



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS

E SINTÉTICOS BIOATIVOS

DAYSIANNE PEREIRA DE LIRA

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DOS ORGANISMOS MARINHOS: *Caulerpa
mexicana*, *Bryothamnion triquetrum*, *Hypnea musciformis* e
Ircinia felix.**

João Pessoa

2013

DAYSIANNE PEREIRA DE LIRA

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS
ORGANISMOS MARINHOS: *Caulerpa mexicana*, *Bryothamnion
triquetrum*, *Hypnea musciformis* e *Ircinia felix*.**

Tese 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 as exigências para a obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacoquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho

CO-ORIENTADOR(A): Profa. Dra. Bárbara Viviana de O. Santos

João Pessoa

2013

L768c Lira, Daysianne Pereira de.

Constituintes químicos e atividade biológica dos organismos marinhos: Caulerpa mexicana, Bryothamnion triquetrum, Hypnea musciformis e Ircinia felix / Daysianne Pereira de Lira.- João Pessoa, 2013.

174f. : il.

Orientador: José Maria Barbosa Filho

Coorientadora: Bárbara Viviana de O. Santos

DAYSIANNE PEREIRA DE LIRA

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS
ORGANISMOS MARINHOS: *Caulerpa mexicana*, *Bryothamnion
triquetrum*, *Hypnea musciformis* e *Ircinia felix*.**

Tese aprovada em ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Tânia Maria Sarmiento da Silva

Doutora em Química Orgânica pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Departamento de Ciências Moleculares
Universidade Federal Rural de Pernambuco
(Membro I)

Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa

Doutor em Química Orgânica pela Universidade Federal de São Carlos
Departamento de Farmácia – Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Paraíba – *Campus I*
(Membro II)

Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de Strathclyde
Departamento de Biotecnologia – Centro de Biotecnologia
Universidade Federal da Paraíba – *Campus I*
(Membro III)

Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza

PhD em Química Orgânica pela Universidade de São Paulo
Departamento de Ciências Farmacêuticas – Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Paraíba – *Campus I*
(Membro IV)

*Ao meu marido Otonildo Moreira Uchôaa Segundo e aos meus
pais Normando Pereira de Lira e Maria Lúcia Pereira de Lira.*

Felizes são os que ouvem a palavra de Deus e a guarda!

Lucas 11:28

AGRADECIMENTOS

- ★ A **Deus** pai todo poderoso, por nunca permitir eu caminhar sozinha, por sempre me ouvir e me confortar e por me mostrar sempre o sentido da vida.
- ★ Aos meus pais **Normando** e **Lúcia**, por toda a dedicação em todos os momentos da minha vida, pela sempre torcida tanto em momentos felizes como tristes e por ter sempre me incentivado a conquistar a maior herança do mundo, a educação.
- ★ Ao meu marido **Segundo** pelo companheirismo e por todo o apoio que me deu desde que nos conhecemos. Pela participação intensa na minha vida, se tornando quase um “farmacêutico” no laboratório para me ajudar.
- ★ Aos meus irmãos **Nando**, **Rafael** e **Luciano** pelo carinho e apoio.
- ★ A minha avó **Maria José** pelo carinho e afeto.
- ★ Aos meus sogros **Fátima** e **Otonildo**, cunhados **Verônica**, **George** e **Guilherme** e o sobrinho **João Victor** pelo apoio, força e estímulo.
- ★ A professora **Dra. Bárbara** por todos os ensinamentos, apoio, dedicação, incentivo, amizade e por acreditar no meu trabalho.
- ★ Ao professor **Dr. José Maria Barbosa Filho** pelos ensinamentos e pelo exemplo profissional.
- ★ Às alunas de iniciação científica **Mariana** e **Catharine** e de doutorado **Jéssica**, por toda a ajuda e torcida.
- ★ A todos os **professores desta Pós-Graduação** e especialmente o professor **Dr. Luís** por todos os ensinamentos.
- ★ Ao professor **Dr. José Raimundo Braz** pela grande contribuição que deu a este trabalho.
- ★ Ao LABETOX, especialmente a **Heloísa**, **João Carlos**, **Débora** e a **professora Dra. Mariana**, pelos experimentos realizados
- ★ A professora **Dra. Magna Suzana** e seus alunos **Luiz Henrique**, **Carolina Babosa** e **Éverton Tenório**, da Universidade Federal de Alagoas, pela realização dos testes de inflamação e pela parceria que foi realizada.
- ★ À **professora Dra. Janeusa**, da Universidade Federal de Alagoas, pela realização dos testes de inflamação e pela parceria que foi realizada.
- ★ À **professora Dra. Tânia Sarmento** e suas alunas pela atenção e por terem disponibilizado o laboratório para experimentos.

- ★ À **professora Dra. Cláudia de O. Pessoa** pela realização dos experimentos antitumorais.
- ★ Ao professor **Dr. Roberto Mioso** por ter disponibilizado a esponja *Ircinia felix*.
- ★ Ao professor **Dr. George Miranda** (UFPB) pela coleta e identificação das algas marinhas. E ao **professor Dr. Ulisses** (UFPE) pela identificação da esponja *Ircinia felix*.
- ★ À **Fabiana** por toda atenção e ajuda que me forneceu e ainda fornece na realização de espectros na **USP** e na **UNICAMP**. Por isso também agradeço a estas duas instituições.
- ★ Ao professor **Dr. Edilberto** da Universidade Federal do Ceará/CENAUREM, pela realização dos espectros deste trabalho, bem com, à **Patrícia** e a **Karísia**.
- ★ Às alunas do professor Eduardo: **Ingrid, Antonilene, Micheline, Aline, Eugenia e Aiala**, por toda a paciência e disponibilidade para me ajudarem a usar o CLAE.
- ★ Pelos grandes amigos que esta Pós-Graduação me permitiu fazer: **Analúcia, Fábio e Thaisa**. A companhia de vocês foi uma das coisas mais importantes que me aconteceu nos últimos cinco anos.
- ★ À minha amiga **Allana**, pela nossa grande amizade e por estar presente nos momentos mais importantes da minha vida.
- ★ Aos meus amigos **Guto, Ariane, Veber, Socorro, Arnaldo, Fabíola e Bruno**, que sempre estiveram na torcida por mim.
- ★ A alguns amigos que também são especiais: **Heloísa, Gabriela, Camila e Xirley**.
- ★ Ao funcionário **Nonato** por ser tão prestativo e dedicado ao laboratório. Muito obrigada pelo apoio durante todas as fases deste trabalho.
- ★ A aluna de iniciação científica **Heloísa Mara** pela alegria e pela cor rosa que sempre me passa quando estou ao seu lado.
- ★ A todos os colegas do laboratório pela companhia e pelo compartilhamento do nosso trabalho.
- ★ A todos os funcionários do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, nos seus mais diversos setores.
- ★ A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (**CAPES**), pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de estudos, o qual foi muito importante para a realização deste trabalho.

- ★ Ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pelo patrocínio deste projeto.
- ★ **Pelo auxílio financeiro do Instituto Nacional em Ciência e Tecnologia em Ambientes Marinhos Tropicais (INCT_AmbTropic).**

RESUMO

LIRA, Daysianne Pereira. **Constituintes Químicos e Atividade Biológica dos Organismos Marinhos: *Caulerpa mexicana*, *Bryothamnion triquetrum*, *Hypnea musciformis* e *Ircinia fêlix***. 176 p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

O Brasil encontra-se entre os 10 primeiros países no ranking da biodiversidade mundial e por apresentar uma das maiores áreas costeiras na região tropical do planeta, tem despertado para a importância dos produtos marinhos como fonte da riqueza da nossa flora e, como fonte inigualável de diversidade estrutural de constituintes químicos das mais variadas classes, capazes de construir moléculas de alta complexidade estrutural, com absoluta quimio, regio e estereosseletividade. Tendo consciência de que um dos aspectos de maior importância na bioprospeção da fauna e flora é o conhecimento sobre o potencial químico-farmacológico encontrado no habitat aquático do litoral brasileiro em especial do litoral paraibano, objetivou isolar e identificar os constituintes químicos de três espécies de algas: *Caulerpa mexicana*, *Hypnea musciformis* e *Bryothamnion triquetrum*; e uma esponja: *Ircinia fêlix*, bem como, avaliar suas atividades citotóxicas e antitumoral, além de realizar parcerias para avaliação das atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias destes produtos. Logo, através de métodos cromatográficos usuais e técnicas espectroscópicas de IV, RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, CG-EM, EM-MALDI e comparação com valores da literatura, foi possível isolar e identificar sete substâncias: um esteroide β -Sitosterol e um alcaloide caulerpina de *Caulerpa mexicana*; um esteroide Saringosterol e um barbitúrico 2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona, 5-etil-5-fenil de *Hypnea musciformis*; um esteroide Colest-4-en-3-ona e um ftalato Di-isobutilftalato de *Bryothamnion triquetrum*; e um derivado de ácido N-[(4E)-3-hidroxi-1-[[[(sodiooxi)sulfonil]oxi}non-4-en-2-il]dotriacontanamida de *Ircinia fêlix*, relatado pela primeira vez na literatura. Os extratos metanólicos de *Hypnea musciformis* e *Bryothamnion triquetrum* apresentaram alta e baixa citotoxicidade, respectivamente, quando avaliados a sua citotoxicidade em eritrócitos de camundongos Swiss. Entretanto, estes mesmos extratos não apresentam atividade citotóxica frente a células de Tumor Ascítico de Ehrlich. E assim, através das parcerias realizadas foi possível observar que os extratos de *Caulerpa mexicana* e *Bryothamnion triquetrum* apresentaram resultados significativos em diferentes modelos de inflamação e que o alcaloide bis-indólico, substância majoritária de *Caulerpa mexicana* em modelos tumorais, de inflamação e atividade espasmolítica apresentou resultados significativos.

Palavras-chave: Algas. Esponja. Produtos naturais. Farmacologia.

ABSTRACT

LIRA, Daysianne Pereira. **Chemical Constituents and Biological Activity of a Marine Organism: *Caulerpa mexicana*, *Bryothamnion triquetrum*, *Hypnea musciformis* and *Ircinia felix***. 176 p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

The Brazil is among the first 10 countries in the ranking of the world's biodiversity and to present one of the largest coastal areas in the tropical region of the world has awakened to the importance of marine products as a source of richness of our flora and as a source of unbeatable structural diversity of chemicals of various classes, able to build molecules of high structural complexity, with absolute chemo, regio and stereoselectivity constituents. Being aware that one of the most important aspects in bioprospeção flora and fauna is the knowledge about the chemical and pharmacological potential aquatic habitat found on the Brazilian coast in particular Paraíba coast, aimed to isolate and identify the chemical constitintes three species of algae : *Caulerpa mexicana*, *Hypnea musiformis* and *Bryothamnion triquetrum*; and a sponge: *Ircnia felix*, as well as evaluate their cytotoxic and antitumor activities, and partnerships to conduct assessment of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of these products. Thus, by standard chromatographic and spectroscopic methods IR, ^1H NMR and ^{13}C and uni-dimensional, GC-MS, MALDI-MS and compared with literature values was possible to isolate and identify seven substances: a steroid and β -Sitosterol caulerpina one alkaloid from *Caulerpa mexicana*; Saringosterol one steroid and barbiturate 2,4,6 (1H, 3H, 5H)-pirimidinatriona, 5-ethyl-5-phenyl of *Hypnea musciformis*; one cholest-4-en-3-one steroid and phthalate Di-isobutylftalato of *Bryothamnion triquetrum*; and a derivative of N - [(4E)-3-hydroxy-1 - {[[(sodiooxi) sulfonyl] oxy} non-2-en-4-yl] dotriacontanamida of *Ircinia felix*, first reported in the literature. The methanol extracts of *Hypeneae musciformis* and *Bryothamnion triquetrum* showed high and low cytotoxicity, respectively, when evaluated their cytotoxicity in erythrocytes of Swiss mice. However, these same extracts did not exhibit cytotoxic activity against tumor cells of *Ehrlich* Ascitic. And so, through partnerships held was observed that extracts of *Caulerpa mexicana* and *Bryothamnion triquetrum* showed significant results in different models of inflammation and the *bis*-indole alkaloid, the major substance of *Caulerpa mexicana* in tumor models of inflammation and espamolítica activity showed significativos results.

Keywords: Algae. Sponge. Natural products. Pharmacology.

