeira utilização de LC-RMN foi realizada na década de 70 por Watanabe e Niki. Porém a primeira amostra a ser realmente analisada por CL-RMN foi um combustível de jato militar, usando colunas de fase normal e como solventes clorofórmio e Freon 113 deuterados (EXARCHOU, 2005).

1.2. Aspectos gerais sobre a farmacognosia marinha

Embora a biodiversidade terrestre ofereça um complexo arsenal de organismos vivos de espécies distintas para o levantamento científico de produtos naturais a serem

explorados, é necessário salientar a importância da farmacognosia marinha, que, desde o século XX, vem construindo a sua própria linha de pesquisa (CANNELL, 1998).

A biodiversidade marinha contém mais de 200.000 espécies de algas e invertebrados ocupando um espaço geográfico aquático de cerca 70 % do Planeta e entre eles estão as algas. (SIMÕES et al, 2004).

O interesse em produtos naturais marinhos, no entanto, esperou por uma melhoria em termos de tecnologia (principalmente mergulho) para coletar os organismos dessa fonte. Mesmo assim, no final dos anos 1950, o conceito de drogas de fontes marinhas atraiu alguns interessados. A azidovudina (AZT), um agente desenvolvido para retrovírus causadores de câncer, mas pouco eficiente para combater câncer em desenvolvimento, foi importante recurso quimioterápico disponível para o combate ao vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) que marcou a química dos produtos naturais marinhos na década de 80. O estudo desenvolvido pelos laboratórios Burroughs-Wellcome Company (hoje GlaxoSmithKline), teve como objetivo criar um programa de avaliação das propriedades antivirais do AZT, particularmente para *Herpes zoster* e *Herpes simplex*. No entanto AZT mostrou-se importante para a sobrevivência de pacientes com HIV. A partir de sua síntese, ele se consagrou eficazmente contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BARREIRO & FRAGA, 2001; HAJDU et al, 1999).

O bioma marinho se destaca como recurso de produtos naturais ilimitados por causa da vasta extensão dos oceanos. Muitos desses metabólitos marinhos provêm quase exclusivamente de algas e invertebrados, ou seja, algas pardas, algas verdes algas vermelhas, esponjas, tunicados, briozoários, cnidários, ascídias e moluscos como também de microrganismos marinhos que podem ser bactérias e cianobactérias marinhas (JIN, 2005). Porém como é de se esperar a dificuldade de desenvolver medicamentos a partir de uma fonte marinha, sem dúvida, é um dos maiores problemas. A aquisição ou produção de quantidades de compostos de raras fontes marinhas para garantir um fornecimento sustentável não foi contornado, uma vez que alguns organismos marinhos como alguns tipos de esponjas são incultiváveis artificialmente (MOLINSKI et al , 2009). Uma característica marcante dos produtos bioativos marinhos reside no fato de que são estruturalmente muito diferentes dos metabólitos secundários encontrados no ambiente terrestre. É possível que essa diferença dos

metabólitos marinhos se reflita pelo ecossistema também tão diferente, onde sua sobrevivência se deu pela incorporação de eletrólitos incomuns no ambiente terrestre. Altas concentrações de íons SO_4^{2-} , Cl^- , Br^- , Γ foram incorporados pelos os organismos marinhos os quais são produtores de substâncias halogenadas ou estruturas químicas pouco comuns nos organismos terrestres como o produtos naturais contendo grupos sulfato em compostos químicos (FENICAL, 1975). Na década de 70, os estudos de drogas marinhas deram seu primeiro fruto. A primeira droga explorada do mar, ziconotido, (ω -conotoxin MVIIA) – um peptídeo presente em um caracol tropical marinho – foi aprovado nos Estados Unidos em 2004 com o nome de Prialt no combate contra a dor crônica provocada por lesão na medula espinhal. O segundo foi a trabectedina, um composto com atividade antitumoral, aprovada pela União Européia em outubro de 2007 para o tratamento de alguns tipos de sarcoma (MOLINSKI et al , 2009).

Já foram encontradas por volta de 30,000 espécies de algas vivendo ao longo das costas marinhos. Relatos mostram que as algas já foram utilizadas como remédio e fertilizantes. Quimicamente os metabólitos bioativos da flora marinha incluem fenóis bromados, heterocíclicos oxigenados, nitrogenados e de enxofre, terpenóides, polissacarídeos, peptídeos e proteínas (BHAKUNI & RAWAT, 2005). Pesquisadores do Japão em busca de aditivos para alimentos com menos toxicidade descobriram que as algas são ricas em agentes antioxidantes, uma vez que ao serem estocadas por um longo período não entram em deterioração oxidativa, mesmo apresentando mais de 30% do total de seus ácidos graxos na forma de cadeias poliinsaturadas (principalmente as algas pardas) (ROCHA et al, 2007). Lipídios de algas pardas ricos em fucoxantina são importantes fontes potenciais de ácidos graxos altamente insaturados como omega-3 (HUFA), juntamente com as fontes de ômega-6, tais como o ácido araquidônico. Esses lipídios são constituídos de alguns compostos ficoquímicos interessantes, tais como fucosterol e polifenóis. Outras classes de compostos naturais como carotenóides, fitoesteróis e polifenóis em geral, especialmente os de origem terrestre, têm sido exaustivamente revistos com relação a sua ocorrência, as funções biológicas e possíveis benefícios para a saúde possível, no entanto, tem havido relativamente pouca informação sobre os de origem marinha (MIYASHITA, 2009). A pesquisa desenvolvida no alcance de novas drogas anti-fúngicas, antiparasitárias, antibacterianas e antivirais altamente resistentes tem voltado suas expectativas aos produtos naturais marinhos,

considerando como um recurso não explorado pelo homem, mas com uma potencial aplicação na medicina (DONIA & HARMANN, 2003).

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Considerações da família Sargassaceae

A família de algas pardas Sargassaceae é constituída de 12 gêneros nos quais estão distribuídas cerca de 481 espécies. Essa família compreende os gêneros *Acystis*, *Anthophycus*, *Carpacanthus*, *Carpophyllum*, *Cladophyllum*, *Halochloa*, *Hizikia*, *Nizamuddinia*, *Pterocaulon*, *Sargassopsis*, *Sargassum* e *Turbinaria* (ALGAEBASE, 2012). Os bancos de algas da família Sargassaceae são considerados como fontes de algas à deriva que também fornecem alimento e abrigo para organismos marinhos e geralmente apresentam órgãos como caulículos, folículos, vesículas e receptáculos (YATSUYA, et al, 2005).

A literatura tem poucas informações sobre a relação filogenética desta família. Os gêneros *Sargassum* e *Turbinaria* são as algas da família de maior distribuição, sendo a primeira encontrada em regiões tropicais e subtropicais em quase todos os oceanos e a segunda em regiões tropicais e subtropicais dos Oceanos Pacífico e Índico (COIMBRA, 2006; ROHFRITSCH, et al, 2010). Na indústria alimentícia, algas como *Hizikia fusiformis* são consumidas na alimentação ou usadas como ingrediente herbal em países asiáticos da China, Corea e Japão. Na medicina apresenta a propriedade de inibir a toxicidade causada pelo uso de acetaminofeno (HWANG, KIM & NAM, 2008), no entanto, têm-se sugerido que *Turbinaria* e outros membros da família Sargassaceae são inherentemente não comestíveis devido à grande concentração de substâncias polifenólicas (SHEU, et al, 1999). O interesse de países do oriente por esse tipo de algas reflete-se também nos estudos científicos desenvolvidos sobre esses produtos naturais bioativos que pode ser observado no levantamento.

Os gêneros *Sargassum* e *Turbinaria* são as fontes mais ricas de alginatos, assim como são conhecidas na comunidade científica por suas atividades biológicas. Alginatos de espécies como *S. carpophyllum*, *S. ilicifolium* e *S. siliquosum* são utilizados nas indústrias alimentícias por causa de suas propriedades viscosas mais apropriadas para a fabricação de alimentos. A produção de defesas químicas, principalmente de compostos fenólicos, dessas algas aumenta consideravelmente em espécies de ecossistemas coralíferos onde a biodiversidade, a predação herbívora e a competição são mais elevadas (ZUBIA, PAYRI & DESLANDES, 2008).

Grande parte dos trabalhos descritos na literatura relata que os extratos de várias espécies dessa família geralmente apresentam atividade biológica de relevância para estudo farmacológico. A atividade antioxidante já foi comprovada em extratos do gêneros *Hizikia*, *Sargassum* e *Turbinaria* (CHOI et al, 2009; ZUBIA, PAYRI & DESLANDES, 2008) o que demonstra serem detentores de uma biossíntese rica de compostos fenólicos. Foram também descobertos atividades antimicrobiana, antitumoral, imuno-estimulatória, gastroprotetora em espécies dos gêneros *Carpophyllum* e *Hizikia* (GLOMBITZA & SCHMIDT, 1999; CHOI et al, 2009).

3.2. Considerações sobre o gênero *Sargassum*

Sargassum é um gênero de macroalgas da família Sargassaceae que apresenta aspecto flutuante, constituindo um dos mais representativos dentre os 41 gêneros da ordem Fucales (Phaeophyceae, Heterokontophyta) sendo representado por 340 espécies (ALGAEBASE, 2012). Sabe-se ainda que o gênero *Sargassum* se divide em 3 subgêneros: *Phyllotrichia*, *Sargassum* e *Bactrophycus* (STIGER et al, 2003). As algas desse gênero se distribuem predominantemente por áreas costeiras através de substrato consolidado, tanto nas regiões tropicais e por áreas subtropicais (ver **figura 2** na pág 29), muitas vezes formando os chamados bancos de *Sargassum* (COIMBRA, 2006). O quadro 1 (pág 29) mostra algumas espécies estudadas de *Sargassum* e as regiões encontradas.

As algas do gênero *Sargassum* são compostas de apressório, eixos principais e ramos laterais, os quais se diferenciam a partir de eixos principais e constituem a maior parte do talo. Os ramos finais são laminares e assemelham-se às folhas das angiospermas, possuindo uma nervura central, sendo denominados filoides. Algumas espécies apresentam vesículas flutuadoras designadas de aerocistos e cavidades com poros, contendo ou não um ramo de pêlos (ver **figura 3** na pág 30) (COIMBRA, 2006).

Quadro 1. Relação de regiões de espécies do gênero *Sagassum* que apresentam estudos científicos.

Espécie	Origem	Referências
<i>S. fallax</i>	Australia, Oceano Pacífico	Reddy, e Urban, 2009
<i>S. fulvellum</i> ,	Japão, Oceano Pacífico	Ina, et al., 2007
<i>S. micracanthum</i>	Coréia do Sul, Oceano Pacífico	Ham et al., 2010
	Japão, Oceano Pacífico	Iwashima et al., 2008
<i>S. pallidum</i>	China, Oceano Pacífico	Liu et al., 2009
<i>S. siliquastrum</i>	Coréia do Sul, Oceano Pacífico	Cho et al., 2008
<i>S. hemiphyllum</i>	Estados Unidos, Oceano Pacífico	Takada et al., 2001
<i>S. thunbergii</i>	Coréia do Sul, Oceano pacífico	Seo, Park, e Nam, 2007
<i>S. tortile</i>	Japão, Oceano Pacífico	Kubo et al., 1992
		Kikuchi et al, 1983

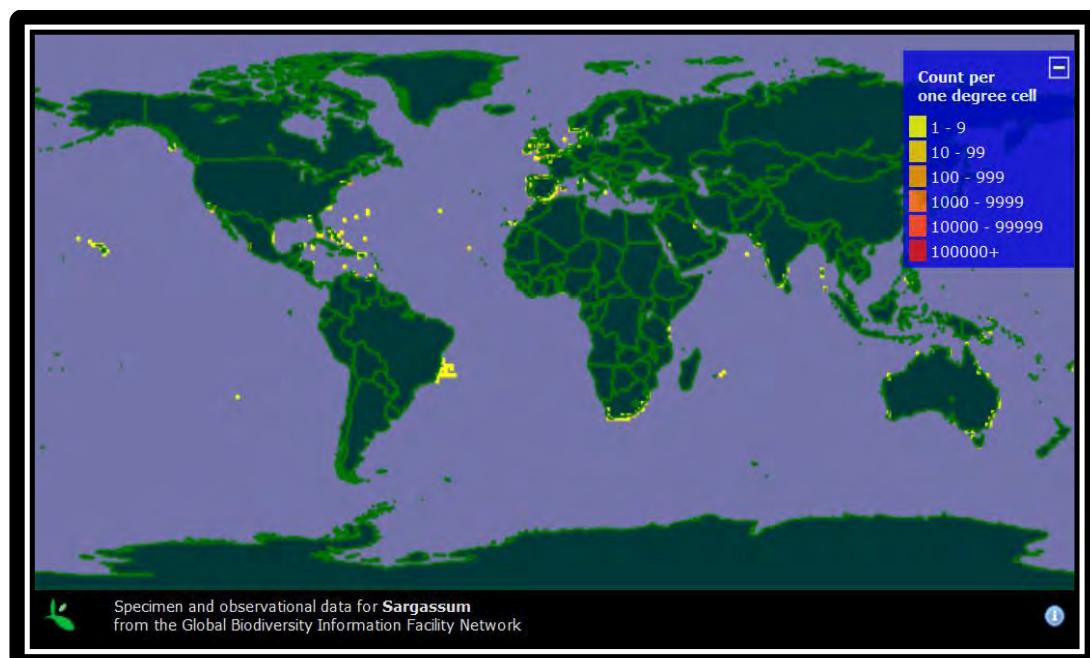


Figura 2. Mapa de distribuição do gênero *Sargassum* em regiões litorâneas do Oceano Atlântico, Pacífico, Índico e mar mediterrâneo (ZIPCODE ZOO, 2012)

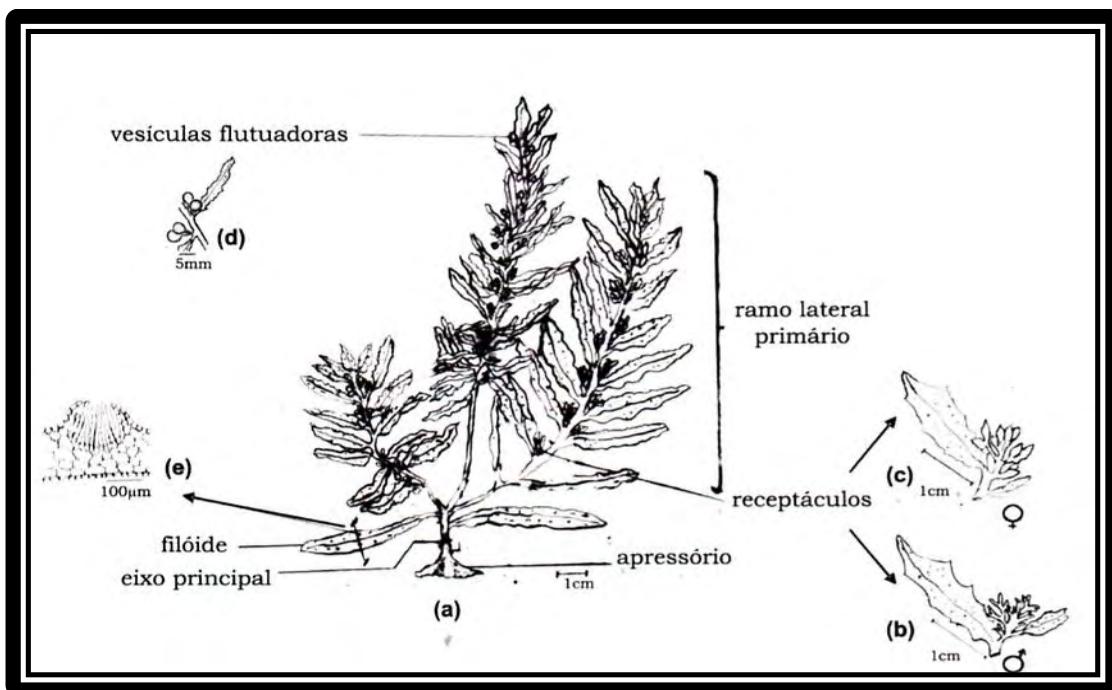


Figura 3. (a) Desenho esquemático de uma planta *Sargassum* com três ramos laterais; (b) aspecto dos receptáculos masculinos; (c) Aspectos do receptáculos femininos; (d) vesículas; (e) aspecto do corte transversal na região do criptostoma (Coimbra, 2006).

Economicamente, são utilizadas as partes secas e pulverizadas das plantas do gênero *Sargassum* para preparar massas de biscoitos, sorvetes e outros produtos alimentícios (WANG, 2008). Além de serem utilizadas na indústria dos alimentos, ecologicamente, tem um papel importante para diminuição da poluição produzida pelo descarte humano, pois espécies de algas de *Sargassum* atuam como biofiltros marinhos, acumulando metais pesados tóxicos e, assim, diminuindo o impacto prejudicial ao ecossistema local das regiões costeiras litorâneas (MURUGADAS, PHANG & TONG, 1995). Alterações sazonais influenciam diversos fatores abióticos das algas desse gênero tais como temperatura, pH, salinidade e etc, bem como fatores bióticos como morfologia e diversidade, em última instância, epifaunal responsável pela biossíntese de metabólitos secundários (CHENNUBHOTLA et al, 1982). As algas marinhas *Sargassum sp.* podem ser usadas como um complemento alimentar nas refeições para ovelhas, especialmente em regiões onde outras fontes alimentares são escassas (MARÍN et al, 2009).

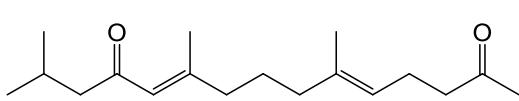
3.4. Metabólitos secundários estudados no gênero *Sargassum*

Dentre os metabólitos secundários, são encontrados no gênero *Sargassum* classes como cumarinas, cromonas do tipo meroterpenóides, quinonas, ácidos

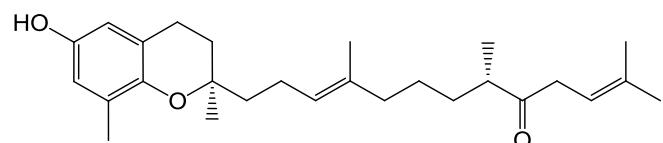
quinônicos e terpenóides. Embora seja pouco usual a presença de flavonóides em plantas marinhas como na alga vermelha *Acanthophora spiciferae* na alga verde *Nitella hookeri*, o estudo químico de *Sargassum pallidum* obteve pela primeira vez o isolamento e a identificação da Calicosina, um isoflavonóide comum em plantas angiospermas, como por exemplo em *Spatholobus suberectus*, *Hedysarum polybotrys* e *Astragalus membranaceus* (LIU et al, 2009). Exemplos de estruturas de cada classe podem ser observados no **Quadro 2** e na **Figura 4** (AFOLAYAN et al, 2008; IWASHIMA et al, 2008;).

Quadro 2. Produtos naturais isolados em espécies do gênero *Sargassum*.

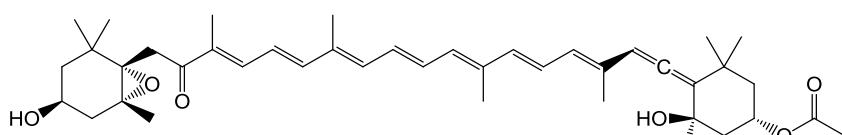
Espécie	Composto	Classe do composto	Referências
<i>S. fallax</i>	Falahidroquinona	Quinona	Reddy, e Urban, 2009
	Falaquinona	Quinona	Reddy, e Urban, 2009
	Ácido sargaquinoico	Quinona	Reddy, e Urban, 2009
	Ácido sargahidroquinóico	Quinona	Reddy, e Urban, 2009
	Sargacromanol	Cromona	Reddy, e Urban, 2009
<i>S. fulvellum</i> ,	Feofitina a	Feofitina	Ina, et al., 2007
<i>S. horni</i>	fucoxantina	tetraterpeno	Miyashita, 2009
<i>S. micracanthum</i>	Ácido sargaquinoico	Quinona	Ham et al., 2010
	Sargacromanol	Cromona	Ham et al., 2010
	Fucosterol	Esteroide	Ham et al., 2010
	Tocotrienol, (2R)- 9'-oxo- δ -	Cromona	Iwashima et al., 2008
<i>S. pallidum</i>	Calicosina	Flavonoide	Liu et al., 2009
	Liquiritigenina	Flavonoide	Liu et al., 2009
	Fucosterol	Esteroide	Liu et al., 2009
	Saringosterol	Esteroide	Liu et al., 2009
<i>S. siliquastrum</i>	Mojabancromanol	Cromona	Cho et al., 2008
<i>S. hemiphyllum</i>	Hedaol A	Bisnorditerpeno	Takada et al., 2001
	Hedaol B	Bisnorditerpeno	Takada et al., 2001
	Hedaol C	Bisnorditerpeno	Takada et al., 2001
<i>S. thunbergii</i>	Ácido sargaquinoico	Quinona	Seo, Park, e Nam, 2007
	Ácido sargahidroquinóico	Quinona	Seo, Park, e Nam, 2007
	Sargacromanol	Cromona	Seo, Park, e Nam, 2007
	Sargatubergol	Cromona	Seo, Park, e Nam, 2007
<i>S. tortile</i>	Critinol	Diterpeno	Kubo et al., 1992
	Geranilgeraniol	Diterpeno	Kubo et al., 1992
	Fitol	Diterpeno	Kubo et al., 1992
	Sargatriol	Cromona	Kikuchi et al., 1983



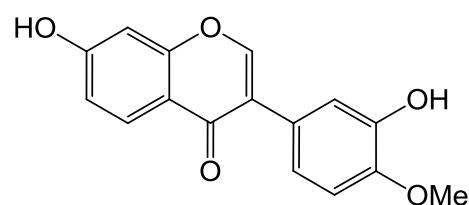
(a). (5E,10E)-6,10,14-trimetilpentadeca-5,10-dien-2,12-diona



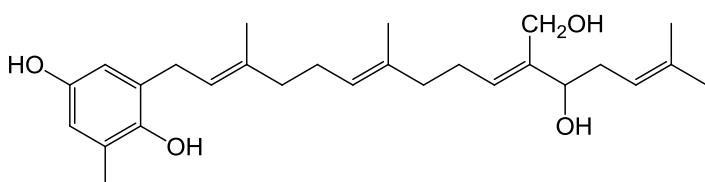
(b). (2R,8'S)-7',8'-diidro-9'-oxo- δ -tocotrienol



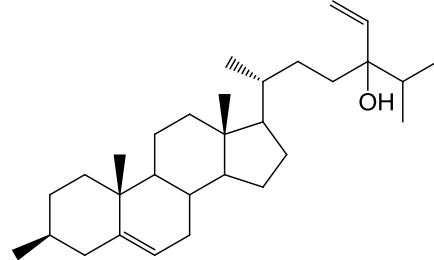
(c). Fucoxantina



(d). Caylcosina



(e). Falahidroquinona



(f). Saringosterol

Figura 4. Estruturas químicas de diterpeno (a), uma cromona (b), um betacarotenóide (c), isoflavonóide (d), quinona (e) um esteróide (f) isolados de espécies do gênero *Sargassum*.

3.3 Considerações sobre a espécie *Sargassum vulgare* var. *nanum* E. de Paula

Dentro da espécie *Sargassum vulgare*, há outras subespécies das quais se encontra a variação de pequeno porte que habita regiões rochosas do litoral paraibano denominado de *Sargassum vulgare* var. *nanum*. De acordo com levantamento de dados realizados no Chemical Abstracts, Biological Abstracts, NAPRALERT (banco de dados

da Universidade de Illinois, Chicago, Natural), constatou-se que a espécie *Sargassum vulgare* var. *nanum* E. de Paula não apresenta trabalhos científicos publicados. No entanto, são descritos estudos de outras variedades dessa espécie onde já foram constatados a presença de alginatos (TORRES et al, 2007), esteroides (HALKET et al, 1976) e proteínas a base de arginina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, treonina e valina e traços de metionina (GUVEN et al, 1975).

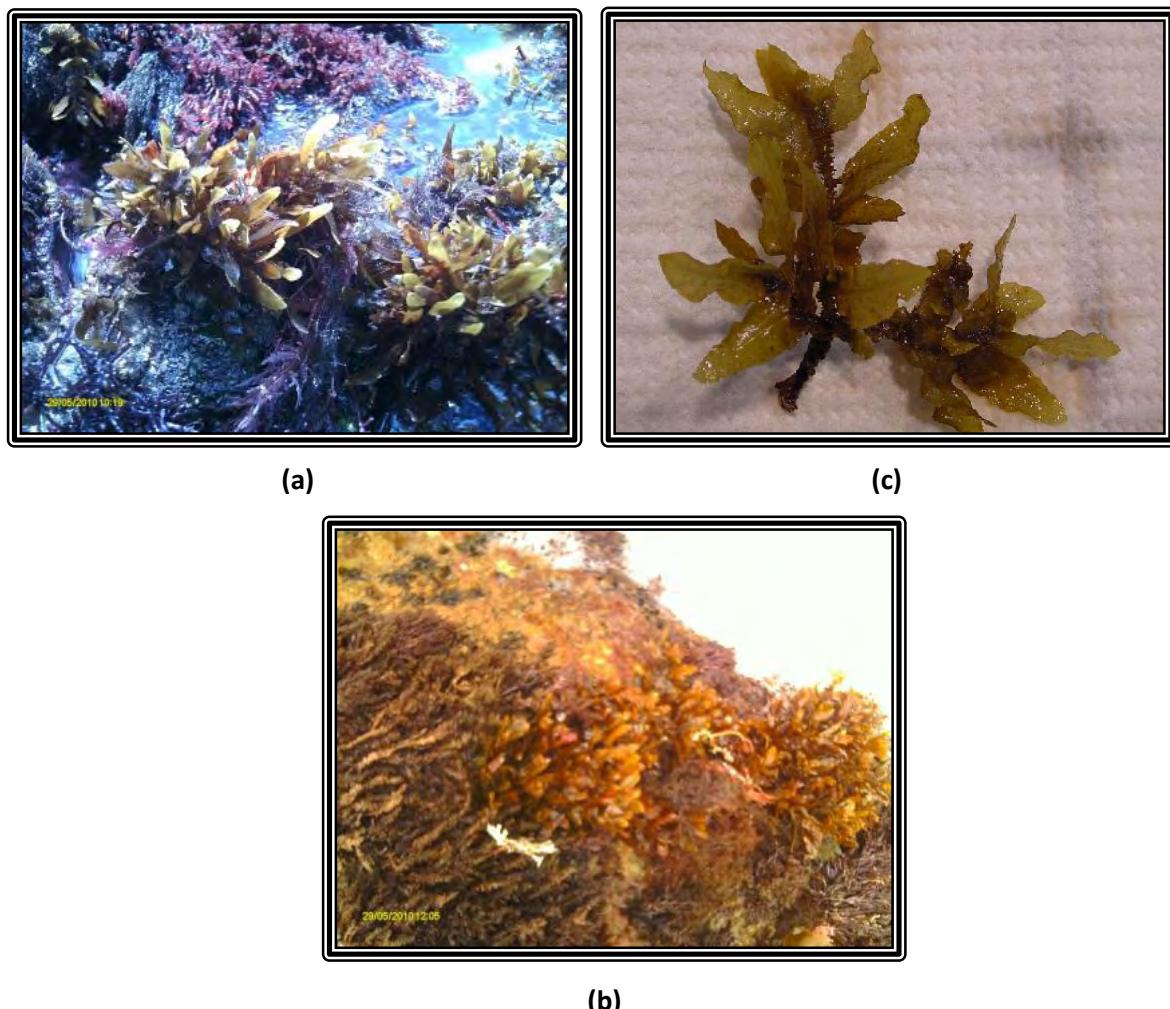


Figura 5. Imagens da alga *Sargassum vulgare* var. *nanum* E. de Paula na praia de coquerinho (Conde-PB) (a) e (b) em seu habitat rochoso antes da coleta e (c) após a coleta.

3.4 Considerações sobre a via do mevalonato

O mevalonato é um composto formado biossinteticamente da condensação de uma unidade da acetoacetil-CoA como uma molécula da acetil-CoA. A via do

mevalonato também conhecida pela via da HMG-CoA redutase está presente em seres eucarióticos (LEHNINGER; NELSON & COX, 2011). Nas plantas, essa via forma uma série de metabólitos secundários como terpenóides, uma família diversificada de produtos naturais derivados de unidades de C₅ isoprênicas (**Figura 7**) e de certa forma outros metabólitos como óleos voláteis terpênicos, saponinas e glicosídeos cardiotônicos (SIMÕES et al, 2010) assim como de cadeias laterais preniladas da clorofila e plastoquinonas (LANGE e CROTEAU, 1999).

Os terpenos são estruturas constituídos de múltiplos isopreno e estão classificados em hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀). O isopreno (**Figura 7**), por si só, tem sido caracterizado como um produto de decomposição de vários hidrocarbonetos cíclicos e já foi considerado como peça fundamental na construção destes compostos, também já chamados de isoprenóides. O isopreno é produzido naturalmente, mas não está envolvido na formação dos terpenos. As unidades bioquimicamente ativas foram identificadas como ésteres difosfatos (pirofosfatos): dimetilalil difosfato (DMAPP) e o isopentenil difosfato (IPP). Na via metabólica clássica, basicamente as unidades de isopreno se combinam em ligações cabeça-cauda como o geraniol (C₁₀), farnesol (C₁₅) e geranilgeraniol (C₂₀). No entanto, poucos terpenóides naturais são formados por essa combinação, como o esqualeno (C₃₀) e o fitoeno (C₄₀) os quais mesmo formados por várias unidades de isopreno, suas estruturas demonstram uma combinação cauda-cauda iniciada no centro da molécula. Outros terpenos possuem uma modificação por reações de ciclização, mas ainda podem ser reconhecido o arranjo de cabeça-cauda como por exemplo o mentol, bisaboleno e o taxidieno (DEWICK, 2009). Terpenos são os produtos vegetais mais numerosas e estruturalmente diverso na natureza (**Figura 6**) (ZWENGER & BASU, 2008).

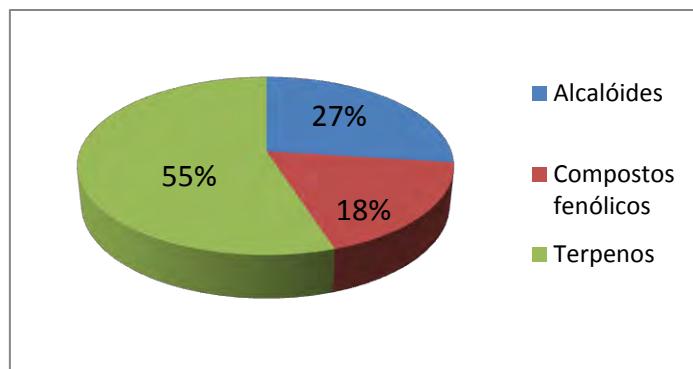


Figura 6. Representação gráfica dos maiores grupos de metabólitos secundários de acordo com Croteau et al. (2000).

Por outro lado, produtos naturais provenientes da via do acetato ou a do chiquimato podem adquirir em seu esqueleto uma porção terpênica, sejam eles alcalóides, produtos fenólicos e vitaminas. Particularmente, os meroterpenóides possuem um fragmento C₅, usualmente um substituinte dimetilalil (fragmento prenil) ligado a estrutura principal da molécula, como exemplo as furocumarinas (TRAVEN, 2004) carotenóides (CROMBIE & WHITING, 1998) e alcalóides de ergot (MUKHERJEE & MENGE, 2000). Meroterpenóides à base de quinona ou hidroquinona são encontrados em plantas, animais e microrganismos e abundantes em algas pardas (divisão Phaephyta) principalmente nos gêneros *Cystoseira* e *Sargassum* (JUNG et al, 2008) produzem uma grande quantidade de meroterpenóides em que existe uma cadeia poliprenil ligada a um núcleo de anel de quinona ou hidroquinona como a sargaquinona, ácido sargaquinônico e ácido sargahidroquinônico e, mais especificamente no gênero *Sargassum*, outros metabólitos como as plastoquinonas que adotam o mesmo esqueleto, mas com porção da cadeia terpênica modificada (REDDY et al, 2008).

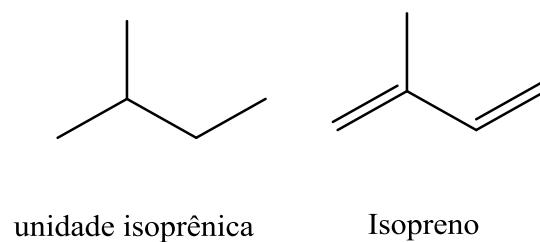


Figura 7. Diferenças estruturais entre a unidade isoprênica e o composto isopreno.

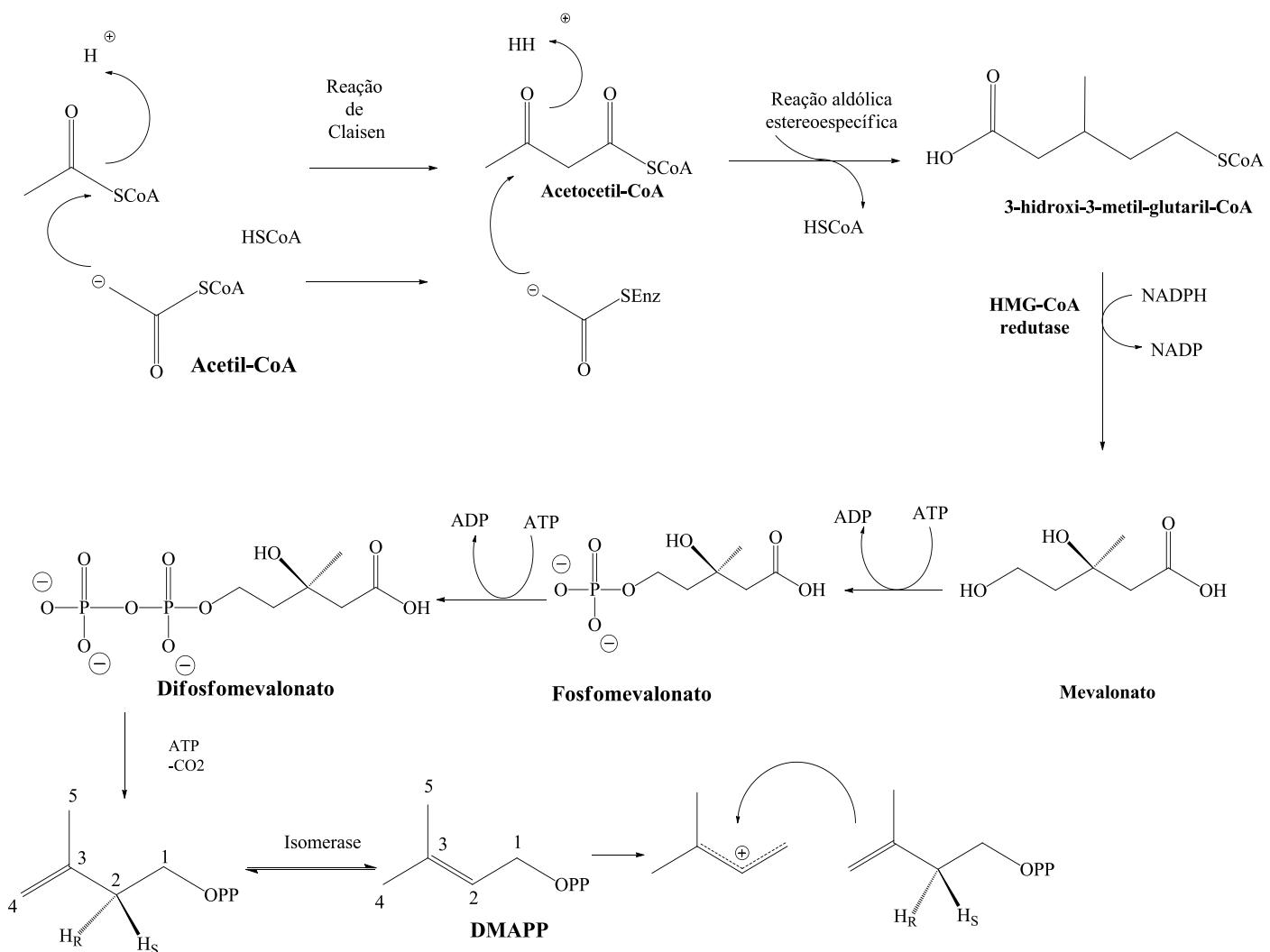


Figura 8. Biossíntese dos terpenos produzidas em seres unicelulares e pluricelulares. (ROHDICH et al, 2003 e SIMÕES, 2010)

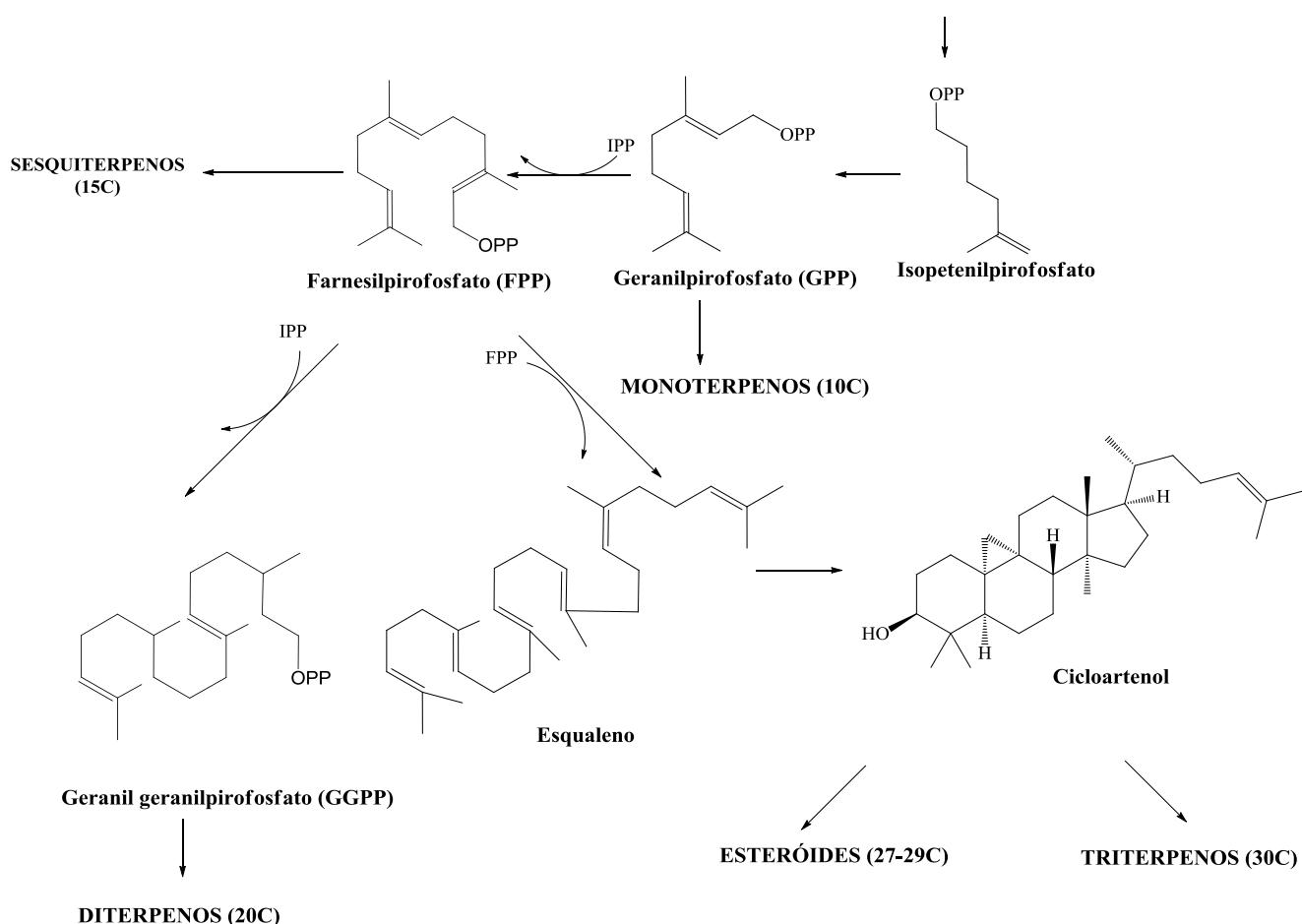


Figura 9. Biossíntese dos terpenos produzidas em seres uni e pluricelulares (continuação) (ROHDICH et al, 2003 e SIMÕES, 2010).

Os terpenos têm várias aplicações no cotidiano da sociedade desde tempos remotos. As indústrias farmacêuticas e alimentícias exploraram grande parte do potencial desses metabólitos principalmente como medicamentos e flavorizantes. Um dos terpenos mais disseminados pela humanidade é a borracha, sendo um politerpeno formado por subunidades de isopreno, que foi modificado para gerar maior qualidade pelo processo de adição de enxofre denominado de “vulcanização” por Charles Goodyear, o que gerou maior flexibilidade ao material. (ZWENGER & BASU, 2008 Apud STIEHLER e WAKELIN, 1947)

3.5. Considerações sobre esteroides

Esteroides são triterpenos modificados que apresentam em comum a estrutura química denominada ciclopentanoperidrofenantreno (**Figura 10**), um núcleo cíclico semelhante ao fenantreno (anéis A, B e C), ligado a um anel ciclopentano (D). Diferente do triterpenos, faltam três metilas nos carbonos C-14 e C-4, sendo o colesterol um modelo estrutural básico. A nomenclatura sistemática dos esteróides é baseada em uma série de esqueletos bases, incluindo estrano, androstano, pregnano, colano, colestano, ergostano, campestano, estigmastano e and poriferastano. A estereoquímica dos substituintes é representada por α (na face de baixo da molécula, quando é desenhado de acordo com convenções habituais) ou β (na face de cima) (DEWICK, 2009).

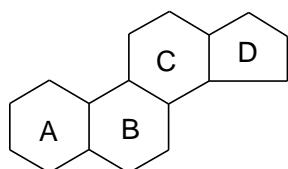


Figura 10. Ciclopentanoperidrofenantreno, núcleo básico de compostos esteroidais.

Todos os átomos de carbono do colesterol são derivados do acetato. O acetato é primeiramente convertido a unidades de isopreno, unidades C-5. As unidades de isopreno são condensadas para formar uma molécula linear, precursora do colesterol. O esqualeno, um hidrocarboneto poliisoprenóide é o intermediário linear na biossíntese do colesterol (VOET, 2006).

Os esteróides exercem uma função muito importante nos processos fisiológicos do organismo, na composição química de hormônios sexuais, adrenocorticóides (cortisona), glicosídeos cardiotônicos e os ácidos biliares uma vez que as células eucarióticas expressam muitas proteínas célula-específicas em resposta à presença de vários compostos esteroidais. Muitos desses hormônios possuem efeitos importantes no crescimento, etapas especiais como a gravidez e defesa e proteção do organismo (LEHNINGER; NELSON & COX, 2011)

3.6. Considerações sobre derivados da clorofila

As feofitinas, assim como outros derivados da clorofila, são encontradas em algas e em plantas terrestres (**Figura 11**). As clorofilas são sais complexos de magnésio coordenado com grupo porfirínico o qual está ligado através do grupo éster ao álcool fitílico. A clorofilase, uma enzima comumente encontrada no tecido da planta verde, pode hidrolisar o álcool, o grupo fitol das clorofilas, formando os clorofilídeos (Chlide). As clorofilas e os clorofilídeos, na presença de um ácido diluído, sofre facilmente a perda do magnésio, respectivamente, formando feofitinas e feoforbídeos. Willstatter e Stoll (1928) relatam que clorofilase também vai hidrolisar o álcool fitil das feofitinas, formando feoforbídeos. O fitol, cadeia lipofílico lateral das clorofilas e feofitinas, é uma forma reduzida do diterpeno geranilgeraniol (WHITE, JONES & GIBBS, 1963).

Há vários tipos de clorofilas que vão ser base estrutural das feofitinas. A clorofila a (Chl a) está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica. A Chl a é o pigmento utilizado para realizar o processo fotoquímico (o primeiro estágio da fotossíntese), enquanto que os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação. As outras clorofilas como Chl b está presente em vegetais superiores, algas verdes e algumas bactérias; Chl c, em feofitas e diatomáceas; e Chl d, em algas vermelhas (ZOU, & GAO, 2010).

Nota-se a mudança da Chl a e b para as respectivas feofitinas pela perda de cor durante o armazenamento sob congelamento. Este fenômeno, denominado de feofitinização, é atribuído ao desvanecimento da cor verde vívida da clorofila a uma marrom azeitona da feofitina causado pela substituição do magnésio do centro da molécula de clorofila pelo hidrogênio (HEATON, 1996). Durante o armazenamento sob congelamento, as baixas temperaturas aumentam a tendência de precipitação de proteínas dos alimentos por provocarem a diminuição do pH, ampliando as taxas de reações de catálises ácidas, como a feofitinização (MARTINS & SILVA, 2002).

Desta maneira, para se explicar a formação dos derivados da clorofila é necessário descrever a degradação da clorofila. Durante o período de senescência de uma alga ou de um vegetal, a Chl b se transforma em Chl a, o qual passa por vários processo de degradação até a formação do feoforbídeos de acordo com a **figura 11** (HÖRTENSTEINER, 2006).

Os relatos da literatura demonstram que uma dieta rica em derivados de clorofila previne contra mutagênese, teratogênese e carcinogênese (Chernomorsky, Segelman, & Poretz, 1999).

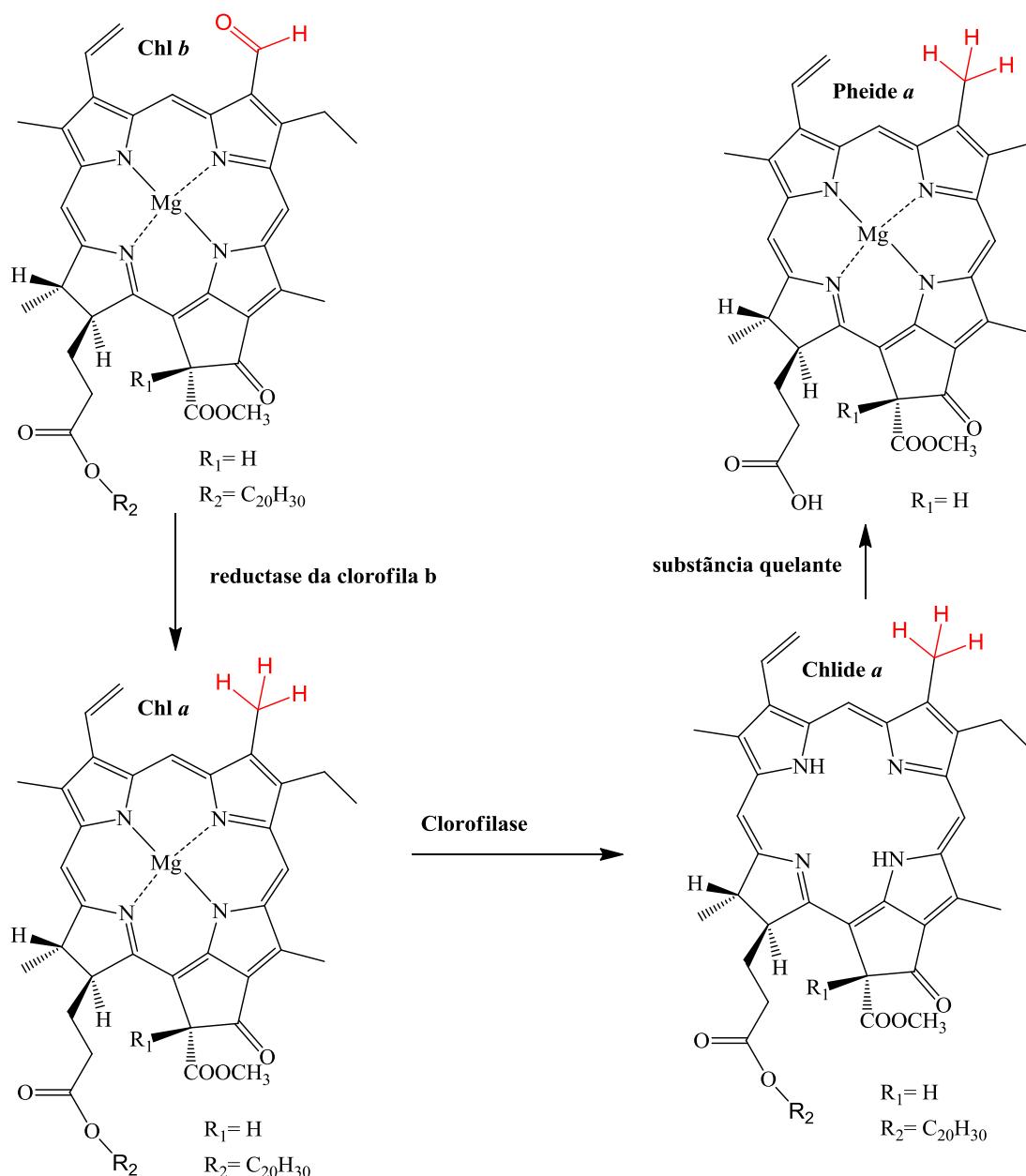


Figura 11. Degradção da clorofila e formação de derivados como o feoforbídeo.



OBJETIVOS

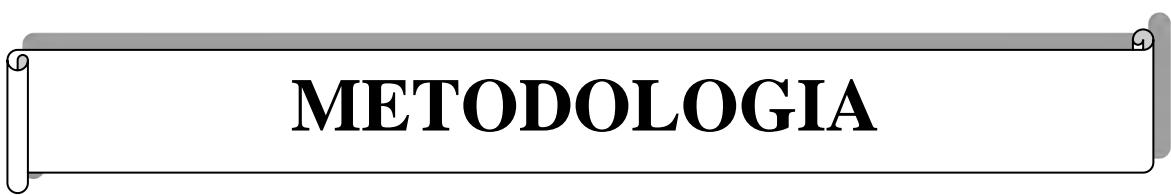
2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Contribuir com estudo quimiotaxonômico do gênero *Sargassum* com a investigação dos metabólitos secundários de *Sargassum vulgare* var. *nanum* E. de Paula

2.2 Objetivo específico

- Extrair os componentes da alga com solventes orgânicos como também separar, purificar e analisar os metabólitos secundários por técnicas cromatográficas de adsoção ou exclusão molecular.
- Identificar e/ou elucidar a estrutura dos constituintes químicos através de técnicas espectroscópicas como IR, UV, RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e espectrometria de massa, além de determinar características físico-químicas.
- Contribuir a investigação dos biometabólitos de *Sargassum vulgare* var. *nanum*.
- Propor método de melhor processamento do extrato e constituintes de algas.



METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1. Método de análise

4.1.1 Métodos cromatográficos

Para as cromatografias de adsorção em coluna (CC) utilizou-se sílica gel 60, ART 7734 da MERCK, de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm e Sephadex LH-20 da AMERSHAM BIOSCIENCES, tendo como suporte colunas de vidro cilíndricas cujas dimensões variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada. Para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se sílica gel 60 PF254, ART 7749 da MERCK. Como fase móvel foram utilizados os solventes hexano (Hex), clorofórmio (CHCl_3), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), isoladamente ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade.

A cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foi empregada para a análise das frações obtidas por CC. As revelações das substâncias nas CCDA foram executadas pela exposição das cromatoplacas à lâmpada de irradiação ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) por meio de aparelho MINERALIGHT, modelo UVGL-58, bem como pela impregnação das placas em cubas de vidro saturadas por vapores de iodo.

4.1.2. Ponto de fusão

O ponto de fusão (PF) de cada amostra foi determinado em placa de aquecimento de aparelho digital para ponto de fusão da marca Microquímica Equipamentos LTDA, modelo MQAPF - 302, com bloco de platina em microscópio óptico tipo “Kofler”, marca REICHERT, modelo R3279, com temperatura que varia de 0-350 °C.

4.1.3. Pureza da amostra

O grau de pureza das substâncias evidenciado por CCDA, foi determinado quando observada uma única mancha após revelação, em pelo menos três tipos de sistemas de eluições diferentes. Além disso, também foram considerados a determinação do ponto de fusão das substâncias (o critério de pureza adotado é que a diferença entre o PF final e o PF inicial não seja maior que 3 °C), bem como a análise dos dados espectrais.

4.2. Métodos espectroscópicos

4.2.1. Infravermelho

Os dados espectrais na região do infravermelho (IV) foram obtidos em aparelho de BOMEM FT-IR, série 100 MB do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/UFPB, utilizando de 1,00 a 3,00 mg de amostra em pastilhas de KBr, com freqüência medida em cm⁻¹.

4.2.2. Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H) e Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze (RMN de ¹³C), uni e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro VARIAN MERCURY, operando na freqüência do hidrogênio a 200 MHz e do carbono a 50 MHz, bem como em espectrômetro de marca BRUKER, operando na freqüência do hidrogênio a 500 MHz e do carbono a 125 MHz. As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se uma pequena quantidade em solvente deuterado (CDCl₃ e MeOD). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm), sendo referenciados para RMN de ¹H os picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas dos solventes: clorofórmio ($\delta_H = 7,24$ ppm) e metanol ($\delta_H = 3,3$ ppm). Para os espectros de RMN de ¹³C, estes mesmos parâmetros foram utilizados: clorofórmio ($\delta_c = 77,00$ ppm) e metanol ($\delta_c = 49,00$ ppm).

4.3. Estudo ficoquímico

4.3.1. Coleta e identificação da alga marinha e pré-tratamento do material

O material para o estudo foi coletado na praia de Coqueirinho, município do Conde, localizado no litoral sul do estado da Paraíba. Após a coleta do material, a alga foi lavada em água corrente para retirada de areia e epífitas. Uma amostra do material foi retirada para realizar a identificação da espécie pelo Professor George Emmanuel Cavalcanti de Miranda (DSE/UFPB). Após a análise, a espécie foi identificada como *Sargassum vulgare* var. *nanum* e uma exsicata foi depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (CCEN/UFPB), da Universidade Federal da Paraíba, sob código JPB 46346.

O material tratado com cerca de 10 kg foi acondicionado em sacos tipo zíper e resfriados a -10 °C foi liofilizado e posteriormente, pulverizado com auxilio de moinho mecânico tipo Harley.

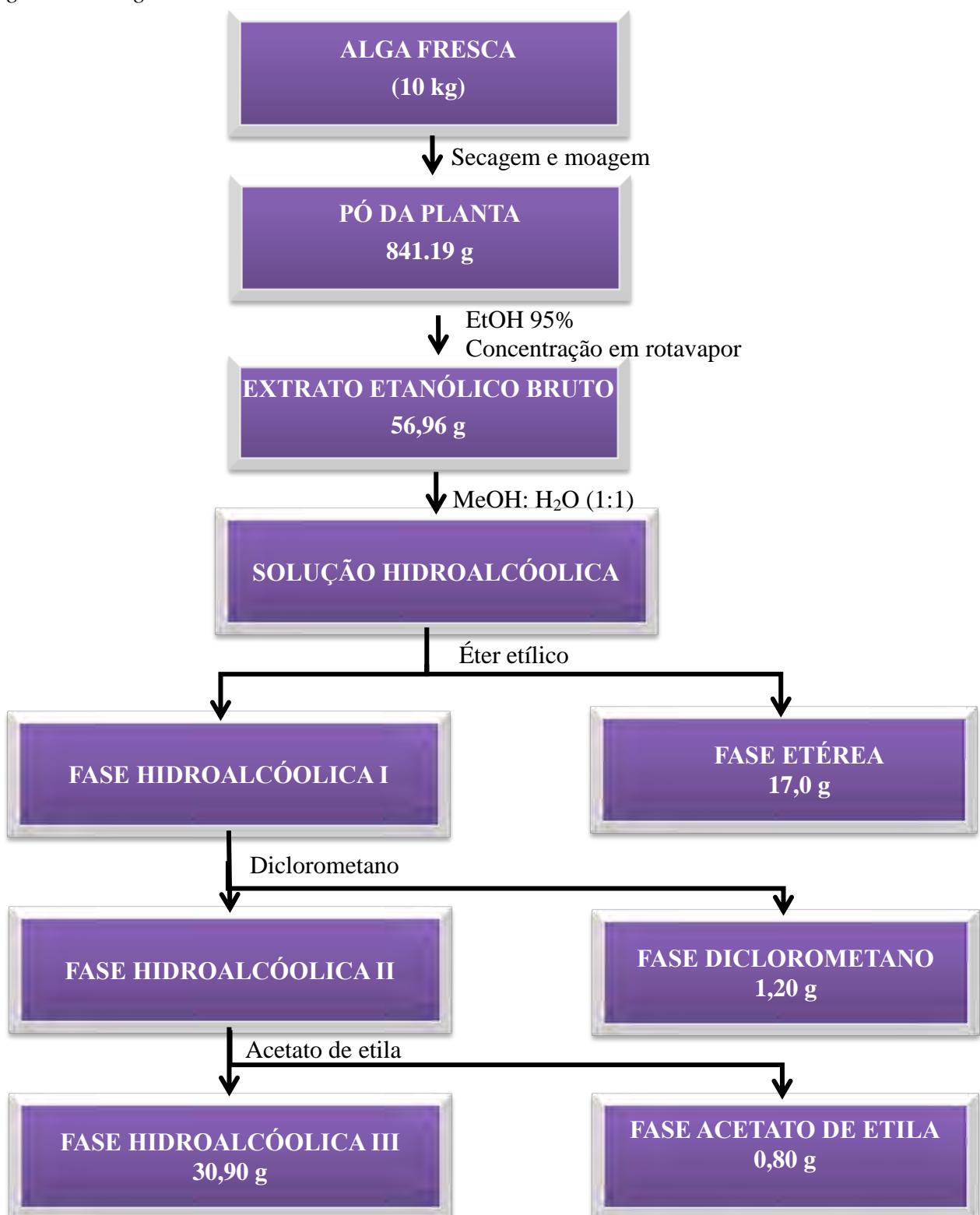
4.3.2. Obtenção do extrato etanólico bruto (E.E.B.) da alga marinha *Sargassum vulgare* var. *nanum*

O pó liofilizado de 841,19 g de *Sargassum vulgare* var. *nanum* foi submetido a uma processo de maceração exaustiva, utilizando em cada processo de extração 4 L de EtOH a 96 °G.L., retirando-se após um período de 72 horas. A solução extrativa foi filtrada e concentrada em rotavapor a uma temperatura menor do que 60 °C, sob pressão reduzida, rendendo 167 g do E.E.B. . Para retirada do sal segundo a metodologia de IWASHIMA et al, 2008, esse E.E.B. foi dissolvido em uma solução CH₂Cl₂:MeOH 3:1 e filtrado, rendendo 56,96 g do E.E.B. dessanilizado (34,0 % em relação ao E.E.B.).

4.3.3. Partição do extrato etanólico bruto

O E.E.B. concentrado foi solubilizado em uma solução MeOH:H₂O (1:1 v/v) com auxílio de um agitador mecânico e depois filtrado. A solução foi colocado em uma ampola de separação onde foi realizada a partição, utilizando como solventes: éter, diclorometano (CH₂Cl₂) e acetato de etila (AcOEt). As soluções fracionadas foram tratadas com Na₂SO₄ anidro, filtradas e concentradas em rotavapor sob pressão reduzida a 40 °C, e seus rendimentos foram de 17,0 g da fase etérea, 1,20 g da fase diclorometano e 0,80 g da fase AcOEt e 30,90 g da fase hidroalcoólica (**Esquema 1**, pág **48**).

Esquema 1. Obtenção e particionamento do extrato etanólico bruto de *Sargassum vulgare* var. *nanum*.

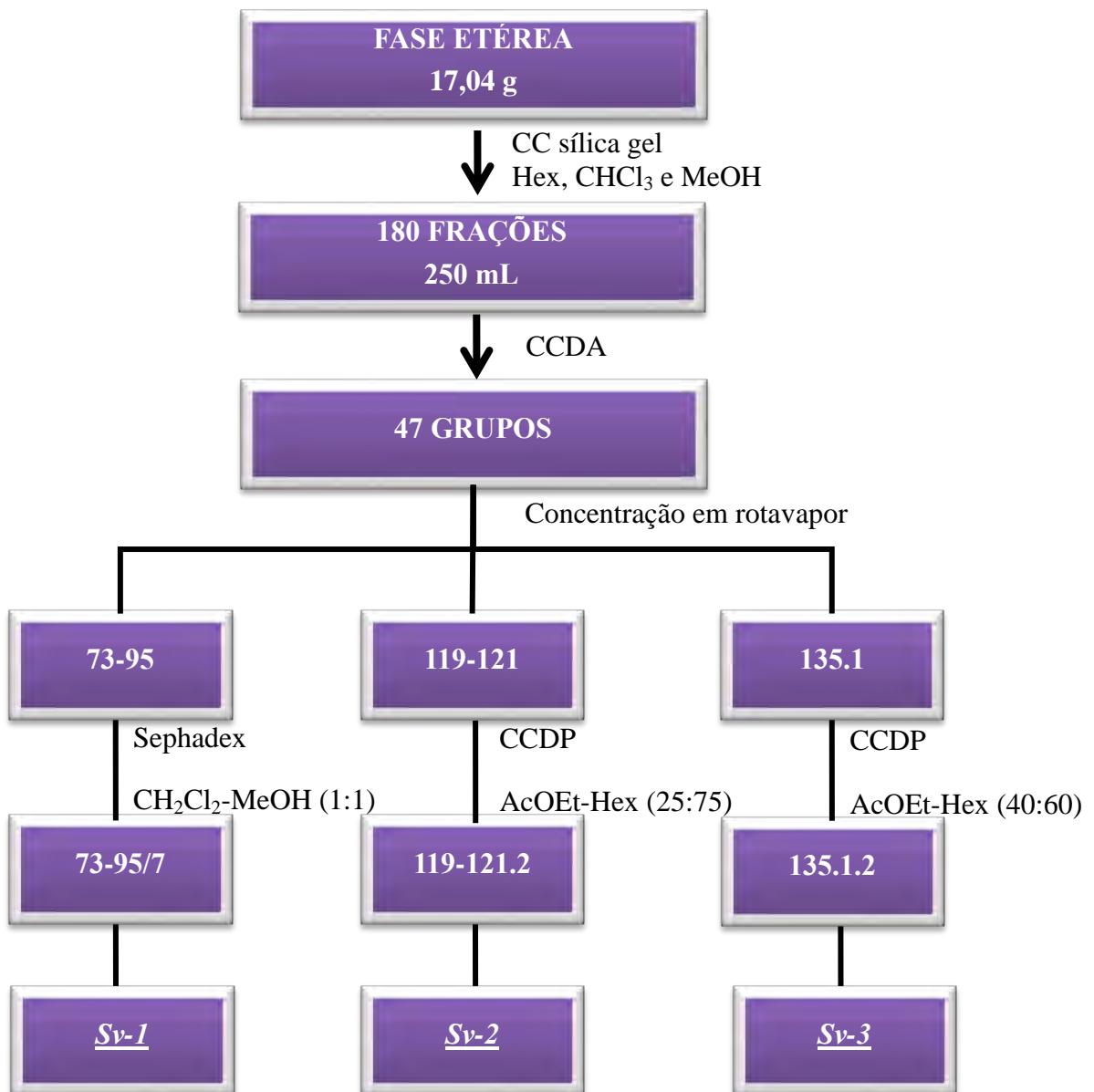


4.3.4. Fracionamento cromatográfico da fase etérea

A fase etérea da alga (17,04 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna (CC), utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (Art. 7734 MERCK) e os eluentes: hexano, diclorometano e metanol individualmente ou em sistemas binários com gradiente crescente de polaridade. No total, foram coletadas de 180 frações de 250 mL que foram concentradas em rotavapor.

Todas as frações foram submetidas a cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), sendo analisadas e reunidas as frações que possuíam Rf semelhantes (**Quadro 3**, pág 54). A fração reunida 73-95 foi submetida a uma cromatográfica em coluna em Sephadex LH-20, utilizando um sistema de MeOH:CH₂Cl₂ (1:1) que possibilitou purificar a fração 73-95/7. As frações 119-121.2 e 135.1 foram submetidas a uma CCDP, utilizando os sistemas AcOEt-Hex (25:75) e AcOEt-Hex (40:60), respectivamente, o que possibilitou purificar as frações 119-121.2 e 135.1.2, respectivamente. As frações 73-95/7 119-121.2 e 135.1.2 apresentavam-se puras nas placas e codificadas como *Sv-1*, *Sv-2* e *Sv-3*. Todas as frações purificadas foram enviadas para análise espectral.

Esquema 2. Fracionamento da fase etérea do extrato etanólico bruto de *Sargassum vulgare* var. *nanum*.



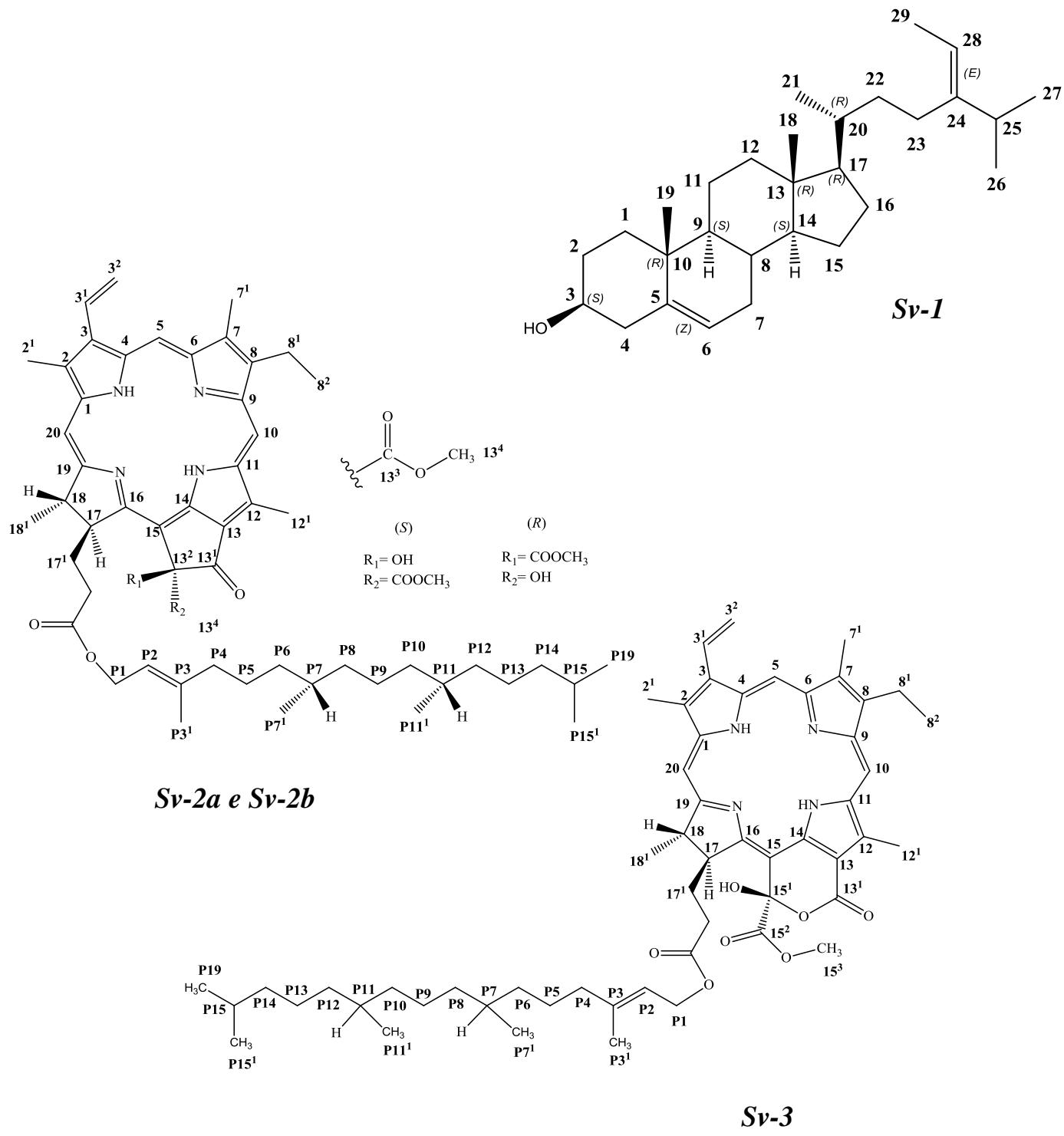
Quadro 3. Eluentes utilizadas e frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fase etérea do extrato bruto de *Sargassum vulgare* var. *nanum*.

Eluentes	Proporção	Frações eluídas	Frações reunidas
Hexano	100	1-5	2-3
			4-6
Diclorometano:Hexano	1:99 – 6:94	6-26	14-15
			16-19
			22-26
Diclorometano:Hexano	7:93 – 19:81	27-39	27-32
			33-39
Diclorometano:Hexano	20:80 – 44:56	40-68	41-58
			59-68
Diclorometano:Hexano	45:55 – 63:33	69-80	69-73
			75-93
			76-80
Diclorometano:Hexano	64:32 – 80:20	81-98	81-93
			94-95
			96-98
Diclorometano:Hexano	81:19 – 86:14	99-105	100-103
			104-105
Diclorometano:Hexano	87:13 – 100:0	106-118	106-112
			113-118
Metanol:Hexano	0.5:99.5 – 2:98	119-121	119-121
Metanol:Hexano	4:96 – 9.5:90.5	122-131.3	123-131.2
Metanol:Hexano	10:90 – 30:70	132-180	135.1
			135.3-136.1
			139-164

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo químico da alga *Sargassum vulgare* var. *nanum* levou a caracterização estrutural de quatro substâncias: o esteroide fucosterol (*Sv-1*) e a mistura dos isômeros *R* e *S* da 13²-hidroxi-feofitina-a (*Sv-2a* e *Sv-2b*) e da 15¹-hidroxi(15¹*S*) porfirinolactona a. Além do uso de técnicas espectroscópicas, as estruturas foram elucidadas baseadas na literatura.



5.1. Identificação estrutural de *Sv-1*

O composto codificado como *Sv-1* foi obtido na forma de pó branco amorfo com ponto de fusão igual a 98 °C e com rendimento de 10 mg, ou seja, 0,0012 % em relação ao peso da planta fresca.

O espectro de IV (**figura 12**, pág. 54) deste composto mostrou uma banda de absorção em 3446 cm⁻¹ típico de deformação axial de N-H ou O-H, sugerindo a presença de aminas e/ou hidroxilas. No entanto, a ausência de absorção em 1300 cm⁻¹ atribuído ao estiramento da ligação C-N impossibilitou sugerir a suspeita de aminas. Absorções em 1734 e 1097 cm⁻¹, referente a estiramento de C=O e C-O, respectivamente, sugerem a presença de carbonila de éster. Também foi observada uma banda de absorção em 2862 e 2954 cm⁻¹, característico de estiramento de CH₂ e CH₃, que foi indicativo da presença de cadeias alifáticas e bandas de estiramento =C-H acima de 3000 cm⁻¹ e de C=C em 1616 cm⁻¹ característicos de ligações olefínicas (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2007; PAVIA et al., 2001).

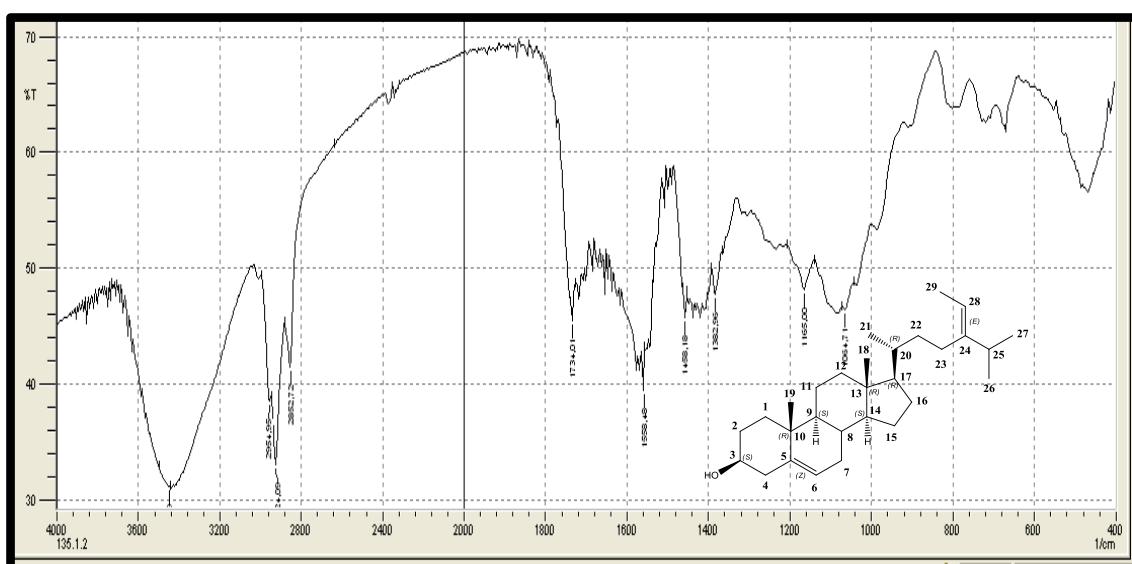


Figura 12. Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) de *Sv-1*.

O espectro de RMN de ¹³C-APT (150 MHz, CDCl₃) (**FIGURAS 13-15**, pág 55 e 56) revelou a presença de 29 sinais, dos quais quatro referentes a carbonos quaternários, nove carbonos metínicos, dez carbonos metilênicos e seis carbonos metílicos. Destes sinais, observou-se um sinal em δ_C 71.8, típico de carbono C-3 hidroxilado e um envelope de sinais na região de campo mais alto de RMN de ¹H característicos de esteroide (HAM et al., 2010).

Além disso, a presença de dois carbonos quaternários (δ_C 147.0 e δ_C 140.8) e os dois carbonos metínicos (δ_C 121.7 e δ_C 115.5) corroboraram com a hipótese de realmente tratar-se de um esteroide, pois normalmente esteroides do tipo estigmastano apresentam duas insaturações no seu esqueleto com deslocamentos químicos similares.

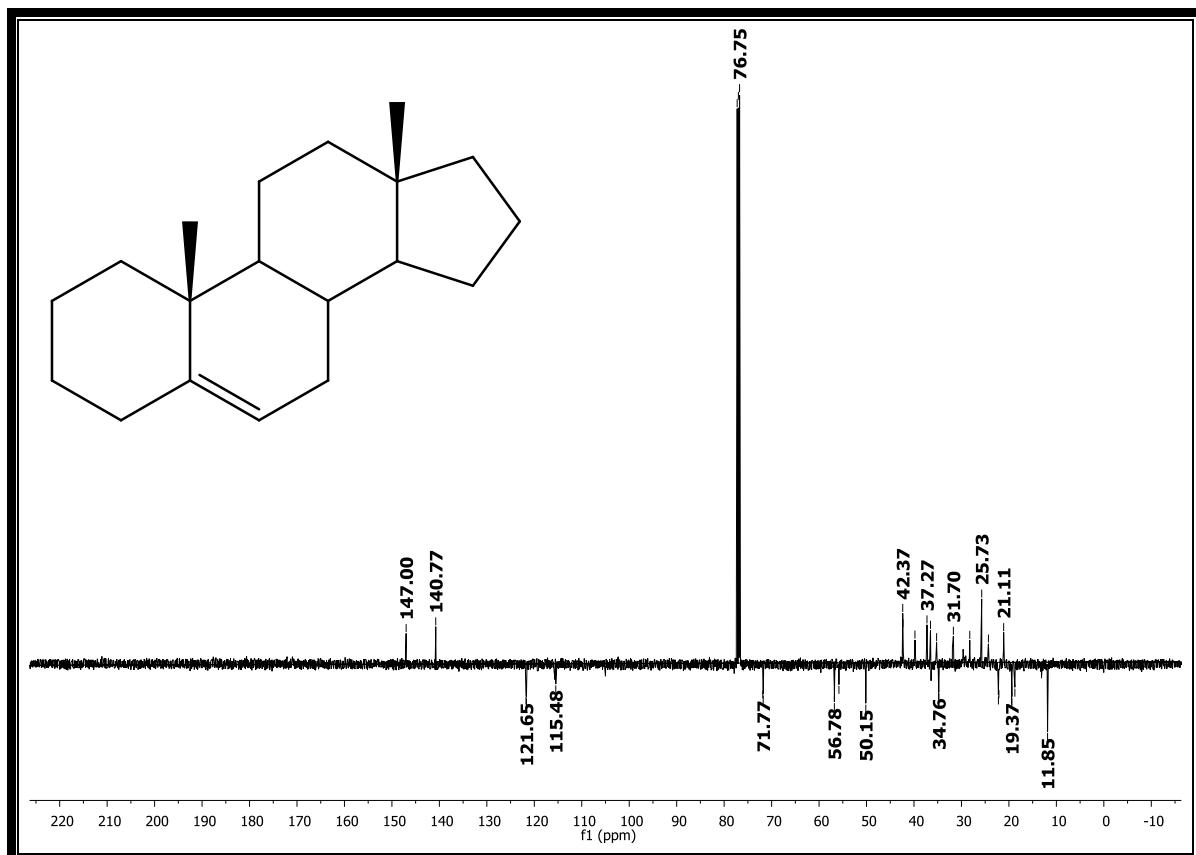


Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C -APT de *Sv-I*.

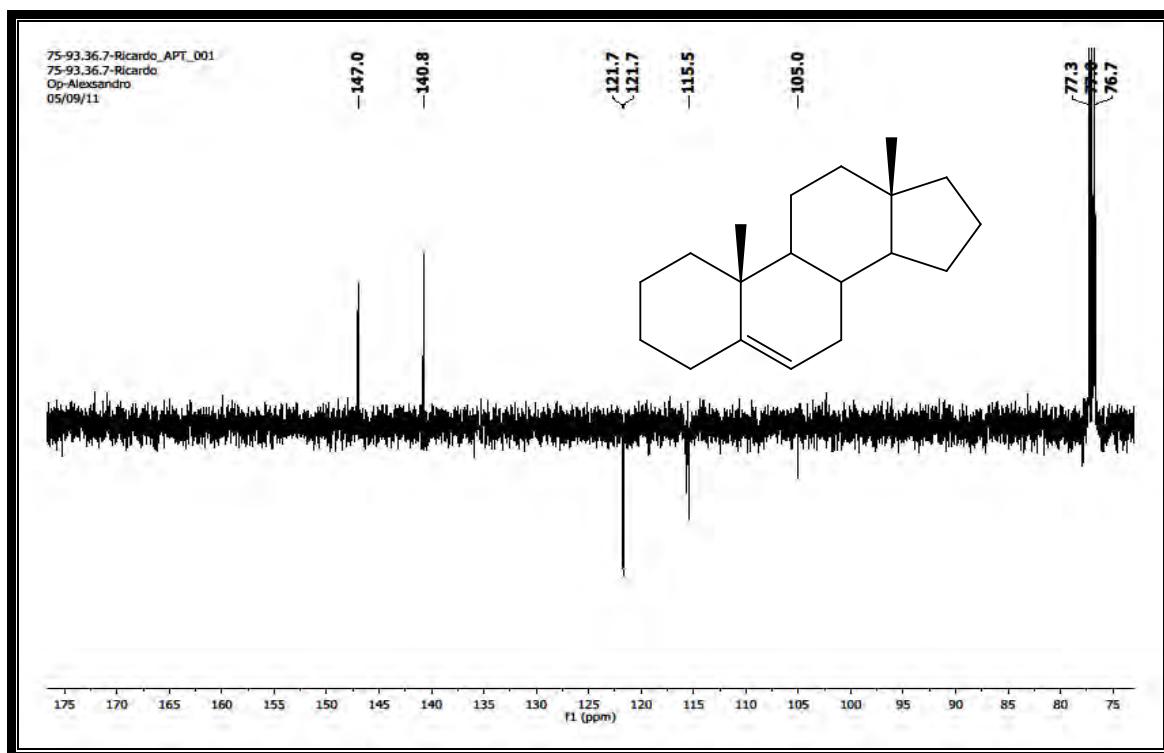


Figura 14. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *Sv-1* na região de 75,0 – 175,0 ppm.