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1. Obtenção e particionamento do extrato metanólico bruto de <i>Caulerpa mexicana</i>	59
ESQUEMA 2. Obtenção e particionamento do extrato metanólico bruto de <i>Hypnea musciformis</i>	60
ESQUEMA 3. Obtenção e particionamento do extrato metanólico bruto de <i>Bryothamnion triquetrum</i>	61
ESQUEMA 4. Obtenção e particionamento do extrato metanólico bruto de <i>Ircinia felix</i>	62
ESQUEMA 5. Purificação dos compostos de <i>Caulerpa mexicana</i>	63
ESQUEMA 6. Purificação dos compostos de <i>Hypnea musciformis</i>	64
ESQUEMA 7. Purificação dos compostos de <i>Bryothamnion triquetrum</i>	65
ESQUEMA 8. Coluna filtrante com o Extrato Metanólico Bruto de <i>Bryothamnion triquetrum</i>	66
ESQUEMA 9. Purificação dos compostos de <i>Ircinia felix</i>	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da espongouridina e espongotimidina e seus análogos sintéticos.....	22
Figura 2. Estrutura química do Azidotimidina (AZT).....	22
Figura 3. Substâncias químicas de origem marinha que estão em fase clínica como anticancerígenas.....	24
Figura 4. Algumas substâncias químicas isoladas do filo Chlorophyta com unidades 1,4-diacetoxibutadieno.....	27
Figura 5. Principais substâncias isoladas do gênero <i>Caulerpa</i>	30
Figura 6. Foto ilustrativa de <i>Caulerpa mexicana</i> Sonder ex Kützing.....	32
Figura 7. Alguns exemplos de substâncias químicas isoladas de Rhodophyta.....	34
Figura 8. Ftalatos isolados de algas vermelhas marinhas coletadas no estado do Espírito Santo, Brasil.....	37
Figura 9. Foto ilustrativa de <i>Hypnea musciformis</i>	38
Figura 10. Foto ilustrativa de <i>Bryothamnion triquetrum</i>	44
Figura 11. Foto ilustrativa de <i>Ircinia felix</i>	48
Figura 12. Substâncias químicas isoladas de <i>Ircinia</i>	50
Figura 13. Estrutura química do β -sitosterol.....	72
Figura 14. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de Cm-1	74
Figura 15. Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de Cm-1	74
Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) de Cm-1	75
Figura 17. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) de Cm-1	75
Figura 18. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) de Cm-1	76
Figura 19. Estrutura química do alcaloide bis-indólico caulerpina.....	78
Figura 20. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de Cm-2	81
Figura 21. Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de Cm-2	81
Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de Cm-2	82
Figura 23. Expansão do Espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de Cm-2	82
Figura 24. Espectro de HMQC (CDCl_3 , 200 e 50 MHz) de Cm-2	83
Figura 25. Expansão do Espectro de HMQC (CDCl_3 , 200 e 50 MHz) de Cm-2	83
Figura 26. Expansão do espectro NOESY (200 MHz, CDCl_3) de Cm-2	84
Figura 27. Espectro HMBC (200 e 50 MHz, CDCl_3) de Cm-2	84
Figura 28. Expansão do espectro HMBC (200 e 50 MHz, CDCl_3) de Cm-2	85
Figura 29. Expansão do espectro HMBC (200 e 50 MHz, CDCl_3) de Cm-2	85
Figura 30. Possibilidades estruturais para Hm-1	87
Figura 31. Estrutura química do esteroide Saringosterol.....	88
Figura 32. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de Hm-1	91
Figura 33. Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de Hm-1	91
Figura 34. Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de Hm-1	92
Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) de Hm-1	92
Figura 36. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) de Hm-1	93
Figura 37. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) de Hm-1	93
Figura 38. Possibilidades estruturais para Hm-2	95

Figura 39. Estrutura química do 2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona, 5-etil-5-fenil.....	96
Figura 40. Espectro na região do Infravermelho de Hm-2 (Pastilha de KBr).....	99
Figura 41. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, Py-D ₅) de Hm-2	100
Figura 42. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, Py-D ₅) de Hm-2	100
Figura 43. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, Py-D ₅) de Hm-2	101
Figura 44. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, Py-D ₅) de Hm-2	101
Figura 45. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, Py-D ₅) de Hm-2	102
Figura 46. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, Py-D ₅) de Hm-2	102
Figura 47. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, Py-D ₅) de Hm-2	103
Figura 48. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, Py-D ₅) de Hm-2	103
Figura 49. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, Py-D ₅) de Hm-2	104
Figura 50. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, Py-D ₅) de Hm-2	104
Figura 51. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, Py-D ₅) de Hm-2	105
Figura 52. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, Py-D ₅) de Hm-2	105
Figura 53. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, Py-D ₅) de Hm-2	106
Figura 54. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, Py-D ₅) de Hm-2	106
Figura 55. Cromatograma de Hm-2 obtido em CG-EM.....	107
Figura 56. Espectro de massas de Hm-2	107
Figura 57. Possibilidades estruturais dos núcleos A e B da substância Bt-1	109
Figura 58. Estrutura química do colest-4-en-3-ona.....	109
Figura 59. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-1	112
Figura 60. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-1	112
Figura 61. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-1	113
Figura 62. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl ₃) de Bt-1	113
Figura 63. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl ₃) de Bt-1	114
Figura 64. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-1	114
Figura 65. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-1	115
Figura 66. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-1	115
Figura 67. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-1	116
Figura 68. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-1	116
Figura 69. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-1	117
Figura 70. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-1	117
Figura 71. Estrutura química do ftalato Di-isobutilftalato.....	119
Figura 72. Espectro na região do Infravermelho de Bt-2 (Pastilha de KBr).....	121
Figura 73. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl ₃) de Bt-2	122
Figura 74. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-2	122
Figura 75. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-2	123
Figura 76. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-2	123
Figura 77. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-2	124
Figura 78. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-2	124
Figura 79. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-2	125
Figura 80. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-2	125
Figura 81. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de Bt-2	126

Figura 82. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, CDCl_3) de Bt-2	126
Figura 83. Possibilidades estruturais para If-1	128
Figura 84. Análise do pico do íon molecular de If-1	130
Figura 85. Estrutura química do N-[(4E)-3-hidroxi-1-{[(sodiooxi)sulfonil]oxi}non-4-en-2-il]dotriacontano.....	131
Figura 86. Espectro na região do Infravermelho de If-1 (Pastilha de Br).....	133
Figura 87. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de If-1	134
Figura 88. Expansão do espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de If-1	134
Figura 89. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de If-1	135
Figura 90. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (75 MHz, CDCl_3) de If-1	133
Figura 91 . Expansão do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (75 MHz, CDCl_3) de If-1	136
Figura 92. Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) de If-1	136
Figura 93. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) de If-1	137
Figura 94. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) de If-1	137
Figura 95. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (300 MHz, CDCl_3) de If-1	138
Figura 96. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (300 MHz, CDCl_3) de If-1	138
Figura 97. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (300 MHz, CDCl_3) de If-1	139
Figura 98. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (300 MHz, CDCl_3) de If-1	139
Figura 99. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (300 MHz, CDCl_3) de If-1	140
Figura 100. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (300 MHz, CDCl_3) de If-1	140
Figura 101. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (300 MHz, CDCl_3) de If-1	141
Figura102. Espectro de massas (EM-MALDI) de If-1	142
Figura103. Espectro de massas (EM-MALDI) de If-1	143

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação Taxonômica do gênero <i>Caulerpa</i>	28
Quadro 2. Porcentagem de ftalatos naturais encontrados em espécies de algas vermelhas marinhas coletadas no estado do Espírito Santo, Brasil.....	36
Quadro 3. Classificação Taxonômica de <i>Hypnea musciformis</i>	38
Quadro 4. Classificação Taxonômica de <i>Bryothamnion triquetrum</i>	43
Quadro 5. Classificação Taxonômica de <i>Ircinia félix</i>	48
Quadro 6. Screening da atividade citotóxica da caulerpina em linhagens de células tumorais humanas. Doxirrubicina (Dox) foi usada como controle positivo. A tabela esta apresentando a inibição da proliferação (%) realizado em duplicata pelo método do MTT após 72 horas de incubação.....	153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metabólitos secundários isolados de <i>Hypnea musciformis</i>	40
Tabela 2. Dados comparativos de RMN ¹³ C da substância Cm-1 (δ, CDCl ₃ , 50 MHz) com modelos da literatura (δ, C ₅ D ₅ N, 100 MHz), (Tomaz,2008).....	73
Tabela 3. Dados de RMN de ¹ H (500 MHz), ¹³ C (125 MHz) e correlações entre sinais de ¹ H x ¹³ C (HMBC) de Cm-2 registrados em CDCl ₃ (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).....	79
Tabela 4. Dados comparativos de RMN ¹³ C da substância Cm-2 (δ, CDCl ₃ , 50 MHz) com modelos da literatura (δ, CDCl ₃ , 125 MHz), (LORENZO, 2010).....	80
Tabela 5. Dados de RMN de ¹ H (200 MHz), ¹³ C (50 MHz) de Hm-1 registrados em CDCl ₃ (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).....	89
Tabela 6. Dados comparativos de RMN ¹³ C da substância Hm-1 (δ, CDCl ₃ , 50 MHz) com modelos da literatura (δ, CDCl ₃ , 125 MHz), (AYYAD et al., 2003).....	90
Tabela 7. Dados de RMN de ¹ H (500 MHz), ¹³ C (125 MHz) e correlações entre sinais de ¹ H x ¹³ C (HMQC e HMBC) de Hm-2 registrados em Py-D ₅ (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).....	97
Tabela 8. Dados comparativos de RMN ¹³ C da substância Hm-2 (δ, CDCl ₃ , 50 MHz) com modelos da literatura (CD ₃ OD, 100 MHz), (LONG; GOLDSTEIN, 1974).....	98
Tabela 9. Dados de RMN de ¹ H (500 MHz), ¹³ C (125 MHz) e correlações entre sinais de ¹ H x ¹³ C (HMQC e HMBC) de Bt-1 registrados em CDCl ₃ (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).....	110
Tabela 10. Dados comparativos de RMN ¹³ C da substância Bt-1 (δ, CDCl ₃ , 50 MHz) com modelos da literatura (δ, C ₅ D ₅ N, 100 MHz), (LANG, 2006).....	111
Tabela 11. Dados de RMN de ¹ H (500 MHz), ¹³ C (125 MHz) e correlações entre sinais de ¹ H x ¹³ C (HMQC e HMBC) de Bt-2 registrados em CDCl ₃ (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).....	120
Tabela 12. Dados de RMN de ¹ H (500 MHz), ¹³ C (125 MHz) e correlações entre sinais de ¹ H x ¹³ C (HMQC e HMBC) de I-1 registrados em CDCl ₃ (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).....	132

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS, SIGLAS E UNIDADES

ACN: Acetonitrila

AcOEt: Acetato de Etila

Ara-A: adenina-arabinosídeo

Ara-C: citosina-arabinosídeo

A_{TX}: Absorbância do poço contendo controle positivo com Triton-X

A_{óleo}: Absorbância do poço contendo a concentração do O.E.H.