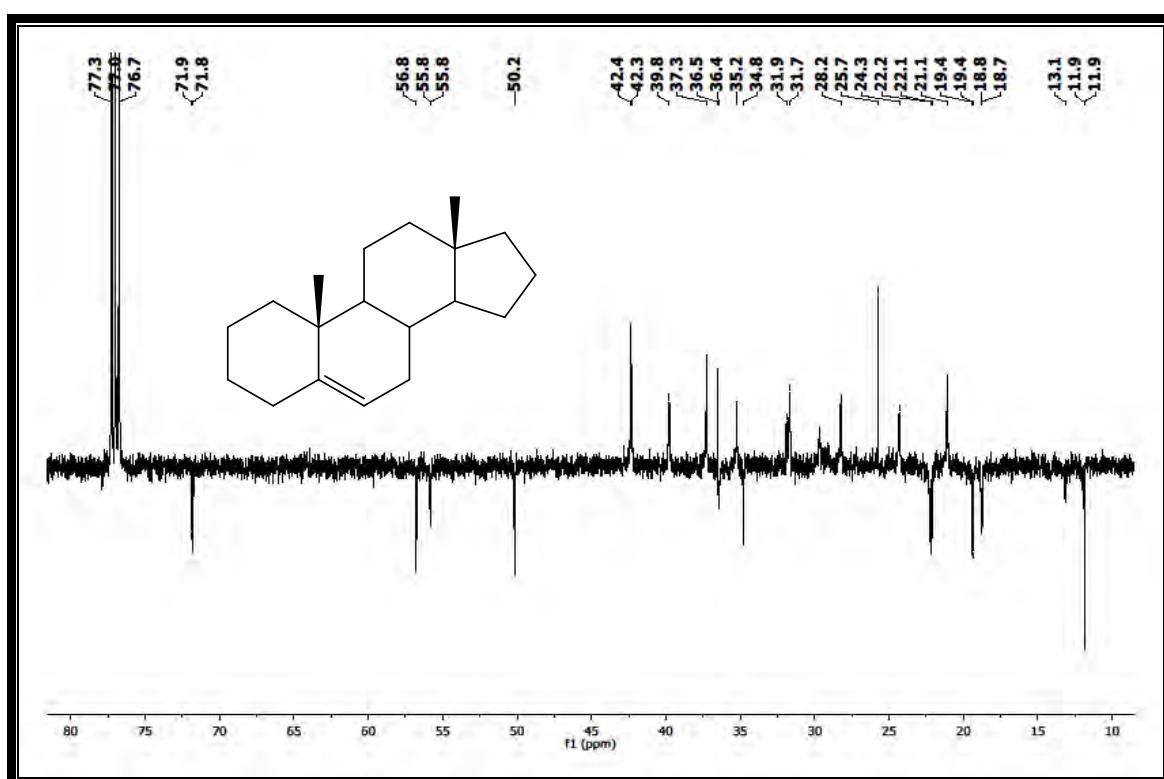


Figura 15. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *Sv-1* na região de 10,0 – 80,0 ppm.

No espectro de RMN ^1H , alguns sinais permitiram reforçar a hipótese sobre o esqueleto esteroide. Observou-se um duploto em δ_{H} 5,33 atribuído ao hidrogênio metínico H-6 desblindado devido a ligação olefínica, que pode ser confirmado pela correlação direta com sinal de C-6 (δ_{C} 121,7) no espectro de HMQC (Figura 19); um multiplet em δ_{H} 3,50 típico do hidrogênio metínico H-3 devido a desblindagem da hidroxila é caracterizado pelo respectivo carbono em δ_{C} 71,8 observado pela correlação HMQC. De acordo com o espectro de RMN ^1H e os dados do trabalho de HAM et al, 2010 e LEE et al, 2011, o composto *Sv-1* isolado de *Sargassum vulgare* var. *nanum* apresenta estrutura similar ao beta-sitosterol, porém o quarteto em δ_{H} 5,16 (1H, $J= 6.7$ Hz) se deve a uma ligação insaturada atribuída hidrogênio metínico H-28. Essa desblindagem é causada pelo efeito anisotrópico (PAVIA et al, 2010).

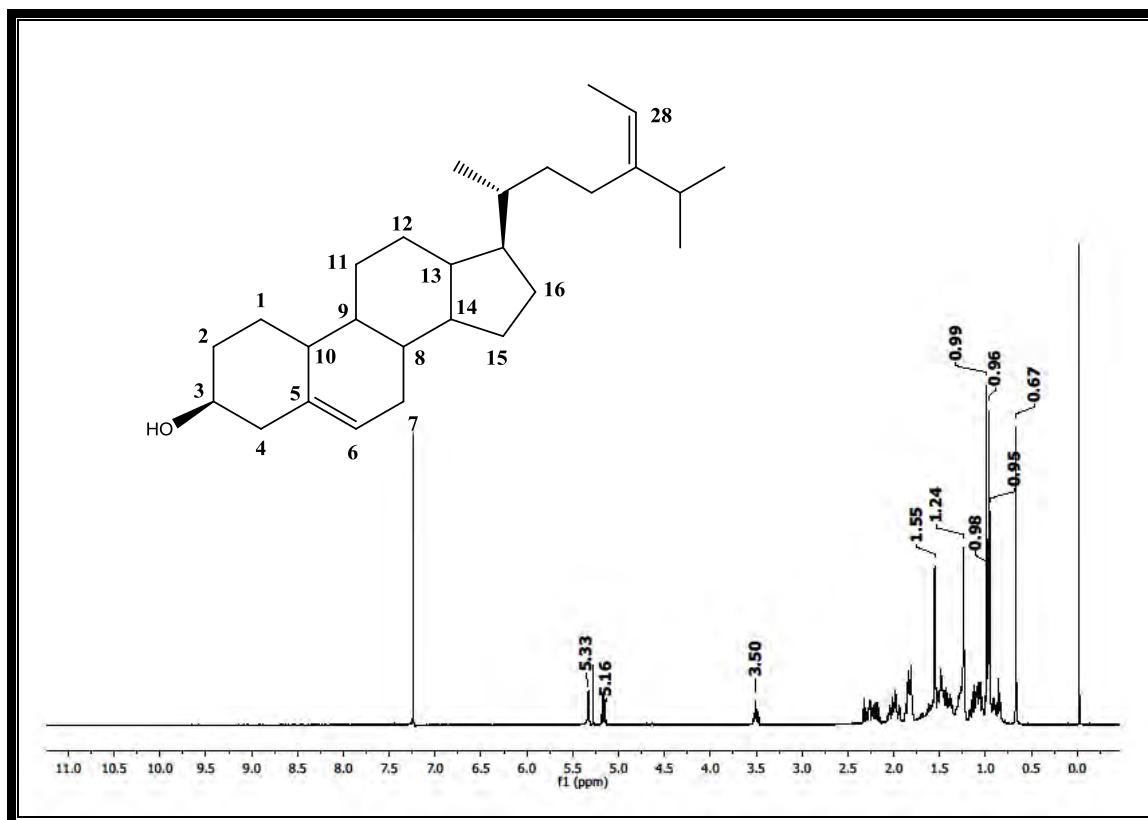


Figura 16. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *Sv-1*.

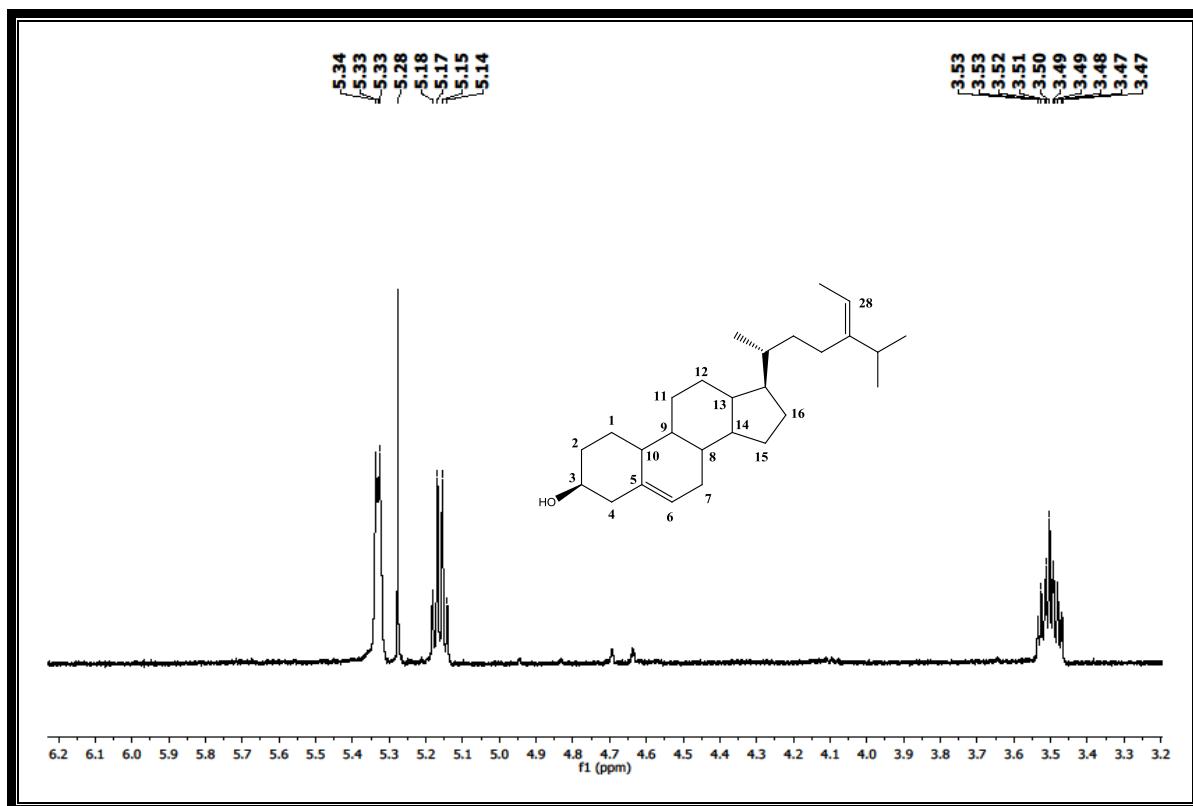


Figura 17. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *Sv-1* na região de 3,2 – 6,2 ppm.

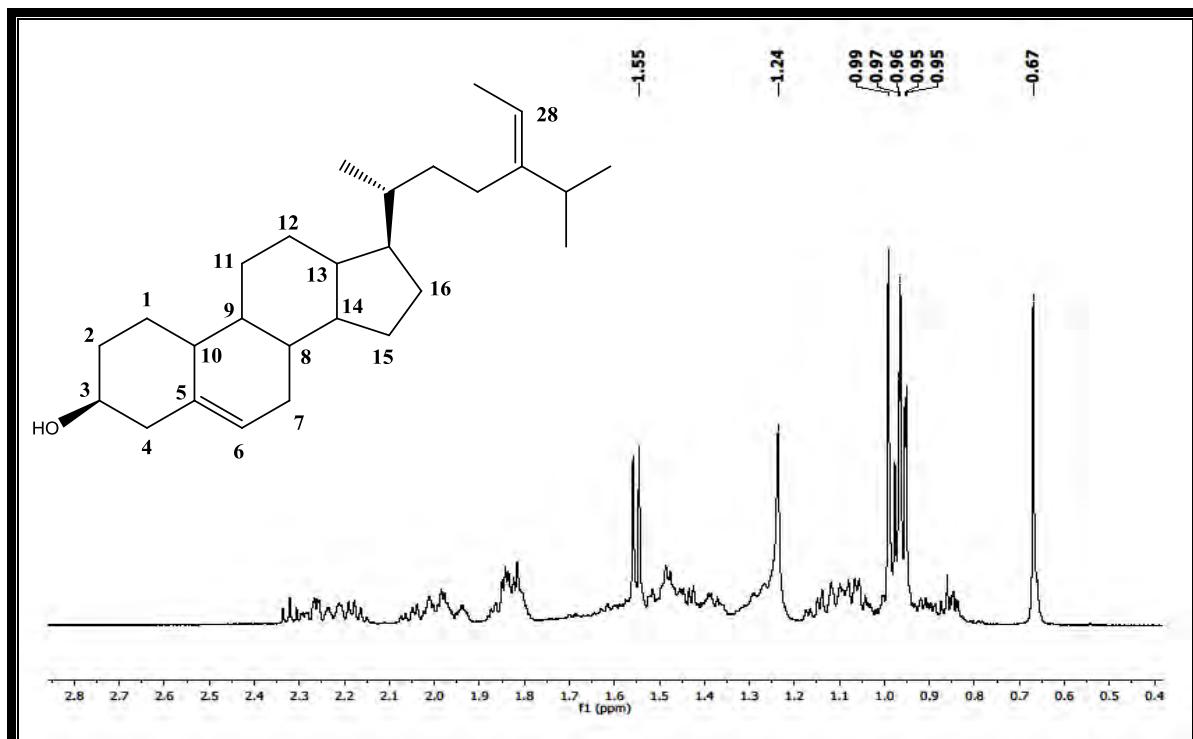


Figura 18. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *Sv-1* na região de 0,4 – 2,8 ppm.

No espectro bidimensional de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC, além das correlações anteriormente observadas, outras correlações foram importantes para determinação da estrutura. Dentre elas, têm-se correlações dos hidrogênios δ_{H} 5,16 (H-28), δ_{H} 1,55 (H-29), δ_{H} 0,96 (H-27), δ_{H} 0,95 (H-26), δ_{H} 0,66 (H-18), δ_{H} 0,97 (H-21), δ_{H} 0,99 (H-19) respectivamente com seus carbonos δ_{C} 115,5 (C-28), δ_{C} 13,1 (C-29), δ_{C} 22,1 (C-27), δ_{C} 22,2 (C-26), δ_{C} 11,8 (C-18), δ_{C} 18,8 (C-21), δ_{C} 19,4 (C-19). Essas correlações permitiram evidenciar a presença de um hidrogênio olefínico H-28 e de seis metilas do esteroide.

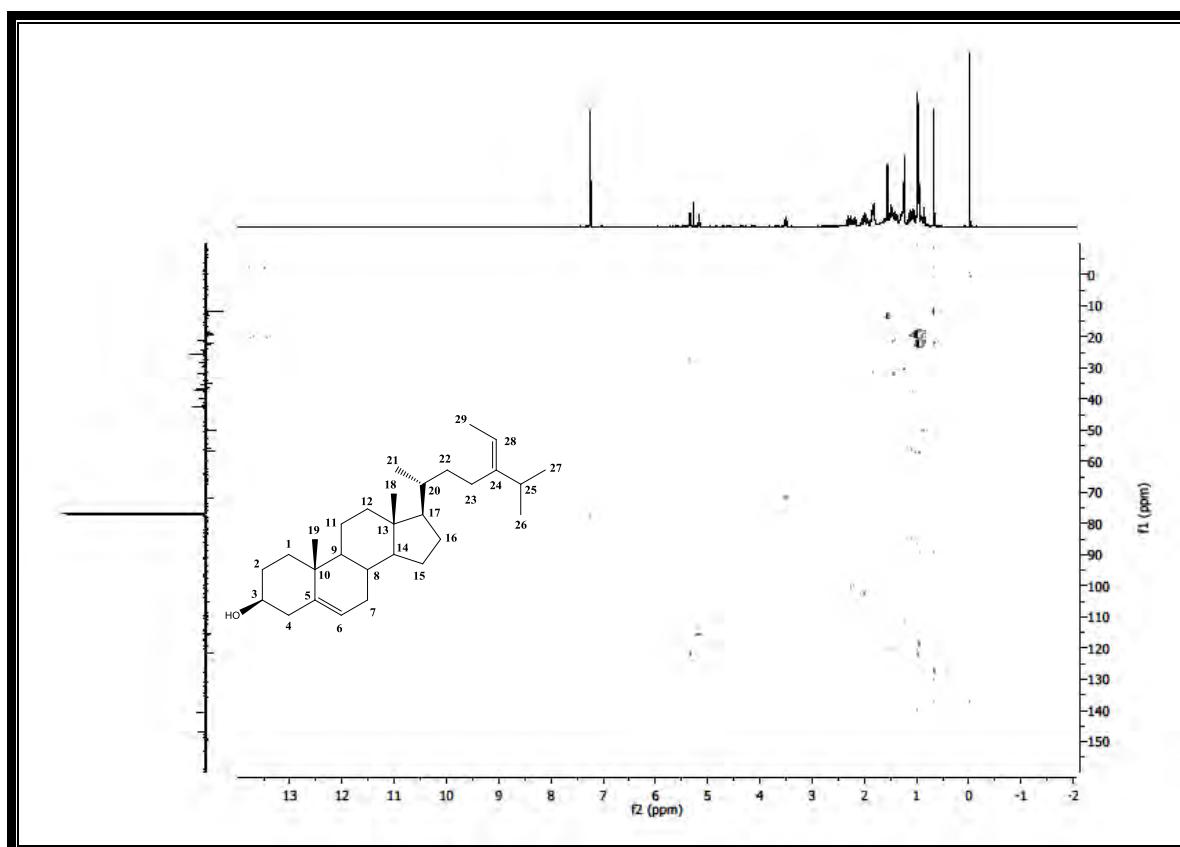


Figura 19. Espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de *Sv-1*.

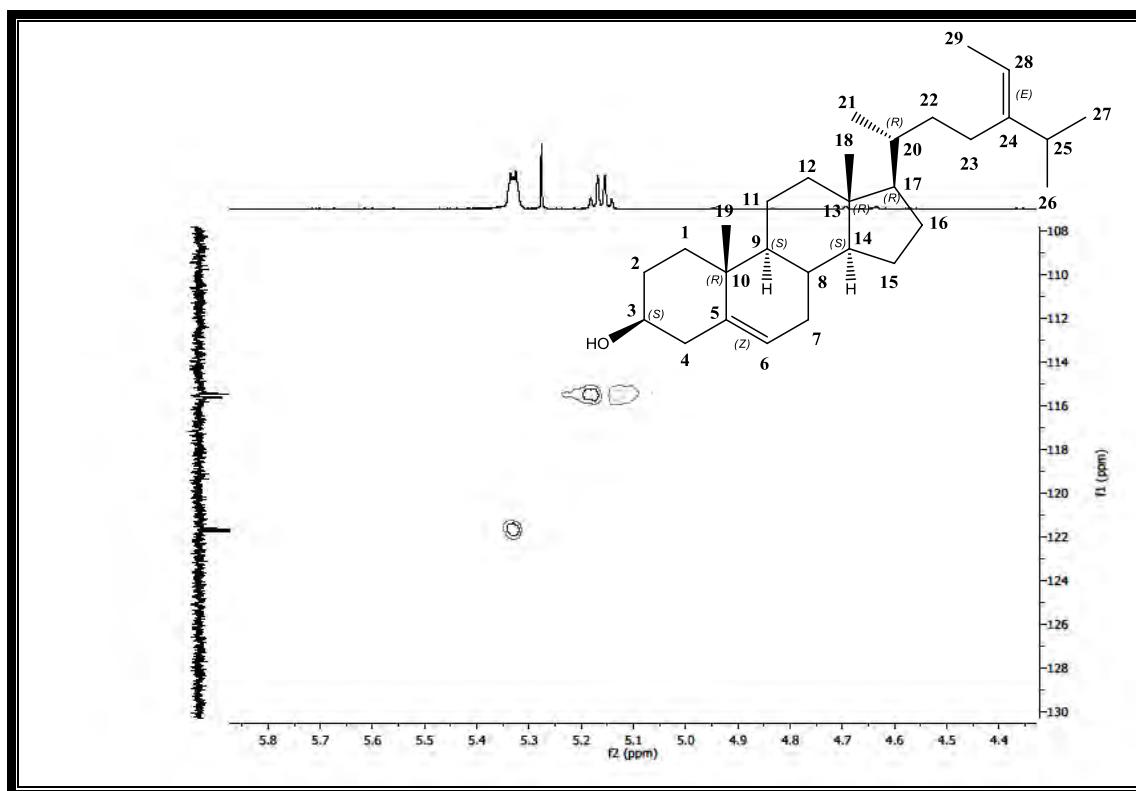


Figura 20. Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de *Sv-1* na região de (4,4 – 5,8 ppm) x (108,0 – 130,0 ppm).

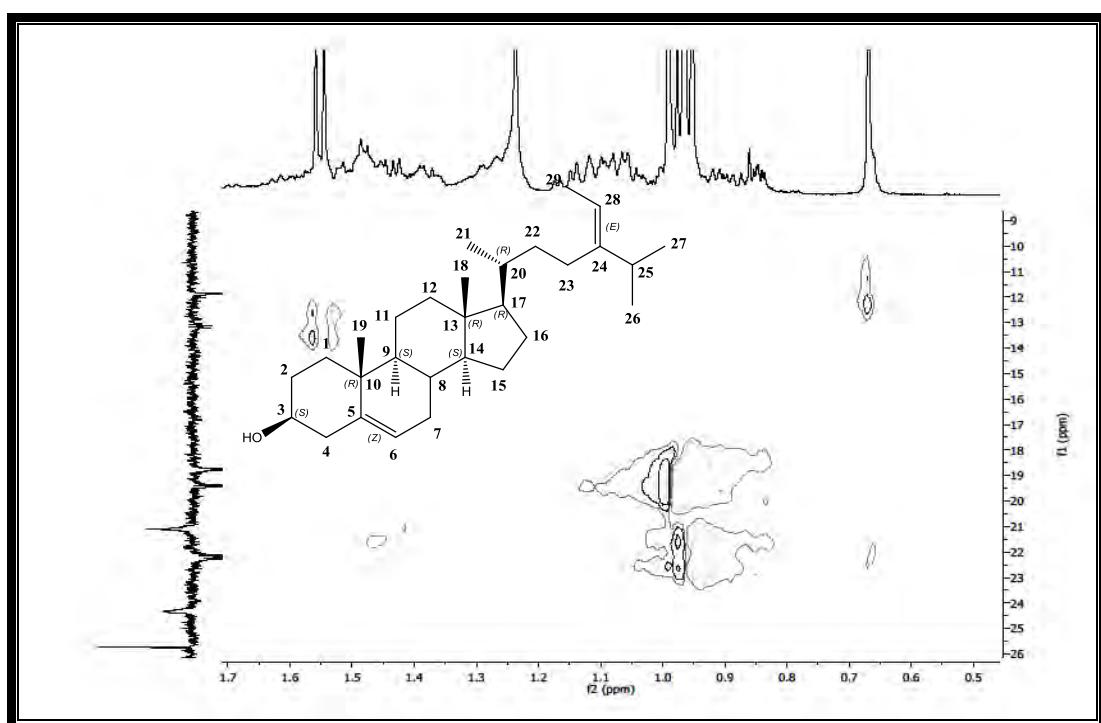


Figura 21. Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de *Sv-1* na região de (0,5 – 1,7 ppm) x (9,0 – 26,0 ppm).

A análise do espectro bidimensional homonuclear H^1xH^1 COSY (figura 22 e 23, pág 61 e 62), observou a correlação entre o doubleto em δ_{H} 5,16 (H-28) e o quarteto em 1,55 (H-29), indicando que o carbono oléfínico C-28 encontra-se vizinho a metila do C-29. Outra correlação entre os hidrogênios em δ_{H} 2,29 (H-4) e o multiplet em 3,50 (H-3) evidencia a hidroxila no anel A.

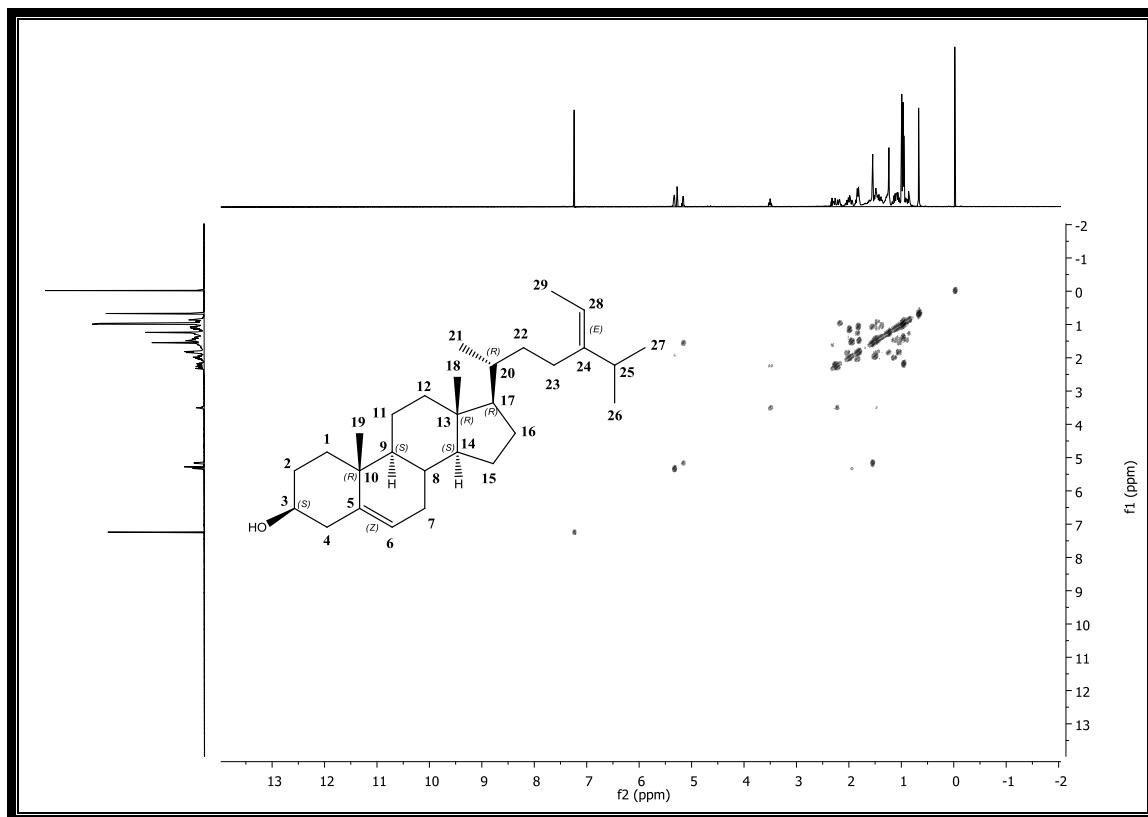


Figura 22. Espectro bidimensional de ${}^1\text{HX}^1\text{H}$ COSY de *Sv-1*.

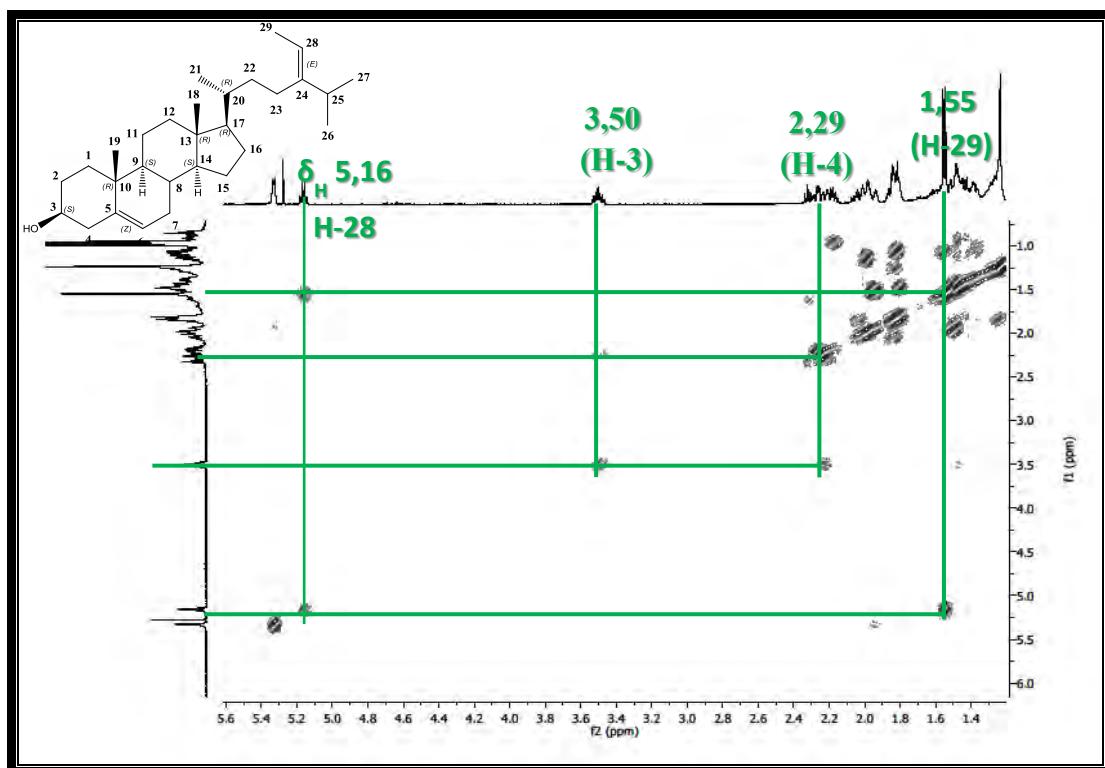


Figura 23. Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de *Sv-1* na região de (1,0 – 6,0 ppm) x (1,4 – 5,6 ppm).

No espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMBC (FIGURA 22), observou-se a correlação a 2J e 3J que contribuíram para elucidação da estrutura esterooidal. Assim puderam ser observadas as correlações entre o H-29 (δ_{H} 1,55) a 2J com os carbonos C-28 (115,5) e 3J com C-24 (δ_{C} 147,0), o que permite sugerir que uma insaturação esteja entre os carbonos C-24 e C-28.

Outras correlações no espectro bidimensional de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC como de H-27 (δ_{H} 0,96) com C-25 (δ_{C} 34,8) a 2J e com C-26 (δ_{C} 22,1), C-28 (δ_{C} 146,9) a 3J , os quais permitiram estabelecer o modelo estrutural das posições 24, 25, 26, 27 e 28 dos carbonos da cadeia lateral do esteroide. As correlações de H-19 (δ_{H} 0,99) com C-9 (δ_{C} 50,2) a 2J e com C-5 (δ_{C} 140,8) a 3J , de H-21 (δ_{H} 0,97) com C-17 (δ_{C} 55,81) a 3J e de H-18 (δ_{H} 0,66) com C-12 (δ_{C} 39,8) permitiram determinar as posições das metilas 18, 19 e 21 dentro do núcleo esterooidal. Todos os dados descritos podem ser observados na figura dos espectros e suas expansões de *Sv-1* (pág 63 e 64), bem como todos os dados compilados na **tabela 1** para *Sv-1* (pág 67) e a comparação com dados da literatura tabela 2, pág 68.

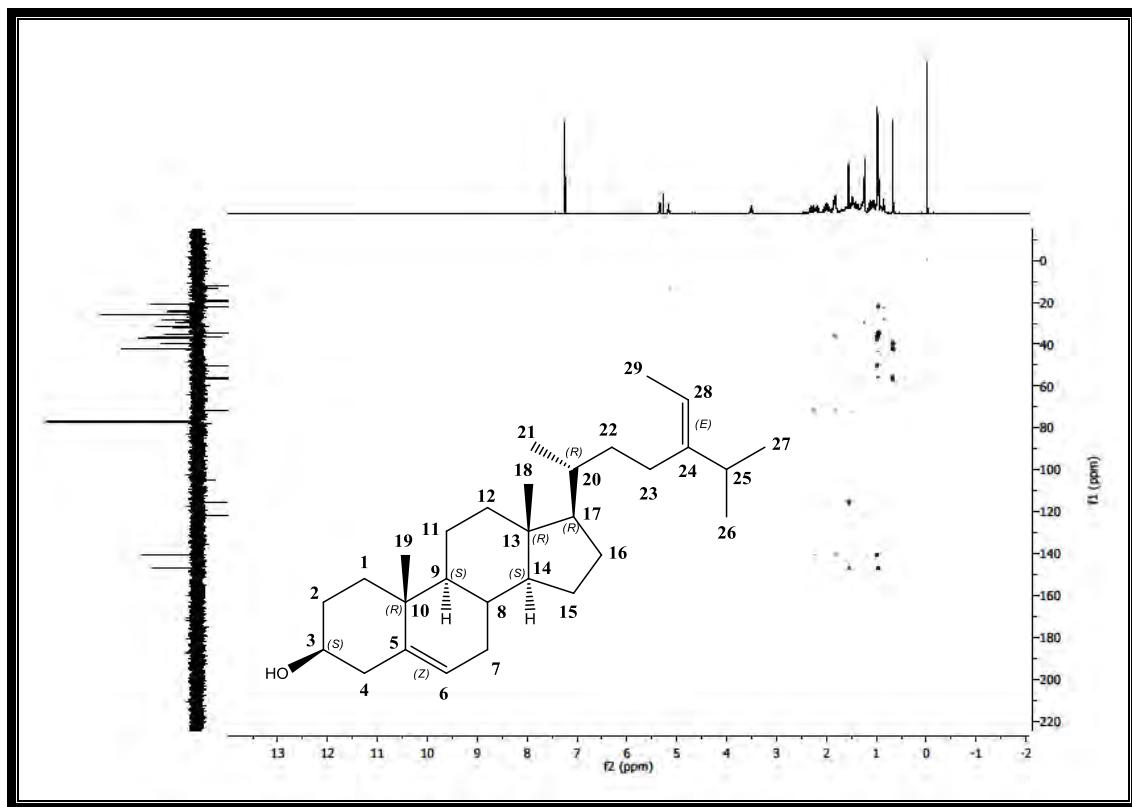


Figura 24. Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Sv-1*.

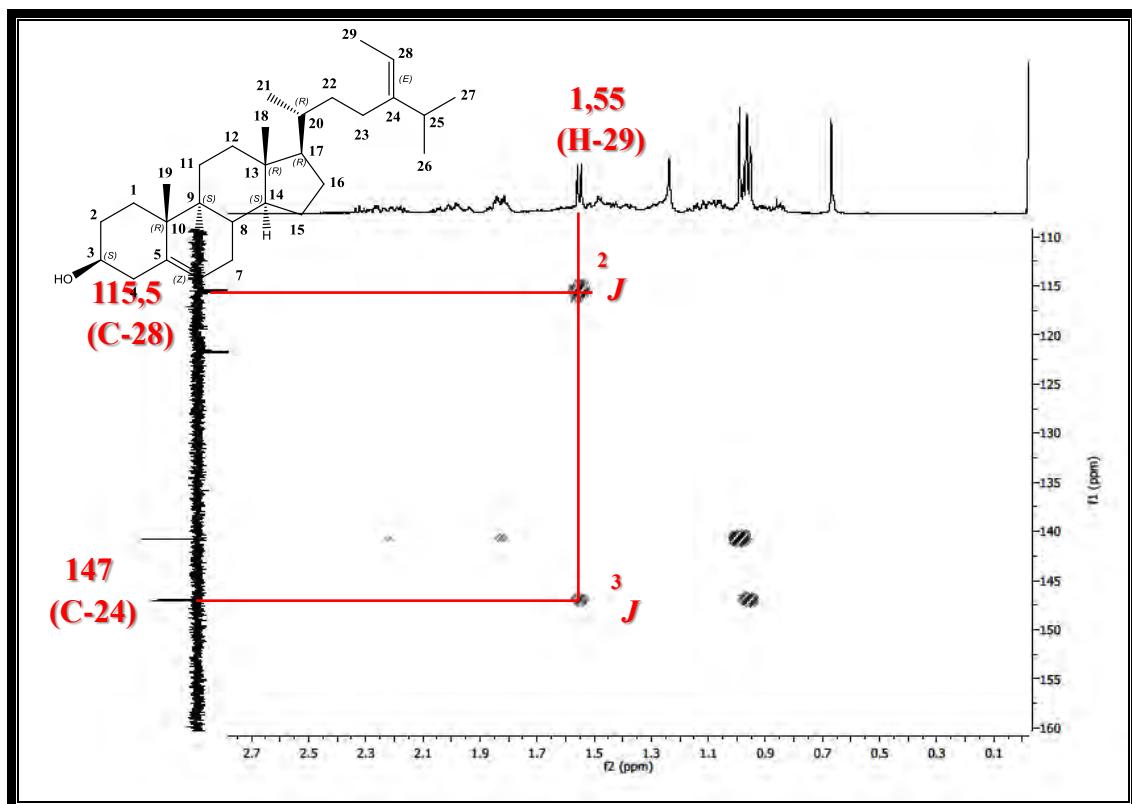


Figura 25. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Sv-1* na região de (0,1 – 2,7 ppm) x (110,0 – 160,0 ppm).

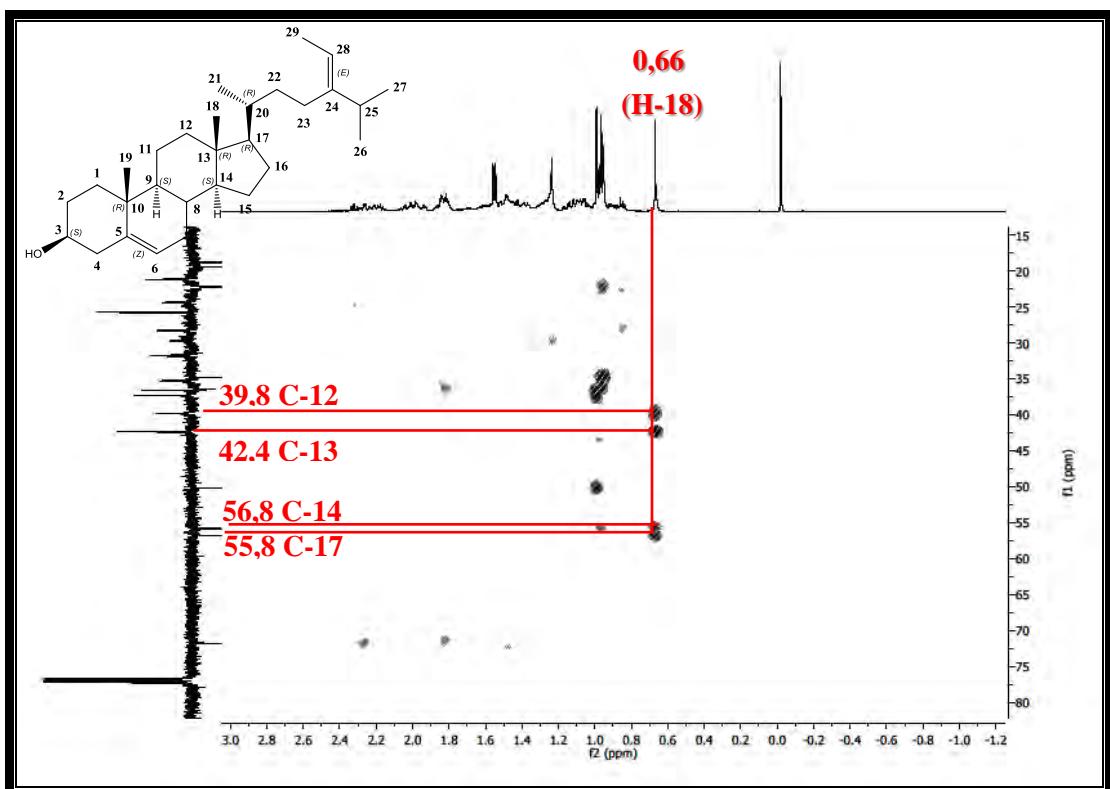


Figura 26. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Sv-1* na região de (-1,2 – 3,0 ppm) x (15,0 – 80,0 ppm).

No espectro de correlação homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (figura 27, pág 65), foi observado correlação entre os hidrogênios em 2,29 (H-4) e 5,33 (H-6), o que reforça a sugestão de que *Sv-1* trata-se de um esteroide com uma instauração em C-6.