AZT: Azidotimidina

BB: Broadening

BHT: butilhidroxitolueno

CC: cromatografia em coluna

CC: cromatografia de adsorção em coluna aberta

CCD: cromatografia de camada delgada

CCDA: Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CDCl₃: clorofórmio deuterado

CD₃OD: metanol deuterado

EC: extrato clorofórmico

CENAUREMN: Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear

CG-EM: Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLP: caulerpina

CH₅₀: (concentração do que produz 50% de hemólise)

D₂O: água deuterada

DBP: di-n-butil ftalato

DEHP: di-(2-etilhexil) ftalato

DEPT-135: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DMSO₄: dimetilsulfóxido

DO_{Branco}:Densidade óptica dos poços contendo apenas o meio de cultura

DO_{Células tratadas}:Densidade óptica dos poços com o produto teste

DO_{Controle negativo}:Densidade óptica dos poços do controle negativo

EM: Espectrometria de massa

EMB: extrato metanólico bruto

EMB_{BT}: extratos brutos de *Bryothamnion triquetrum*

EMB_{HM}: *Hypnea musciformis*

eNOS: sintase de óxido nítrico endotelial

Hex: hexano

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Coherence

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation

J: constante de acoplamento

KCl: cloreto de potássio

LABETOX: Laboratório de Ensaio Toxicológicos

LAFI Laboratório de Farmacologia e Imunidade

MeOH: metanol

MHz: megahertz

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio

Na₂SO₄: sulfato de sódio anidro

NOESY: Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

NUCAL: Núcleo de Caracterização e Análise

PBS: solução tampão fosfato

PPgPNSB: Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

RMN de ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

RMN de ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de carbono

TFA: ácido trifluoracético

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO.....	20
I.1 MACROALGAS VERDES: CHLOROPHYTAS.....	26
I.1.1 Considerações sobre o gênero <i>Caulerpa</i> J.V. Lamour. (Caulerpaceae).....	27
I.1.2 Considerações sobre <i>Caulerpa mexicana</i> Sonder ex Kützinger.....	32
I.2 MACROALGAS VERMELHAS: RHODOPHYTAS.....	33
I.2.1 Considerações sobre <i>Hypnea</i> e <i>Hypnea musciformis</i>	37
I.2.2 Considerações sobre <i>Brythamnion</i> e <i>Bryothamnion triquetrum</i>	42
I.3 ESPONJAS.....	45
I.3.1 Considerações sobre <i>Ircinia</i> e <i>Ircinia felix</i>	47
II OBJETIVOS.....	52
II.1 Objetivos gerais.....	53
II.2 Objetivos específicos.....	53
III CAPÍTULO I: ESTUDO QUÍMICO.....	54
III.1 METODOLOGIA.....	54
III.1.2 Métodos Cromatográficos.....	55
III.1.3 Pontos de fusão.....	56
III.1.4 Métodos espectroscópicos.....	56
III.1.5 Coleta e processamento do material em marinho.....	57
III.1.6 Obtenção dos extratos e seus particionamentos.....	58
III.1.7 Isolamento dos compostos de <i>Caulerpa mexicana</i>	63
III.1.8 Isolamento dos compostos de <i>Hypnea musciformis</i>	64
III.1.9 Isolamento dos compostos de <i>Bryothamnion triquetrum</i>	65
III.1.10 Isolamento dos compostos de <i>Ircinia felix</i>	67
III.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
III.2.1 Substâncias isoladas neste trabalho.....	70
III.2.2 Resultados obtidos com <i>Caulerpa mexicana</i>	71
III.2.2.1 Identificação estrutural de Cm-1.....	71
III.2.2.2 Identificação estrutural de Cm-2.....	77
III.2.3 Resultados obtidos com <i>Hypnea musciformis</i>	86
III.2.3.1 Identificação estrutural de Hm-1.....	86
III.2.3.2 Identificação estrutural de Hm-2.....	94
III.2.4 Resultados obtidos com <i>Bryothamnion triquetrum</i>	108
III.2.4.1 Identificação estrutural de Bt-1.....	108
III.2.4.2 Identificação estrutural de Bt-2.....	118
III.2.5 Resultados obtidos com <i>Ircinia felix</i>	127
III.2.5.1 Identificação estrutural de I-1.....	127
IV CAPÍTULO II: ESTUDO FARMACOLÓGICO.....	144
IV.1 METODOLOGIA.....	145
IV. 1.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de camundongos Swiss.....	145
IV.1.2 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vitro</i> em linhagens de Ehrlich.....	146
IV.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	148
IV.2.1 Resultados farmacológicos obtidos com <i>Caulerpa mexicana</i>	149
IV.2.1.1 Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório.....	149
IV.2.1.2 Efeito espasmódico da Caulerpina (CLP).....	151
IV.2.1.3 Citotoxicidade <i>in vitro</i> de caulerpina em linhagens de células tumorais humanas.....	152
IV.2.2 Resultados farmacológicos obtidos com <i>Hypnea musciformis</i>	152

IV.2.2.1 Citotoxicidade em eritrócitos de camundongos Swiss e atividade antitumoral <i>in vitro</i> em linhagens de <i>Ehrlich</i>	153
IV. 2.3 Resultados farmacológicos de <i>Bryothamnion triquetrum</i>	153
IV. 2.3.1 Citotoxicidade em eritrócitos de camundongos Swiss e atividade antitumoral <i>in vitro</i> em linhagens de <i>Ehrlich</i>	154
IV.2.3.2 Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório.....	155
V CONSIDERAÇÕES FINAIS	156
VI CONCLUSÃO	158
REFERÊNCIAS	161
ANEXO	

Introdução



I INTRODUÇÃO

O ambiente marinho, principalmente nas regiões tropicais, apresenta uma diversidade de espécies comparável àquela presente nas florestas tropicais. O Brasil possui uma enorme biodiversidade aquática e terrestre que está intimamente ligada com a rica herança sócio-cultural do país. No ambiente marinho as algas representa um dos maiores grupos em termos de diversidade. Do total de 32.000 espécies conhecidas, pelo menos 820 táxons foram identificados ao longo da costa brasileira (MARINHO-SORIANO et al., 2011). Adicionalmente, considera-se que existam cerca de 9000 espécies de esponjas no planeta, em recifes de corais, ou mesmo em lagos de água doce (MULLER, 2003).

Os mares são habitados por um grande número de plantas, invertebrados marinhos e microrganismos. Esses seres vivos marinhos são fontes de um grande número de substâncias com estruturas únicas, responsáveis por funções ecológicas diferentes que atuam na comunicação entre espécies, na defesa contra herbívoros ou predadores, entre competidores, na reprodução ou simplesmente como produto de seu metabolismo (PINTO et al., 2002). Além de apresentarem importância para a compreensão da evolução e manutenção das comunidades marinhas nos diferentes habitats, são fontes potencialmente prolíficos de metabólitos secundários bioativos, que podem apresentar grupos funcionais úteis, para modelos estruturais, no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos e no tratamento de doenças, como antitumorais, antiviróticos e anti-inflamatórios (ABRANTES et al., 2010; FOLMER et al., 2010; DELLAI et al., 2010).

Diante dessas premissas, nos últimos cinco anos, o número de substâncias orgânicas isolados de fontes marinhas tem sido surpreendente. Segundo Munro e Blunt (2009) estamos próximos a 20.000 metabólitos isolados de organismos marinhos com mais de 30 compostos em fases clínicas distintas. Em sua última revisão anual sobre os produtos naturais marinhos, Blunt et al. (2010) relaciona que mais de 1000 moléculas isoladas apenas no ano de 2008 em todo o mundo, publicadas em cerca de 370 artigos internacionais. Esse número significou um aumento de mais de 11% do número de moléculas conhecidas em 2007, o que revela o grande desenvolvimento da área.

Apesar desses dados, é necessário se aprofundar ainda mais sobre essa espetacular fonte de diversidade molecular marinha, tendo em vista a descoberta de novos protótipos (TEIXEIRA, 2009), pois substâncias com atividades antivirais e principalmente anticâncer,

fazem parte da composição de muitos produtos marinhos utilizados pela indústria farmacêutica e, por essa razão, existe um grande interesse da comunidade científica no estudo de produtos marinhos. Um bom exemplo da importância de descoberta de novas moléculas foi o isolamento dos nucleosídeos espongouridina e espongotimidina (Figura 1) da esponja *Cryptotethya crypta*, onde seus análogos sintéticos, a adenina-arabinosídeo (ara-A) e a citosina-arabinosídeo (ara-C) (Figura 1), serviram de modelo para o desenvolvimento de inúmeros antivirais como o Azidotimidina (AZT) (Figura 2), medicamento básico no tratamento da AIDS que é até hoje utilizado na terapêutica (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

Figura 1. Estrutura química da espongouridina e espongotimidina e seus análogos sintéticos.

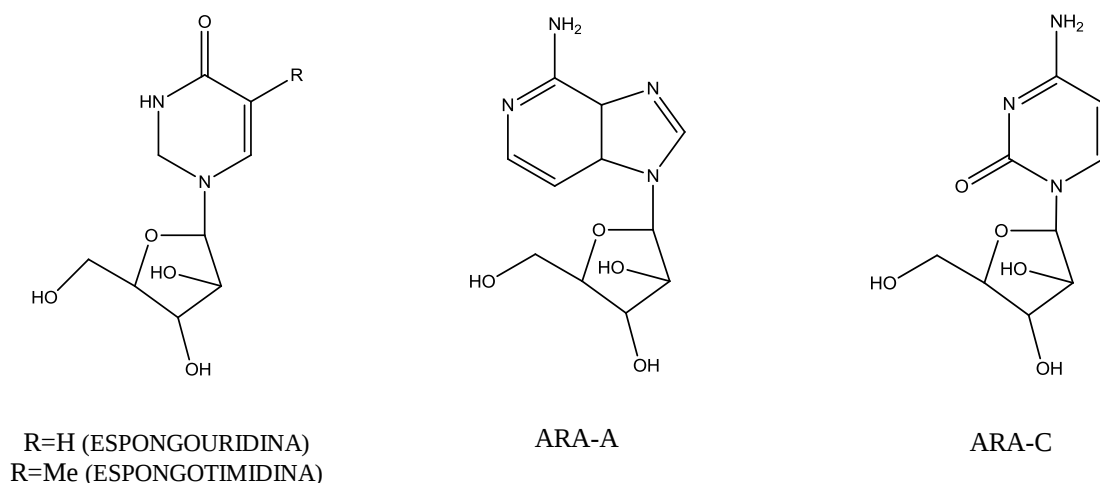
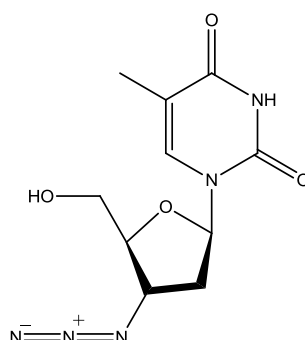


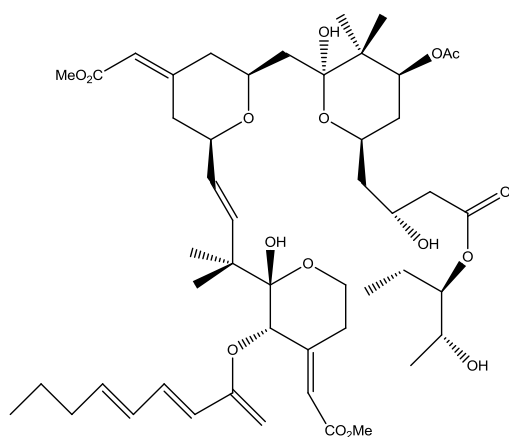
Figura 2. Estrutura química do Azidotimidina (AZT).



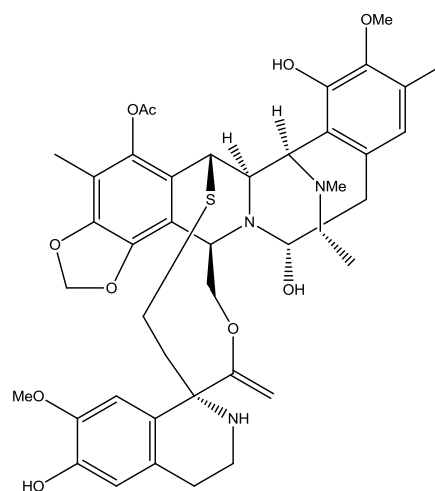
Outro sucesso para a indústria farmacêutica, foi o produto natural conotoxina isolado do molusco *Conus magnus*, que deu origem ao Prialt® (Ziconotide) utilizado para o

tratamento da dor crônica e intensa em adultos que necessitam de um analgésico por injeção intratecal (injeção no canal raquideano, diretamente no espaço subaracnoide) (PROKSCH et al., 2003). Outros exemplos mostram também que pesquisas com microrganismos marinhos levaram ao isolamento de briostaina 1 (Figura 3) uma lactona macrocíclica isolada do briozoário *Bugula neritina*, a ecteinascidina 743 (Figura 3), um alcaloide tetrahydroisoquinolínico, isolado do tunicato *Ecteiascidia lurbinata*, a aplidina (Figura 3) isolada de *Aplidium albicans* e o discodermolideo (Figura 3), lactona polihidroxilada, isolada da esponja *Discordemia dissoluta*, onde todas essas substâncias passaram pela fase clínica de experimentos como anticancerígenas (NEWMAN et al., 2004; COSTA-LOTUFO, 2009; WILKE e JIMENEZ, 2010).

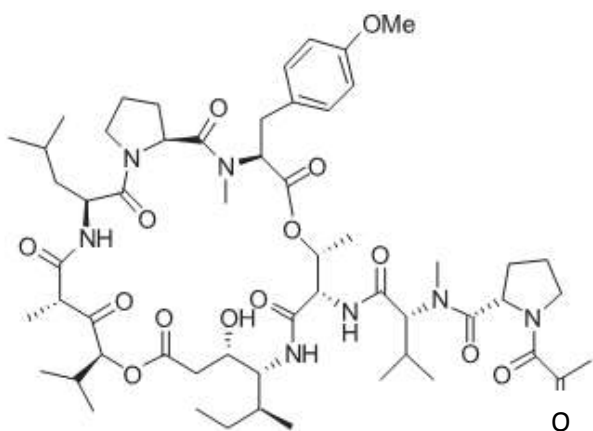
Figura 3. Substâncias químicas de origem marinha que estão em fase clínica como anticancerígenas.



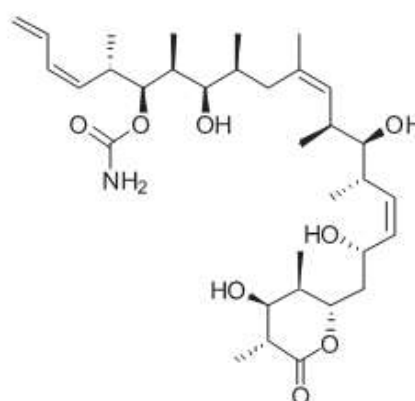
Briostatina 1



Ecteinascidina 743



Aplidina



Discodermolido

Considerando apenas os protótipos em fase de testes clínicos, pode-se reconhecer que a grande maioria dos alvos identificados apresenta-se como relevantes no tratamento do câncer e é, exatamente, no estudo e na terapêutica dessa doença que se pode visualizar a importância em buscar compostos promissores como agentes terapêuticos, principalmente por alternativas as formas resistentes ou mutagênicas da doença e que seja mais eficaz e menos tóxicas aos organismos. Desta forma, o Brasil com uma extensa costa de 8.698 km, uma diversidade biológica, e com grande número de pesquisadores na área de produtos naturais,

não pode abdicar dos estudos sobre o potencial tecnológico dos organismos marinhos. Logo, o conhecimento existente sobre a química dos organismos do mar, motivam efetivamente, as pesquisas nesta área no Brasil (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

No nosso país, a pesquisa de produtos naturais marinhos iniciou por volta de 1962, no Instituto de Pesquisa Agrícola do Rio de Janeiro. Posteriormente, órgãos federais como a EMBRAPA e Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) começaram a desenvolver investigações científicas nesta área. Em 1976, após uma década de pesquisa em produtos naturais marinhos, a SARSA laboratórios farmacêuticos do Rio de Janeiro, formou uma equipe multidisciplinar com químicos, biólogos e farmacologistas que durante 5 anos realizaram um screening de mais de 500 extratos de esponjas, anêmonas do mar, estrelas do mar e várias algas. Até 1997 os estudos brasileiros concentraram-se principalmente em invertebrados (Equinodermos, Celenterados, Poríferas, Tunicados e Moluscos) e em algas pardas, verdes e vermelhas. (KELECOM, 1997).

Diante da realidade acima citada, várias pesquisas no Brasil estão sendo desenvolvidas na busca racional de bioprodutos de valor agregado. Vislumbrando atingir estes objetivos, a partir do Edital MCT/CNPq/FNDCT Nº 71/2010 – foram criados quatro Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia em Ciências do Mar, dentre eles o nosso, sendo coordenado pelo Prof. Dr. José Maria Landim Domingues da UFBA, cujo objetivo dentre outros, e atendendo à indução do edital, é o conhecimento dos fundos marinhos: geodiversidade e biodiversidade e mapeamento da biodiversidade marinha, que poderá contribuir também para o desenvolvimento tecnológico nacional, levando em conta que a diversidade micromolecular dos inúmeros organismos marinhos ainda é muito pouco explorada no Brasil, como fonte de substâncias de interesse farmacológico.

Reconhecendo a importância destes produtos como fonte da riqueza da nossa flora marinha e, como fonte inigualável de diversidade estrutural de constituintes químicos das mais variadas classes, capazes de construir moléculas de alta complexidade estrutural para o desenvolvimento de novos modelos estruturais, o grupo de Química de Produtos Naturais da UFPB coordenado pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho no âmbito do projeto “Rede Interinstitucional de Algas Bentônica” (Edital MCT-CNPq/MS-SCTIE-DECIT/CTSaúde– Nº 10/2006) e projeto temático “Bioprospecção de Produtos Naturais de Origem Marinha” do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ambientes Marinhos Tropicais (Edital MCT/CNPq/FNDCT Nº 71/2010), optou por estudar três espécies de macroalgas: *Caulerpa*

mexicana (alga verde), *Hypnea musciformis* e *Bryothamnion triquetrum* (algas vermelhas), e uma esponja: *Ircinia felix*., cujas espécies além de habitarem a zona litorânea da Paraíba, encontram-se relativamente em abundância, o que facilitou sua coleta e consequentemente o rendimento do material para estudos químicos e farmacológicos.

1.1 MACROALGAS VERDES: CHLOROPHYTAS

As algas verdes estão inseridas no filo Chlorophyta, constituindo o maior e mais diversificado grupo de algas, tanto em nível de espécie, como também de padrões morfológicos, estruturais e reprodutivos (OLIVEIRA-CARVALHO, 2003). Atualmente, o filo encontra-se representado por 17.000 espécies (OLIVEIRA-CARVALHO, 2008). Estas algas são extremamente abundantes nos ambientes aquáticos, classificando-se como um dos mais importantes componentes do fitoplâncton. As algas verdes são responsáveis pela maior parte da produção de oxigênio molecular disponível no planeta a partir da fotossíntese, habitando águas doces ou salgadas, solos úmidos ou troncos. Estes organismos podem também estabelecer relações de mutualismo com outros seres vivos, como os fungos, formando os líquens (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

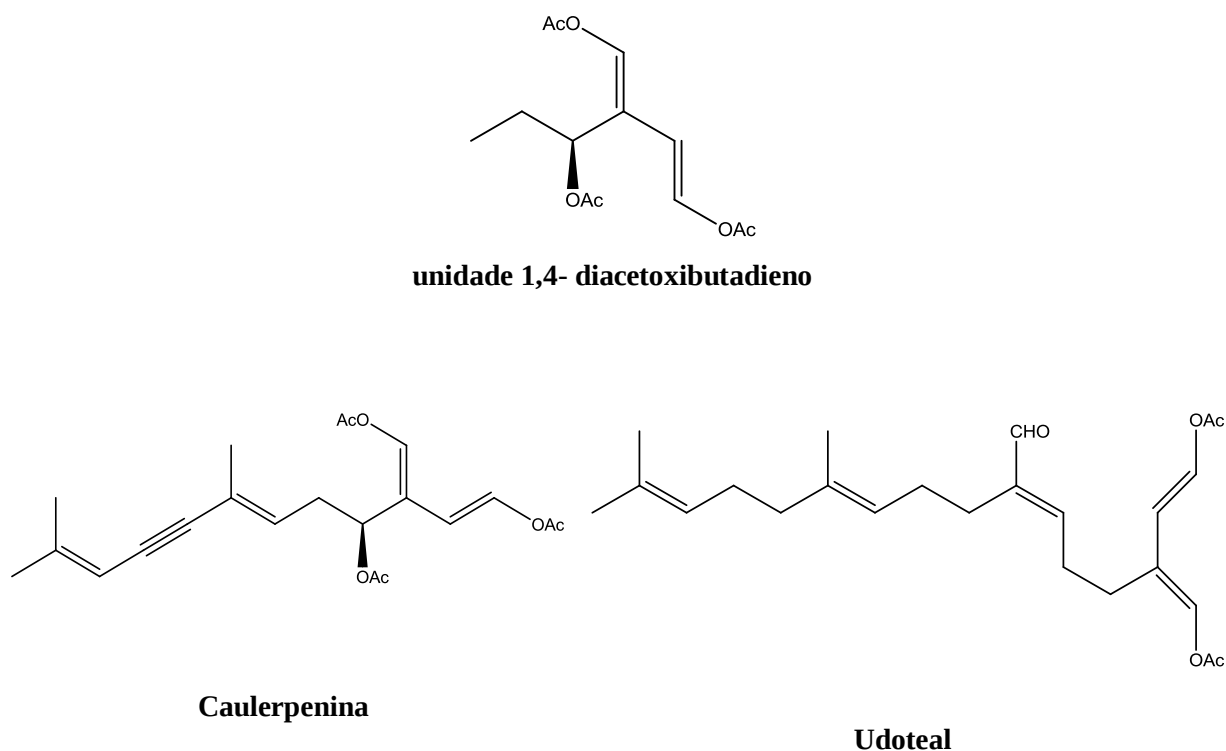
As clorófitas marinhas ocorrem, em sua maioria, em águas pouco profundas. No entanto, nos mares tropicais e subtropicais alguns de seus representantes são encontrados a profundidades em torno de 100 m. Algumas ordens são predominantemente marinhas, como Bryopsidales. Dentre estas destacam o gênero *Caulerpa* que é característico da flora dos mares tropicais (LUCENA et al., 2007).

De todas as algas, as verdes são os produtores menos prolíficos de produtos naturais, com menos de 300 compostos conhecidos e apenas um pequeno número de novos metabólitos secundários reportados a cada ano (BLUNT et al., 2010). As algas marinhas verdes são conhecidas por produzir substâncias semelhantes aos das algas vermelhas, principalmente os di e sesquiterpenoides, mas sem a extensa halogenação das substâncias das algas vermelhas (VIDAL, 2006).

A característica química de Chlorophyta é a presença de "1,4-diacetoxibutadieno", éster dienolato, encontrado em muitos terpenos de algas verdes (Figura 4). É importante citar, que menos da metade dos produtos naturais relatados de algas verdes, são provenientes da ordem Bryopsidales e a grande maioria de seus metabólitos (> 85%) são terpenóides (MUNRO; BLUNT, 2009), onde as famílias Udoteaceae, Caulerpaceae e Halimedaceae

produzem mais de 85% de substâncias conhecidos em Bryopsidales, muitos dos quais contêm a anteriormente mencionada unidade 1,4-diacetoxibutadieno, exemplos dos quais incluem caulerpenina de *Caulerpa flexilis* e udoteal encontrado em *Udotea* sp. (VIDAL, 2006) (Figura 4).

Figura 4. Algumas substâncias químicas isoladas do filo Chlorophyta com unidades 1,4-diacetoxibutadieno.



I.1.1 Considerações sobre o gênero *Caulerpa* J.V. Lamour. (Caulerpaceae).

Caulerpa foi reconhecido por Lamouroux em 1809 como pertencente à família Caulerpaceae que abriga, atualmente, os gêneros *Caulerpa* e *Caulerpella* (Quadro 1) (WYNNE, 2005). O gênero compreende espécies morfologicamente complexas, cujos limites de separação têm sido bastante confusos. Espécies de *Caulerpa* distribuem-se em regiões tropicais à subtropicais do mundo, mas algumas espécies se estendem no mar mediterrâneo e em regiões temperadas da Austrália (KEVEKORDES et al. 2006). No Brasil, o gênero *Caulerpa* está representado por 38 táxons.

Estudos realizados no litoral pernambucano e arquipélago de Fernando de Noronha, observaram que o gênero apresenta uma grande diversidade taxonômica. Este fato se justifica porque a costa do referido estado, se encontra inserida na região tropical, considerada uma das mais representativas em diversidade específica do litoral brasileiro (BRAYNER et al., 2008).

Quadro 1. Classificação Taxonômica do gênero *Caulerpa*. (Fonte: www.algaebase.org).

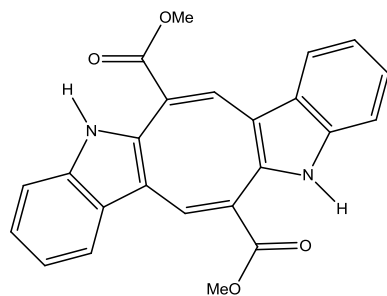
Reino	Plantae
Filo (Divisão)	Chlorophyta
Classe	Ulvophyceae
Ordem	Bryopsidales
Família	Caulerpaceae
Gênero	<i>Caulerpa</i>

A flora algológica marinha paraibana começou a ser estudada a partir das primeiras décadas deste século. A publicação da primeira lista de espécies efetuadas por Luetzelburg, entre 1922 e 1923, pode ser considerada o marco inicial das investigações ficológicas na Paraíba (CARVALHO, 1983). Situado na região nordeste, o estado da Paraíba é detentor de um litoral com 117 km de extensão. Seu ambiente litorâneo apresenta diferentes tipos de substratos propícios para o crescimento da flora bentônica marinha típica de áreas tropicais. Em levantamento feito na flora do infralitoral do município de Pitimbu (Litoral Sul do Estado da Paraíba), foram identificadas 5 espécies de *Caulerpa*: *Caulerpa lanuginosa* J. Agardh, *Caulerpa kempfii* (Forsskal) J. V. Lamouroux, *Caulerpa kempfii* A.B. Joly & S. Pereira, *Caulerpa mexicana* Sonder ex Kützinger, *Caulerpa verticillata* J. Agardh e *Caulerpa sertularioides* (S. G. Gmelin) M. Howe (LUCENA et al., 2007).