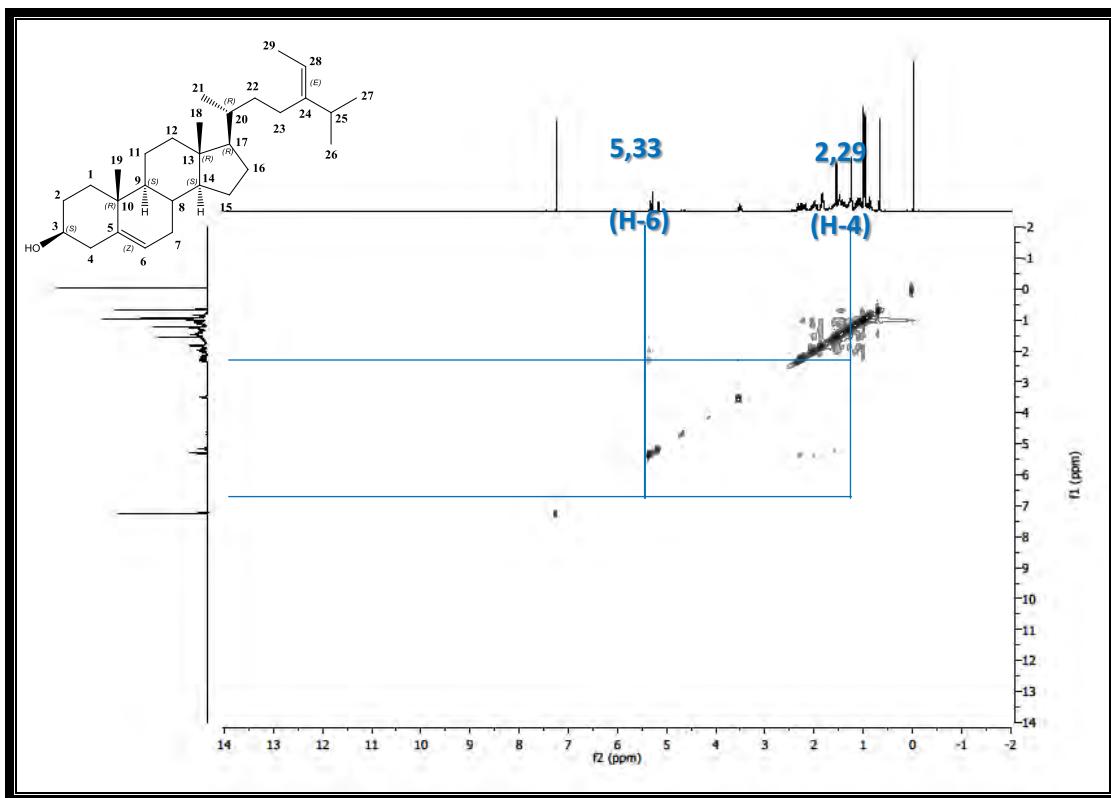


Figura 27. Espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) de *Sv-1*.

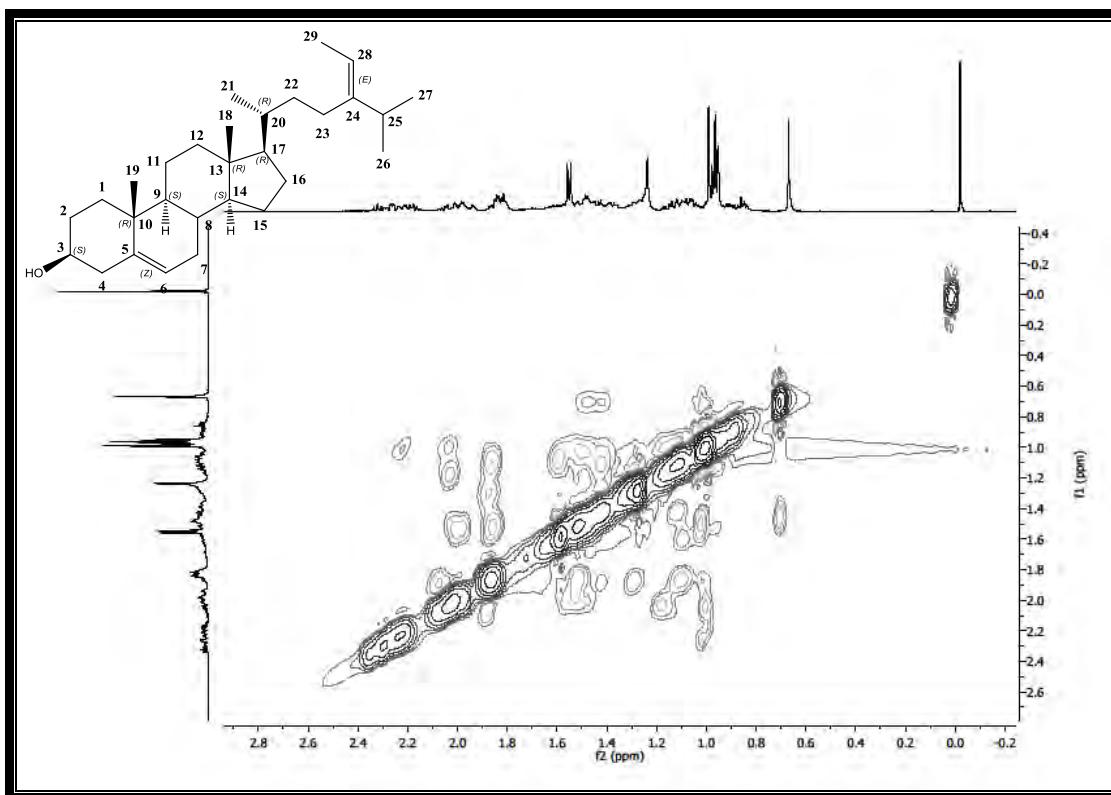


Figura 28. Expansão do espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) de *Sv-1* na região de (0,4 – 2,6 ppm) x (-2,0 – 2,8 ppm).

Essas informações sobre a presença de cada grupo de carbonos na molécula levam a hipótese de que o composto *Sv-1* trata-se de um esteroide do tipo estigmastano com duas duplas ligações Sp²: uma entre os carbonos C-5 e C-6, típica do núcleo esteroidal e outra entre os carbonos C-24 e C-28, sugerindo que o composto *Sv-1* trate-se do fucosterol, um esteroide marcador químico encontrada em várias algas marinhas a exemplo da *Pelvetia siliquosa* (LEE et al, 2003) e algumas plantas terrestres como *Osmanthus fragrans* var. *aurantiacus* (LEE et al, 2011). A literatura relata que o fucosterol possui atividade antioxidante, antidiabética, citotóxica a células cancerígenas comprovada em ratos (LEE et al., 2003; LEE et al., 2004; LEE, 2011).

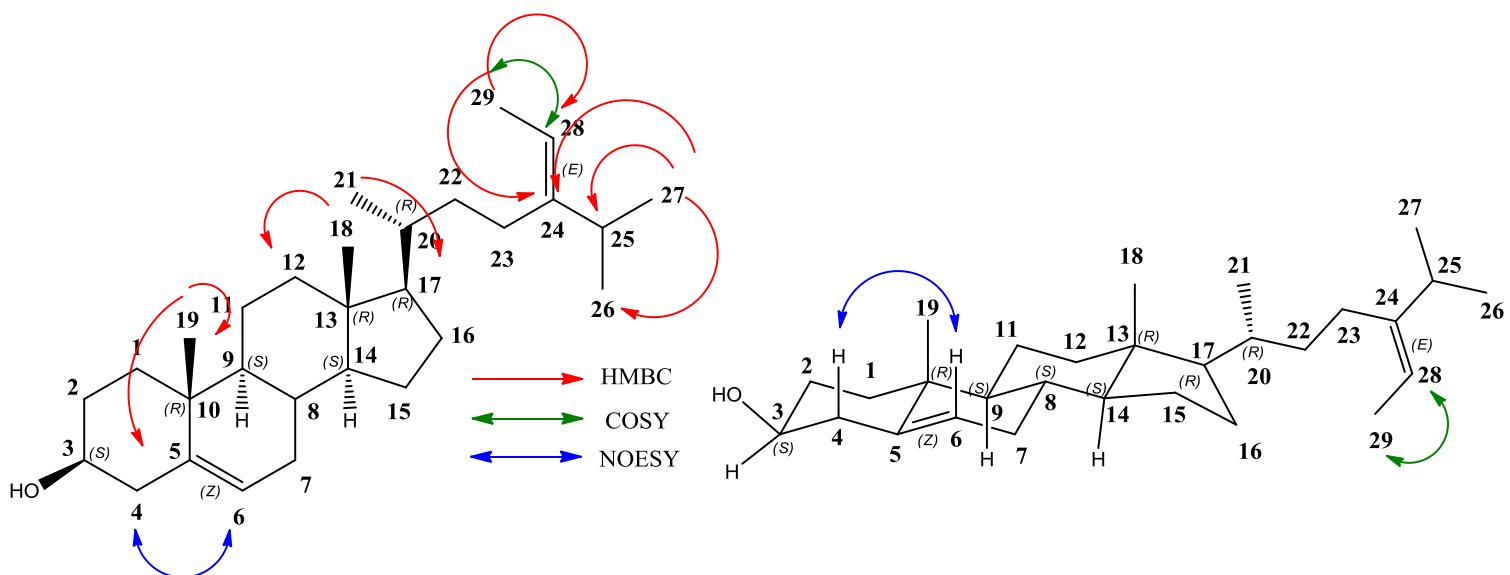


Figura 29. Correlações bidimensionais de *Sv-1* observadas espectros de HMBC, COSY e NOESY.

Tabela 1. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para *Sv-1*, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3 .

Posição	HMQC		HMBC		COSY	NOESY
	δ	δ_{HH}	δ_{C}	2J	3J	
1	-		37,2			
2	-		31,7			
3	3,50 (1H, m)		71,7			H-4
4	2,29 (d, $J= 2\text{Hz}$, 2H)		42,3			H-3 H-6
5	-		140,7			
6	5,33 (1H, m)		121,6			H-4
7	-		31,9			
8	-		31,9			
9	-		50,1			
10	-		36,5			
11	-		21,1			
12	-		39,8			
13	-		42,4			
14	-		56,8			
15	-		24,3			
16	-		28,3			
17	-		55,8			
18	0,66 (3H, s)		11,9			C-12
19	0,99 (3H, s)		19,4	C-9		C-5
20	-		36,4			
21	0,97 (sl, 3H)		18,8			C-17
22	-		35,2			
23	-		25,7			
24	-		147,0			
25	-		34,8			
26	0,95(d, $J= 2,5\text{ Hz}$, 3H)		22,2			
27	0,96 (d, $J= 2,5\text{ Hz}$, 3H)		22,1	C-25	C-26, C-24	
28	5,16 (<i>q</i> , $J= 7,0\text{ Hz}$, 1H)		115,5			H-29
29	1,55 (d, $J= 7,5\text{ Hz}$, 3H)		13,1	C-28	C-24	H-28

Tabela 2. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Sv-I* em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) do fucosterol (HAM et al) em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente).

Posição	<i>Sv-I</i>		Fucosterol (HAM et al)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	37,2	-	37,2
2	-	31,7	-	31,6
3	3,50 (<i>m</i> , 1H)	71,7	3,53 (<i>m</i> , 1H)	71,8
4	-	42,3	-	42,2
5	-	140,7	-	140,7
6	5,33 (<i>m</i> , 1H)	121,6	5,33 (<i>dl</i> , $J=5.0$, 1H)	121,7
7	-	31,9	-	31,9
8	-	31,9	-	31,9
9	-	50,1	-	50,1
10	-	36,5	-	36,5
11	-	21,1	-	21,0
12	-	39,8	-	39,7
13	-	42,4	-	42,3
14	-	56,8	-	56,7
15	-	24,3	-	24,3
16	-	28,3	-	28,2
17	-	55,8	-	55,7
18	0,66 (<i>s</i> , 3H)	11,9	0,66 (<i>s</i> , 3H)	11,8
19	0,99 (<i>s</i> , 3H)	19,4	0,98 (<i>s</i> , 3H)	19,4
20	-	36,4	-	36,4
21	0,97 (<i>sl</i> , 3H)	18,8	0,97 (<i>sl</i> , 3H)	18,7
22	-	35,2	-	35,2
23	-	25,7	-	25,6
24	-	147,0	-	146,9
25	-	34,8	-	34,7
26	0,95(<i>d</i> , 2,5 Hz, 3H)	22,2	0,95 (<i>d</i> , $J=1.5$ Hz, 3H)	22,2
27	0,96 (<i>d</i> , $J=2,5$ Hz, 3H)	22,1	0,96 (<i>d</i> , $J=1.2$ Hz, 3H)	22,1
28	5,16 (<i>q</i> , $J=7,0$ Hz, 1H)	115,5	5,17 (<i>q</i> , $J=6.5$ Hz, 1H)	115,5
29	1,55 (<i>d</i> , $J=7,5$ Hz, 3H)	13,1	1,55 (<i>d</i> , $J=7.0$ Hz, 3H)	13,1

5.2. Identificação estrutural de *Sv-2a* e *Sv-2b*

O composto codificado como *Sv-2* foi obtido na forma de um pó verde-escuro amorfo com ponto de fusão entre 109 - 111 °C e com rendimento de 25 mg, ou seja, 0,003% em relação ao extrato.

O espectro de IV (**Figura 30**, pág. 69) deste composto mostrou uma banda de absorção em 3433 cm⁻¹ típico de deformação axial de N-H ou O-H, sugerindo a presença de aminas e/ou hidroxilas. No entanto, a presença de absorção em 1379 cm⁻¹ atribuído ao estiramento da ligação C-N possibilitou afirmar sobre a suspeita de aminas. Absorções em 1716 e 1055 cm⁻¹, referente a estiramento de C=O e C-O, respectivamente, sugerem a presença de carbonila de éster. (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2007; PAVIA et al., 2001).

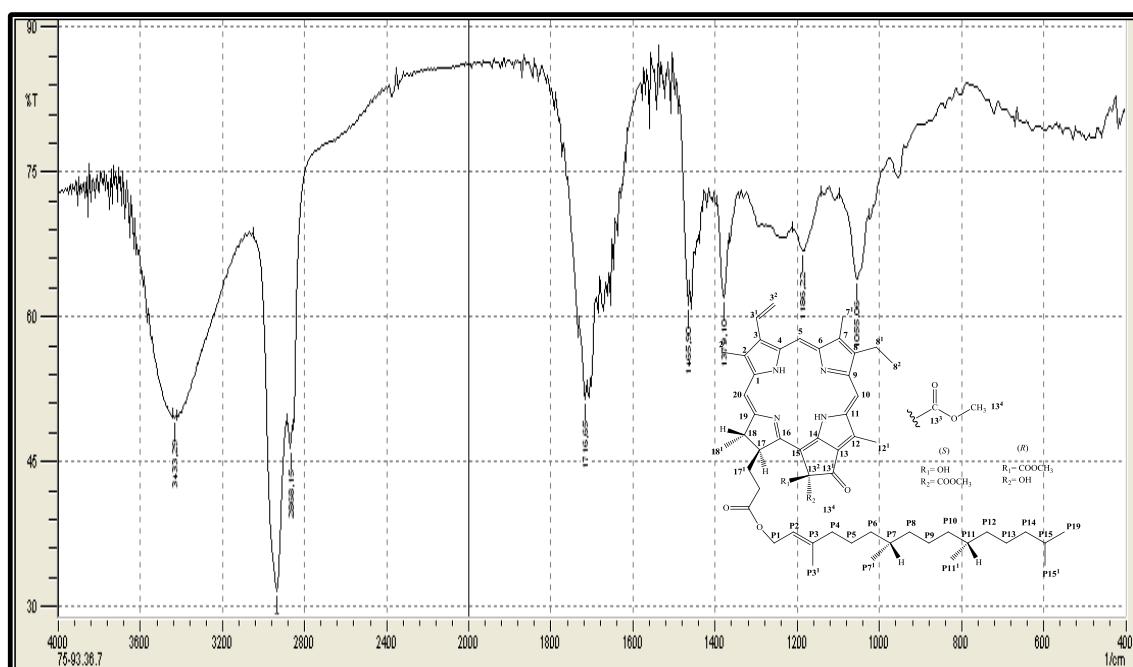
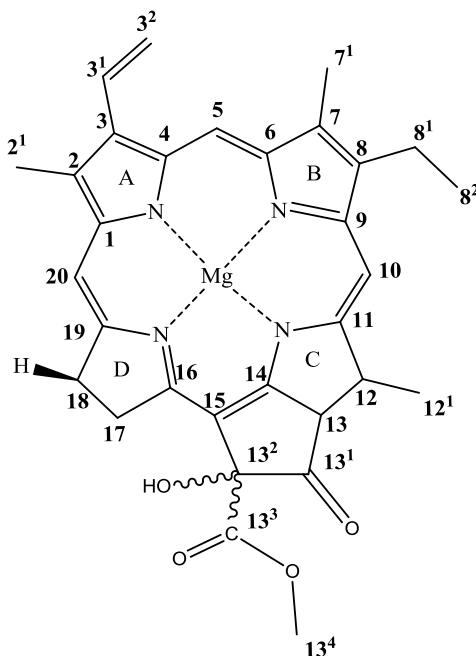


Figura 30. Espectro de Infravermelho (KBr, cm⁻¹) de *Sv-2*.

O espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) e suas expansões (**FIGURA 30, 31e 32**) juntamente com dados da literatura (JERZ, 2007; TOMAZ, 2007 e MATSUO, 1996) apresentaram sinais duplicados que permitiram afirmar que a *Sv-2* tratava-se de uma mistura de duas substâncias, ambas apresentando o mesmo esqueleto carbônico: o núcleo porfirínico. Sendo assim, as substâncias foram codificadas por *Sv-2a* e *Sv-2b*.

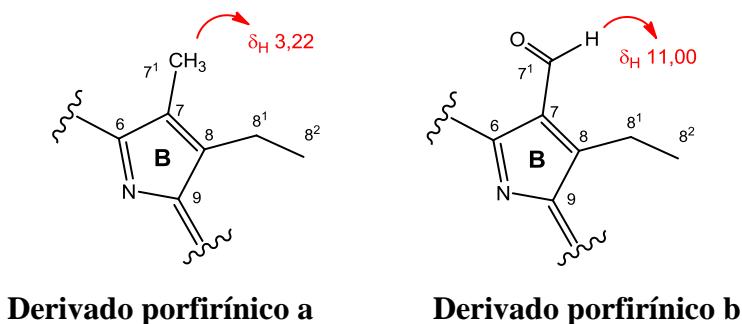
O conjunto desses sinais de metilas, grupos vinílicos e grupos olefínicos caracterizaram a substância isolada como derivado porfirínico (MATSUO et al, 1996;

DUAN et al, 2002; SILVA et al, 2006). As absorções de três singletos referentes a grupos metílicos em δ_H 3,19, δ_H 3,39 e δ_H 3,71 atribuídos aos hidrogênios H-7¹, H-2¹ e H-12¹, dois duplo-dupletos sobrepostos em δ_H 7,96 ($J=11,5$ e 17,5 Hz) e dois dupletos em δ_H 6,26 ($J= 17,5$ Hz) e δ_H 6,15 ($J=11,5$ Hz) atribuídos respectivamente grupos vinílicos dos hidrogênios H-3¹, e H-3² de *Sv-2a* e *Sv-2b*, respectivamente. Observou-se também a presença de três hidrogênios olefínicos pelos singletos em δ_H 9,55 e 9,53 (H-10 de *Sv-2a* e *Sv-2b*, respectivamente), δ_H 9,39 e 9,37 (H-5 de *Sv-2a* e *Sv-2b*, respectivamente) e δ_H 8,62 e 8,59 (H-20, de *Sv-2a* e *Sv-2b*, respectivamente). A presença de uma cadeia etilíca ligada a C-8 foi determinada pela absorção em 3,63. Além disso, foi observada uma metoxila pelo singuleto em δ_H 3,68 atribuído aos hidrogênios 13⁴.



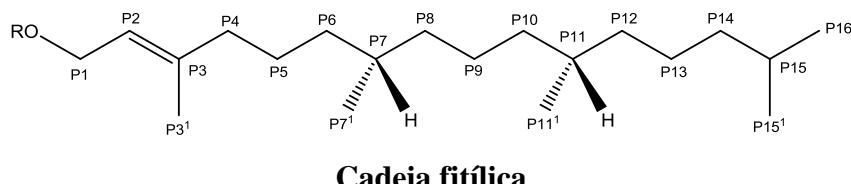
Esqueleto porfirínico

O deslocamento do sinal em δ_H 3,19 permitiu classificar esse derivado porfirínico em mistura (*Sv-2a* e *Sv-2b*) como uma derivado da clorofila do tipo “*a*”, uma vez que este sinal caracteriza o hidrogênio 7¹. Essa mesma absorção está ausente em derivados do tipo “*b*” o qual possui um deslocamento característico em δ_H 11,00.



Dois singletos largos em δ_H -1,76 e -1,86 (**figura 31**, pág 72), atribuídos a dois N-H pirrólicos blindados. Essa blindagem se dá quando as linhas do campo magnético passam por dentro do anel porfirínico, conferindo uma superproteção aos hidrogênios dentro da corrente do anel como os dos grupos aminas (SILVERSTEIN, F. X. & WEBSTER., 2007). A ausência do íon Mg central na molécula e a presença desses hidrogênios superprotegidos indicou que o composto tratava-se de um derivado da clorofila conhecido como feofitina, em que há troca do íon Mg pelos hidrogênios. Esses dados favoreceram a hipótese de que a banda de absorção em 3433 cm⁻¹, observada no espectro de IV (**FIGURA 30**, pág 69), correspondia ao estiramento de N-H descartando a presença de O-H, pois esta informação leva a sugerir que Sv-2 trata-se de uma mistura de uma feofitina-a ou um feorfibídeo-a (MATSUO et al., 1996; BUCHANAN, M. S.; HASHIMOTO, T. & ASAKAWA, Y., 1996; KOBAYASHI et al., 1991).

O feoforbídeo caracteriza-se pela ausência do grupo fitol e pode ser observado no espectro pelos sinais desblindados. Porém um envelope de sinais em δ_H 0,76 – 1,68 (**Figura 31**, pág 72) atribuídos aos hidrogênios CH, CH₂ e CH₃ de cadeias alifáticas sugeriram a presença de um grupo fitil (-C₂₀H₃₉) comumente encontrado em moléculas de natureza porfirínica. O multiplet em δ_H 4,48 (2H), bem como, o triploto em δ_H 5,21 ($J = 5,0$ Hz, 1H) e 5,16 (**Figura 32**, pág 72) indicaram a proposta de Sv-2 trata-se de uma mistura de um derivado da feofitina *a* uma vez que correspondem aos deslocamentos químicos dos hidrogênios H-P₁ e H-P₂ da cadeia fitílica, respectivamente. (SCHWIKKARD et al., 1998).



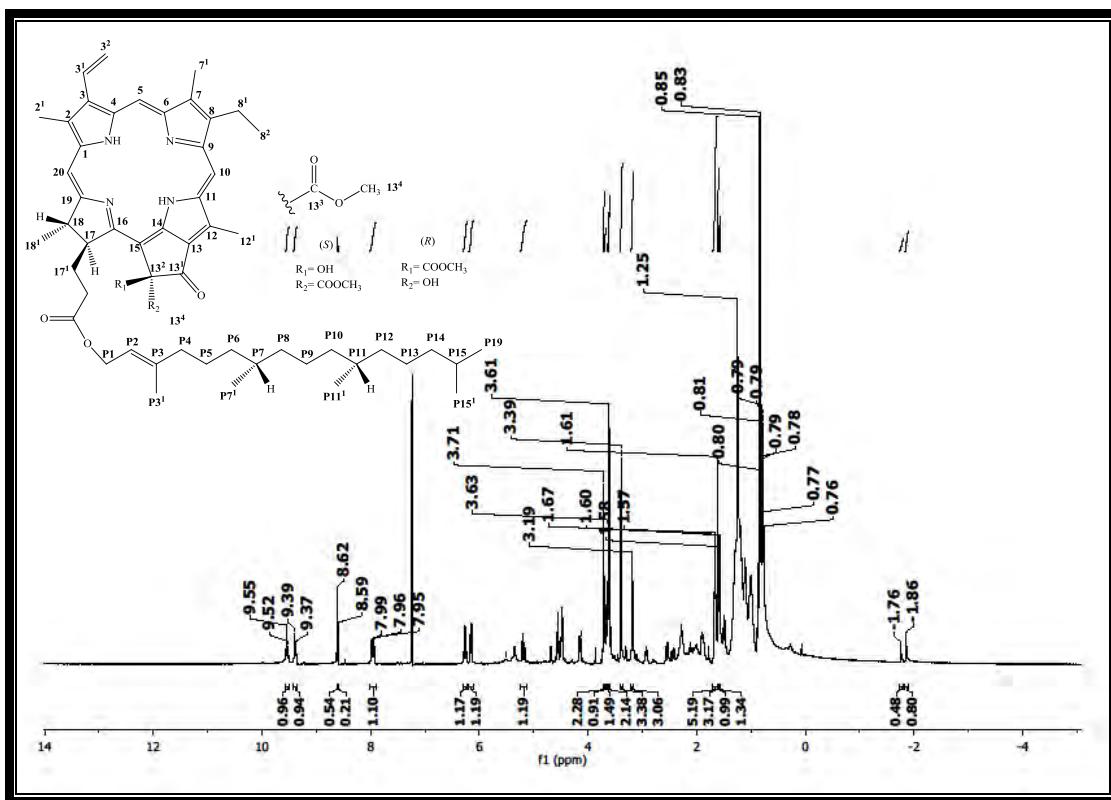


Figura 31. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Sv-2 .

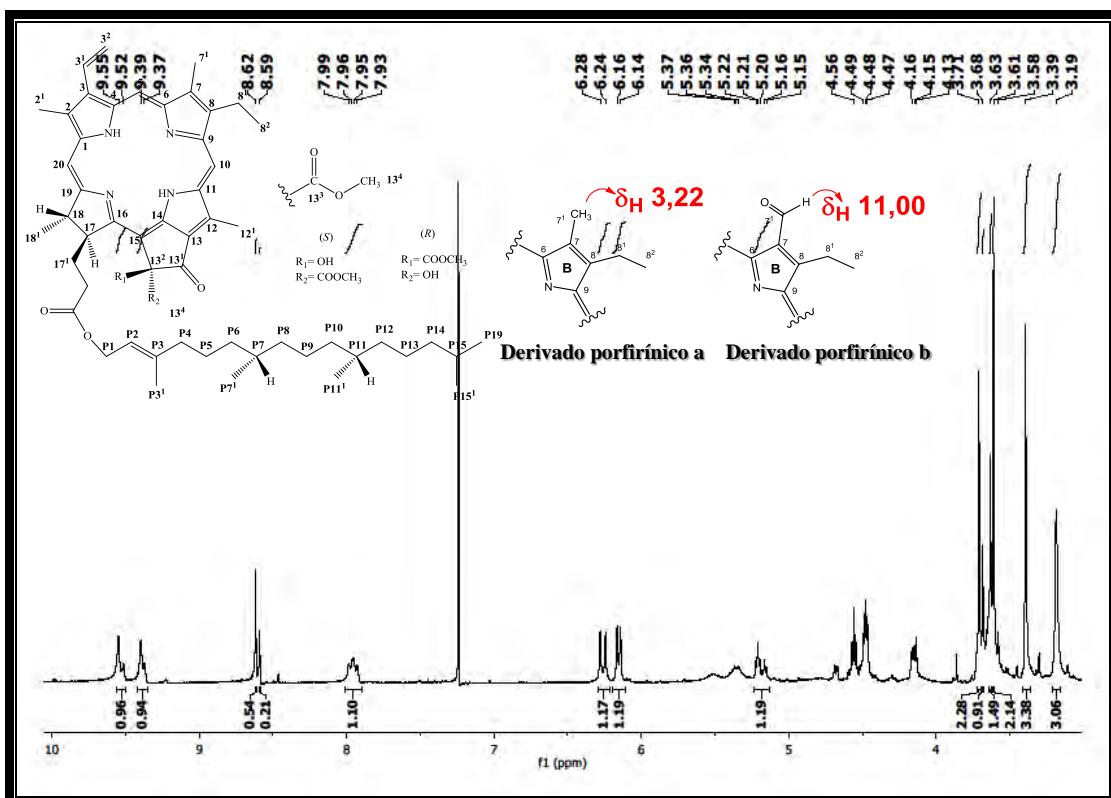


Figura 32. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Sv-2 na região de 4,0 – 10,0 ppm.

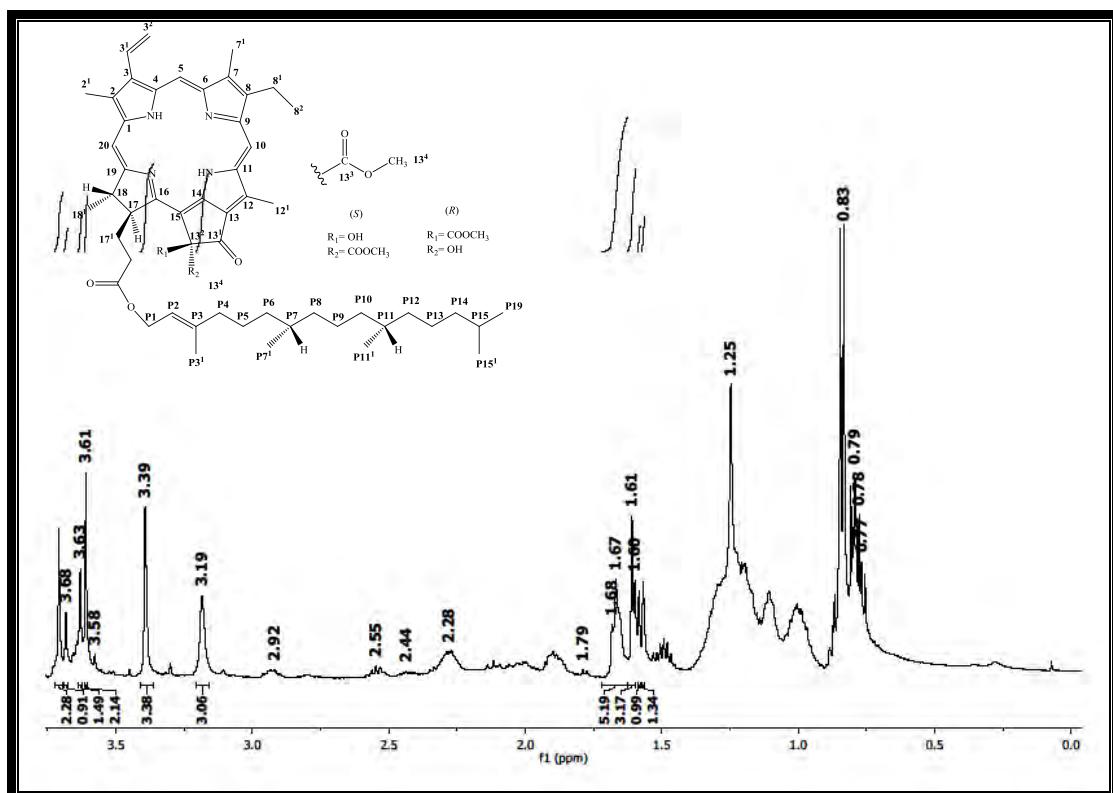


Figura 33. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *Sv-2* na região de 0,5 – 4,5 ppm.

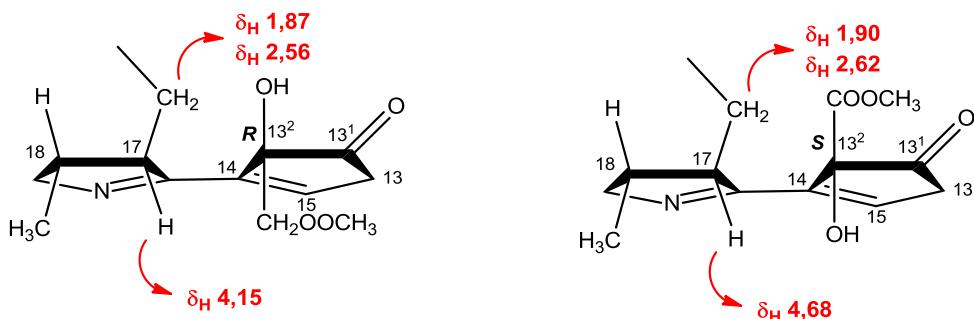
O espectro de RMN ^{13}C – APT (125 MHz, CDCl_3) e as expansões (figuras 34-36, pág. 75 e 76) apresentou sinais intensos e outros duplicados confirmaram as suposições obtidas nos espectros de RMN ^1H ao permitir supor que o composto codificado como *Sv-2* trata-se de uma mistura de duas substâncias, ambas apresentando o mesmo esqueleto carbônico. Entre eles se destacaram os sinais em δ_{C} 104,2; 97,9 e 93,6 referentes aos carbonos C-10, C-5 e C-20 do esqueleto carbônico do núcleo porfirínico para a mistura *Sv-2a* e *Sv-2b*, respectivamente. Além disso, verificou-se a presença de sinais para dois carbonos vinílicos em δ_{C} 129,4 e 122,8, típicos dos carbonos C-3¹ e C-3², bem como, sinais para três metilas em δ_{C} 12,2, 12,1 e 11,2 atribuídos aos carbonos C-12¹, C-2¹ e C-7¹, respectivamente (KOBAYASHI et al., 1991; SCHWIKKARD et al., 1998; TOMAZ et al., 2008).

Também foi observada a presença de sinais que corroboraram com a proposta dos espectros de RMN ^1H para a presença de cadeia fitílica em *Sv-2*, sendo aqueles em δ_{C} 61,5; 117,9 e 142,7 atribuídos aos carbonos C-P1, C-P2 e C-P3, respectivamente (SCHWIKKARD et al., 1998; HUANG et al., 2007; JERZ et al., 2007; TOMAZ et al., 2008).

A presença dos sinais em δ_C 128,0 δ_C 192,0, δ_C 89,0, δ_C 173,6 e δ_C 53,8, δ_C 149,9 e δ_C 107,7 atribuídos aos carbonos 13, 13¹, 13², 13⁴, 14 e 15 permitiu determinar que a estrutura da feofitina tem o anel do tipo E como sendo uma ciclopentanona, de acordo com a literatura (JERZ et al, 2007). A hidroxilação do anel “E” foi deduzida a partir do deslocamento de C-13² em 89,0 (MATSUO et al, 1996). A presença de haver uma mistura entre a feofitina-a e a 13²-hidroxi-feofitina-a foi descartada, uma vez que sinais em 190,0 e 64,8 não foram observados.



Juntamente a essa informação, a absorção do espectro de RMN de 1H em δ_H 5,36 e 5,52 pôde-se sugerir que hidroxila 13²-OH possui tanto uma configuração 13*R* e 13*S*, tratando-se de uma mistura racêmica (MATSUO et al, 1996; Nakatani, Ourisson e Beck, 1981). Além destes sinais, observou-se que o hidrogênio H-17 aparece em dois sinais distintos no espectro de RMN de 1H , sendo um multiplo em δ_H 4,15 e um duplo em δ_H 4,68 ($J=7,5$ Hz). Neste caso as absorções diferentes para o mesmo hidrogênio se dá devido a desblindagem do H-17 (δ_H 4,68) sofrida pela 13²-OH, o que evidencia a configuração 13*R*, enquanto a blindagem de H-17 (δ_H 4,17) permite sugerir a coexistência do diastereoisomero 13*S*.



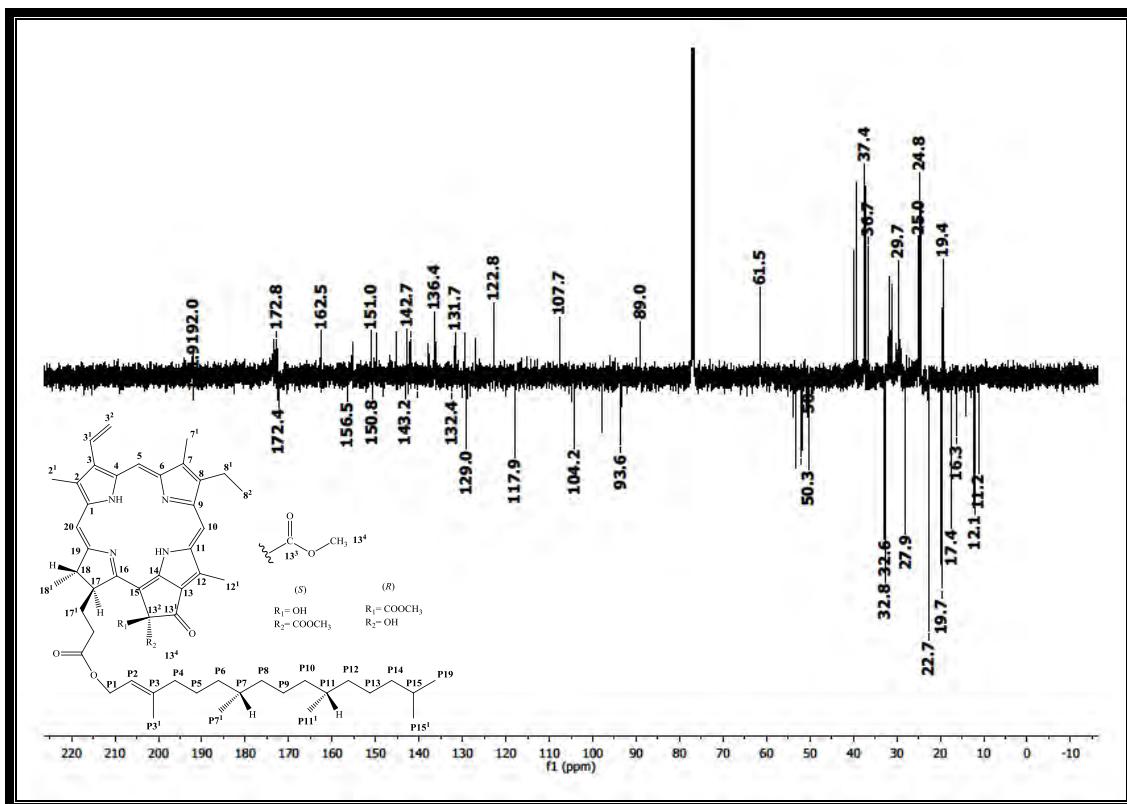


Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *Sv-2*.