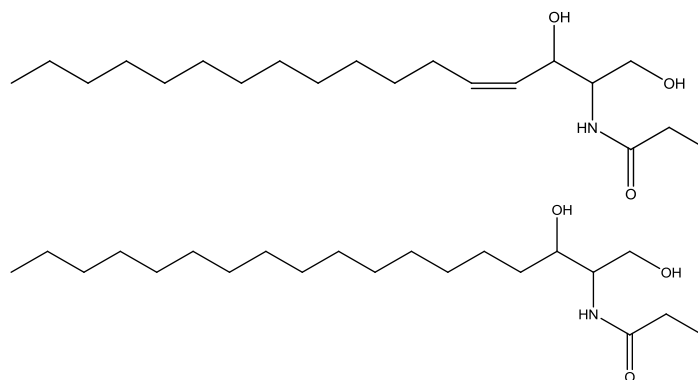
Segundo levantamento realizado em bancos de dados, o gênero *Caulerpa* é composto por diferentes classes de substâncias. Entretanto as que apresentam maior prevalência são os alcalóides, terpenoides e esteroides (Figura 5). A substância majoritária deste gênero é o alcaloide indólico caulerpina, este por sua vez está presente em vinte espécies, entre elas a *C. Ashmeadii*, *C. Lamourouxii*, *C. lentillifera*, *C. mexicana* (SCHWEDE et al., 1987), *C. peltata* (CAPON, et al., 1983.), *C. racemosa* (AYYAD; BADRIA, 1994.), *C. sertularioides* (RAUB et

al., 1987.; XU et al., 1998). Estudos com as espécies *C. ashmeadii*, *C. paspaloides*, *C. lentillifera*, *C. racemosa* var. *Uvifera*, *C. sertularioides*, levaram ao isolamento do composto formado por hidroxí-amidas, denominada caulerpircina (VEST et al., 1983; NIELSEN et al., 1982). Outras substâncias que apresentam relevância no gênero, são os sesquiterpenos caulerpenina, metabólito majoritário da *Caulerpa taxifolia* (AMICO et al., 1978) e flexilina (BLACKMAN; WELLS, 1978), colesterol (XU et al., 1998;), o β -sitosterol e o colesteno, (ANJANEYULU et al., 1991; HANDLEY; BLACKMAN, 2001), o diterpeno trifarina, o ácido caulerpínico (PAUL; FENICAL, 1985;) isolados em *Caulerpa mexicana*. Recentemente, foram isoladas a partir de *Caulerpa racemosa* duas novas substâncias derivados de para-xilenos, chamados caulerprenilol A e B e dois novos alcalóides bisindólico racemosina A e B (Figura 5)(LIU et al, 2013 a; LIU et al, 2013b).

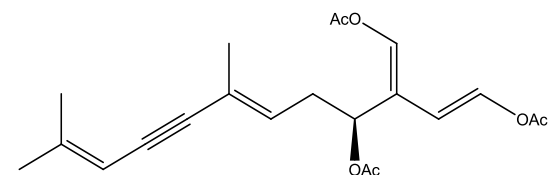
Figura 5. Principais substâncias isoladas do gênero *Caulerpa*.



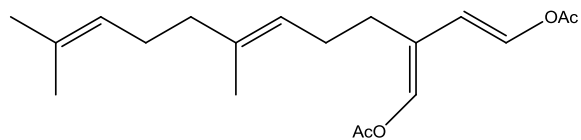
Caulerpina



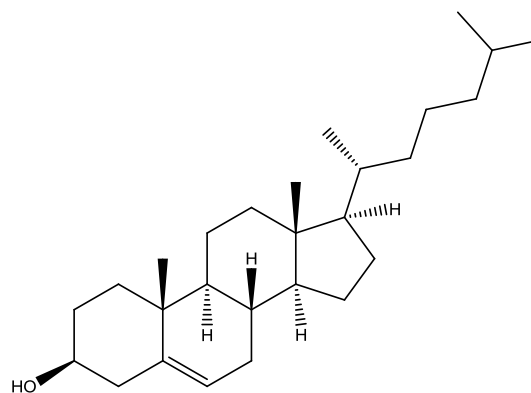
Caulerpicina



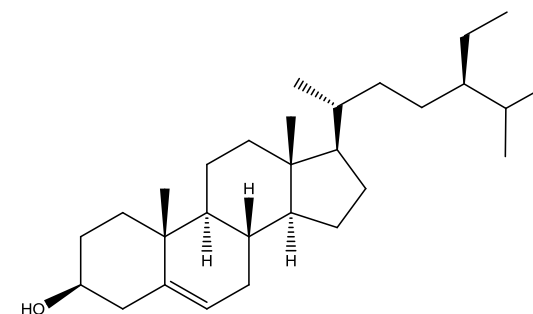
Caulerpenina



Flexilina

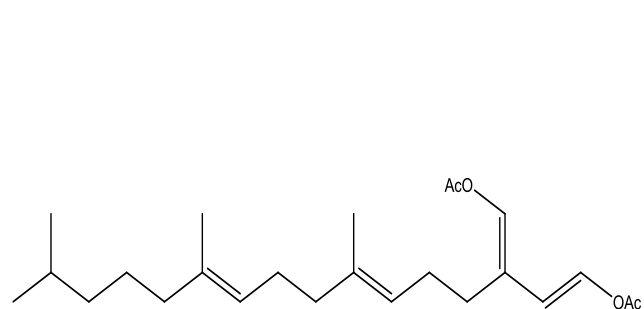


colesterol

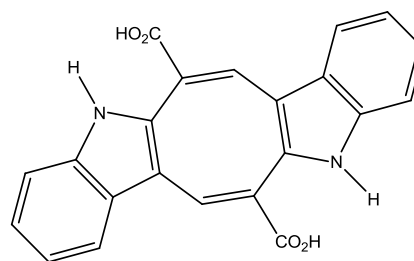


β-sitosterol

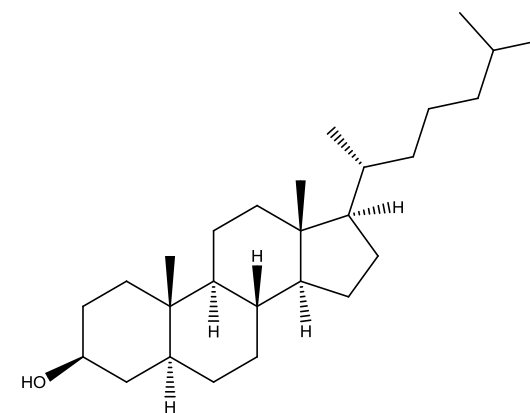
Figura 5. Principais substâncias isoladas do gênero *Cauperpa* (continuação).



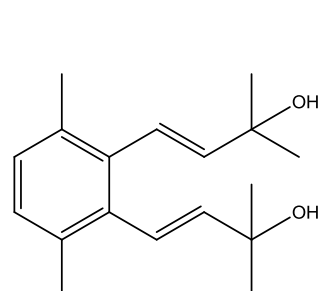
trifarina



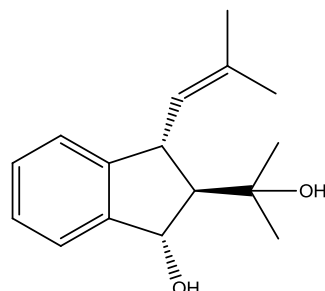
ácido caulerpínico



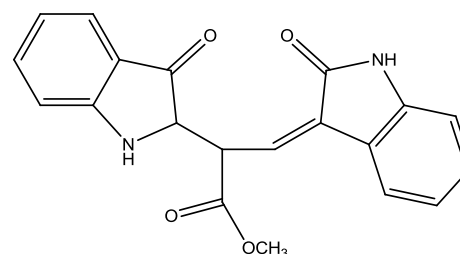
colestenol



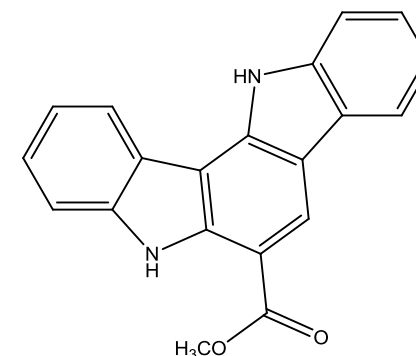
caulerprenilol A



caulerprenilol B



racemosina A



racemosina B

Vários estudos têm demonstrado o potencial terapêutico de diversas espécies de *Caulerpa*, isto é confirmado através de levantamento bibliográfico, que mostra que os extratos testados de muitas espécies apresentam um amplo espectro de atividades, incluindo atividades antibacteriana (ALBUQUERQUE et al., 1983; SRIDHAR et al., 1984; USMANGHANI et al., 1984; PEREZ et al., 1990), antifúngica (ALBUQUERQUE et al., 1983; USMANGHANI et al., 1984; PEREZ et al., 1990), antiviral (PREMANTHAN et al., 1994 ; PREMANTHAN et al., 1995; PUJOLA et al., 2012), antitumoral (NAKAMURA et al., 1997), repelente (THANGAM et al., 1993), citotóxica (ARA et al., 1999), anti-inflamatória (LI et al., 2012), entre outros.

I.1.2 Considerações sobre *Caulerpa mexicana* Sonder ex Kützing.

Caulerpa mexicana Sonder ex Kützing (Figura 6), está distribuída nas Ilhas do Atlântico, na América do Sul, na América do Norte, Ilhas do Caribe, Austrália e Nova Zelândia, na África, Ilhas do oceano Índico, sudeste asiático e Ilhas do Pacífico (STAM et al., 2006). A mesma possui quatro sinônimos, *Caulerpa harveyana*, *Caulerpa crassifolia* (C. Agardh) J. Agardh, *Caulerpa crassifolia* f. *mexicana* (Sonder ex Kützing) J. Agardh e *Caulerpa pinnata* f. *mexicana* (Sonder ex Kützing) Weber-van Bosse 1898 (LAM; ZECHMAN, 2006).

Figura 6. Foto ilustrativa de *Caulerpa mexicana* Sonder ex Kützing. (Fonte: www.algaebase.org. Acessado em: 10/07/2012).



De acordo com a literatura, foi identificado na espécie o alcaloide bisindólico caulerpina (Figura 5) (SCHWEDE et al., 1987), os ácidos graxos palmítico, α -linoleico, linoleico e hexadecatrienóico (KHOTIMCHENKO, 1995), as vitaminas α - e β -caroteno e α -tocoferol (SOUSA et al., 2008). Nos extratos polares foram confirmadas a presença de substâncias polifenólicas (ECHAVARRIA, FRANCO e MARTINEZ, 2009).

1.2 MACROALGAS VERMELHAS: RHODOPHYTAS

Com mais de 1.500 substâncias relatadas, a química dos metabólitos secundários de Rhodophyta é mais rica do que as de outras macroalgas, tanto em termos de abundância como diversidade. Com a exceção dos florotaninos, todas as principais classes de produtos naturais estão representadas entre Rhodophyta (AMSLER, 2008).

As algas vermelhas apesar de possuírem um grande número de espécies, geralmente são menores em tamanho e as espécies individuais são menos abundantes que as algas verdes (Chlorophytae) e pardas (Phaeophytae) (VIDAL, 2006).

As algas vermelhas produzem predominantemente derivados isoprenóides e acetogenina, juntamente com alguns aminoácidos, derivados do ácido nucleico e chiquimato. O que realmente distingue as algas vermelhas das demais, é que as mesmas são produtoras de substâncias halogenadas, com mais de 90% contendo bromo ou cloro, em comparação com compostos de algas verdes que contêm apenas 7% e menos de 1% nas algas pardas. Entretanto, estes derivados terpenóicos halogenados têm mostrado apenas uma escassez de bioatividade, o que pode explicar o declínio do interesse na química de algas vermelhas (AMSLER, 2008).