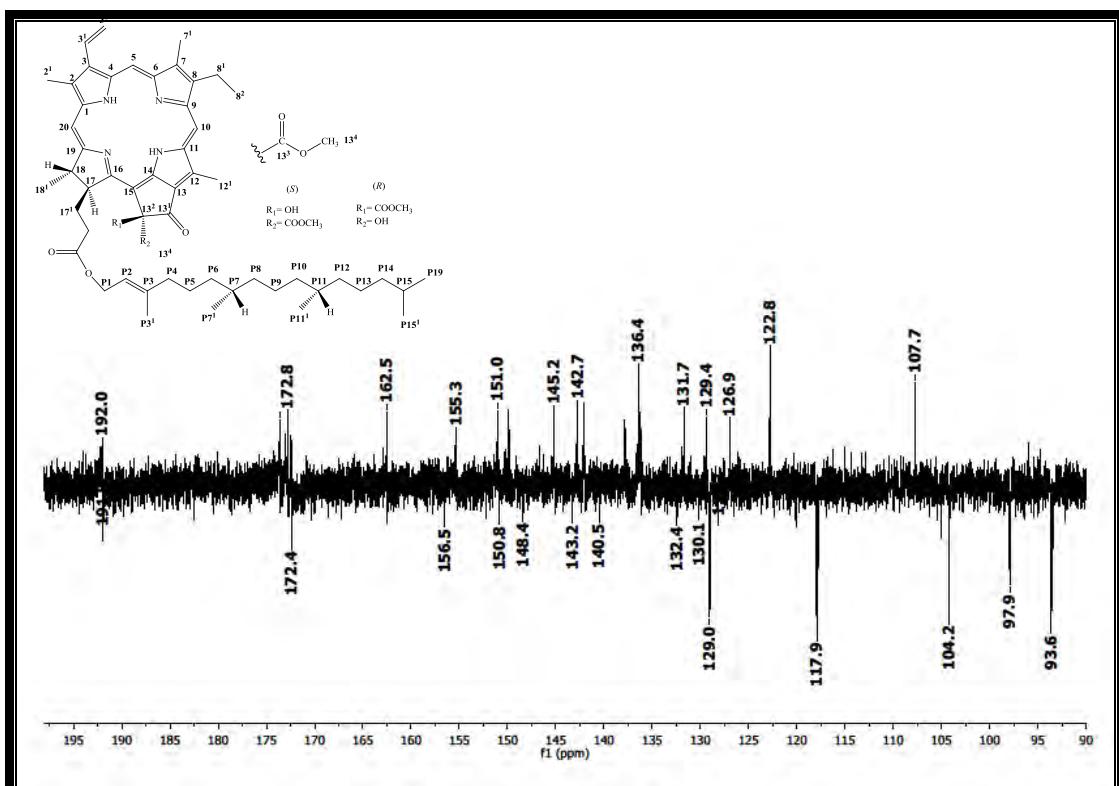


Figura 35. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *Sv-2* na região de 90,0 – 195,0 ppm

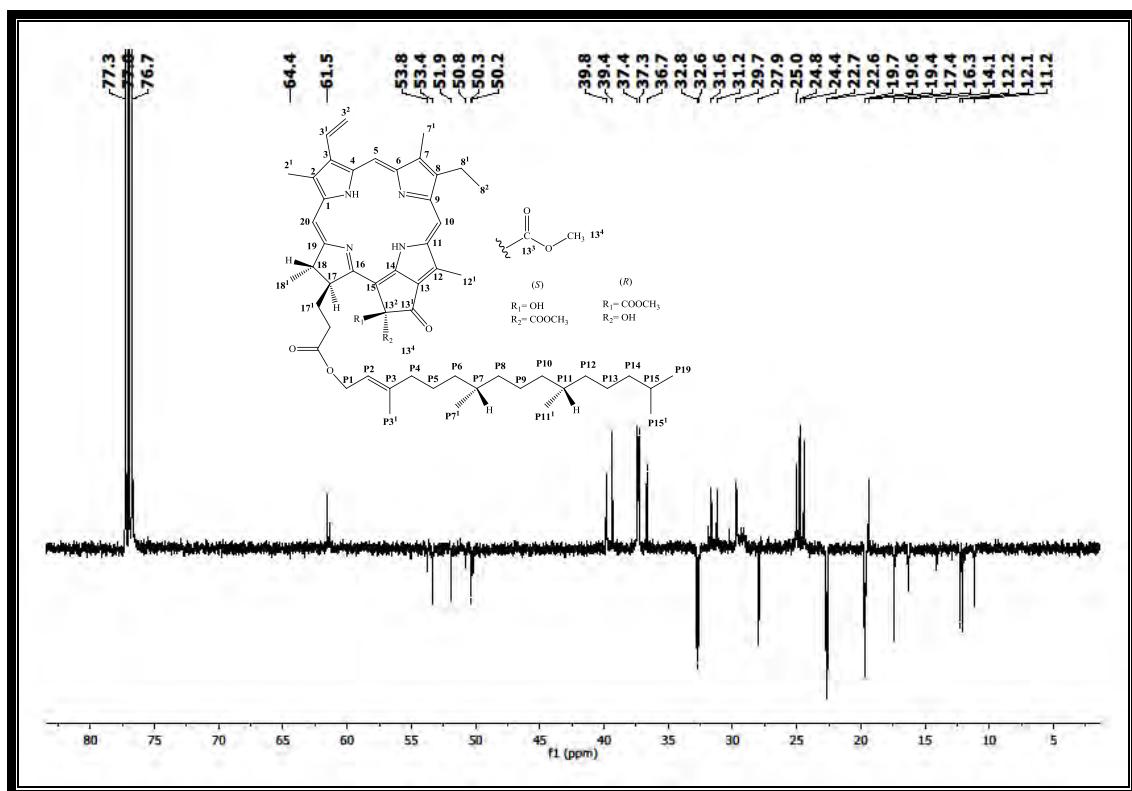


Figura 36. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *Sv-2* na região de 5,0 – 80,0 ppm

A análise do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMQC demonstrou correlações dos carbonos do esqueleto do anel porfirínico e da cadeia fitílica com os seus respectivos hidrogênios. Pode-se destacar as correlações em δ_{H} 4,48 (H- P1), δ_{H} 5,21 (H-P2), δ_{H} 1,61 (H-P3¹), δ_{H} 1,10 (H-P4) δ_{H} 1,37 (H-P5) respectivamente com aqueles seus carbonos δ_{C} 50,3 (C- P1), δ_{C} 117,9 (C-P2), δ_{C} 16,3 (C-P3¹), δ_{C} 39,8 (H-P4), δ_{C} 24,7 (H-P5), δ_{C} 53,4 (H-13⁴). Além disto, permitiram assinalar os hidrogênios e o carbono da metoxila em C-13⁴ ao mostrar correlação do sinal em δ_{H} 3,61 com o sinal em δ_{C} 53,4. As outras correlações da mistura de 13²-(13²*R*)-hidroxi-feofitina-a e 13²-(13²*S*)-hidroxi-feofitina-a estão sumarizadas na **TABELA 04**.

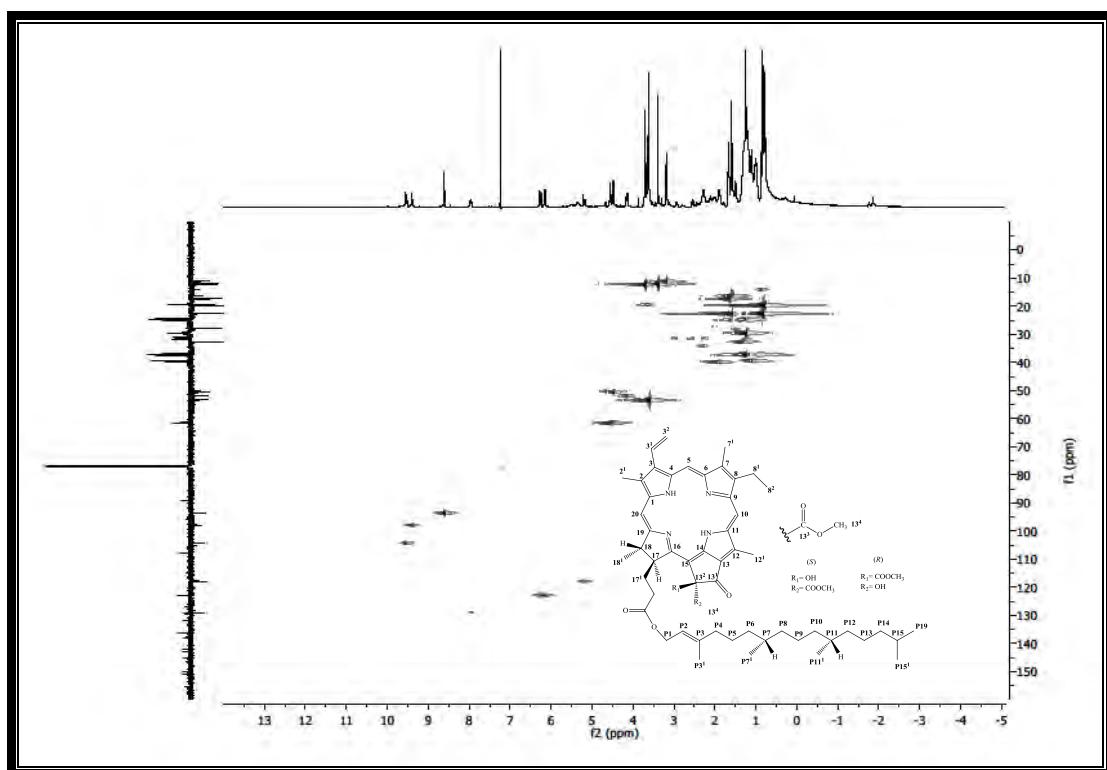


Figura 37. Espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de *Sv-2*.

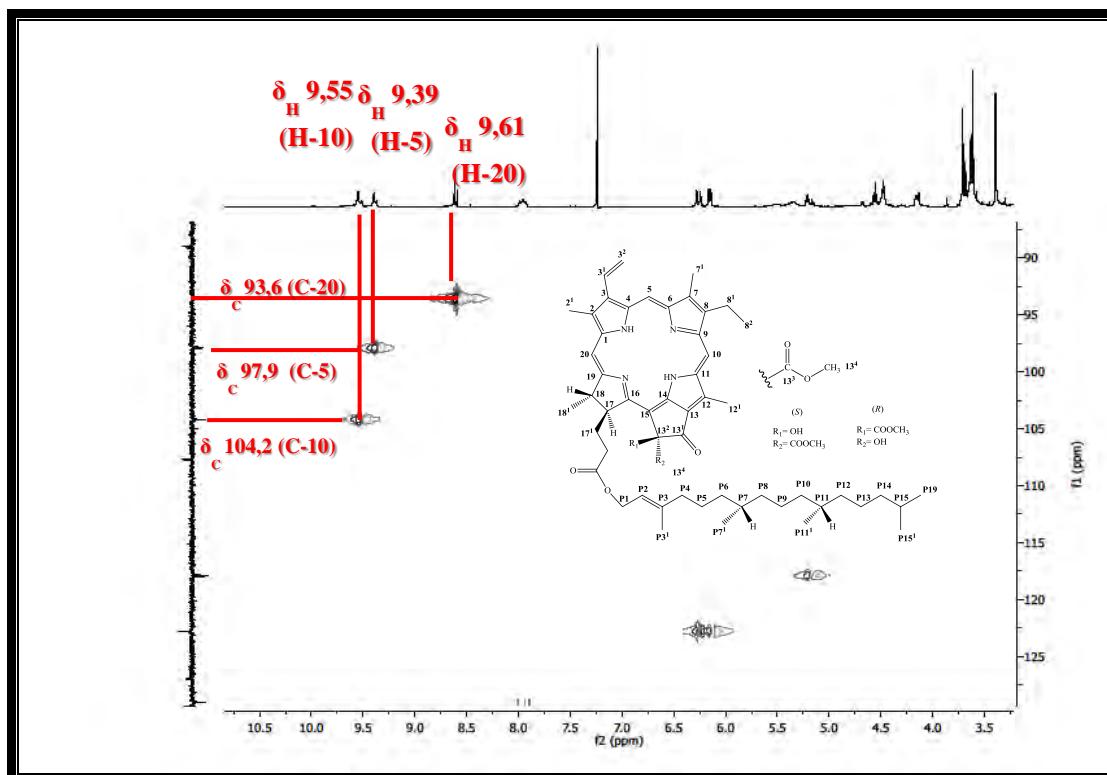


Figura 38. Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de *Sv-2* na região de (3,5 – 10,0 ppm) x (90,0 – 125,0 ppm).

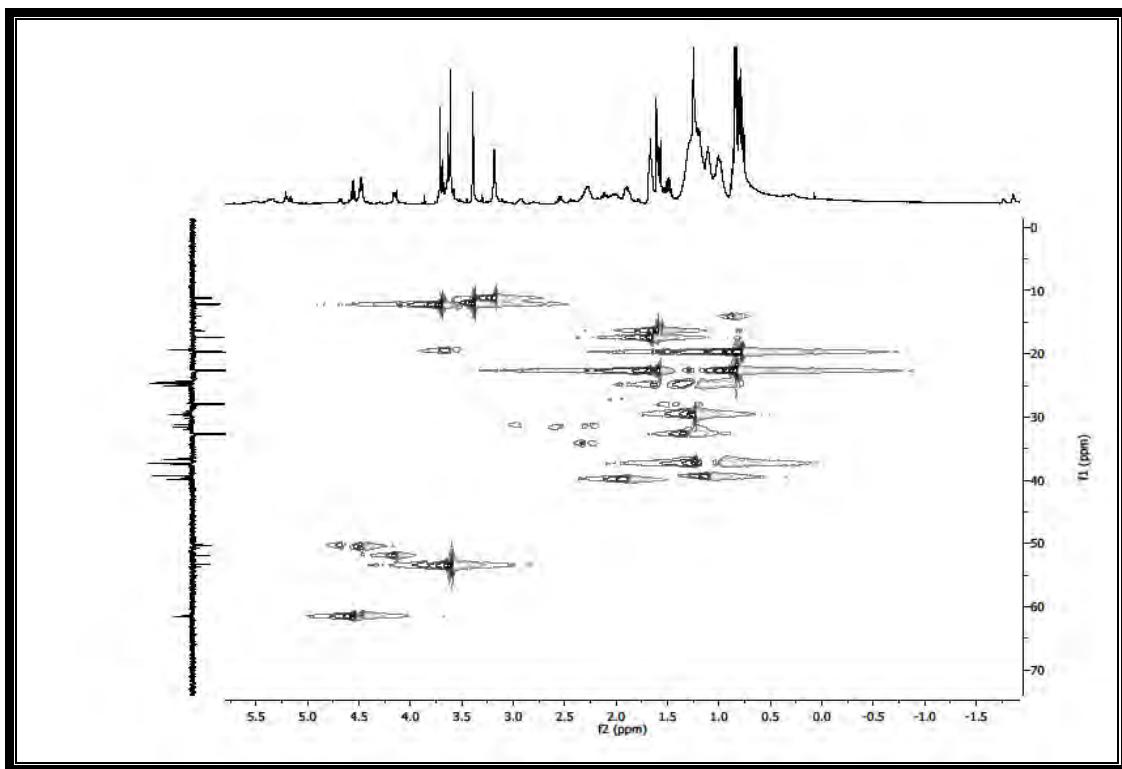
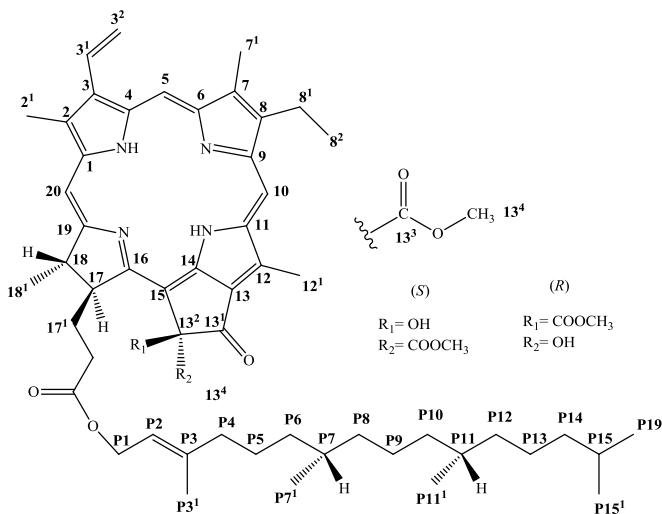


Figura 39. Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de *Sv-2* na região de (-1,5 – 5,5 ppm) x (0,0 – 70,0 ppm).

O espectro de correlação homonuclear COSY e as expansões (FIGURA 40-42, pág. 79-80) confirmaram o acoplamento *trans* e *cis* observado para os hidrogênios H-3¹ e H-3² ao mostrar correlações entre δ_{H} 7,95 (H-3¹) e 6,28/6,16 (H-3²_(trans)/H-3²_(cis)) caracterizando o grupo vinila terminal. Correlação entre o quarteto em δ_{H} 3,63 (H-8¹) e o triploto em δ_{H} 1,67 (H-8²) confirmou a presença de um radical etila inserido na posição 8. Os espectros de COSY também ratificaram os deslocamentos químicos para os hidrogênios H-17¹ (δ_{H} 2,28 e 2,93), bem como, dos hidrogênios H-18 (δ_{H} 4,46) e H-18¹ (δ_{H} 1,68), ao mostrar correlação entre estes sinais. Outras correlações foram observadas e são apresentadas na Tabela 5



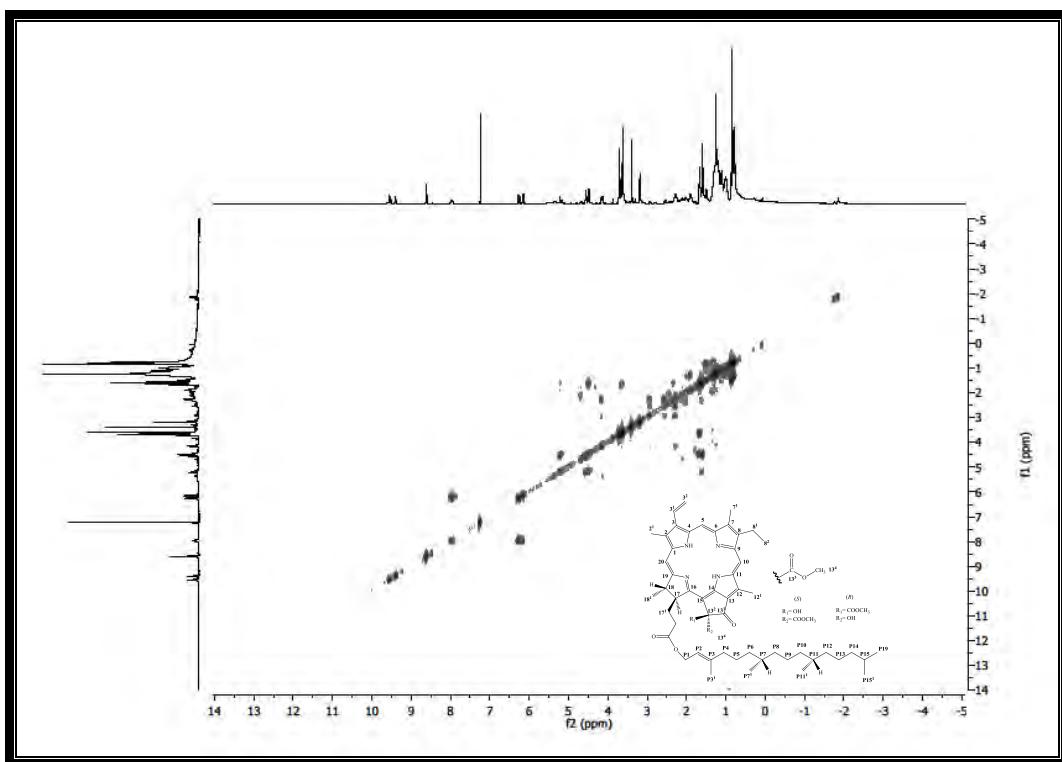


Figura 40. Espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de *Sv-2*.

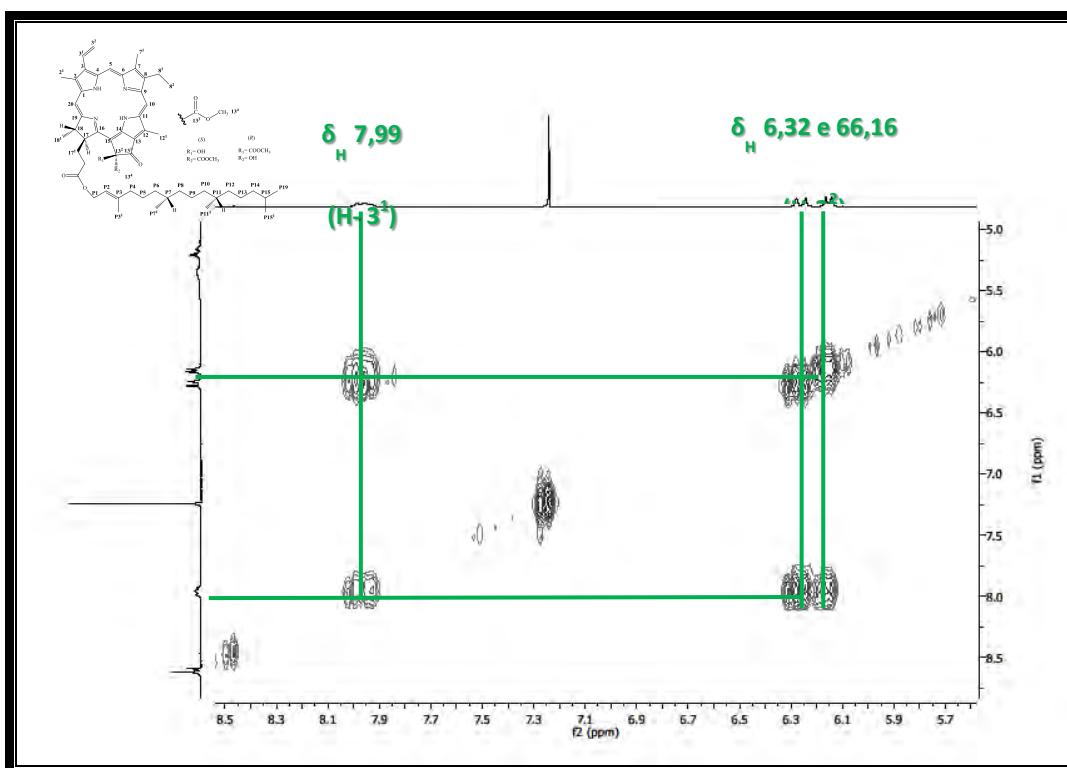


Figura 41. Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de *Sv-2* na região de (5,5 – 8,5 ppm) x (5,5 – 8,5 ppm).

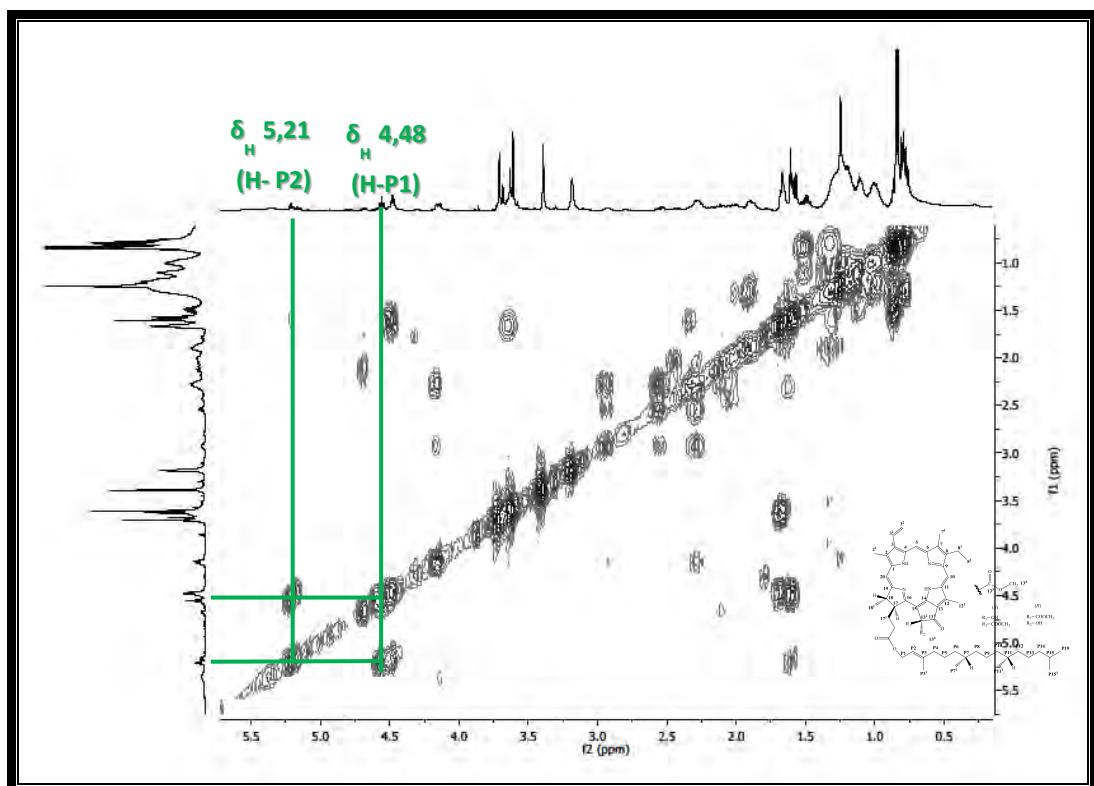


Figura 42. Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de *Sv-2* na região de (0,5 – 5,5 ppm) x (0,5 – 5,5 ppm).

A análise do espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC e suas expansões puderam assinalar várias porções do esqueleto estrutural da mistura racêmica. O sinal em δ_{H} 8,62 (H-20) mostrou correlação a 2J com δ_{C} 142,0 (C-1), a 3J com δ_{C} 131,7 (C-2), e a 4J com δ_{C} 50,3 (C-17), o que demonstra a interconexão entre o anel A e anel D. As correlações dos hidrogênios em δ_{H} 6,28 (H- 3^2-E) e δ_{H} 6,16 (H- 3^2-Z) com 7,95 (H- 3^1) a 2J e com δ_{C} 136,4 (C-3) a 3J evidenciam a presença do grupo vinil ao carbono C-3. As correlações de δ_{H} 4,48 (H-P1) 2J com 117,9 (C-P2), e a 3J com 142,7 (C-P3) e 172,8 (C-17 3) e a e as correlações em δ_{H} 5,21 (H-P2) a 3J com 16,3 (C-P3 1) e 39,4 (C- P4) demonstram a conectividade do esqueleto porfirínico com a cadeia fitílica reforçando a hipótese de que a mistura *Sv-2* trata-se de uma feofitina e não de um feoforbídeo. Os hidrogênios em δ_{H} 3,71 (H- 12^1) fazem correlação a 2J com 129,4 (C-12) e a 3J com 137,8 (C-11) evidenciam a presença do grupo metila na carbono C-12 do anel C. Outras correlações em δ_{H} 3,39 (H-2) a 2J com 131,7 (C-2), a 3J com 142,0 (C-1) e a 4J com 142,0 (C-1) e as correlações em δ_{H} 3,19 (H-7)) a 2J com 136,4 (C-7), a 3J com 145,2 (C-8) e 4J com 155,3 (C-9) permitiram esboçar a posição das metilas 2^1 e 7^1 dentro estrutura da cadeia do anel A e do anel B respectivamente. As correlações dos hidrogênios δ_{H} 4,15 (H-17R) e δ_{H} 4,68 (H-17S) a 3J com os mesmos carbonos 22,7

(181) e 31,6 (17²) demonstram que o hidrogênio da mesma posição (H-17) porém de estereoisômeros diferentes se correlacionam com o mesmo carbono, evidenciando que Sv-2 trata-se de uma mistura dos isômeros (13²R)-13²-hidroxi-feofitina-a e (13²S)-13²-hidroxi-feofitina-a. As outras correlações foram sumarizadas na **Tabela 3** (pág 81).

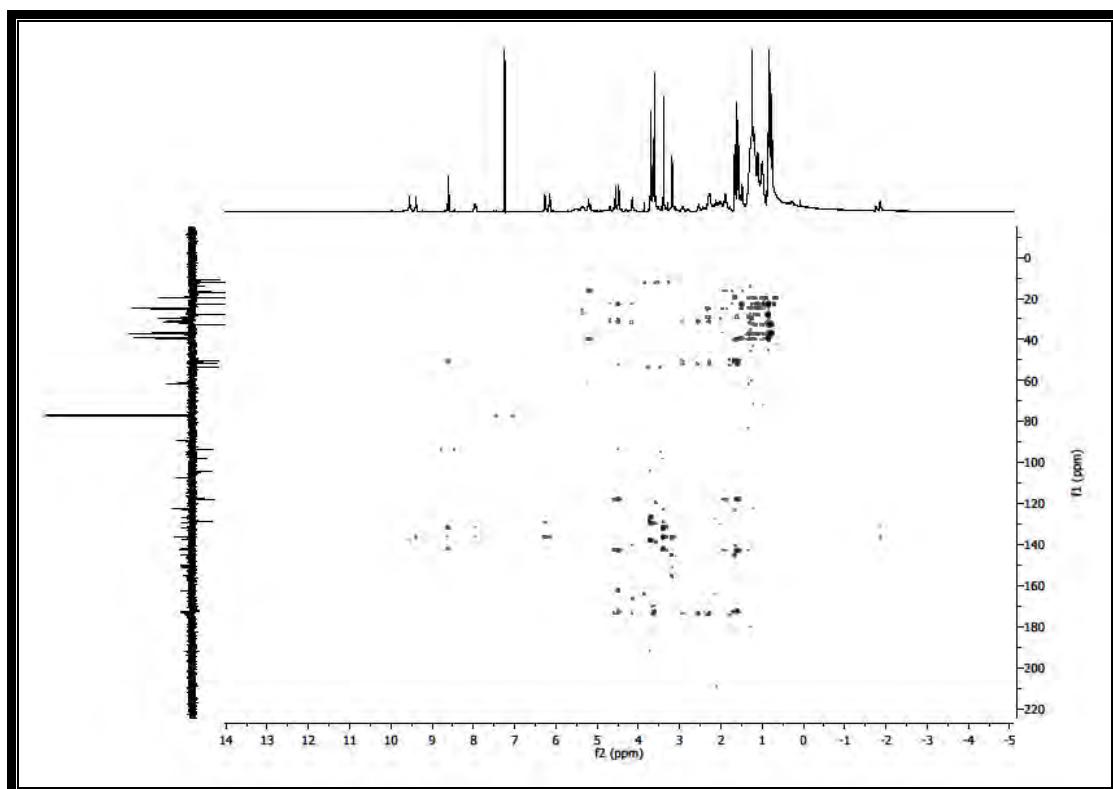


Figura 43. Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl₃) de Sv-2.

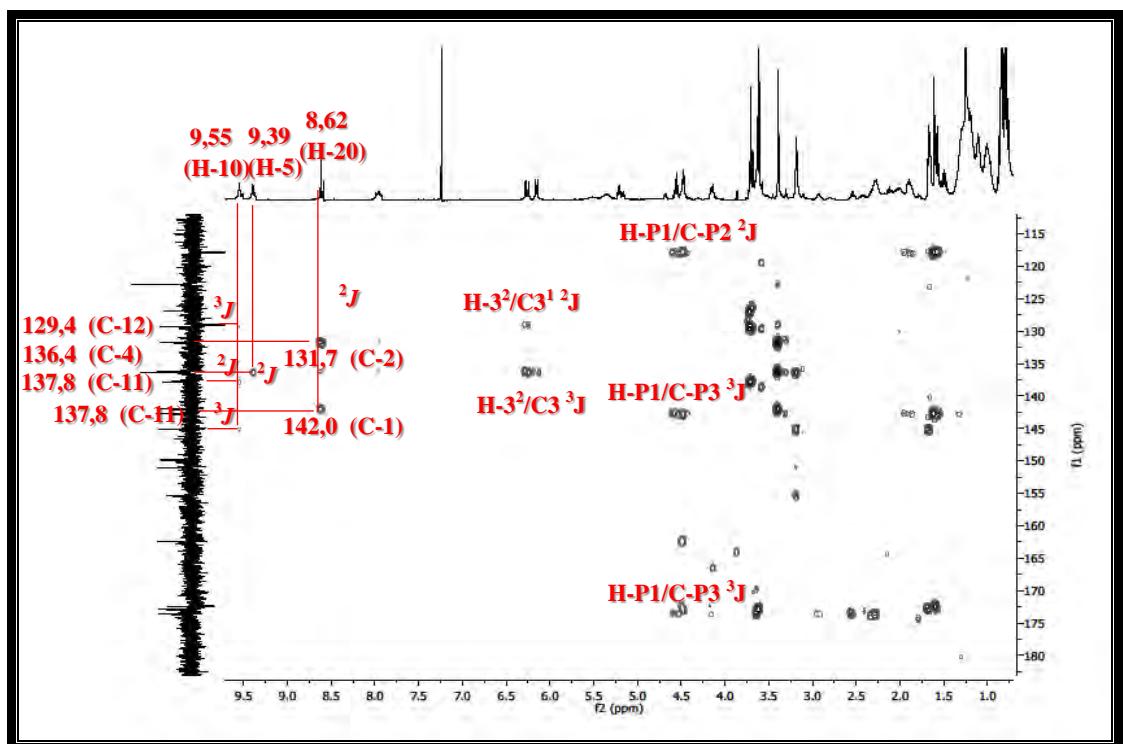


Figura 44. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Sv-2* na região de (1,00 – 9,50 ppm) x (155,0 – 180,0 ppm).

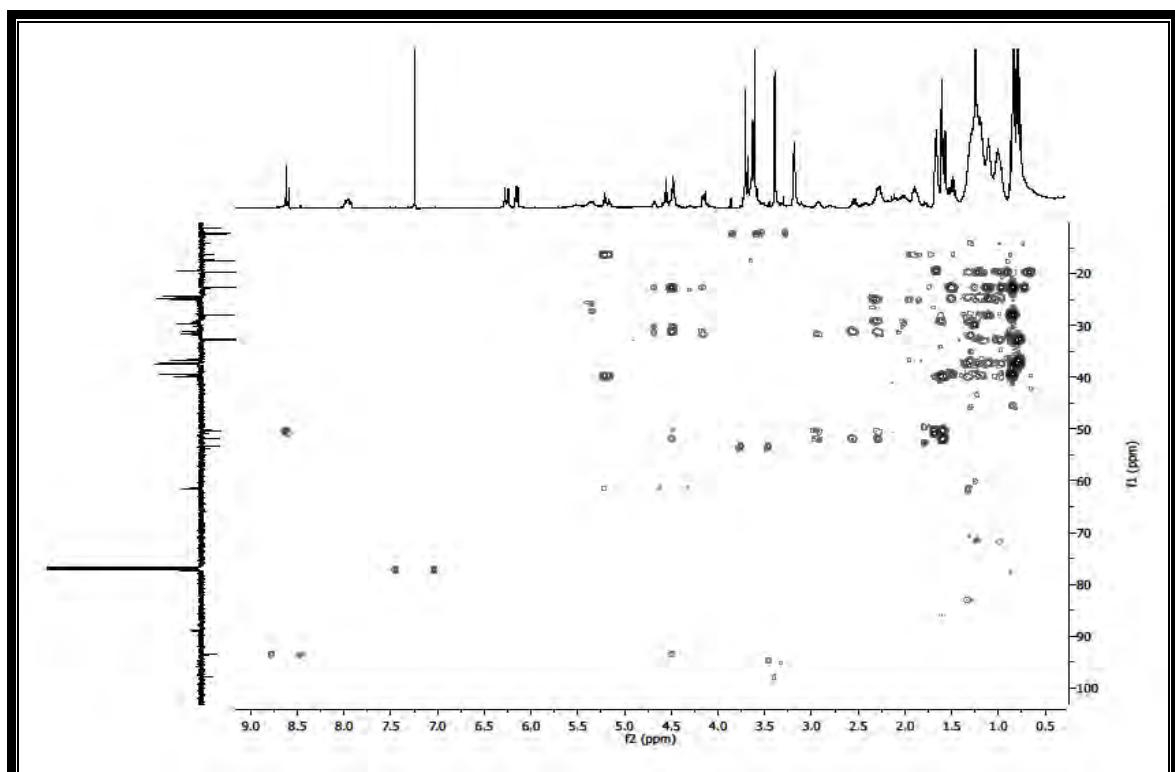


Figura 45. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Sv-2* na região de (1,00 – 9,50 ppm) x (155,0 – 180,0 ppm).

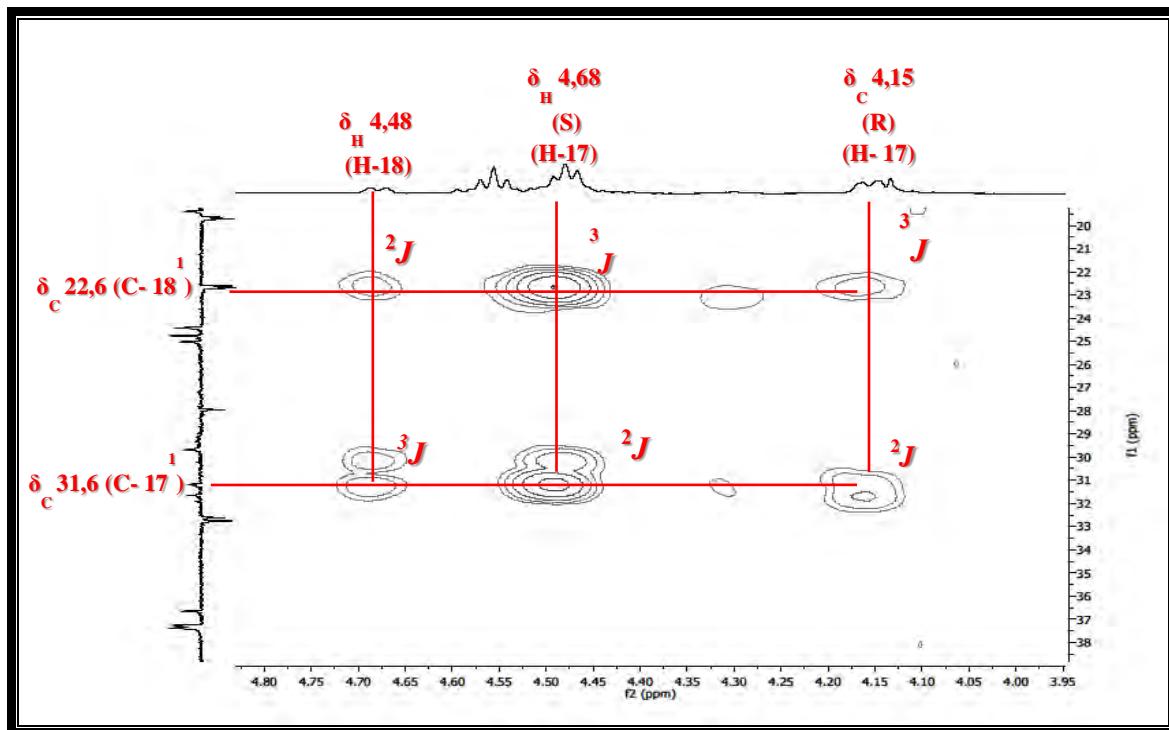


Figura 46. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl₃) de Sv-2 na região de (3,95 – 4,80 ppm) x (20,0 – 38,0 ppm).

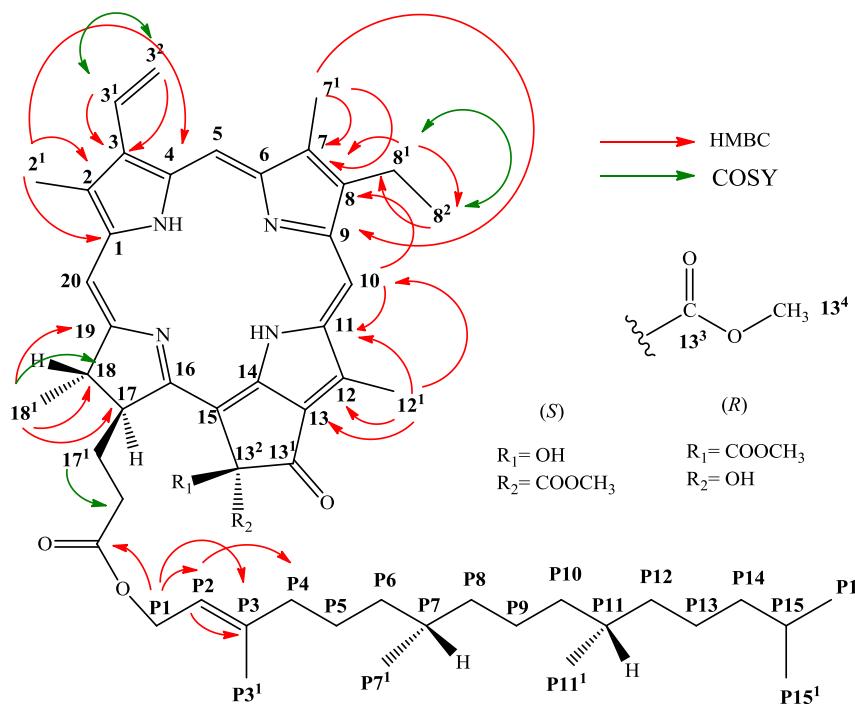


Figura 47. Correlações bidimensionais de Sv-2 observadas espectros de HMBC, COSY e NOESY.

Tabela 3. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para *Sv-2a* e *Sv-2b*, verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3 .

C	HMQC		HMBC			COSY	NOESY
	δ_{C}	δ_{H}	2J	3J	4J		
1	142,0	-					
2	131,7	-					
2 ¹	12,1	3,39 (<i>s</i> , 3H)		C-2	C-1	C-4	H-20, H-3 ¹ , H-3 ² , H-2 ¹
3	136,4	-					
3 ¹	129,0	7,95 (<i>dd</i> , $J = 11,5$ e 16,5 Hz, 1H)			C-3		H-3 ² H-5, H-3 ² , H-2 ¹
3 ²	122,8	6,28 (<i>d</i> , $J = 17,5$ Hz, 1H) 6,16 (<i>d</i> , $J = 11,5$ Hz, 1H)			C-3		H-3 ¹ H-2 ¹
4	136,4	-					
5	97,9	9,39 (<i>s</i> , 1H)			C-3		H-3 ¹ , H-7 ¹
6	155,7	-					
7	136,4	-					
7 ¹	11,2	3,19 (<i>s</i> , 3H)		C-7	, C-8 e C-9		H-5, H-8 ¹
8	145,2	-					
8 ¹	19,7	3,63 (<i>m</i> , 2H)		C-8 ² , C-8	C-7		H-8 ² H-10, H-7 ¹
8 ²	17,5	1,67 (<i>t</i> , $J = 7,5$ Hz, 3H)		C-8 ¹	C-8		H-8 ¹
9	155,2	-					
10	104,2	9,55 (<i>s</i> , 1H)		C-11	C-8, C-12		H-12 ¹ , H-8 ¹
11	137,8	-					
12	129,4	-					
12 ¹	12,2	3,71 (<i>s</i> , 3H)		C-12	C-11, C-13	C-10	H-10
13	129,4	-					
13 ¹	192,0	-					
13 ²	-						
13 ³	-						
13 ⁴	19,7	3,68 (<i>s</i>)					
14	150,8	-					
15	107,7	-					
16	164,0	-					
17(S)	50,3	4,68 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz, 1H)					
17(R)	51,9	4,15 (<i>m</i> , 1H) e					H-18 ¹
17 ¹	31,6	2,28 (<i>m</i> , 1H) e 2,93 (<i>m</i> , 1H)					H-17 ¹
17 ²	32,6	2,55 (<i>m</i> , 2H)					H-17 ²
17 ³	172,8	-					
18	50,8	4,48 (<i>m</i> , 1H)					H-18 ¹ H-20
18 ¹	22,6	1,68 (<i>m</i>)		C-18	C-19, C-17		H-18 H-17
19	172,4	-					
20	93,6	8,62 (<i>s</i> , 1H)		C-1	C-2	C-3	H-18, H-2 ¹
P1	50,3	4,48 (<i>m</i> , 1H)		C-P2	C-P3, C-17 ³		
P2	117,9	5,21 (<i>t</i> , $J = 7,0$ Hz, 1H)			C-P3 ¹ , C-P4		
P3	142,7	-					
P3 ¹	16,3	1,61 (<i>sl</i> , 3H)					
P4	39,4	-					
P5	24,7	-					
P6	36,6	-					
P7	32,8	-					
P7 ¹	19,6	-					
P8	37,4	-					
P9	24,4	-					
P10	37,3	-					
P11	32,6	-					
P11 ¹	19,7	-					
P12	37,3	-					
P13	24,8	-					
P14	39,8	-					
P15	27,9	-					
P15 ¹	22,7	-					
P16	22,6	-					
21-NH	-	-1,11 (<i>sl</i> , 1H)					
23-NH	-	-1,42 (<i>sl</i> , 1H)					

Tabela 4. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de do isômero *S* de *Sv-2* com os valores da literatura.

Posição	<i>Sv-2</i> (isômero <i>S</i>)		^{13}C - <i>S</i> -13-hidroxi-feofitina a (JERZ et al., 2007)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	142,0	-	142,8
2	-	131,7	3,45 (<i>s</i>)	132,6
2¹	3,39 (<i>s</i> , 3H)	12,1		12,4
3	-	136,4		137,0
3¹	7,95 (<i>dd</i> , $J = 11,5$ e 16,5 Hz, 1H)	129,0	8,03 (<i>dd</i> , $J = 11,5$ e 17,5, 1H)	129,4
3²	6,28 (<i>d</i> , $J = 17,5$ Hz, 1H) 6,16 (<i>d</i> , $J = 11,5$ Hz, 1H)	122,8	6,32 (<i>dd</i> , $J = 17,5$ e 1,0, 1H) 6,23 (<i>dd</i> , $J = 11,5$ e 1,0, 1H)	123,6
4	-	136,4		136,3
5	9,39 (<i>s</i> , 1H)	97,9	9,60 (<i>s</i>)	98,4
6	-	155,7		150,9
7	-	136,4		136,3
7¹	3,19 (<i>s</i> , 3H)	11,2	3,30 (<i>s</i>)	11,6
8	-	145,2		145,3
8¹	3,63 (<i>m</i> , 2H)	19,7	3,77 (<i>q</i>)	19,9
8²	1,67 (<i>t</i> , $J = 7,5$ Hz, 3H)	17,5	1,70 (<i>t</i>)	17,6
9	-	155,2		155,4
10	9,55 (<i>s</i> , 1H)	104,2	9,76 (<i>s</i>)	104,7
11	-	137,8		138,4
12	-	129,4		129,4
12¹	3,71 (<i>s</i> , 3H)	12,2	3,77 (<i>s</i>)	12,7
13	-	129,4	-	127,7
13¹	-	192,0	-	192,2
13²	-	-	-	89,4
13²-OH	5,52 (<i>sl</i>)	-	5,47 (<i>s</i>)	-
13³	-	173,2	-	173,3
13⁴	3,68 (<i>s</i>)	19,7	3,62 (<i>s</i>)	53,8
14	-	150,8		150,9
15	-	107,7		107,1
16	-	164,0		164,0
17	4,68 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz, 1H)	50,3	-	51,7
17¹	2,28 (<i>m</i> , 1H) e 2,93 (<i>m</i> , 1H)	31,6	2,25 (<i>m</i>) 2,95 (<i>m</i>)	31,6
17²	2,55 (<i>m</i> , 2H)	32,6	2,55	32,0
17³	-	172,8		173,8
18	4,48 (<i>m</i> , 1H)	50,8	4,56 (<i>m</i>)	173,8
18¹	1,68 (<i>m</i>)	22,6	1,63 (<i>d</i> , $J = 7,0$, 1H)	22,9
19	-	172,4		173,0
20	8,62 (<i>s</i> , 1H)	93,6	8,76 (<i>s</i>)	95,0
P1	4,48 (<i>m</i> , 1H)	50,3	-	
P2	5,21 (<i>t</i> , $J = 7,0$ Hz, 1H)	117,9	-	
P3	-	142,7	-	
P3¹	1,61 (<i>sl</i> , 3H)	16,3	-	
P4	-	39,4	-	
P5	-	24,7	-	
P6	-	36,6	-	
P7	-	32,8	-	
P7¹	-	19,6	-	
P8	-	37,4	-	
P9	-	24,4	-	
P10	-	37,3	-	
P11	-	32,6	-	
P11¹	-	19,7	-	
P12	-	37,3	-	
P13	-	24,8	-	
P14	-	39,8	-	
P15	-	27,9	-	
P15¹	-	22,7	-	
P16	-	22,6	-	
21-NH	-1,11 (<i>sl</i> , 1H)	-	-	
23-NH	-1,42 (<i>sl</i> , 1H)	-	-	

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos dois isômeros *R* e *S* da 13^2 -hidroxi-feofitina-a.

Posição	13^2 -hidroxi-(13^2 - <i>S</i>)-feofitina <i>a</i>		13^2 (<i>R</i>)-13-hidroxi-feofitina <i>a</i>	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	142,0	-	142,8
2	-	131,7	-	132,6
2¹	3,39 (<i>s</i> , 3H)	12,1	3,39 (<i>s</i> , 3H)	12,4
3	-	136,4	-	137,0
3¹	7,95 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 11,5 e 16,5 Hz, 1H)	129,0	7,95 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 11,5 e 16,5 Hz, 1H)	129,4
3²	6,28 (<i>d</i> , <i>J</i> = 17,5 Hz, 1H) 6,16 (<i>d</i> , <i>J</i> = 11,5 Hz, 1H)	122,8 129,0	6,28 (<i>d</i> , <i>J</i> = 17,5 Hz, 1H) 6,16 (<i>d</i> , <i>J</i> = 11,5 Hz, 1H)	123,6 129,4
4	-	136,4	-	136,3
5	9,39 (<i>s</i> , 1H)	97,9	9,37 (<i>s</i> , 1H)	98,4
6	-	155,7	-	150,9
7	-	136,4	-	136,3
7¹	3,19 (<i>s</i> , 3H)	11,2	3,19 (<i>s</i> , 3H)	11,6
8	-	145,2	-	145,3
8¹	3,63 (<i>m</i> , 2H)	19,7	3,63 (<i>m</i> , 2H)	19,9
8²	1,67 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz, 3H)	17,5	1,67 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz, 3H)	17,6
9	-	155,2	-	155,4
10	9,55 (<i>s</i> , 1H)	104,2	9,52 (<i>s</i> , 1H)	104,7
11	-	137,8	-	138,4
12	-	129,4	-	129,4
12¹	3,71 (<i>s</i> , 3H)	12,2	3,71 (<i>s</i> , 3H)	12,7
13	-	129,4	-	127,7
13¹	-	192,0	-	192,2
13²	-	-	-	89,4
13²-OH (<i>R</i>)	5,37 (<i>s</i>)	-	5,37 (<i>s</i>)	-
13²-OH (<i>S</i>)	5,52 (<i>sl</i>)	-	5,52 (<i>sl</i>)	-
13³	-	-	-	173,3
13⁴	3,68 (<i>s</i>)	19,7	3,68 (<i>s</i>)	53,8
14	-	150,8	-	150,9
15	-	107,7	-	107,1
16	-	164,0	-	164,0
17	4,68 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz, 1H)	50,3	4,15 (<i>m</i> , 1H)	51,7
17¹	2,28 (<i>m</i> , 1H) e 2,93 (<i>m</i> , 1H)	31,6	2,28 (<i>m</i> , 1H) e 2,93 (<i>m</i> , 1H)	31,6
17²	2,55 (<i>m</i> , 2H)	32,6	2,55 (<i>m</i> , 2H)	32,0
17³	-	172,8	-	173,8
18	4,48 (<i>m</i> , 1H)	50,8	4,48 (<i>m</i> , 1H)	173,8
18¹	1,68 (<i>m</i>)	22,6	1,68 (<i>m</i>)	22,9
19	-	172,4	-	173,0
20	8,62 (<i>s</i> , 1H)	93,6	8,59 (<i>s</i> , 1H)	95,0
P1	4,48 (<i>m</i> , 1H)	61,5	4,48 (<i>m</i> , 1H)	61,6
P2	5,21 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,0 Hz, 1H)	117,9	5,16 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,0 Hz, 1H)	118,0
P3	-	142,7	-	142,8
P3¹	-	17,4	-	17,4
P4	-	39,8	-	39,4
P5	-	25,0	-	24,8
P6	-	36,7	-	36,7
P7	-	32,8	-	32,6
P7¹	-	19,7	-	19,6
P8	-	37,4	-	37,3
P9	-	24,4	-	24,4
P10	-	37,3	-	37,3
P11	-	31,9	-	31,9
P11¹	-	19,7	-	19,6
P12	-	37,3	-	37,3
P13	-	28,0	-	28,0
P14	-	39,8	-	39,4
P15	-	27,9	-	27,9
P15¹	-	22,7	-	22,7
P16	-	22,6	-	22,6
21-NH	-1,11 (<i>sl</i> , 1H)	-	-1,11 (<i>sl</i> , 1H)	-
23-NH	-1,42 (<i>sl</i> , 1H)	-	-1,42 (<i>sl</i> , 1H)	-

5.3. Identificação estrutural de Sv-3

O composto codificado como *Sv-3* foi obtido na forma de um sólido verde-escuro amorfó com ponto de fusão entre 169-171,0 °C e com rendimento de 20 mg, ou seja, 0,003% em relação ao extrato.

Assim como *Sv-2*, os espectros de IV, RMN ^1H e ^{13}C (500 e 150 MHz, respectivamente, CDCl_3) de *Sv-3* (**Figuras 48-57**, pág. 87-93) apresentaram sinais que permitiram sugerir que a substância em questão também pertence a classes das feofitinas, uma vez que é possível observar sinais para o esqueleto porfirínico, os dois hidrogênios N-H pirrólicos, a cadeia fitílica em C-17³. Além disso, os deslocamentos dos sinais em δ_{H} 3,19 e δ_{C} 11,2 do hidrogênio e carbono da posição classifica o derivado porfirínico de natureza do tipo “a”.

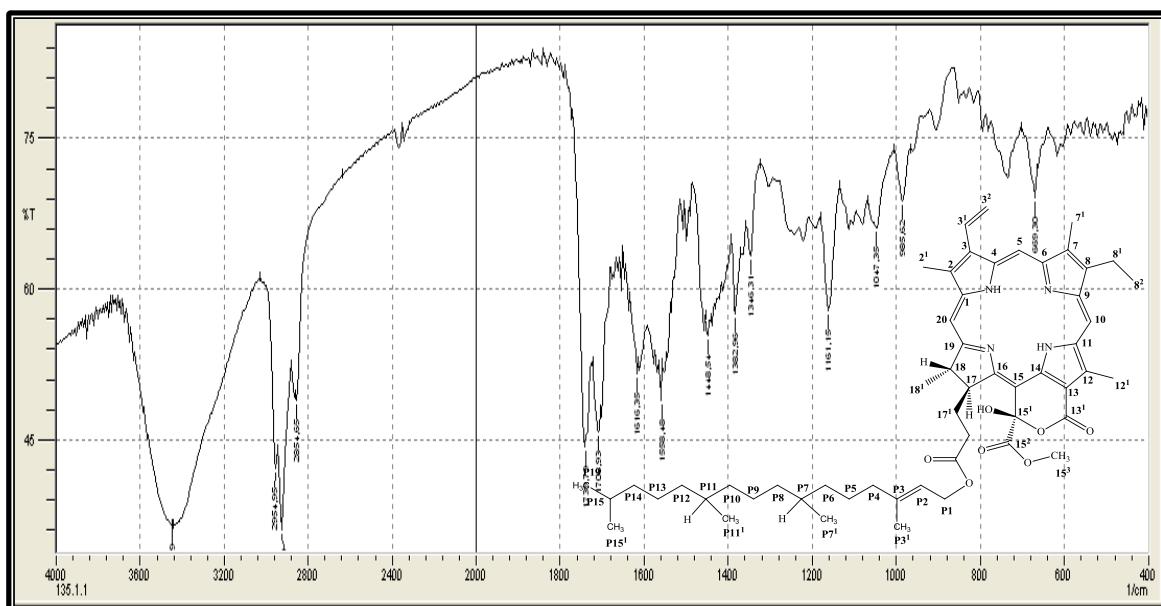


Figura 48. Espectro de Infravermelho ($\text{KBr}, \text{cm}^{-1}$) de *Sv-3*.

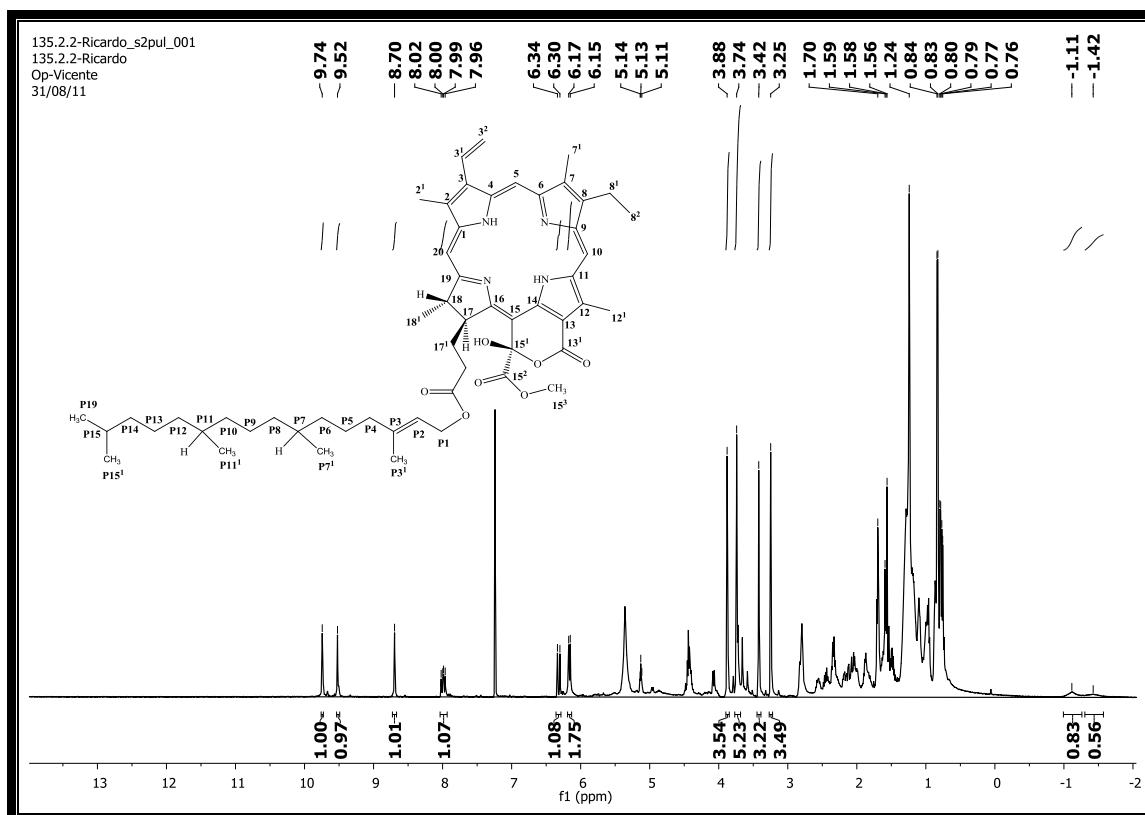


Figura 49. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *Sv-3*.

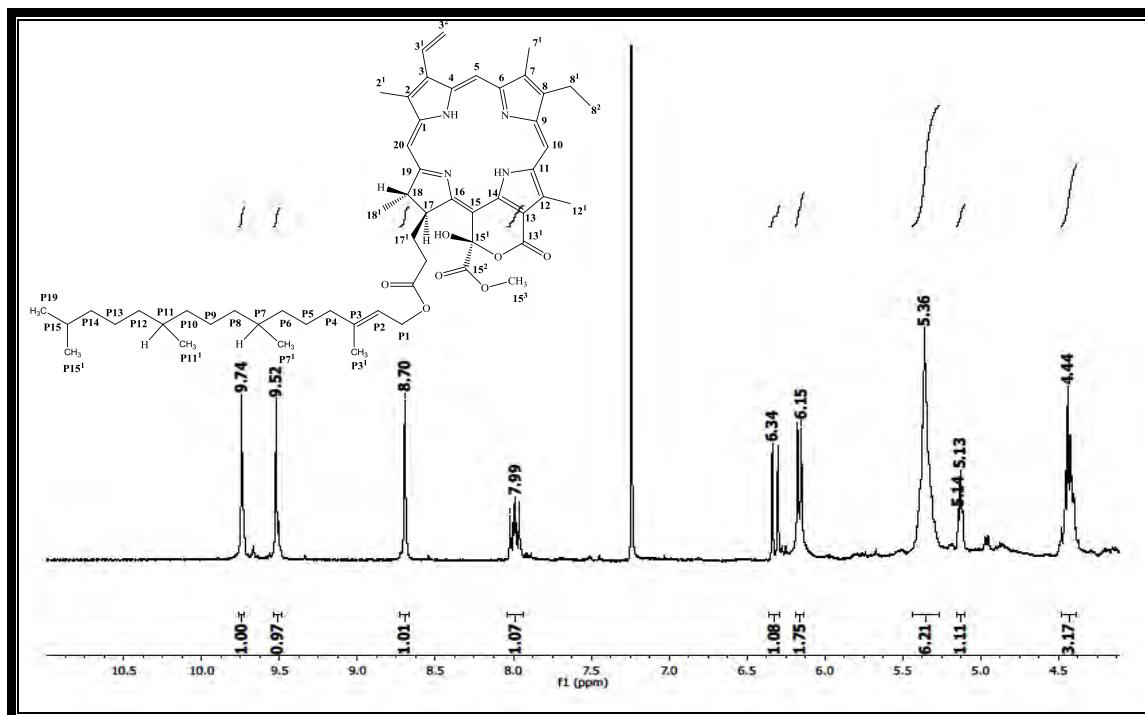


Figura 50. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *Sv-3* na região de 4,5 – 10,5 ppm.

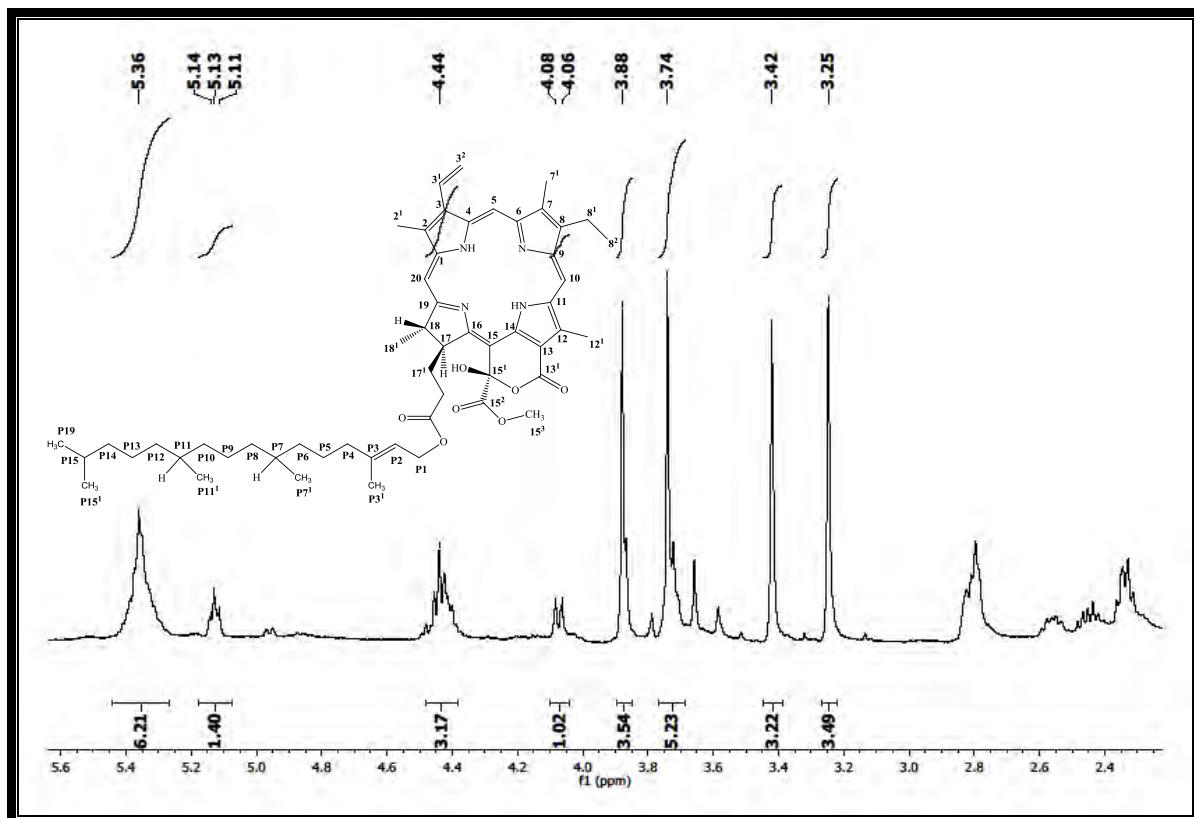


Figura 51. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *Sv-3* na região de 2.95 – 4.05 ppm.

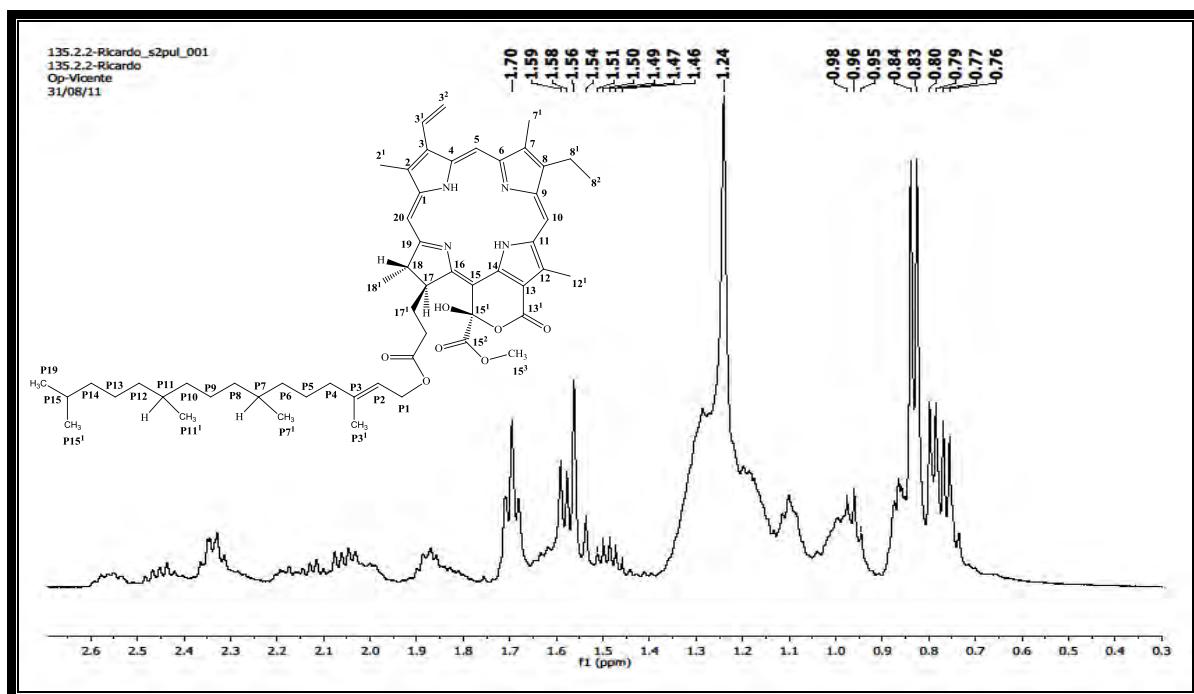
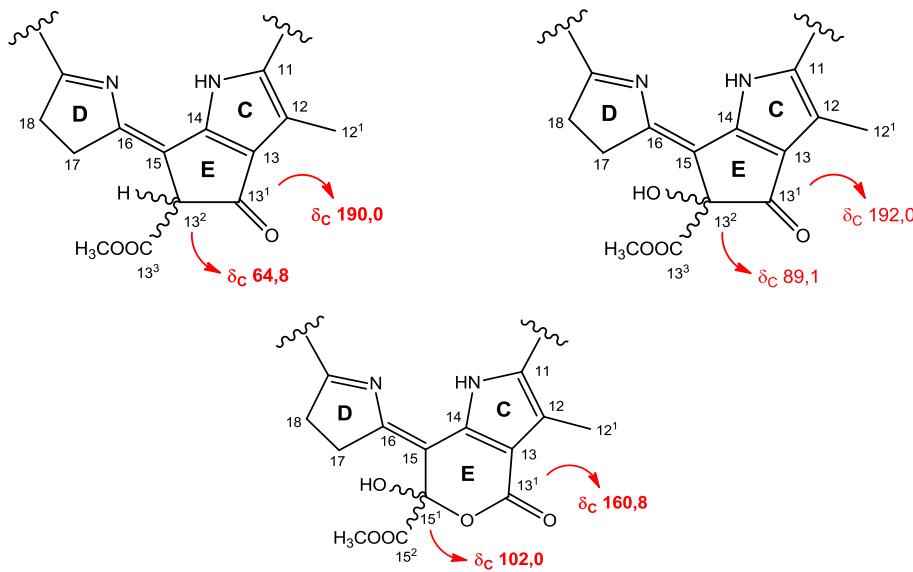


Figura 52. Expansão do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de *Sv-3* na região de 0.30 – 2.60 ppm.

Derivados porfirínicos geralmente são encontrados na natureza apresentando o anel E do tipo ciclopentanona (ver abaixo). No anel do tipo E, a carbonila cetônica encontra-se localizada em C-13¹ e apresenta deslocamento químico em aproximadamente δ_C 190,0 – 192,0. O sinal para carbono C-13² pode variar conforme o tipo de substituinte que possui, sendo aproximadamente δ_C 89,1 quando se trata de um carbono quaternário hidroxilado ou δ_C 64,8 quando o mesmo é um carbono metínico não hidroxilado (KOBAYASHI et al., 1991; MATSUO et al., 1996). No entanto, existem pouquíssimos relatos na literatura de derivados porfirínicos com anel E do tipo δ -lactona conjugada que, segundo alguns autores, se trata de um produto de alomerização daqueles compostos que possuem sistema de anel ciclopentanona (OCAMPO; REPETA, 2004; HUANG et al., 2007). A alomerização é a autooxidação da clorofila a (KOBAYASHI et al., 1991). Neste tipo de anel, a carbonila cetônica foi convertida em carbonila de éster e o sinal da mesma deslocado para frequências menores, aproximadamente δ_C 160,8. O carbono C-15¹, outrora denominado C-13² (antes da alomerização), apresenta-se hidroxilado em todos os relatos e o sinal aparece em torno de δ_C 102,0.



A ausência de sinais em aproximadamente de δ_C 190,0 e 89,1 ou 64,8, bem como, a presença de sinais em δ_C 160,8 para carbonila conjugada e δ_C 102,0 para carbono não hidrogenado (**FIGURA 54**, pág. 91) permitiram propor uma estrutura do tipo δ -lactona conjugada para o anel E de Sv-3. Isto explica o fato do espectro de IV (**figura 48**, pág 87) desta feofitina só apresentar absorção para carbonila de éster em 1739 cm⁻¹.

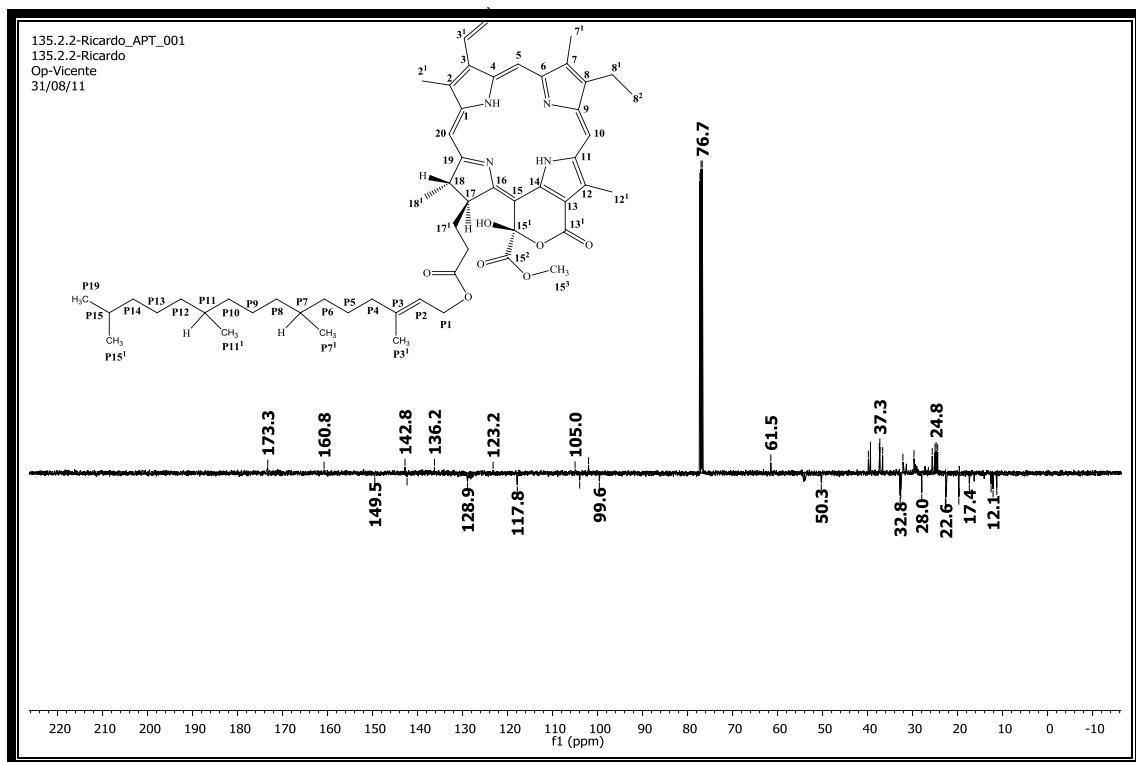


Figura 53. Espectro de RMN ¹³C - APT (CDCl₃, 125 MHz) de Sv-3.

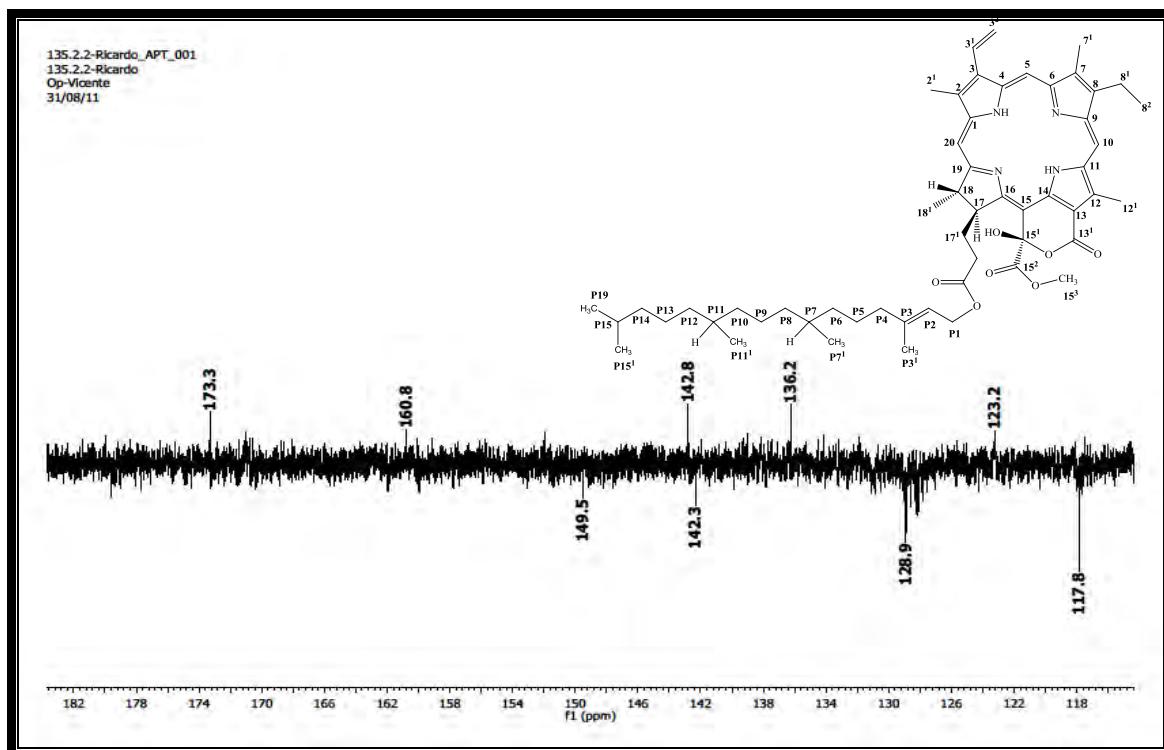


Figura 54. Expansão do espectro de RMN ¹³C - APT (CDCl₃, 125 MHz) de Sv-3 na região de 118,0 – 182,0 ppm.

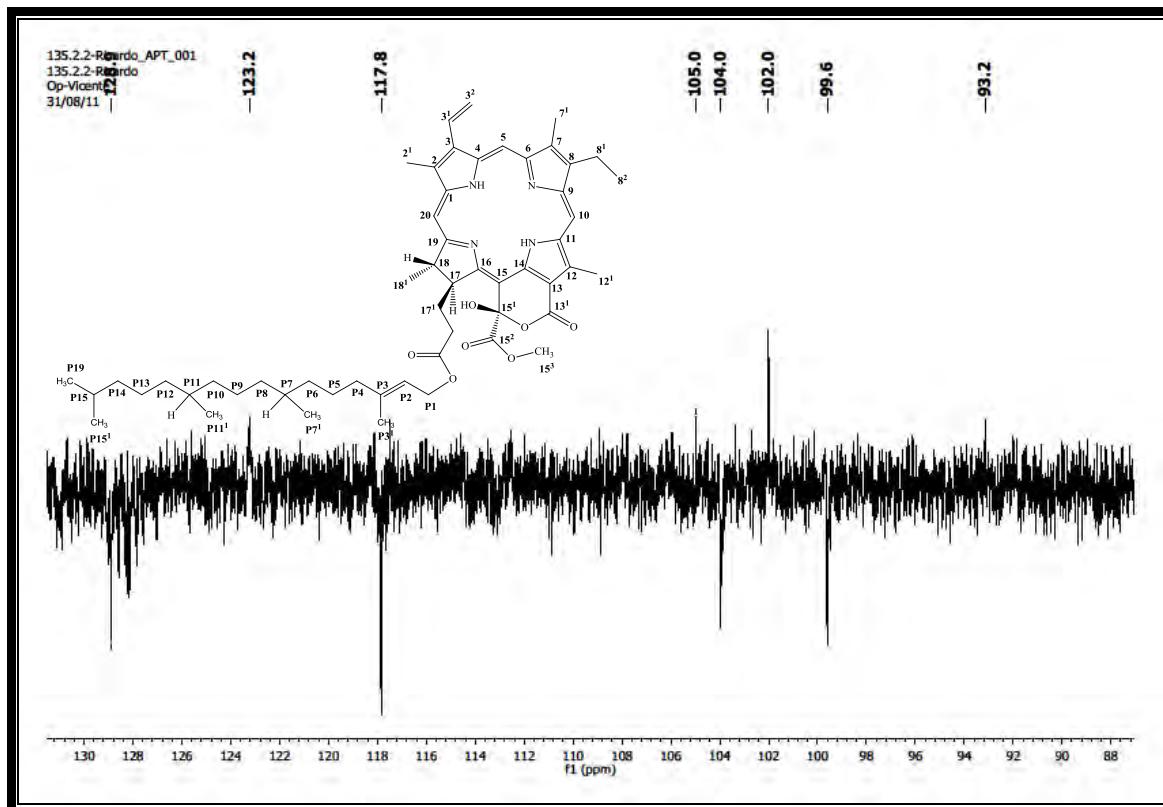


Figura 55. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *Sv-3* na região de 88,0 – 130,0 ppm

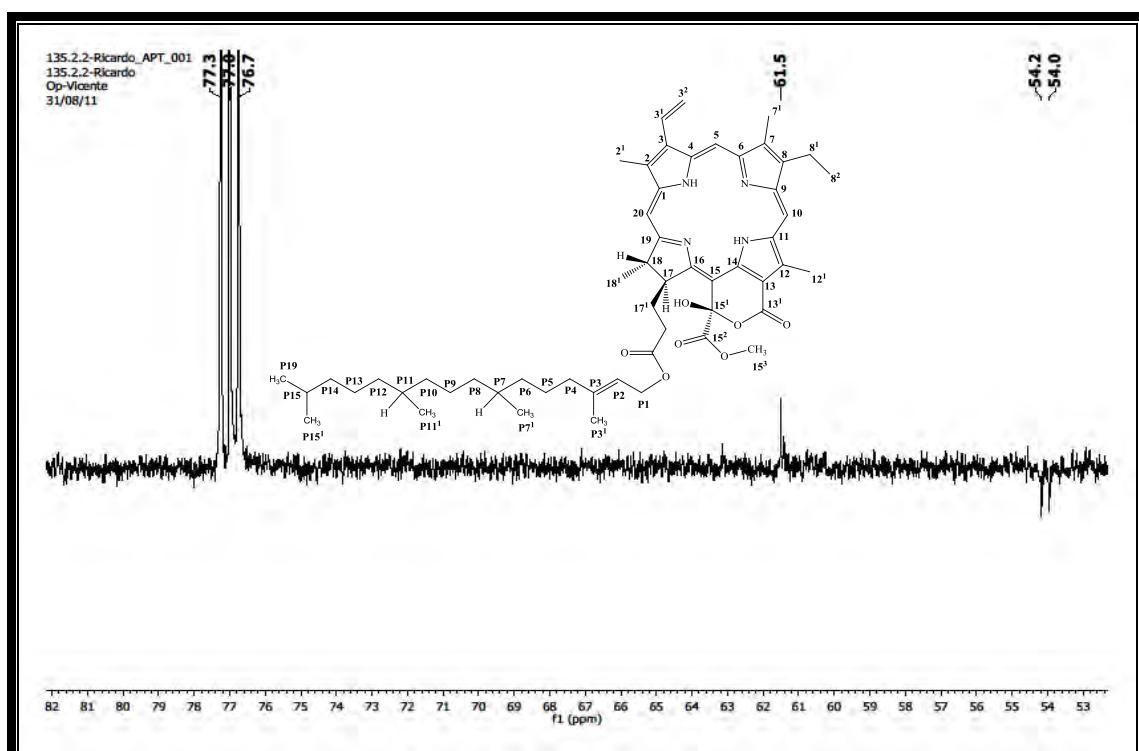


Figura 56. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *Sv-3* na região de 53,0 – 82,0 ppm

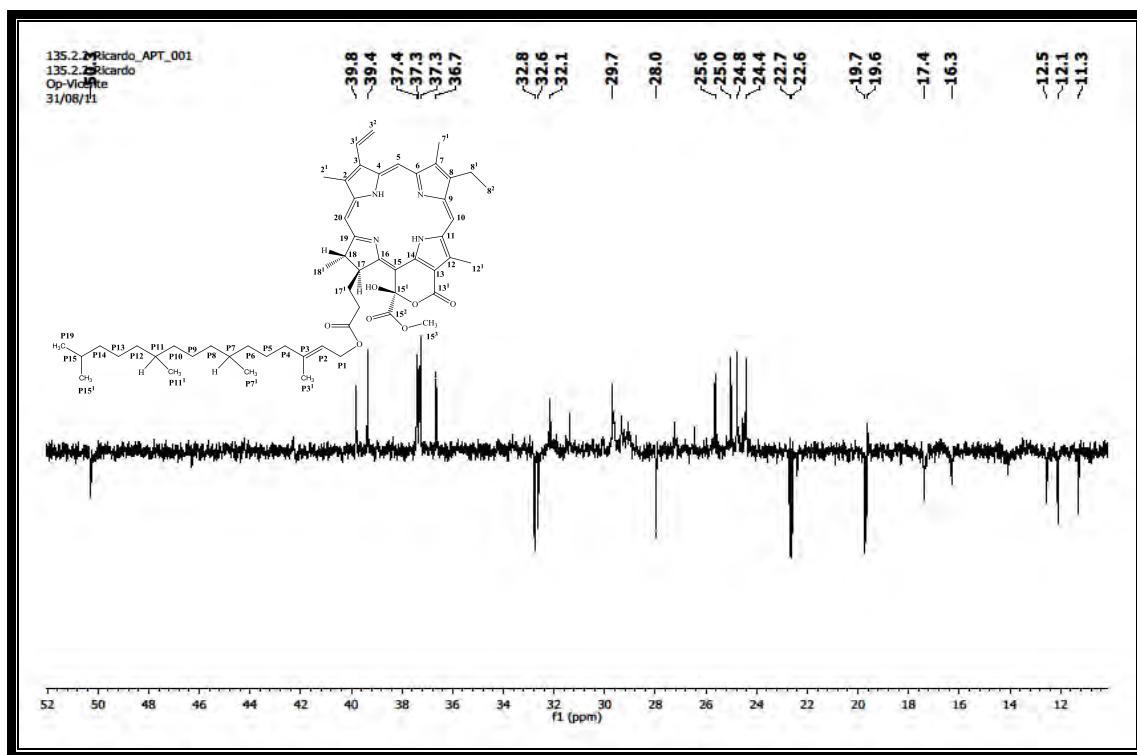


Figura 57. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 125 MHz) de *Sv-3* na região de 12,0 – 520,0 ppm.