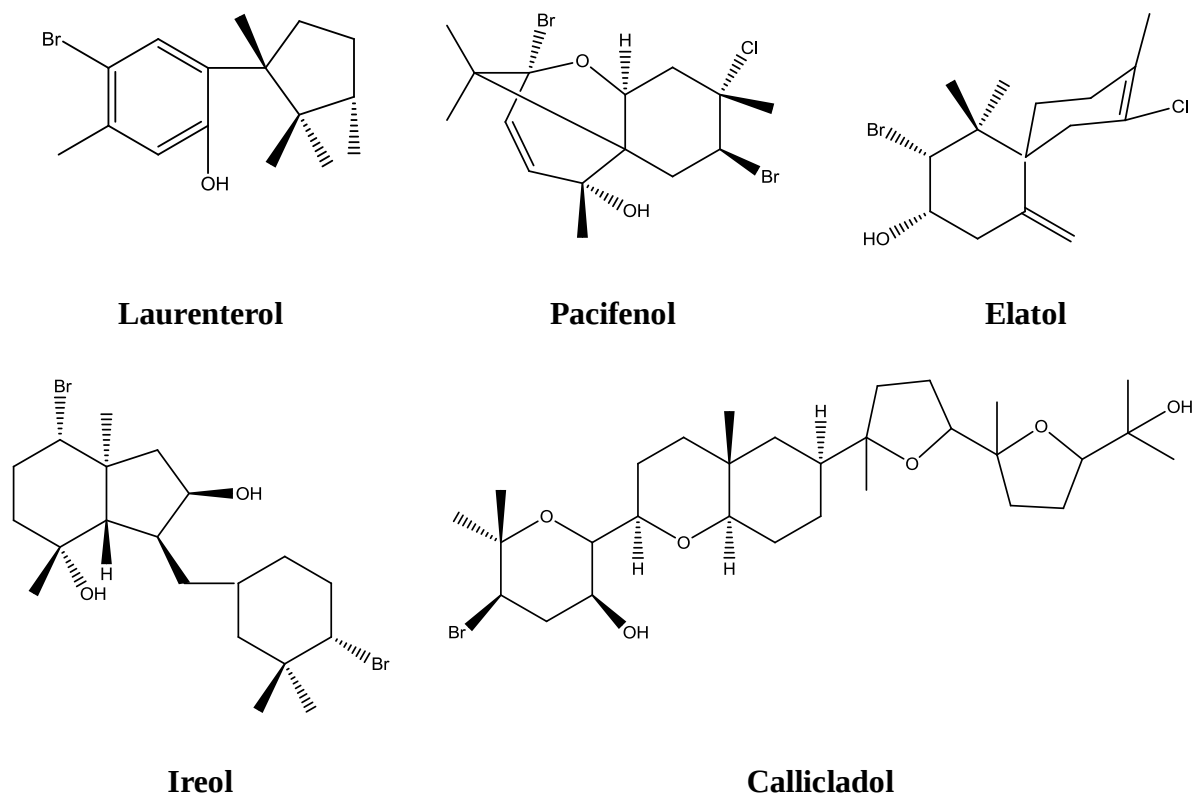
Dentre as substâncias polifenólicas mais importantes das algas vermelhas, os bromofenóis merecem destaque, possuindo estruturas químicas aromáticas hidroxiladas e bromadas em várias posições e em algumas situações, sulfatadas. Outros compostos polifenólicos são os florotaninos, polímeros de alto peso molecular que apresentam como unidade monomérica o floroglucinol e as substâncias polifenólicas sulfatadas. É importante ressaltar, que a maioria dos pesquisadores consideram as substâncias fenólicas simples e ácidos polifenólicos das algas marinhas, como metabólitos secundários (VIDAL, 2006).

Mais da metade dos relatos químicos sobre Rhodophyta vêm da Família Rhodomelaceae (57%) e a grande maioria (85%) por gêneros de *Laurencia*, que produzem

uma riqueza de sesquiterpenos halogenados e acetogeninas C15 (Figura 7). Os sesquiterpenos de *Laurencia*, como também aqueles oriundos de vários outros gêneros de Rhodomelaceae, são tipicamente ciclizados, frequentemente policíclico, como visto na laurinterol e pacifenol (Figura 7) (SIMS et al. 1971). Anéis ligados através de um único átomo, observados em elatol (Figura 7) (SIMS et al., 1974), são comuns entre os sesquiterpenos de *Laurencia*.

Os terpenos mais comuns em Rhodophyta são em grande parte, limitados em *Laurencia*, com algumas exceções. Os diterpenos são principalmente policiclos bromados, tais como o irieol (Figura 7) (AMSLER, 2008), enquanto que na maioria das vezes são triterpenos poliéter, tais como callicladol (SUZUKI et al. 1995). Entretanto, em todas as famílias de Rhodophyta, a quantidade de terpenos polihalogenados é rara, e sesquiterpenos não estão representados neste filo (AMSLER, 2008).

Figura 7. Alguns exemplos de substâncias químicas isoladas de Rhodophyta.



Pesquisas demonstram que espécies de algas vermelhas produzem uma classe de substâncias, comumente, não descritas como originárias de produtos naturais, a classe dos

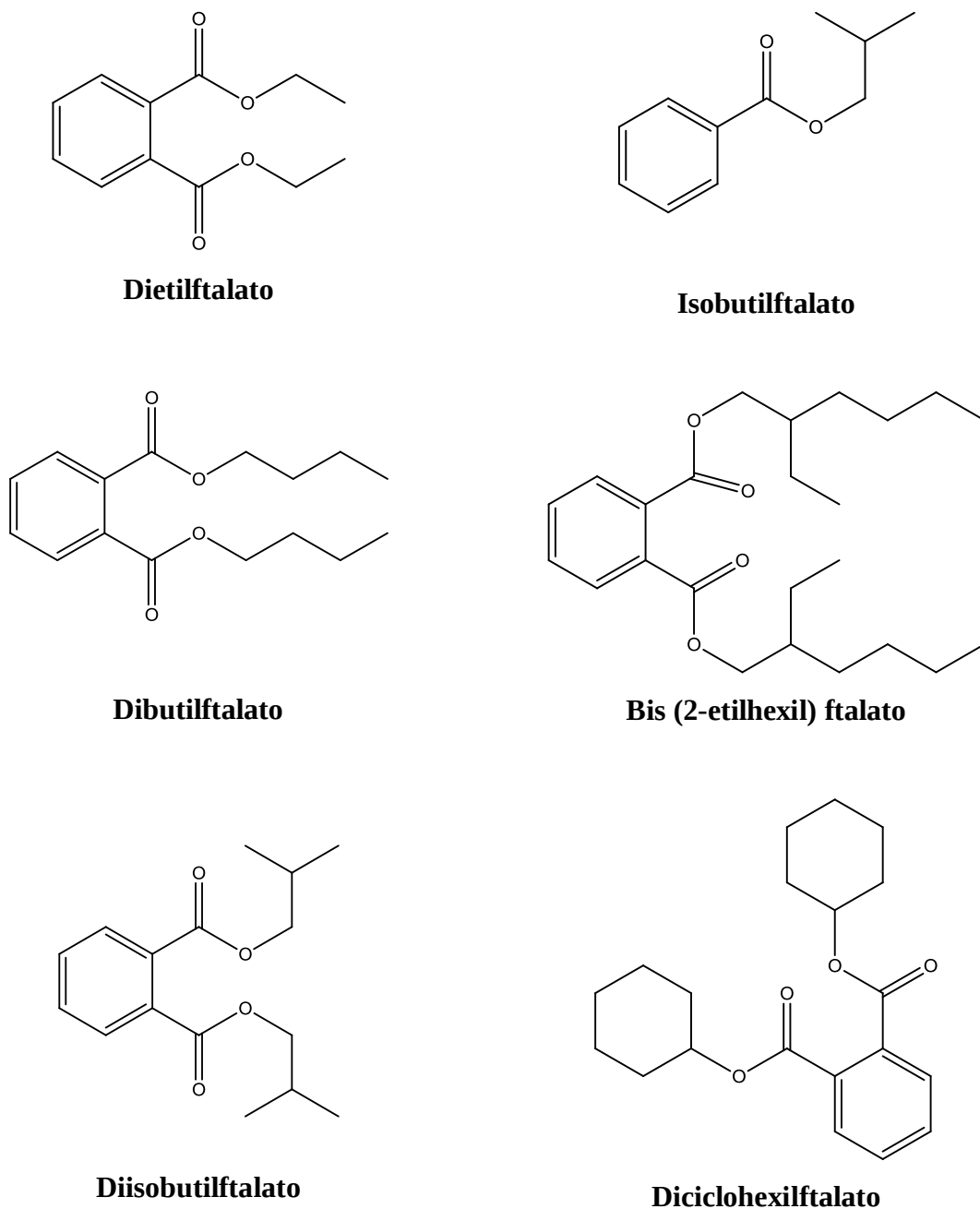
ftalatos. Ésteres de ftalato têm sido amplamente aplicados como plastificantes ou solventes na indústria química (STAPLES, PARKERTON e PETERSON, 2000), entre eles, o di-(2-etilhexil) ftalato (DEHP) e o di-n-butil ftalato (DBP), são mais comumente usados. Entretanto, um levantamento dos componentes solúveis em lípideos de algas, comumente encontrado na costa norte de Taiwan, demonstrou que os dois compostos mencionados acima, foram encontrados em quantidade relativamente grande em todas as amostras de algas estudadas (NOGUCHI, et al., 1979; STEFANOV, et al., 1988; SASTRY; RAO, 1995). Partindo deste pressuposto, Chen (2004), investigou se essas substâncias são naturais ou originários de algum processo comercial, que posteriormente, entraram no ecossistema. Assim, a fim de compreender a origem de ésteres de ftalato, este pesquisador cultivou filamentos da alga vermelha, *Bangia atropurpurea*, em uma água do mar artificial (livre de contaminação e adicionado de $\text{NaH}_{14}\text{CO}_3$ como fonte de carbono) e em uma água do mar natural, para analisar os conteúdos de di-(2-etilhexil) ftalato (DEHP) e di-n-butil ftalato (DBP), em ambas as situações. Os resultados obtidos no presente estudo provaram que as algas vermelhas *Bangia atropurpurea* podem sintetizar DEHP e DBP. E que três outras espécies de algas, que foram cultivadas sob as mesmas condições no laboratório, mostraram diferentes concentrações de ftalatos. Tais resultados devem-se então, a natureza intrínseca das algas.

Estudos no Brasil, também confirmaram a presença de ftalatos naturais em algas vermelhas marinhas, coletadas no estado do Espírito Santo (GRESSLER et al., 2010). Neste estudo, as algas foram submetidas às mesmas condições que no experimento anteriormente citado (quadro 1 e figura 8).

Quadro 2. Porcentagem de ftalatos naturais encontrados em espécies de algas vermelhas marinhas coletadas no estado do Espírito Santo, Brasil. (Fonte: GRESSLER et al., 2010).

Espécie	Ftalatos encontrados	%
<i>L. filiformis</i>	Dietilftalato	0,2
	Isobutilftalato	0,8
	Dibutilftalato	2,8
	Bis (2-etilhexil) ftalato	2,2
<i>L. intricata</i>	Isobutilftalato	6,8
	Dibutilftalato	19,0
	Diciclohexilftalato	2,6
<i>P. brasiliense</i>	Diisobutilftalato	2,1
	Diciclohexiftalato	0,6
	Bis (2-etilhexil) ftalato	1,4
<i>O. secundiramea</i>	Diisobutilftalato	2,7
	Dibutilftalato	4,7
	Diciclohexilftalato	1,5

Figura 8. Ftalatos isolados de algas vermelhas marinhas coletadas no estado do Espírito Santo, Brasil (GRESSLER et al., 2010).



I.2.1 Considerações sobre *Hypnea* e *Hypnea musciformis*

A alga *Hypnea musciformis* (Figura 9) pertence ao gênero *Hypnea* (Quadro 3) que foi reconhecido por Lamouroux em 1813 e compõe a família Cystocloniaceae que abriga, atualmente 18 gêneros, entre eles *Calliblepharis* Klitz., *Craspedocarpus* F. Schmitz in

Schmitz & Hauptfl., *Cystoclonium* Klitz., *Hypnea* J.V. Lamour., *Hypneocolax* Borgesen e *Rhodophyllis* Kutz (WYNNE, 2005).

Figura 9. Foto ilustrativa de *Hypnea musciformis*. (Fonte: www.algaebase.org. Acessado em: 10/07/2013).



Quadro 3. Classificação Taxonômica de *Hypnea musciformis*. (Fonte: www.algaebase.org).

Reino	Plantae
Filo (Divisão)	Rhodophyta
Classe	Florideophyceae
Ordem	Gigartinales
Família	Cystocloniaceae
Gênero	<i>Hypnea</i>

Neste gênero existem 112 atualmente nomes de espécies no banco de dados do Algae base no momento, dos quais 54 espécies foram atualmente aceitas taxonomicamente.