O espectro de correlação heteronuclear direta HMQC e as expansões (Figura 58, pág. 94) confirmaram as atribuições feitas aos hidrogênios e aos carbonos olefínicos do sistema porfirínico ao mostrar correlações dos sinais em δ_{H} 9,74 (H-10), 9,52 (H-5) e 8,70 (H-20) com aqueles em δ_{C} 104,0 (C-10), 99,6 (C-5) e 93,2 (C-20), respectivamente; do grupo vinila terminal pelas correlações entre δ_{H} 7,99 ($\text{H}-3^1$) e δ_{C} 129,0 ($\text{H}-3^1$) e entre δ_{H} 6,32/6,16 ($\text{H}-3^2_{(\text{trans})}/\text{H}-3^2_{(\text{cis})}$) e δ_{C} 123,2 (C-3 2); das metilas alílicas em δ_{H} 3,88 (H-12 1), 3,42 (H-2 1) e 3,25 (H-7 1) com δ_{C} 12,5 (C-12 1), 12,1 (C-2 1) e 11,3 (C-7 1), respectivamente; bem como dos demais átomos da molécula (Tabela 5, pág. 77). Além disto, permitiram assinalar os hidrogênios e o carbono da metoxila em C-15 3 ao mostrar correlação do sinal em δ_{H} 3,74 com o sinal em δ_{C} 54,2.

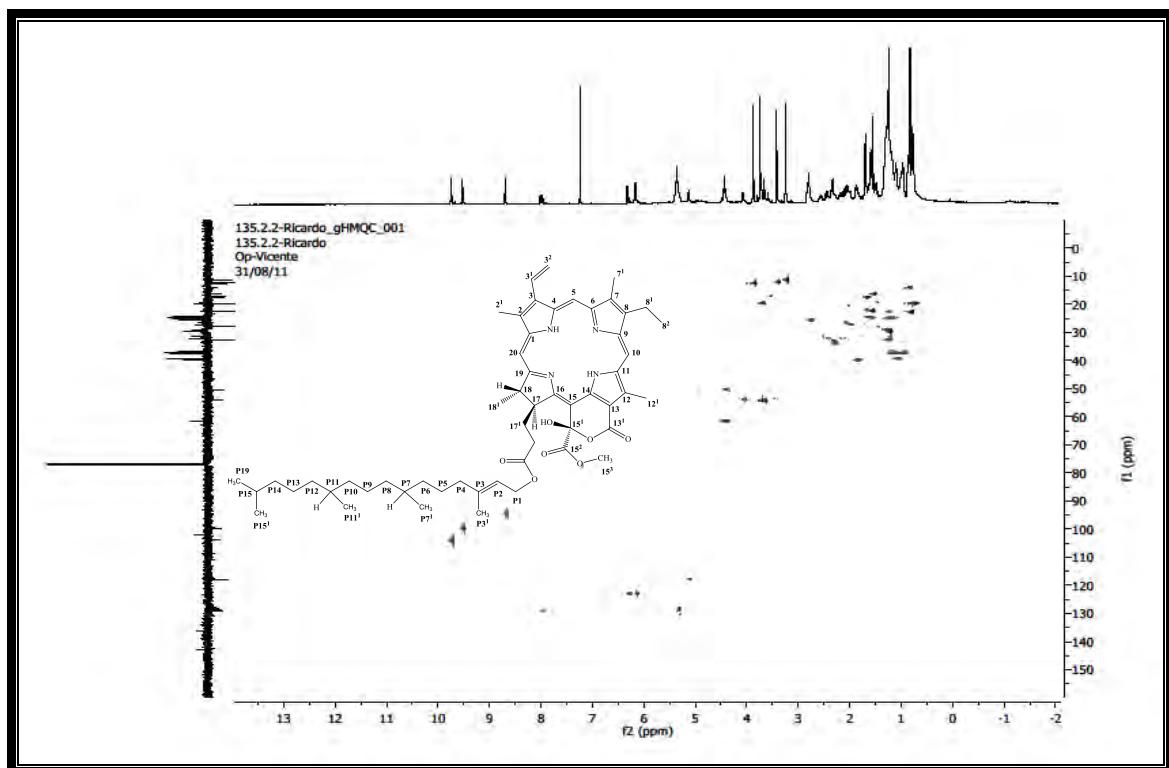


Figura 58. Espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Sv-3.

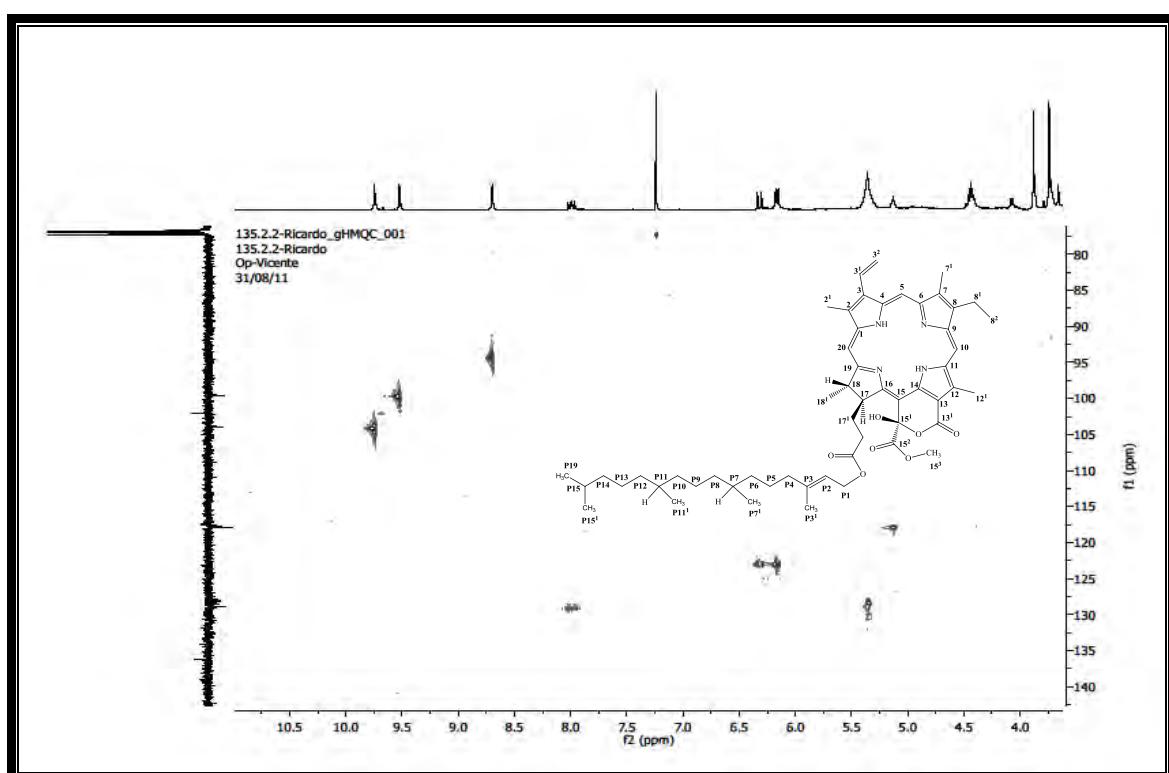


Figura 59. Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de Sv-3 na região de (4,0 – 10,5 ppm) x (80,0 – 140,0 ppm).

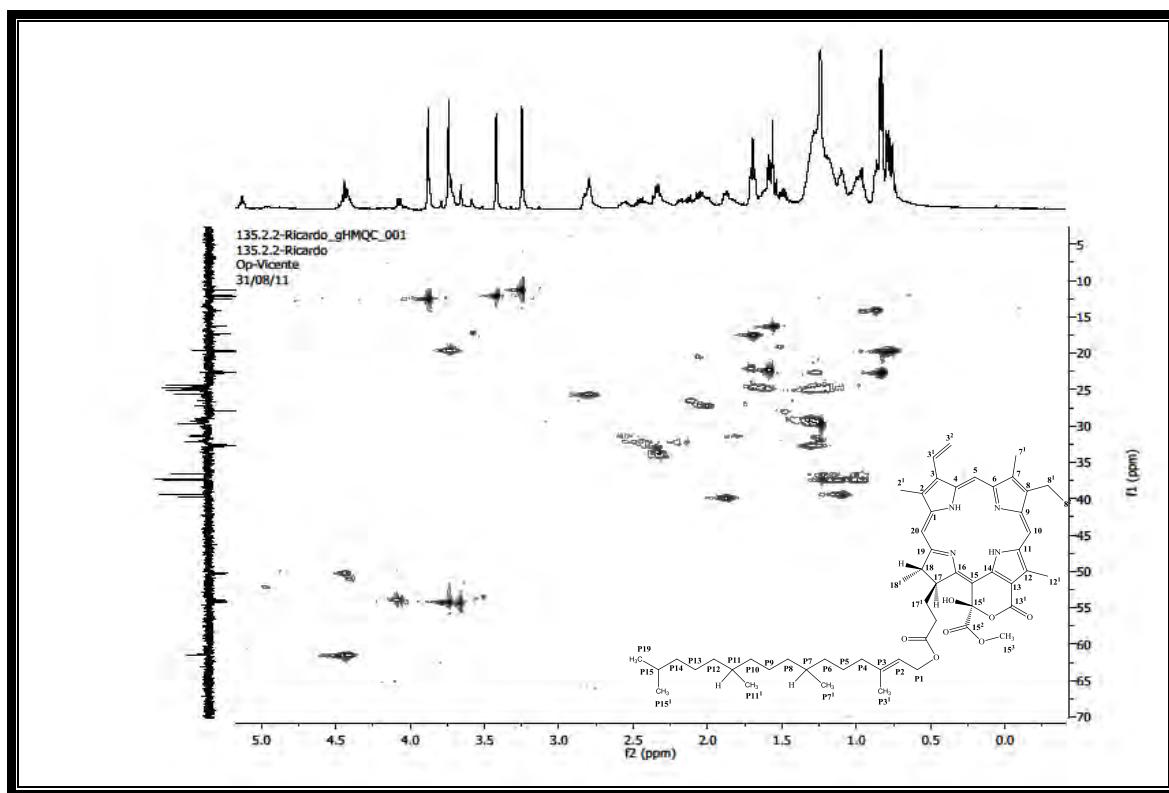


Figura 60. Expansão do espectro HMQC (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) de *Sv-2* na região de (0,0 – 5,0 ppm) x (5,0 – 70,0 ppm).

O espectro de correlação homonuclear COSY e as expansões (FIGURAS 61-63, pág. 96 e 97) confirmaram o acoplamento *trans* e *cis* observado para os hidrogênios $\text{H}-3^1$ e $\text{H}-3^2$ ao mostrar correlações entre δ_{H} 7,99 ($\text{H}-3^1$) e 6,32/6,16 ($\text{H}-3^2_{(\text{trans})}/\text{H}-3^2_{(\text{cis})}$) caracterizando o grupo vinila terminal. Correlação entre o quarteto em δ_{H} 3,74 ($\text{H}-8^1$) e o triploto em δ_{H} 1,70 ($\text{H}-8^2$) confirmou a presença de um radical etila inserido na posição 8. Os espectros de COSY também ratificaram os deslocamentos químicos para os hidrogênios $\text{H}-17^1$ (δ_{H} 1,87 e 2,56) e $\text{H}-17^2$ (δ_{H} 2,17 e 2,43), bem como, dos hidrogênios $\text{H}-18$ (δ_{H} 4,44) e $\text{H}-18^1$ (δ_{H} 1,58), ao mostrar correlação entre estes sinais. Outras correlações foram observadas e são apresentadas na Tabela 6.

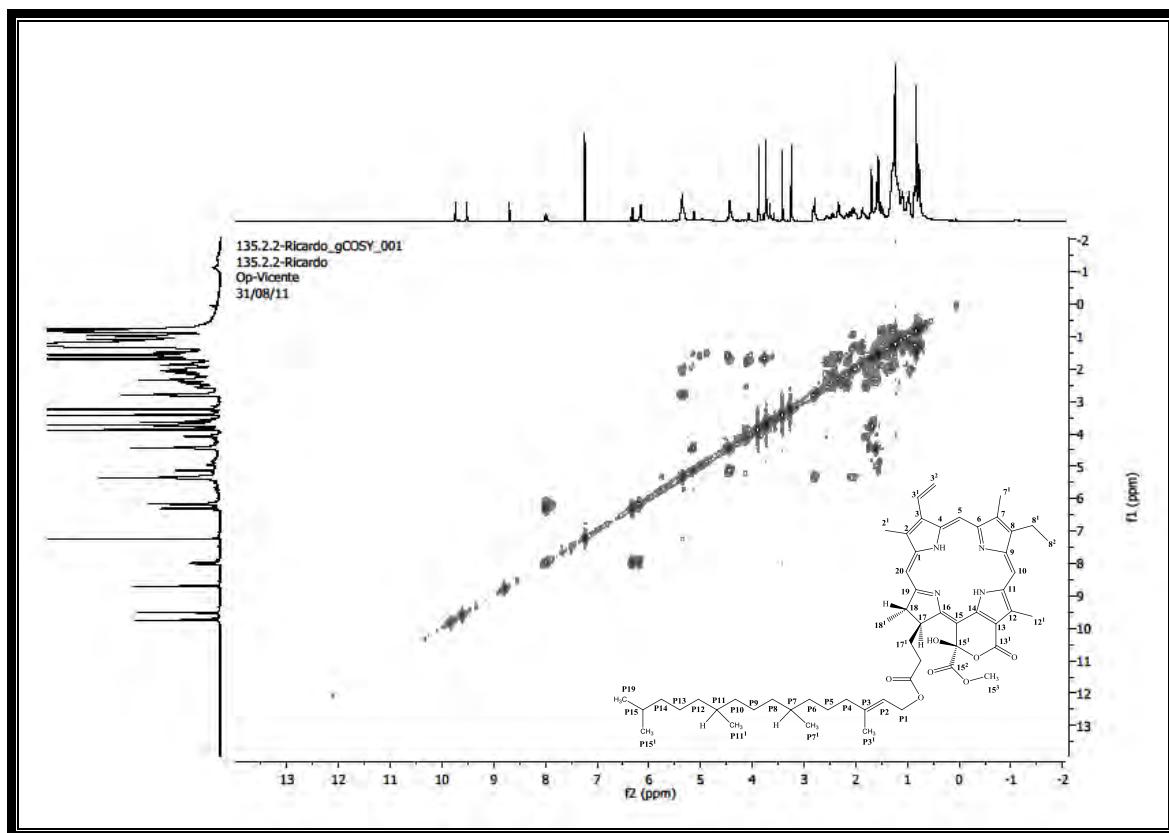


Figura 61. Espectro COSY (500 MHz, CDCl₃) de Sv-3.

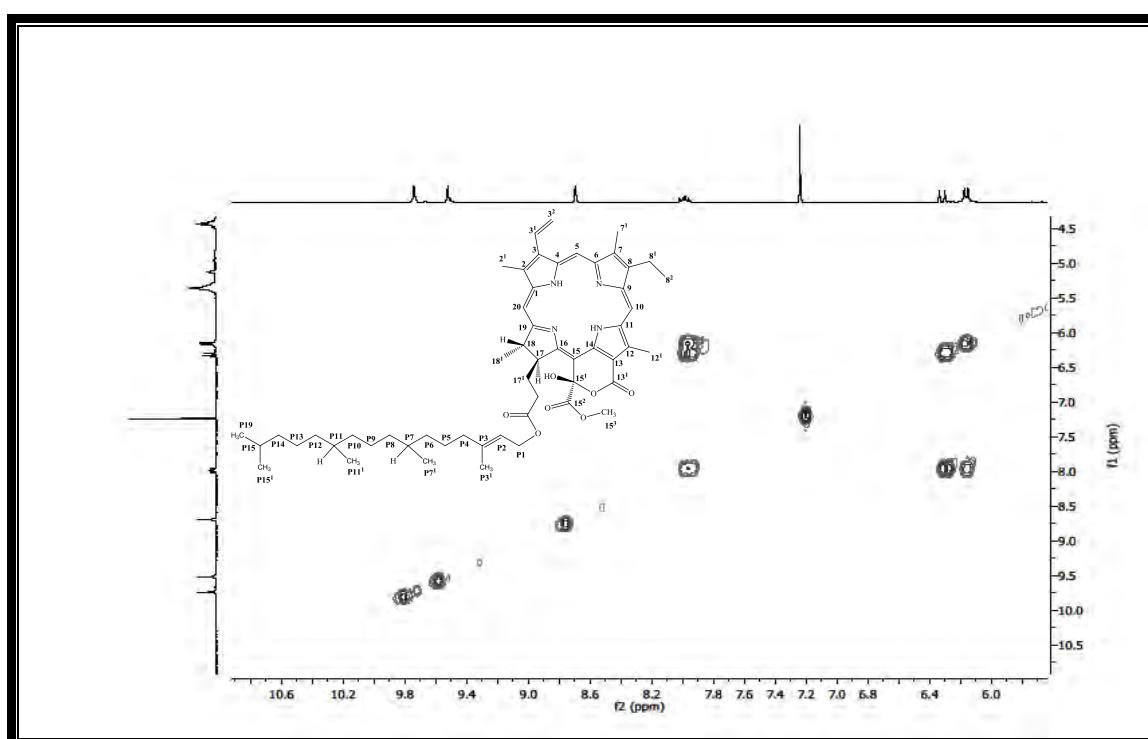


Figura 62. Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl₃) de Sv-3 na região de (5,5 – 9,0 ppm) x (5,5 – 9,0 ppm).

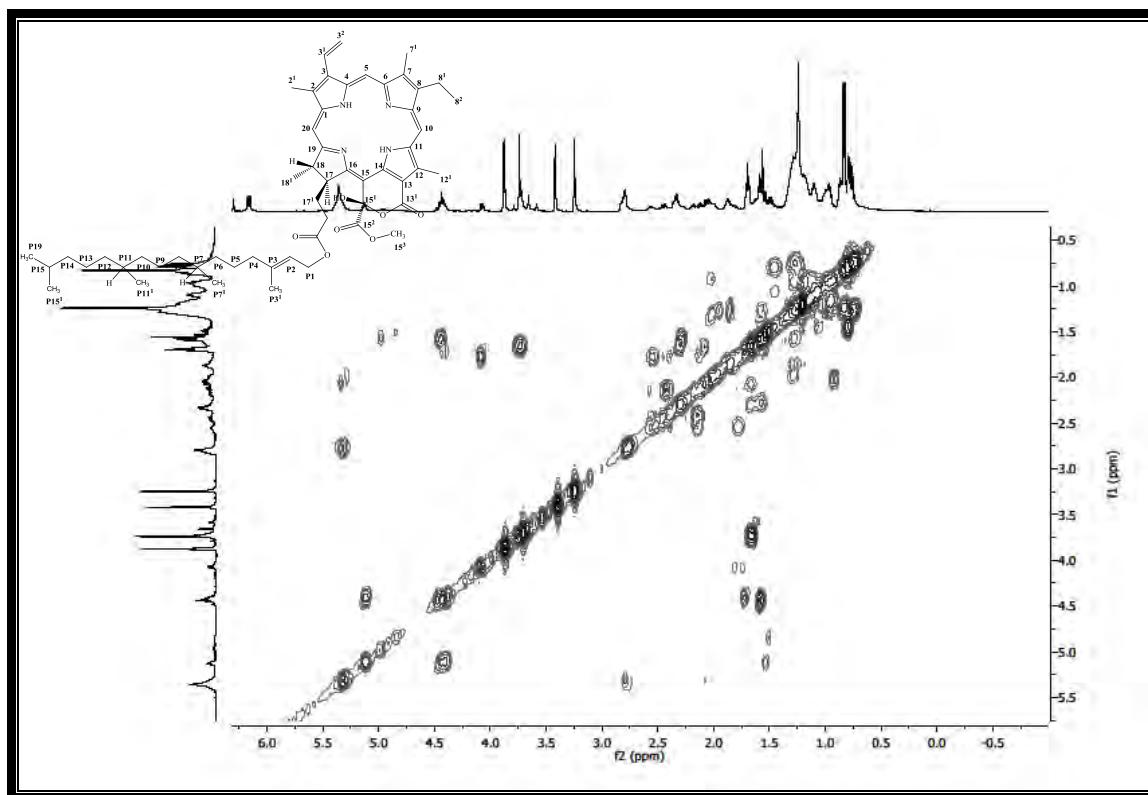


Figura 63. Expansão do espectro COSY (500 MHz, CDCl_3) de *Sv-3* na região de (-0,5 – 6,0 ppm) x (-0,5 – 5,5 ppm).

A completa análise da estrutura porfirínica foi realizada por análise das correlações a duas (2J) e três ligações (3J), apresentadas nos espectros de correlação heteronuclear indireta HMBC (FIGURA 64, pág. 98), para os hidrogênios H-5, H-10 e H-20 que mostraram a conectividade entre os quatro anéis pirrólicos. O sinal de H-5 (δ_{H} 9,52) mostrou correlação a 3J com C-3 (δ_{C} 136,2) do anel A. O H-10 (δ_{H} 9,74) fez correlação a 3J com C-8 (δ_{C} 145,6) do anel B e a 2J e 3J com os carbonos C-11 (δ_{C} 138,7) e C-12 (δ_{C} 131,4) do anel C, respectivamente. Semelhantemente, o H-20 (δ_{H} 8,70) mostrou correlação a 2J e 3J com C-1 (δ_{C} 142,0) e C-2 (δ_{C} 131,8), ambos do anel A.

Os espectros HMBC também apresentaram dados que confirmaram a localização do grupo vinila terminal em C-3 ao mostrar correlação a 3J entre os hidrogênios terminais H-3² (δ_{H} 6,32 e 6,16) e o carbono C-3 (δ_{C} 136,2), bem como, do radical etila em C-8 pela correlação entre os hidrogênios H-8¹ (δ_{H} 3,74) e H-8² (δ_{H} 1,70) com C-8 (δ_{C} 145,6). Uma correlação a 3J dos hidrogênios da metoxila H-15³ em δ_{H} 3,74 com o sinal para a carbonila C-15² em δ_{C} 170,9 definiu a posição do metil-éster.

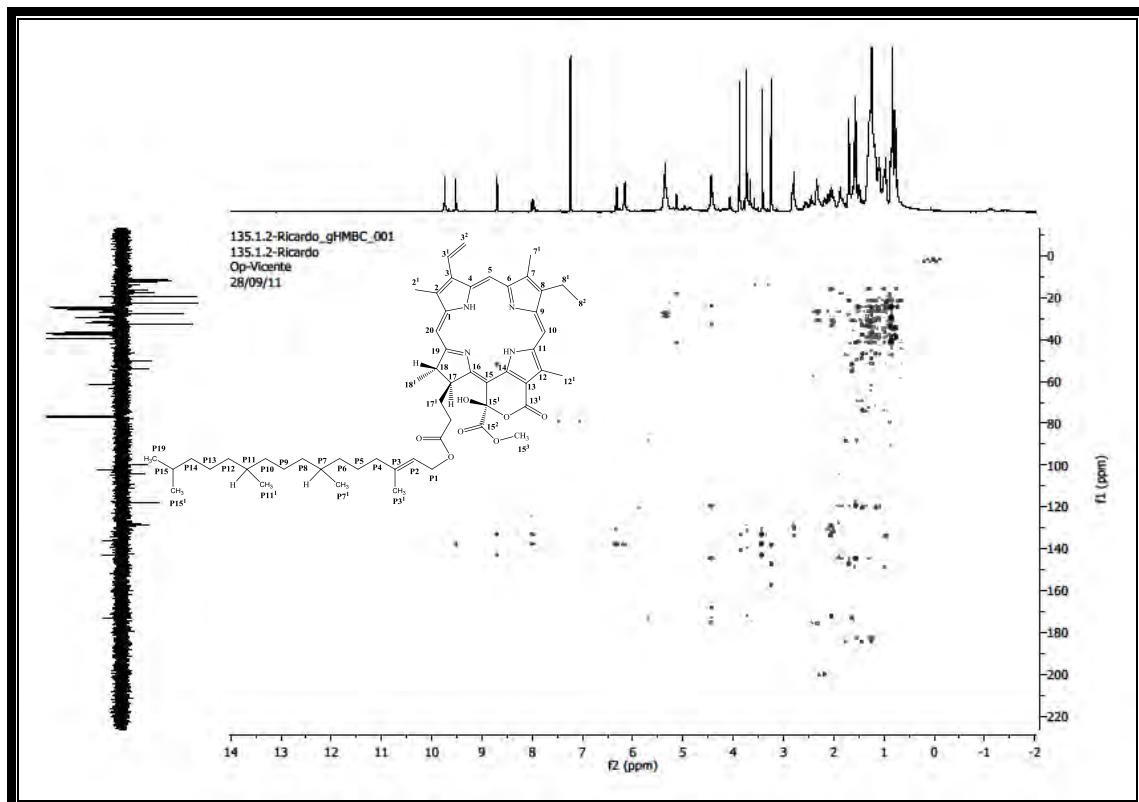


Figura 64. Espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Sv-3*.

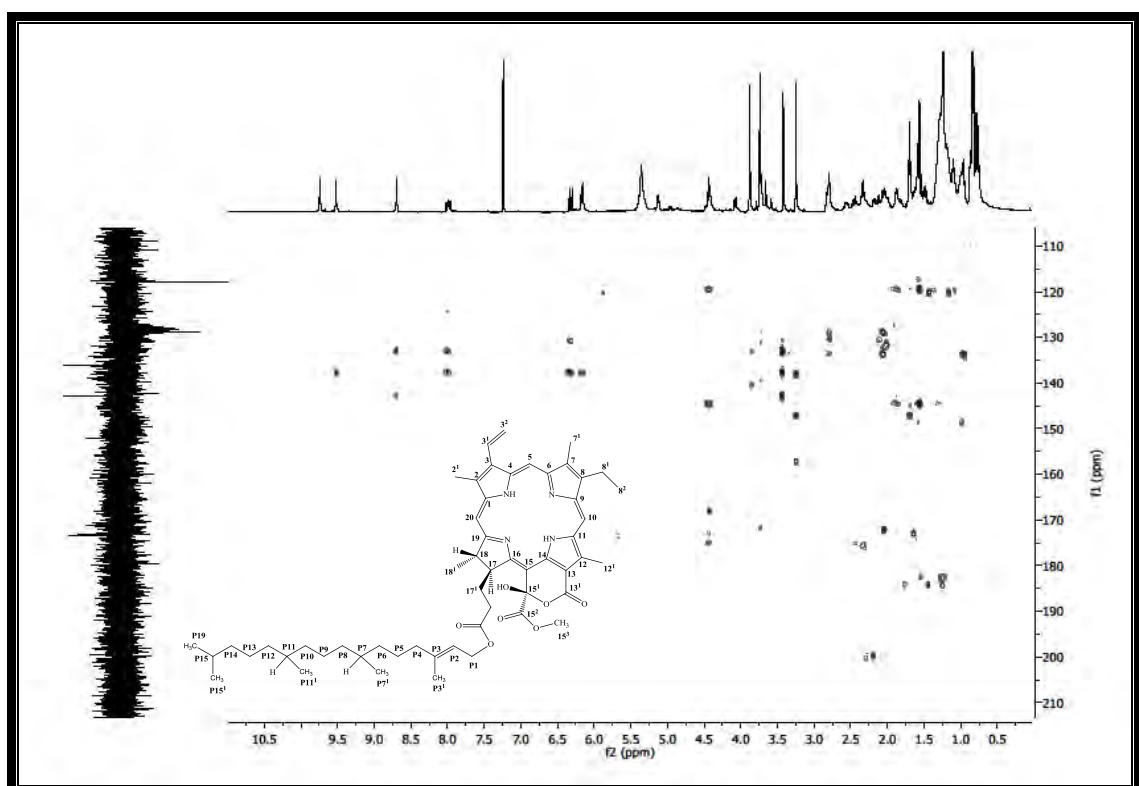


Figura 65. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Sv-3* na região de (0,5 – 10,5 ppm) x (110,0 – 210,0 ppm).

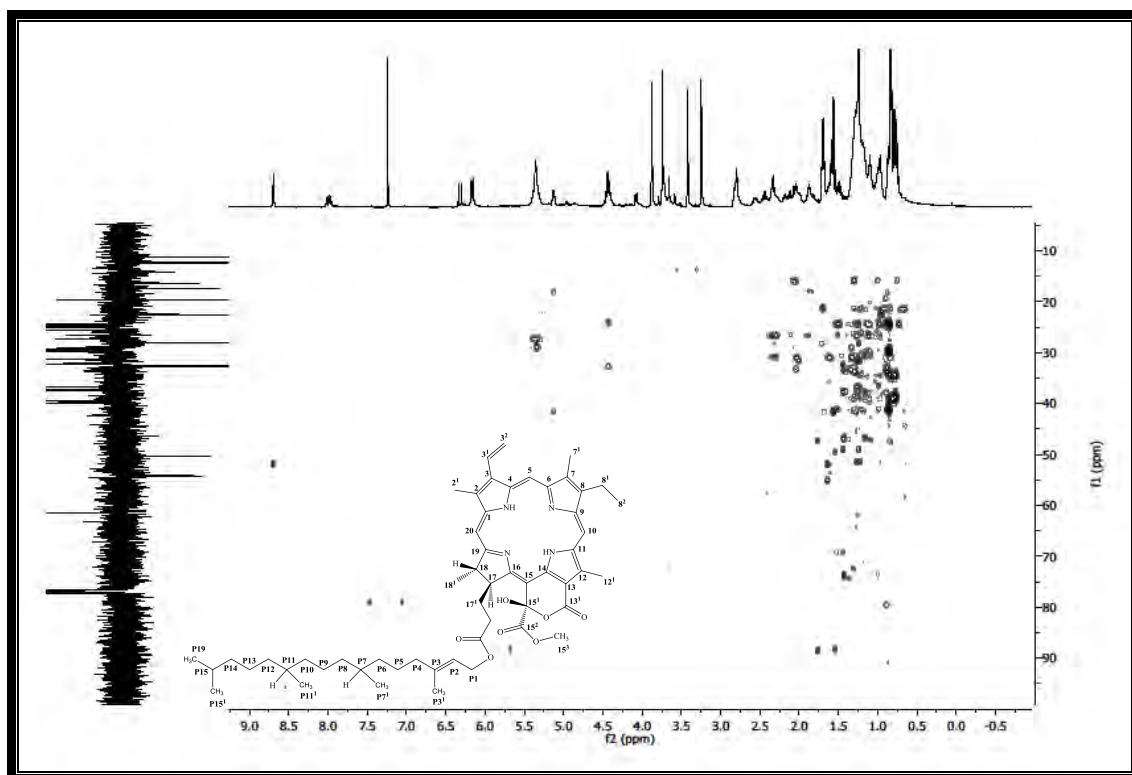
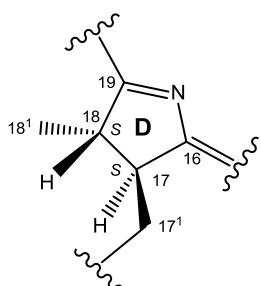


Figura 66. Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de *Sv-3* na região de (-0,5 – 9,0 ppm) x (10,0 – 90,0 ppm).

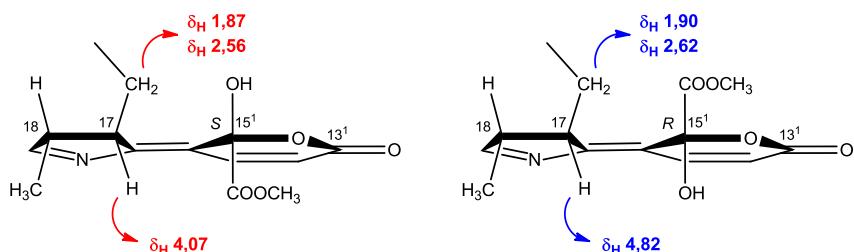
A análise do espectro de correlação homonuclear NOESY e as expansões (**FIGURA 67**, pág. 101) contribuíram para a confirmação do sistema porfirínico ao mostrar correlações espaciais entre hidrogênios que evidenciam a conectividade entre os quatro anéis pirrólicos: H-5 (δ_{H} 9,52) com H-3¹ (δ_{H} 7,99) do anel A; H-7¹ (δ_{H} 3,25) do anel B; H-10 (δ_{H} 9,74) com H-8¹ (δ_{H} 3,74) do anel B e H-12¹ (δ_{H} 3,88) do anel C; e H-20 (δ_{H} 8,69) com H-2¹ (δ_{H} 3,42) do anel A e H-18 (δ_{H} 4,44) do anel D.

A estereoquímica do anel D foi determinada pelo tipo de sinal gerado pelos hidrogênios H-17 e H-18 no espectro de RMN ¹H (**FIGURA 49**, pág. 88) o H-17 aparece como um duplo em δ_{H} 4,07 ($J = 10$ Hz) o que faz sugerir que o mesmo só acopla com os dois hidrogênios H-17¹ (δ_{H} 1,87 e 2,56) não equivalentes quimicamente; o H-18 aparece como um quarteto em δ_{H} 4,44 (*m*), sinal este, que reflete acoplamento apenas com os três hidrogênios H-18¹ (δ_{H} 1,58). O não acoplamento ($J = 0$ Hz) entre os hidrogênios H-17 e H-18 só é possível se o ângulo diedro entre esses dois átomos vicinais for de 90° (SILVERSTEIN et al., 2007; PAVIA et al., 2001), ou seja, se a orientação espacial desses hidrogênios for *trans* (HUANG et al., 2007). Sendo assim, a estereoquímica do anel D foi definida como 17*S* e 18*S* semelhante aos de outras feofitinas já relatadas na literatura. O espectro NOESY corroborou com estas

observações ao mostrar uma correlação espacial entre os sinais para os hidrogênios H-17 e H-18¹.



A configuração de C-15¹ foi determinada como *S*, baseado na blindagem apresentada pelos hidrogênios H-17 (δ_H 4,07) e H-17' (δ_H 1,87 e 2,56) (FIGURA 51, pág. 89), em contraste com δ_H 4,82 para a configuração *R*, como concluído por Nakatani e colaboradores (1981), Huang e colaboradores (2007), Kobayashi e colaboradores (1991) e apresentado abaixo:



Assim, a análise dos espectros de IV e RMN de 1H e ^{13}C uni e bidimensionais de *Sv-3*, bem como, a comparação com os dados da literatura permitiram identificá-la como sendo uma **15¹-hidroxi-(15¹-S)-porfirinolactona a** (Figura 69, pág. 102). O relato desta substância no reino vegetal é bastante escasso. A mesma já foi isolada das folhas do bambu *Phyllostachys pubescens* (Poaceae) (NATIONAL, 2004), de trabalhos produzidos neste programa de pós-graduação como *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae) (NUNES et al., 2008) e *Anisacanthus brasiliensis* Lindau (Acanthaceae) (DIAS et al., 2007) e *Richardia brasilienses* Gomes (Sousa, 2010). No entanto é a primeira vez que 15¹-hidroxi-(15¹-S)-porfirinolactona a é isolada na família Sargassaceae.