Hypnea musciformis apresenta ramos cilíndricos com 10-20 cm de altura e 0,5-1,0 cm de diâmetro, que tornam-se progressivamente mais finos. Possui estrutura firme, cartilaginosa e altamente ramificada, com ramificações variáveis e irregulares, apresentando-se, algumas vezes, torcida em torno do eixo de outras algas. As extremidades de muitos eixos e galhos são

achatados com ganchos largos, o que as diferencia de outras espécies de *Hypnea*. Normalmente são vermelhas, mas podem ser marrom amarelado em ambientes com luz alta ou em água com poucos nutrientes (BOTANY, 2001).

Hypnea musciformis tem ampla distribuição mundial, podendo ser encontrada nos mares da Europa, Ilhas do Atlântico, América do Norte, América do Sul, Ilhas do Caribe, África, Sudoeste da Ásia, Ilhas do Pacífico, entre outros (SILVA, BASSON e MOE, 1996; TITTLE, NETO, 1994; SCHENKMAN, 1989). Ela é comumente encontrada em águas calmas, rasas, regiões entremarés, recifes, ligados à areia, rochas planas, poça-de maré ou frequentemente epífitas em *Sargassum* e outras algas. No estado de florescimento e em ambientes com alta luz ou pobres em nutrientes, podem ser encontradas em livre flutuação, extremamente abundante sendo cultivada comercialmente em toda a sua distribuição mundial como uma fonte de alimento (BOTANY, 2001).

Esta espécie representa grande interesse econômico, pois é produtora de k-carragenano, polissacarídeo com alta qualidade espessante, possuindo ainda substâncias com potencial farmacêutico, as quais têm atividade antiviral (SANTOS et al. 1999), vermífuga, anti-inflamatória e mio-relaxante (SCHENKMAN, 1989). Tem ampla distribuição no litoral brasileiro, embora tenha havido declínio do estoque natural graças a alta exploração (OLIVEIRA-FILHO, 1998).

Nesta espécie encontra-se uma grande diversidade de classes químicas, entre elas os esteroides (BABU et al., 1990), alcaloides (IMPELLIZZERI, et al., 1975) e triterpenos (HAYEE-MEMON, 1991) (Tabela 2).

Tabela 1. Metabólitos secundários isolados de *Hypnea musciformis*.

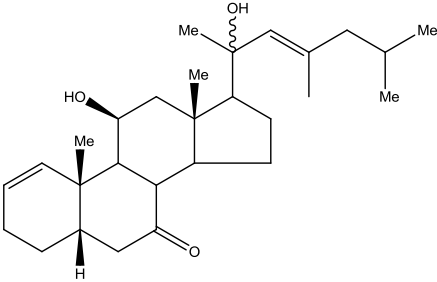
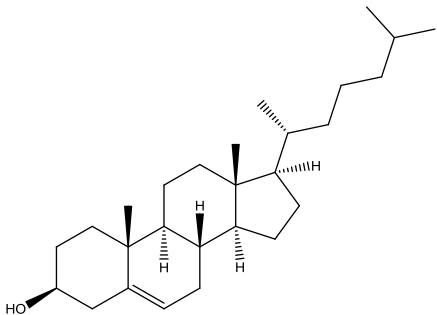
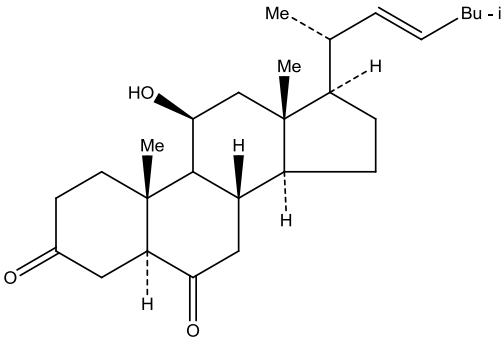
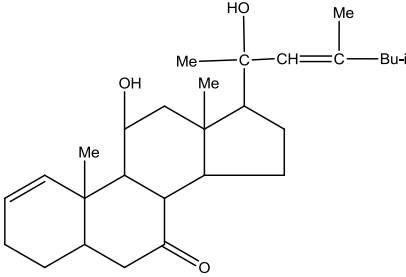
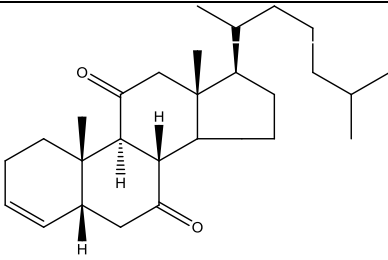
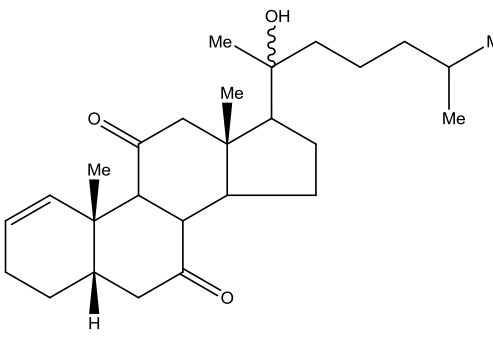
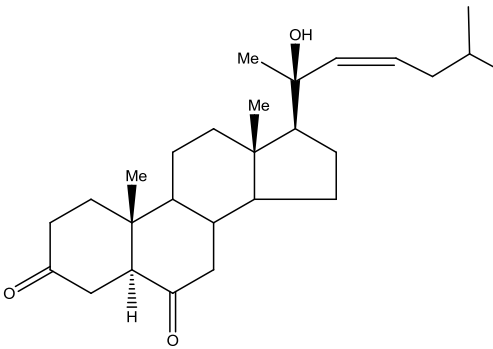
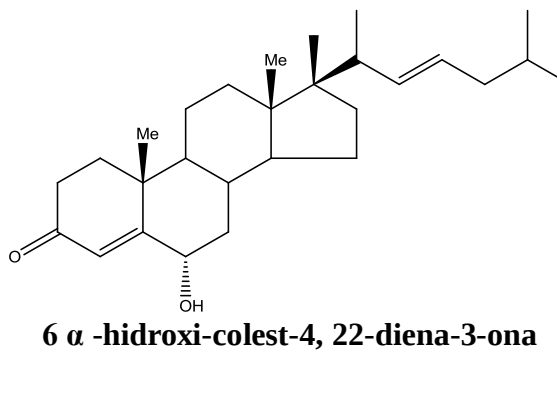
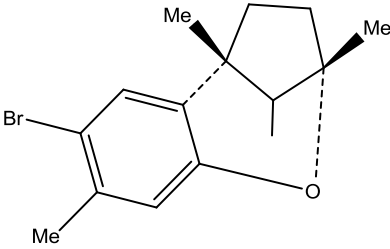
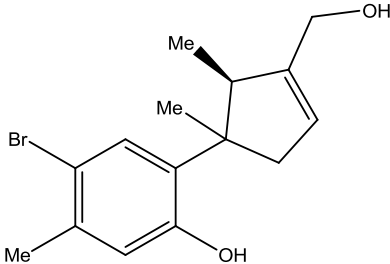
Esteróide	 colest-1-22-dien-7-one,5-beta:11-20-dihidroxi-23-metil	BABU et al., 1990.
	 Colesterol	FATTORUSSO et al. 1975.
	 3-6-diketosteróide	GOSAVI et al., 1995.
	 23-metil-5β-colest-1,22-dieno-11,20-dihidroxi-7-ona	BABU et al., 1990

Tabela 1. Metabólitos secundários isolados de *Hypnea musciformis* (Continuação).

Esteróide		BABU et al., 1990
		BABU et al., 1990
		BULTEL-PONCE; TAHIRIB; GUYOTA, 2002
		BABU et al., 1989.
Alcaloide	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$	IMPELLIZZERI et al., 1975

Taurina

Tabela 1. Metabólitos secundários isolados de *Hypnea musciformis* (Continuação).

Sesquiterpeno	 Filiformina	AFAQ-HUSAIN et al., 1991.
	 Laur-3(4)-ene, 10-bromo-7-12-dihidroxi	AFAQ-HUSAIN et al., 1991.

Do ponto de vista farmacológico, a espécie apresenta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (PEREZ, et al., 1990), *eschericia coli* (ALBUQUERQUE, CAMPOS-TAKAKI e KOENING, 1983), atividade antifúngica (ALBUQUERQUE, CAMPOS-TAKAKI e KOENING, 1983), atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória, citotóxica e hemolítica (ALVES et al., 2012), e antiviral (MENDES et al., 2012).

I.2.2 Considerações sobre *Brythamnion* e *Bryothamnion triquetrum*

O gênero *Bryothamnion* possui 12 espécies e se encontra amplamente distribuído nos mares ocidentais e orientais da África, no oceano Atlântico tropical e subtropical e no Pacífico (México) (GUIRY; GUIRY, 2013).

Este gênero é característico por apresentar lectinas, especialmente em *B. seaforthii* e *B. triquetrum*. As lectinas são um grupo estruturalmente heterogêneo de proteínas, que possuem locais de ligação específicos para os carboidratos e glicoconjugados (NASCIMENTO-NETO et al., 2012; PINTO et al., 2009). Estudos foram realizados e demonstraram que as lectinas podem ser ferramentas para diferenciar células de carcinoma de cólon humano (PINTO et al., 2009), bem como, inibem a adesão de *streptococos* na película dentária (TEIXEIRA et al., 2007), relaxam a musculatura lisa (LIMA et al., 2004), entre outros.

Bryotamnion triquetrum (Figura 8) é uma espécie de alga vermelha, pertencente a família Rhodomelaceae (Quadro 4) (ARECES; MARTÍNEZ-IGLESIAS, 1993), que vive sobretudo em mares quentes e que apresenta em média 20 cm de altura. Uma de suas principais características é a presença do pigmento ficoeritrina em suas células, responsável pela coloração avermelhada destes organismos (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

Quadro 4. Classificação Taxonômica de *Bryotamnion triquetrum*. (Fonte: www.algaebase.org).

Reino	Plantae
Filo (Divisão)	Rhodophyta
Classe	Florideophyceae
Ordem	Ceramiales
Família	Rhodomelaceae
Gênero	<i>Bryothamnion</i>

Estas algas são compostas de talo ereto, rígido, grosseiro, de coloração vermelho escura, medindo até 15 cm (Figura 5), crescendo de forma geral, rapidamente em ambientes de pouca profundidade fixa ao substrato, não apresentando toxicidade e sendo amplamente distribuída (MAIA et. al, 2010).

Figura 10. Foto ilustrativa de *Bryothamnion triquetrum*. (Fonte www.algaebase.org.. Acessado em: 11/07/2013).



A alga marinha vermelha *B. triquetrum* por crescer rapidamente a pouca profundidade, é fácil de ser coletada (VIDAL et al., 2006) e pode ser encontrada no litoral da América do Norte (Flórida e México), da América Central (Costa Rica e Panamá), Ilhas do Caribe (Bahamas, Porto Rico, Cuba, Ilhas Virgens, Jamaica, entre outros), da América do Sul (Brasil, Colômbia e Venezuela) e na África (Angola) (TAYLOR, 1960).

Em relação à constituição química, já foram isoladas de *B. triquetrum* ácidos fenólicos (NOVOA et al., 2001), polissacarídeos (FERNANDES et al., 1987), ácidos graxos (láurico, mirístico, palmítico, oleico, esteárico, entre outros.) (VIDAL, 2006), carboidratos, carotenoides (VIDAL, 2006; SOUSA et al., 2008), fosfolipídeos (MENESES; NAVARRO; GLONEK, 1993), aminoácidos e lectinas (CALVETE et al., 2012).

Estudos realizados com algas marinhas coletadas na costa do México demonstraram que *B. triquetrum* apresenta atividade antioxidante semelhante a substâncias comerciais como o butilhidroxitolueno (BHT), o ácido ascórbico e o α -tocoferol (ZUBIA et al., 2007). Em trabalho realizado com extratos dessa espécie, demonstrou a presença de três constituintes fenólicos majoritários: o ácido *trans*-cinâmico, o ácido *p*-cumárico e o ácido ferúlico, atribuindo, que parte da capacidade antioxidante observada nestas substâncias refere-se ao sequestro do radical hidroxila, ânion superóxido, além de inibição da lipoperoxidação pelo

teste do ácido linoléico (VIDAL et al., 2006). Lima et al. (2004) demonstrou que uma lectina extraída desta espécie induziu o relaxamento de seguimento da aorta torácica de ratos por ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e consequente liberação de NO.