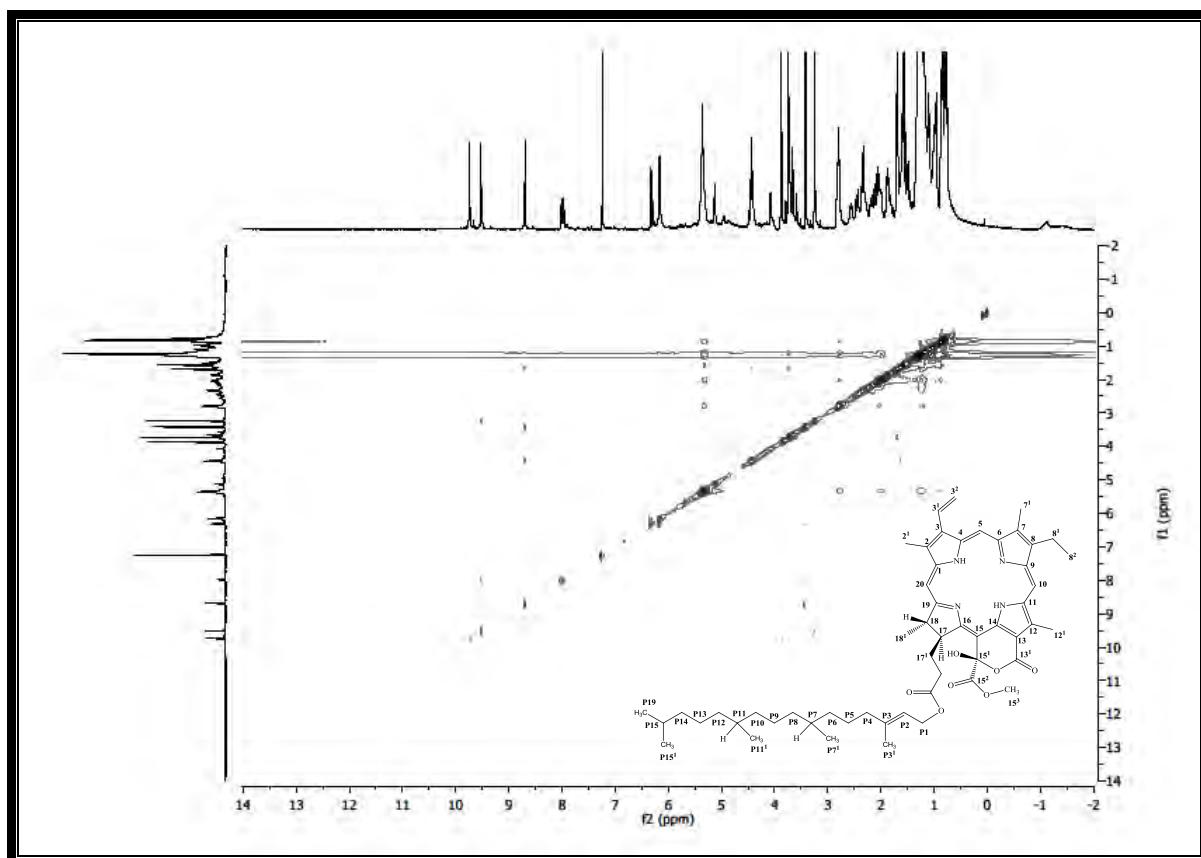


Figura 67. Espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) de *Sv-3*.

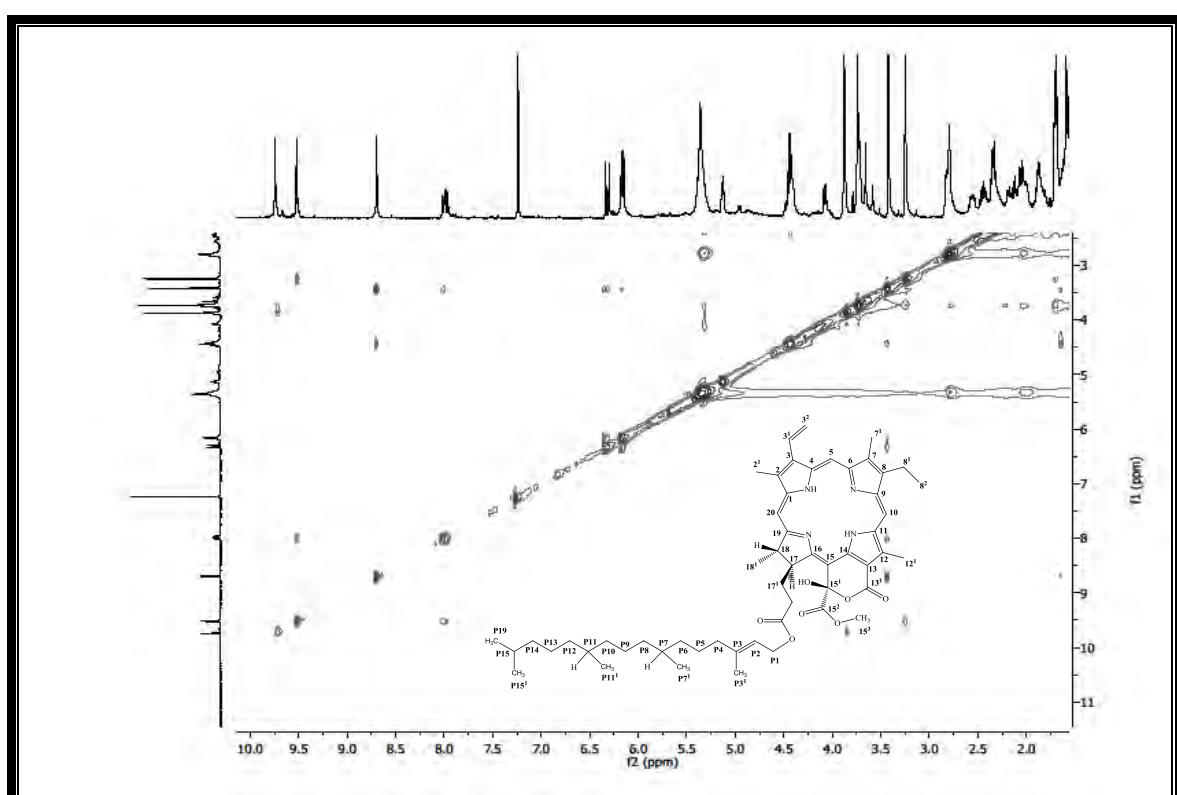


Figura 68. Expansão do espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) de *Sv-3* na região de (3,0 – 11,0 ppm) x (3,0 – 11,0 ppm).

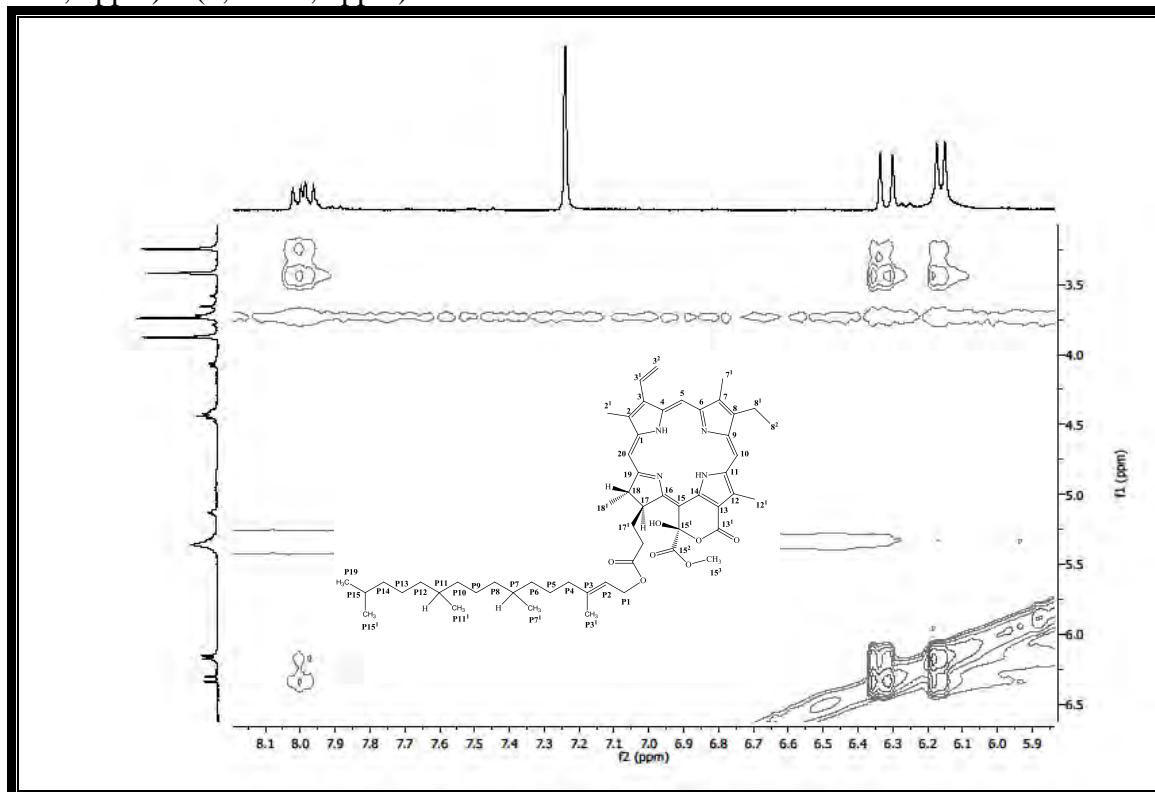


Figura 69. Expansão do espectro NOESY (500 MHz, CDCl_3) de *Sv-3* na região de (3,5 – 6,5 ppm) x (5,9 – 8,1 ppm).

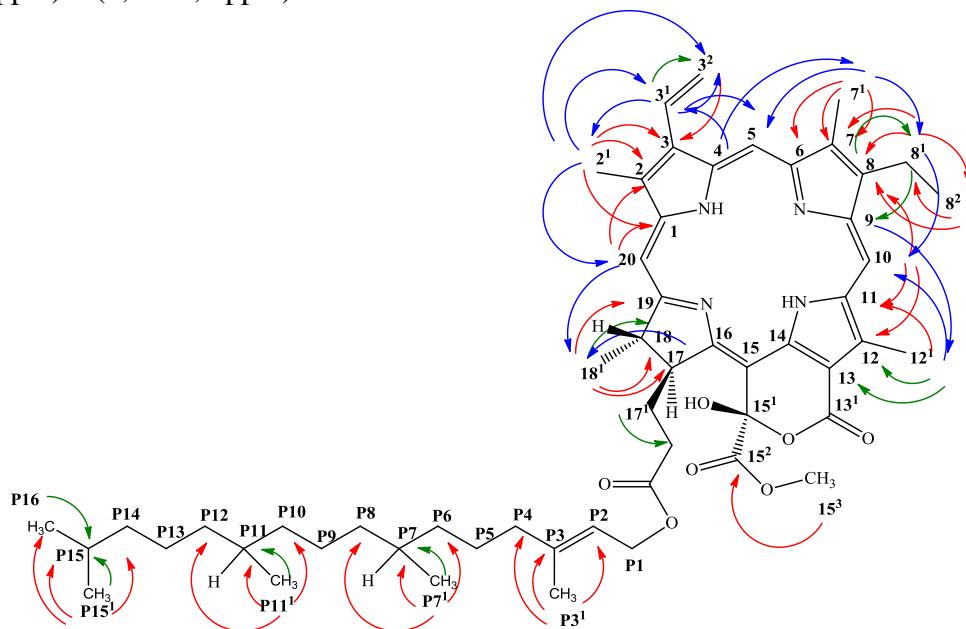


Figura 70. Correlações bidimensionais de *Sv-3* observadas espectros de HMBC, COSY e NOESY.

MONTES, R. C. - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 6. Deslocamentos químicos, tipos de sinal e correlações para *Sv-3* verificados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (500 e 125 MHz, respectivamente) uni e bidimensionais em CDCl_3 .

C	HMQC		HMBC		COSY	NOESY
	δ_{C}	δ_{H}	2J	3J		
1	141,2	-				
2	131,5	-				
2 ¹	12,1	3,42 (<i>s</i> , 3H)	C-2	C-1, C-3	H-20, H-3 ¹ , H-3 ²	
3	136,1	-				
3 ¹	128,9	7,99 (<i>dd</i> , $J = 10,0$ e $20,0$ Hz, 1H)			H-3 ²	H-5, H-3 ² , H-2 ¹
3 ²	123,2	6,32 (<i>d</i> , $J = 20,0$ Hz, 1H) 6,16 (<i>d</i> , $J = 20,0$ Hz, 1H)		C-3	H-3 ¹	H-2 ¹
4	136,0	-				
5	99,6	9,52 (<i>s</i> , 1H)		C-3		H-3 ¹ , H-7 ¹
6	155,7	-				
7	136,5	-				
7 ¹	11,3	3,25 (<i>s</i> , 3H)	C-7	C-6, C-8	H-5, H-8 ¹	
8	145,6	-				
8 ¹	19,6	3,73 (<i>q</i> , $J = 5,0$ e $15,0$ Hz, 2H)	C-8 ² , C-8	C-9, C-7	H-8 ²	H-10, H-7 ¹
8 ²	17,5	1,70 (<i>t</i> , $J = 7,5$ Hz, 3H)	C-8 ¹	C-8	H-8 ¹	
9	150,0	-				
10	104,1	9,74 (<i>s</i> , 1H)	C-11	C-8, C-12	H-12 ¹ , H-8 ¹	
11	138,7	-				
12	131,4	-				
12 ¹	12,5	3,88 (<i>s</i> , 3H)	C-12	C-11, C-13	H-10	
13	111,4	-				
13 ¹	160,8	-				
14	145,6	-				
15	134,8	-				
15 ¹	102,0	-				
15 ²	170,9	-				
15 ³	54,2	3,74 (<i>s</i> , 3H)		C-15 ²		
16	166,3	-				
17	53,8	4,07 (<i>d</i> , $J = 10,0$ Hz, 1H)				H-18 ¹
17 ¹	32,2	1,87 (<i>m</i> , 1H) e 2,56 (<i>m</i> , 1H)			H-17 ¹	
17 ²	31,4	2,17 (<i>m</i> , 1H) e 2,43 (<i>m</i> , 1H)			H-17 ²	
17 ³	173,2	-				
18	50,2	4,44 (<i>m</i>)			H-18 ¹	H-20
18 ¹	22,2	1,58 (<i>d</i> , $J = 5,0$ Hz, 3H)	C-18	C-19, C-17	H-18	H-17
19	171,1	-				
20	93,8	8,70 (<i>s</i> , 1H)	C-1	C-2		H-18, H-2 ¹
P1	61,5	4,44 (<i>m</i> , 2H)			H-P2	
P2	117,8	5,13 (<i>t</i> , $J = 6,5$ Hz, 1H)			H-P1	
P3	142,8	-				
P3 ¹	16,3	1,56 (<i>sl</i> , 3H)	C-P3	C-P2, C-P4		
P4	39,8	1,87 (<i>m</i> , 2H)				
P5	25,0	1,29 (<i>m</i> , 2H)				
P6	36,7	0,97 (<i>m</i> , 2H)				
P7	32,8	1,29 (<i>m</i> , 1H)			H-P7 ¹	
P7 ¹	19,6	0,76 (<i>d</i> , $J = 6,5$ Hz, 3H)	C-P7	C-P6, C-P8	H-P7	
P8	37,4	1,24 (<i>m</i> , 2H)				
P9	24,4	1,24 (<i>m</i> , 2H)				
P10	37,3	0,97 (<i>m</i> , 2H)				
P11	32,6	1,24 (<i>m</i> , 1H)			H-P11 ¹	
P11 ¹	19,7	0,79 (<i>d</i> , $J = 6,6$ Hz, 3H)	C-P11	C-P10, C-P12	H-P11	
P12	37,3	0,97 (<i>m</i> , 2H)				
P13	24,8	1,65 (<i>m</i> , 2H)				
P14	39,4	1,10 (<i>m</i> , 2H)				
P15	27,9	1,52 (<i>m</i> , 1H)			H-P15 ¹	
P15 ¹	22,7	0,83 (<i>d</i> , $J = 6,5$ Hz, 3H)	C-P15	C-P14, C-P16	H-P15	
P16	22,6	0,83 (<i>d</i> , $J = 6,5$ Hz, 3H)		C-P14, C-P15 ¹	H-P15	
21-NH	-	-1,11 (<i>sl</i> , 1H)				
23-NH	-	-1,42 (<i>sl</i> , 1H)				

Tabela 7. Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C de *Sv-3* em CDCl_3 (500 e 125 MHz, respectivamente) e da Porfirinolactona em CDCl_3 (400 e 100 MHz, respectivamente).

C	<i>Sv-3</i>		Porfirinolactona	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	142,8	-	141,5	-
2	131,6	-	131,8	-
2¹	12,1	3,42 (s, 3H)	12,3	3,44
3	136,1	-	136,3	-
3¹	128,9	7,99 (<i>dd</i> , $J = 10,0$ e $20,0$ Hz, 1H)	129,2	8,02
3²	123,2	6,32 (<i>d</i> , $J = 20,0$ Hz, 1H)	123,0	6,34 e 6,17
4	136,0	6,16 (<i>d</i> , $J = 20,0$ Hz, 1H)	136,3	-
5	99,6	-	99,9	9,55 (s)
6	155,7	9,52 (s, 1H)	155,6	-
7	136,5	-	136,7	-
7¹	11,3	-	11,5	3,28
8	145,6	3,25 (s, 3H)	145,8	-
8¹	19,6	-	19,8	3,76
8²	17,5	3,73 (<i>q</i> , $J = 5,0$ e $15,0$ Hz, 2H)	17,8	1,72
9	150,0	1,70 (<i>t</i> , $J = 7,5$ Hz, 3H)	149,9	-
10	104,1	-	104,4	9,77 (s)
11	138,7	9,74 (s, 1H)	139,0	-
12	131,4	-	131,7	-
12¹	12,5	-	12,7	3,92
13	111,4	3,88 (s, 3H)	111,6	-
13¹	160,8	-	161,2	-
14	145,6	-	145,8	-
15	134,8	-	135,0	-
15¹	102,0	-	102,2	-
15²	170,9	-	171,1	-
15³	54,2	3,74 (s, 3H)	54,4	3,76
16	166,3	-	166,5	-
17	53,8	-	53,9	4,05 e 4,96
17¹	32,2	4,07 (<i>d</i> , $J = 10,0$ Hz, 1H)	32,3	1,83 e 2,55
17²	31,4	1,87 (<i>m</i> , 1H) e 2,56 (<i>m</i> , 1H)	31,5	2,46
17³	173,2	2,17 (<i>m</i> , 1H) e 2,43 (<i>m</i> , 1H)	173,6	-
18	50,2	-	50,4	4,43
18¹	22,2	4,44 (<i>m</i>)	22,5	1,61
19	171,1	1,58 (<i>d</i> , $J = 5,0$ Hz, 3H)	171,4	-
20	93,8	8,70 (s, 1H)	94,1	8,71 (s)
P1	61,4	-	61,8	4,42
P2	117,6	4,43 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz, 2H)	119,9	5,12
P3	142,8	5,13 (<i>t</i> , $J = 7,0$ Hz, 1H)	142,4	-
P3¹	16,3	-	16,7	1,58
P4	39,8	1,56 (<i>sl</i> , 3H)	40,5	?
P5	25,0	1,87 (<i>m</i> , 2H)	?	?
P6	36,6	1,29 (<i>m</i> , 2H)	?	?
P7	32,8	0,97 (<i>m</i> , 2H)	?	?
P7¹	19,6	1,29 (<i>m</i> , 1H)	20,4	0,77 (<i>d</i> , $J = 6,9$ Hz)
P8	37,4	0,76 (<i>d</i> , $J = 6,5$ Hz, 3H)	?	?
P9	24,4	1,24 (<i>m</i> , 2H)	?	?
P10	37,3	1,24 (<i>m</i> , 2H)	?	?
P11	32,6	0,97 (<i>m</i> , 2H)	?	?
P11¹	19,7	1,24 (<i>m</i> , 1H)	20,4	0,80 (<i>d</i> , $J = 6,4$ Hz)
P12	37,3	0,79 (<i>d</i> , $J = 6,5$ Hz, 3H)	?	?
P13	24,8	0,97 (<i>m</i> , 2H)	?	?
P14	39,4	1,65 (<i>m</i> , 2H)	?	1,11
P15	27,9	1,10 (<i>m</i> , 2H)	?	1,49
P15¹	22,7	1,52 (<i>m</i> , 1H)	23,4	0,84 (<i>d</i> , $J = 6,8$ Hz)
P16	22,6	0,83 (<i>d</i> , $J = 6,5$ Hz, 3H)	23,3	0,84 (<i>d</i> , $J = 6,8$ Hz)
15¹-OH	-	0,83 (<i>d</i> , $J = 6,5$ Hz, 3H)	?	6,12 (<i>sl</i> , 1H)
21-NH	-	-1,11 (<i>sl</i> , 1H)	-	-1,11
23-NH	-	-1,42 (<i>sl</i> , 1H)	-	-1,49



CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- O presente trabalho atingiu o objetivo principal que se fundamentou na ampliação do conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Sargassum*, utilizando apenas a fração etérea do material da alga *Sargassum vulgare* var. *nanum* E. de Paula.
- Através de métodos cromatográficos usuais e técnicas espectroscópicas de IV e RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais foi possível isolar e identificar três constituintes químicos da alga *Sargassum vulgare* var. *nanum*.
- O estudo ficoquímico da fase etérea de *Sargassum vulgare* var. *nanum* resultou no isolamento e caracterização do esteroide, o fucosterol, descrita pela primeira vez na espécie e das feofitinas: mistura da 13^2 -hidroxi- $13^2(S)$ -feofitina a e 13^2 -hidroxi- $13^2(R)$ -feofitina em que o isômero *S* é descrito pela primeira vez na espécie e o isômero *R* é descrito pela primeira vez no gênero. Além destas substâncias, também foi isolada a 15^1 -hidroxi-(15^1 -S)-porfirinolactona a, que é descrita pela primeira vez na família.
- O isolamento de diversos metabólitos na espécie *Sargassum vulgare* var. *nanum* evidencia o potencial deste gênero, gerando perspectivas de investigá-lo posteriormente.
- Diante do que foi apresentado, percebe-se que *Sargassum vulgare* var. *nanum* detém um potencial farmacológico a ser explorado. Como este foi o primeiro estudo químico de *Sargassum vulgare* var. *nanum*, espera-se que o estudo das fases diclorometânica, acetato de etila e aquosa possam trazer novos substâncias inéditas, de grande importância para a farmacologia que será dado continuidade no doutoramento pelo programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.



REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- AFOLAYAN, A. F.; BOLTON, J. J.; LATEGAN, C. A.; SMITH, P. J. & BEUKES, D. R. Fucoxanthin, tetraprenylated toluquinone, and tolhydroquinone metabolites from *Sargassum heterophyllum* inhibit the in vitro growth of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Zeitschrift für Naturforschung C: Journal of Biosciences.** v. 63 (11/12): pp. 848-852, 2008.
- ALGABASE, 2012. Disponível em <<http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=5187>> acessado no dia 01 de fevereiro de 2012.
- BARREIRO, E. J. & FRAGA, C. A. M. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. 2^a edição, Porto Alegre – RS: **Ed. ArtMed Ltda**, 2008.
- BHAKUNI, D.S. & RAWAT, D.S. Bioactive Marine Natural Products. Nova Delhi, India: **Anamaya Publishers**, 2005.
- BROSS-WALCH, N.; KÜHN, T.; MOSKAU, D. & ZERBE, O. Strategies and tools for structure determination of natural products using modern methods of NMR spectroscopy. **Chemistry biodiversity.** v. 2 (2) pp. 147-177, 2005.
- BUCHANAN, M. S.; HASHIMOTO, T. & ASAKAWA, Y. Phytol esters and phaeophytins from the hornwort *Megaceros flagellaris*. **Phytochemistry**, v. 41(5): pp. 1373-1376, 1996.
- BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products.** v.67 (12): pp. 2141-2153, 2004
- CANNELL, R. J. P. Methods in Biotechnology 4. Natural Products Isolation. Totowa, NJ: **Ed. Humana Press**, 1998.
- CHENNUBHOTLA, V.S.K.; KALIAPERUMAL, N.; KALIMUTHU, S.; SELVARAJ, M., RAMALINGAM, J.R. & NAJMUDDIN, M. Seasonal changes in growth and alginic acid and mannitol contents in *Sargassum ilicifolium* (Tunner) J. Agardh and *S. myriocystum* C. Agardh. **Indian Journal of Marine Sciences.** v. 11 (2): pp. 195–196, 1982.
- CHO, S. H.; CHO, J. Y.; KANG, S. E.; HONG, Y. K. & AHN, D. H.; Antioxidant activity of mojabanchromanol, a novel chromene, isolated from brown alga *Sargassum siliquastrum*. **Journal of Environmental Biology.** v. 29(4): pp. 479-484, 2008.
- CHOI, E. Y.; HWANG, H. J.; KIM, I. H. & NAM, T. J. Protective effects of a polysaccharide from *Hizikia fusiformis* against ethanol toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology.** v. 47 (4): pp. 134–139, 2009
- COIMBRA, C. S. Inferências filogenéticas a ordem Fucales (Phaeophyceae), com ênfase no gênero *Sargassum*. Tese (doutorado). Departamento de Botânica, Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo, São Paulo, 75p, 2006

CROMBIE, L. & WHITING, D. A. Review article number 135 biosynthesis in the rotenoid group of natural products: applications of isotope methodology. **Phytochemistry**. v. 49(6): pp. 1479-1507, 1998.

CROTEAU, R. KUTCHAN, T. M. LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In Buchanan B, Gruissem W, Jones R (Eds.), Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville, MD: **Ed. American Society of Plant Physiologists**. pp. 1250-1318, 2000.

DAVEN'S GARDEN. Disponível em <<http://davesgarden.com/guides/pf/showimage/6748/>>. Acessado no dia 13/11/2011

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products. 3^a edição, West Sussex – Inglaterra: **Editora John Wiley & Sons LTD**, 2009

DONIA, M. & HARMANN, M. T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 3(6): pp. 338-348, 2003.

DUAN, H.; TAKAISHI, Y.; MOMOTA, H.; OHMOTO, Y. & TAKI, T. Immunosuppressive constituents from *Saussurea medusa*. **Phytochemistry**. v. 59 (1): pp. 85-90, 2002.

EXARCHOU, V.; KRUCKER, M.; VAN BEEK, T. A.; VERVOORT, J. ; GEROTHANASSIS, I. P. & ALBERT, K. LC-NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis. **Magnetic Resonance in Chemistry**. v.43 (9): pp. 681–687, 2005

FENICAL, W. Halogenation in Rhodophyta a review. **Journal of Phycology**. v. 11(3): pp. 245, 1975.

FOREST & STARR. Disponível em < http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cinchona_officinalis_%28K%C3%B6hler%29.jpg>. Acessado no dia 13/11/2011

GLOMBITZA, K. W. & SCHMIDT, A. Nonhalogenated and Halogenated Phlorotannins from the Brown Alga *Carpophyllum angustifolium*. **Journal of Natural Products**. v. 62 (9): pp. 1238-1240, 1999.

GUVEN, K. C. & GUVEN, N. Analysis of protein fractions obtained from *Sargassum vulgare*. **Eczacilik Bulteni**. v. 17(1), pp. 13-16, 1975.

HAJDU, E.; BERLINCK, R. G. S. & FREITAS, J. C. Biodiversidade do Estado de São Paulo. Síntese do Conhecimento ao Final do Século XX: Invertebrados marinhos. 1a ed. Brasil: **Editora FAPESP**. v. 4, pp.20-30 1999.

HALKET, J. M.; LISBOA, BELIZARIO P. & PINHEIRO-JOVENTINO, F. The major sterols of *Sargassum vulgare* C. Agardh investigated by mass chromatography. **Arquivos de Ciencias do Mar**. v. 16(2), pp. 117-22, 1976.

- HAM, Y. M.; KIM, K.; LEE, W. J.; LEE, N. H. & HYUN, C. Chemical constituents from *Sargassum micracanthum* and antioxidant activity. **Internacional Journal of Pharmacology.** 6(2), pp. 147-151, 2010.
- HEATON, J. W. & MARANGONI, A. G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends in Foods Science & Technology.** v.7 (1): pp.8-15, 1996.
- HÖRTENSTEINER, S. Chlorophyll Degradation During Senescence. **Annual Review of Plant Biology.** v. 57(s/n): pp.55–77, 2006.
- HUANG, X.; LI, M.; XU, B.; ZHU, X.; DENG, Z. & LIN, W. Proteasome and NF-κB inhibiting phaeophytins from the green alga *Cladophora fascicularis*. **Molecules**, v. (3): pp. 582-592, 2007.
- HWANG, H.; KIM, I. & NAM, T. Effect of a glycoprotein from *Hizikia fusiformis* on acetaminophen-induced liver injury. **Food and Chemical Toxicology.** v. 46 (11): pp. 3475–3481, 2008
- INA, A.; HAYASHI, K.; NOZAKI, V. & KAMEI, Y. Pheophytin a, a low molecular weight compound found in the marine brown alga *Sargassum fulvellum*, promotes the differentiation of PC12 cells. **International Journal of Developmental Neuroscience.** v. 25 (1): pp. 63–68, 2007.
- IWASHIMA, M.; TAKO, N.; HAYAKAWA, T.; MATSUNAGA, T.; MORI, J. & SAITO, H. New Chromane Derivatives Isolated from the Brown Alga, *Sargassum micracanthum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin.** v. 56(1): pp. 124-128, 2008.
- JERZ, G.; ARREY, T. N.; WRAY, V.; DU, Q. & WINTERHALTER, P. Structural characterization of 13²-hydroxy-(13²-S)-phaeophytin-a from leaves and stems of *Amaranthus tricolor* isolated by high-speed countercurrent chromatography. **Innovative Food Science and Emerging Technologies.** v. 8 (3): pp. 413–418, 2007
- JIN, Z. Review Imidazole, oxazole and thiazole alkaloids. **Natural Product Reports.** v. 22(6): pp. 196–229, 2005.
- LAMBERT, M.; WOLFENDER, J.; STÆRK, D.; CHRISTENSEN, S. B.; HOSTETTMANN, K. & JAROSZEWSKI, J. W. Identification of Natural Products Using HPLC-SPE Combined with CapNMR. **Analytical Chemistry.** v. 79 (2): pp 727-735, 2007.
- LANGE, B. M. & CROTEAU, R. Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: Isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v. 96(24): pp. 13714-13719, 1999.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. & COX, M. M. Princípios de bioquímica. 5. ed. Porto Alegre - RS : **Editora Artmed**, 2011.

LEE, Y. S.; LEE, S.; Jung, S. H.; Kang, S. S. & Shin, K. H. Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliquosa*. *Archives of Pharmacal Research* v. 26(9): pp. 719-722, 2003.

LEE, S.; S; LEE, Y. S.; JUNG, H.; KANG, S. S. & SHIN, K. H. Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliquosa*. **Archives of Pharmacal Research Volume.** 26(9): pp. 719-722, 2004.

LEE, D.; PARK, J.; YOO, K.; CHUNG, I.; LEE, Y.; LEE, J.; HAN, D.; CHO, S. & BAEK, N. 24-Ethylcholesta-4,24(28)-dien-3,6-dione from *Osmanthus fragrans* var. *aurantiacus* Flowers Inhibits the Growth of Human Colon Cancer Cell Line, HCT-116. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry.** v. 54(2): pp. 206-210, 2011.

LIU , X.; WANG, C.Y.; SHAO, C.L.; WEI, Y.X.; WANG, B.G.; SUN, L.L.; ZHENG, C.J. & GUAN, H.S. Chemical constituents from *Sargassum pallidum* (Turn.) C. Agardh. **Biochemical Systematics and Ecology.** v. 37(2): pp. 127–129, 2009.

KEELING, C. I & BOHLMANN, J. Genes, enzymes, and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. **New Phytologist.** v.170 (4): pp.657-675, 2006.

KIKUCHI, T.; MORI, Y.; YOKOI, T.; NAKAZAWA, S.; KURODA, H.; MASADA, Y.; KITAMURA, K.; KURIYAMA, K. Structure and absolute configuration of sargatriol, a new isoprenoid chromenol from a brown alga, *Sargassum tortile* C. Agardh. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin.** v. 31(1): 106-13, 1983.

KOBAYASHI, M.; ISHIDA, K.; TERABAYASHI, S. & MITSUHASHI, H. 10-hydroxypheophytins and a new norlabdane diterpene from the leaves of *Cupressus funebris* Endl. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin,** v. 39, (12): pp. 3348-3349, 1991.

KOIVIKKO, R. Brown algal phlorotannins improving and applying chemical methods. 2008. 64f. Tese (doutorado). Departamento de Química. **Faculdade de Matemática e Ciências Naturais-** Universidade de Turku, Finlândia. 61p. 2008.

KÖHLER, F. Disponível em <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Koeh-267.jpg>>. Acessado no dia 13/11/2011

KUBO, I.; HIMEJIMA, M.; TSUJIMOTO, K.; MUROI, H. & ICHIKAWA, N. Antibacterial activity of crinitol and its potentiation. **Journal of Natural Products.** 55(6): pp. 780-5, 1992.

MARÍN, A.; CASAS-VALDEZ, M.; CARRILLO, S.; HERNÁNDEZ, H.; MONROY, A.; SANGINÉS, L. & PÉREZ-GIL, F. The marine algae *Sargassum spp.* (Sargassaceae) as feed for sheep in tropical and subtropical regions. **Revista de Biología Tropical.** v. 57 (4): pp. 1271-1281, 2009.

MARTINS, R. C. & SILVA, C. L. M. Modelling colour and chlorophyll losses of frozen green beans (*Phaseolus vulgaris*. L.). **International Journal of Refrigeration,** v.25 (7): pp. 966-974, 2002.

MATSUO, A; ONO, K; HAMASAKI, K & NOZAKI H. Phaeophytins from a cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. **Phytochemistry**. 42 (2): pp. 427-430, 1996.

MIYASHITA, K. The carotenoid fucoxanthin from brown seaweed affects obesity. **Lipid Technology**. v. 21(8/9): pp. 186-190, 2009.

MOLINSKI, T. F.; DALISAY, D. S.; LIEVENS, S. L. & SALUDES, J. P. Drug development from marine natural products. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 8 (1): pp. 69-85, 2009.

MUKHERJEE, J. & MENGE, M. Progress and Prospects of Ergot Alkaloid Research. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**. v. 68 (s/n): pp. 1-8, 2000.

MURUGADAS, T. L., PHANG, S. M. & TONG, S. L. Heavy metal accumulation cytotoxic principle of the brown alga *Sargassum tortile*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v. 39(8): pp. 2129–2131, 1995.

NATIONAL Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Japan). Yukinae Yamazaki, Yasuhiro Kono. **Photosensitizers and tumor cytotoxic agents containing porphyrins from plants**. JP 2004217541, 05 agosto 2011

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18 (Supl.), p. 718-723, 2008.

OCAMPO, R.; REPETA, D. J. $13^2(S)$ -OH methyl bacteriopheophorbide α allomer in sedimentary organic matter. **Organic Geochemistry**, v. 35, p. 209-214, 2004.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. & VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia. Tradução da 4 ªed. São Paulo-SP: **Cengage Learning**, 2010.

REDDY, P. & URBAN, S. Meroditerpenoids from the southern Australian marine brown alga *Sargassum fallax*. **Phytochemistry**. v. 70(2): pp.250-255, 2009.

ROHFRITSCH, A.; PAYRI, C.; STIGER, V. E. & BONHOMME, F. Habitat-related allelic variation revealed by an anonymous DNA locus in reef-dwelling *Turbinaria ornata* (Fucales, Phaeophyceae). **Botanica Marina**. v. 53(2): pp. 189-192, 2010.

ROCHA, F. D.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. C. & TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17(4): pp. 631-639, 2007.

SAKDARAT, S.; SHUYPROM, A.; AYUDHYA, T.; WATERMAN, P. G. & KARAGIANIS, G. Chemical composition investigation of the *Clinacanthus nutans* Lindau leaves. **Thai Journal of Phytopharmacy**. v. 13(2): pp. 13-24, 2008.

- SCHWIKKARD, S. L.; MULHOLLAND, D. A.; HUTCHINGS, A. Phaeophytins from *Tapura fisheri*. **Phytochemistry**, v. 49(8): pp. 2391-2394, 1998
- SEO, Y.; PARK, K. E. & NAM, T. J. Isolation of a new chromene from the brown alga *Sargassum thunbergii*. **Bulletin of the Korean Chemical Society**. v. 28(10), pp. 1831-1833, 2007.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia : da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre - RS: **Editora da UFSC**, 2004.
- SILVA, D. A.; SILVA T. M. S.; LINS, A. C.S.; COSTA, D. A.; CAVALCANTE, J. M. S.; MATIAS, W. N. & SOUZA M. F. V. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). **Química Nova**. v. 29 (6): pp. 1250-1254, 2006.
- SILVERSTEIN, F. X. & WEBSTER, D. J. K. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7 ed. Rio de Janeiro - RJ: **Editora LTC**, 2007.
- SOUZA, F. H. T. Farmacoquímica e Farmacobotânica de *Richardia brasiliensis Gomes* (RUBIACEAE). Dissertação (Mestrado). Centro de Ciências da Saúde. Centro de Biotecnologia. **Universidade Federal da Paraíba**. 110 p, 2010.
- SHEU, J.; WANG, G.; SUNG, P. & DUH, C. New Cytotoxic Oxygenated Fucosterols from the Brown Algae *Turbinaria conoides*. **Journal of Natural Products**. v. 62 (2): pp. 224-227, 1999.
- STIGER, V.; HORIGUCHI, T.; YOSHIDA, T.; COLEMAN, A. W. & MASUDA, M. Phylogenetic relationships within the genus *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae), inferred from ITS-2 nrDNA, with an emphasis on the taxonomic subdivision of the genus. **Phycological Research**. v. 51(1): pp. 1-10, 2003.
- STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W. & HECKTHEUER, L. H. Hychecki. As clorofilas. **Ciência Rural**. v.35 (3): pp. 748-755, 2005.
- TAKADA, N.; WATANABE, R.; SUENAGA, K.; YAMADA, K. & UEMURA, D. Isolation and structures of hedaols A, B, and C, new bisnorditerpenes from a Japanese brown alga. **Journal of Natural Products**. v. 64(5): pp. 653-655, 2001.
- TOMAZ, A. C.; NOGUEIRA, R. B.; PINTO, D. S.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V.; DA-CUNHA, E. V. L. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltld.) Steud. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18(1): pp. 47-52, 2008.
- TORRES, M. R.; SOUSA, A. P. A.; SILVA FILHO, E. A. T.; MELO, D. F.; FEITOSA, J. P. A.; DE PAULA, R. C. M. & LIMA, M. G. S. Extraction and physicochemical characterization of *Sargassum vulgare* alginate from Brazil. **Carbohydrate Research**. v. 342 (14), pp. 2067-2074, 2007.

TRAVEN, V. F. New Synthetic Routes to Furocoumarins and Their Analogs: A Review. **Molecules**. v. 9(3): pp. 50-66, 2004.

VIEGAS JR. C. & BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. v. 29(2): pp. 326-337, 2006

VOET, D. & VOET, J. G. Bioquímica –Porto Alegre: **Artmed**, 2006

WANG, W.; YANG, X.; CHEN, S.; ZHANG, C.; CHEN, L. & XIE, W. Method for preparing biscuit from *Sargassum*. Patente nº A21D13/08; A21D2/36; A23L1/164; A23L1/29; A23L1/337. **Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu**. pp. 1-6, 2008

WILLSTATTER, R., & A. STOLL.. Investigations on Chlorophyll. Lancaster, Pa: **The Sci. Press Print. Co.**, 1928.

WHITE, R. C.; JONES, I. D. & GIBBS, E. Determination of Chlorophylls, Chlorophyllides, Pheophytins, and Pheophorbides in Plant Material. **Journal of Food Science**. v. 28(4): pp. 431–436, 1963.

YATSUYA, K.; NISHIGAKI, T.; DOUKE, A. & WADA, Y. Annual net production of the five Sargassaceae species in Yoro, western Wakasa Bay, Sea of Japan. **Fisheries Science**. v. 71 (5): pp. 1098-1106, 2005.

ZHANG, L.; HU, T.; LIU, H. & SHUAI, X. Inhibitory effect of *Sargassum* polysaccharide on oxidative stress induced by infectious bursa disease virus in chicken bursal lymphocytes. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 49 (4): pp. 607-615, 2011.

ZIPCODE ZOO, 2012. Disponível em <http://zipcodezoo.com/Key/Chromista/Sargassum_Genus.asp> acessado em 01 de março de 2012.

ZOU, D. & GAO, K. Photosynthetic acclimation to different light levels in the brown marine macroalga, *Hizikia fusiformis* (Sargassaceae, Phaeophyta). **Journal of Applied Phycology**. v. 22 (4): pp. 395–404, 2010

ZWENGER, S. & BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**. v. 3 (1): pp. 01-07, 2008.

ZUBIA, M.; PAYRI C. & DESLANDES, E. Alginato, manitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangareverse* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia). **Journal of Applied Phycology**. v. 20 (6): pp. 1033–1043, 2008.