Um estudo realizado por Fallarero e colaboradores (2006) com extrato aquoso bruto de *Bryothamnion triquetrum*, demonstrou efeito neuroprotetor em condições de isquemia. Este resultado mostrou que o efeito do extrato, é parcialmente relacionado com a presença de ácido ferúlico e juntamente devido sua capacidade de reduzir a geração de radicais livres. Outro estudo anterior, com este extrato, também demonstrou atividade antineurotóxica (FALLARERO, et al., 2003).

I.3 ESPONJAS

As esponjas (Filo Porifera) são animais aquáticos, marinhos ou de água doce, sésseis na fase adulta, com cores, formas e dimensões variadas. São metazoários primitivos (considera-se que as esponjas surgiram entre 600.000.000 e 450.000.000 anos, no período Cambriano), provavelmente os primeiros animais pluricelulares a surgirem ao longo da evolução. As esponjas não possuem órgãos ou sistemas diferenciados, suas células não constituem tecidos *strictu sensu*, e as ligações intercelulares são lábeis e instáveis (ALMEIDA e BERLINCK, 97). Estão distribuídas em ambientes marinhos e dulciaquícolas, dos pólos às regiões tropicais. Em muitos habitats bênticos, incluindo costões rochosos, recifes de coral e grutas submarinas, dentre outros, as esponjas são frequentemente, os organismos dominantes (RIBEIRO, 2008).

Nos ambientes marinhos costeiros, as esponjas chamam a atenção principalmente por suas cores e formas variadas. Porém, é comum que sejam confundidas com algas, corais ou mesmo rochas, como consequência de seu hábito sésil, aparentemente estático. Seu tamanho também varia muito, pois há esponjas que são medidas em milímetros, enquanto outras ultrapassam um ou mais metros, seja em comprimento, altura ou diâmetro. São notoriamente assimétricas, porém há exceções (HAJDU, PEIXINHO E FERNANDEZ, 2011).

Existem quatro Classes de esponjas: Calcarea, Hexactinellida, Demospongiae e Archaeocyatha. A Classe Calcarea reúne esponjas marinhas com espículas constituídas por carbonato de cálcio e são distribuídas em todos os oceanos do mundo, mas a maioria ocorre em águas costeiras e rasas. A Classe Hexactinellida inclui esponjas marinhas que possuem espículas silicosas hexactinais e são conhecidas popularmente como “esponjas-de-vidro”,

muitas delas ocorrendo em grandes profundidades. A Classe Demospongiae é a que reúne o maior número de táxons, compreendendo 90% das espécies de esponjas, marinhas e dulciaquícolas, que possuem o esqueleto formado por espículas silicosas ou fibras de espongina, podendo possuir ambos ou ainda, nenhum deles (RIBEIRO, 2008).

Considera-se que as esponjas, foram os primeiros animais marinhos estudados do ponto de vista químico. Estudos com produtos naturais de esponjas marinhas fornecem importantes informações do ponto de vista quimiotaxonômico, ecológico e sobre sua química e bioquímica. Porém, tendo-se em vista que diversas espécies de esponjas apresentam associações com cianobactérias e bactérias, considera-se que vários produtos naturais isolados de esponjas possam ser originários de microrganismos (ALMEIDA, BERLINCK, 97).

Muitas substâncias produzidas pelas esponjas exibem potente atividade em ensaios farmacológicos. No entanto, há algum tempo, os papéis que desempenhavam estes metabólitos na biologia da esponja, em grande parte eram desconhecidos. Suspeitava-se que esses metabólitos podiam ser produzidos para inibir a incrustação e crescimento de microrganismos, prevenir os danos causados por radiação UV, entre outros. Mas a hipótese mais provável era a predação (PAWLIK, MCFALL e ZEA, 2002). Hoje esta hipótese foi confirmada, visto que, as esponjas vivem em habitat de grande competição por espaço não apenas a nível físico, mas principalmente a nível químico, pela produção de diversas substâncias tóxicas, ou alelopáticas, que lhes permitem competir contra espécies concorrentes ou se proteger de predadores. Associam-se também com uma grande variedade de microrganismos, facilitando sua permanência no meio. Por estes motivos, o interesse farmacológico em suas substâncias cresceu bastante nos últimos anos. Hoje sabemos que estes organismos possuem um metabolismo secundário extremamente diversificado (KOSSUGA, 2008).

Resultados revelam que várias moléculas produzidas por esponjas e/ou microrganismos associados, apresentam atividades farmacológicas relevantes. Destacam-se aqui algumas dessas atividades (PATRÍCIO; LIMA, 2011):

– anti-tumoral (Halichondrina B – metabólito da esponja *H. okadai* é um potencial fármaco em ensaios clínicos no Canadá; Agelasphina – proveniente da *Agela Mauritânia*, está em fase I de testes clínicos na Europa);

- anti-bacteriana (6-hidroxi-manzamina E – alcaloide produzido pela *Acanthostrongylophora* sp. com resultados promissores contra *M. tuberculosis*, o patógeno da tuberculose);
- anti-fúngica (Manzamina A – produto da *Acanthostrongylophora* sp. que exibe atividade anti-*C. neoformans*, fungo que infecta a garganta, encontra-se em testes pré-clínicos);
- antiviral (Ara-A – nucleósido da *Cryptotethya crypta* tem atividade contra o vírus da herpes e da varicela; Avarol – produto da *Dysidea avara* inibe o HIV quase completamente e os seus derivados são potentes inibidores da transcriptase reversa do HIV, enzima fundamental nas primeiras fases de infecção pelo vírus da SIDA),
- anti-protozoário (Manzamine A- alcaloide isolado de várias esponjas parece muito promissor no tratamento de malária, em testes pré-clínicos),
- anti-inflamatória (Contignaterol - isolado de *Petrosia contignata*, encontra-se neste momento em estudo em ensaios clínicos) e;
- imunossupressora (Discodermolideo – metabolito da *Discodermia dissoluta*, é um agente imunossupressivo e anti-canceroso, apresentando actividade semelhante ao Taxol; encontra-se em testes clínicos para cancros resistentes ao Taxol).

II.3.1 Considerações sobre *Ircinia* e *Ircinia felix*

O gênero *Ircinia* pertence à família Ircinidae (quadro 5) e compreende mais de 70 espécies no mundo, das quais cinco ocorrem no Brasil, como é o caso da *Ircinia felix*. No Brasil ela ocorre no Ceará, Rio Grande do Norte, Atol das Rocas, Fernando de Noronha, BA (Salvador, Marau), Ilha da Trindade. Fora do Brasil, ocorre no Noroeste do Atlântico, Golfo do México, Caribe (Bermudas, Flórida, Bahamas, Cuba, Ilhas Cayman, Jamaica, República Dominicana, Porto Rico, Ilhas Virgens, Barbados, México, Belize, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Venezuela, Antilhas Holandesas) (HAJDU, PEIXINHO, FERNANDEZ, 2011).

Quadro 5. Classificação Taxonômica de *Ircinia felix*. (Fonte: www.algaebase.com)

Reino	Animalia
Filo (Divisão)	Porifera
Ordem	Dictyoceratida
Família	Irciniidae
Gênero	<i>Ircinia</i>

As esponjas do gênero *Ircinia* (Figura 11) são bem conhecidas pelo seu odor forte e desagradável, que recentemente tem sido atribuída a uma mistura de substâncias contendo nitrogênio ou enxofre volátil, incluindo dimetilsulfido, metil isocianeto e metil isotiocianato. Estes compostos voláteis exibem atividade antimicrobiana em ensaios laboratoriais (DUQUE et al., 2001).

Figura 11. Foto ilustrativa de *Ircinia felix*. (Fonte: Prof. Dr. Roberto Mioso)



No gênero *Ircinia* já foram isolados macrolídeos (TAKADA et al., 1999; RASHID; GUSTAFSONB; BOYDB, 2001) e principalmente diversos sesterterpenos furânicos (CHEN et al., 2006), como os ácidos furanosesterterpenos tetrônicos (FTAs) (EMURA; HIGUCHI; MIYAMOTO, 2006) (Figura 12), que são substâncias que apresentam uma variedade de

atividades farmacológicas, em sistemas de ensaios diferentes, incluindo atividade antimicrobiana e na inibição do transporte de Ca^{2+} , mas suas potenciais funções ecológicas nunca foram experimentalmente abordadas (PAWLIK, MCFALL e ZEA, 2002). Porém sabe-se, que estão relacionadas com a defesa do animal, pois se evidenciou uma maior quantidade em esponjas que foram encontradas ou transplantadas para áreas de menor intensidade de luz (exemplo, *Ircinia Felix*), e bem maiores em esponjas intencionalmente feridas (ZEA et al., 1999).

Figura 12. Substâncias químicas isoladas de *Ircinia*.

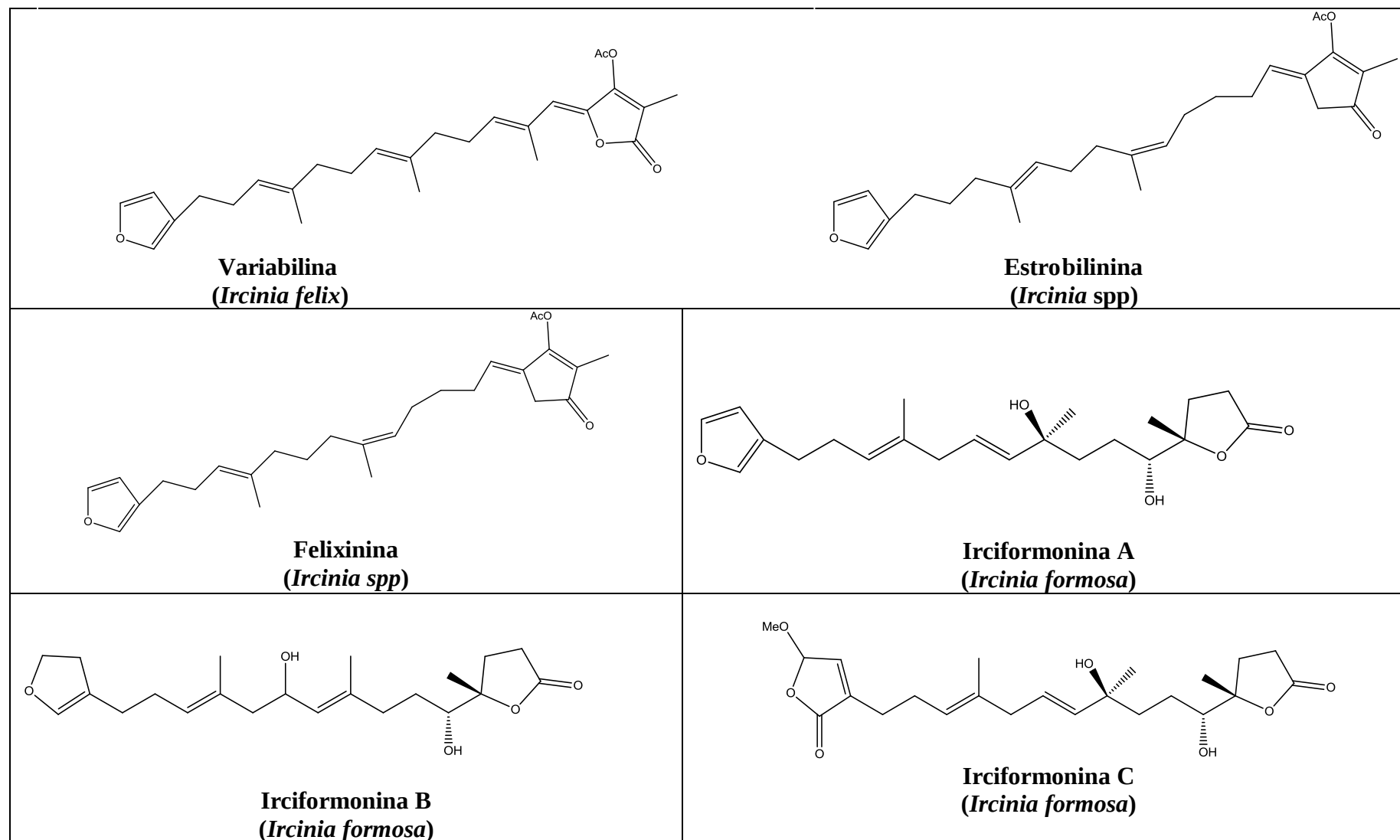
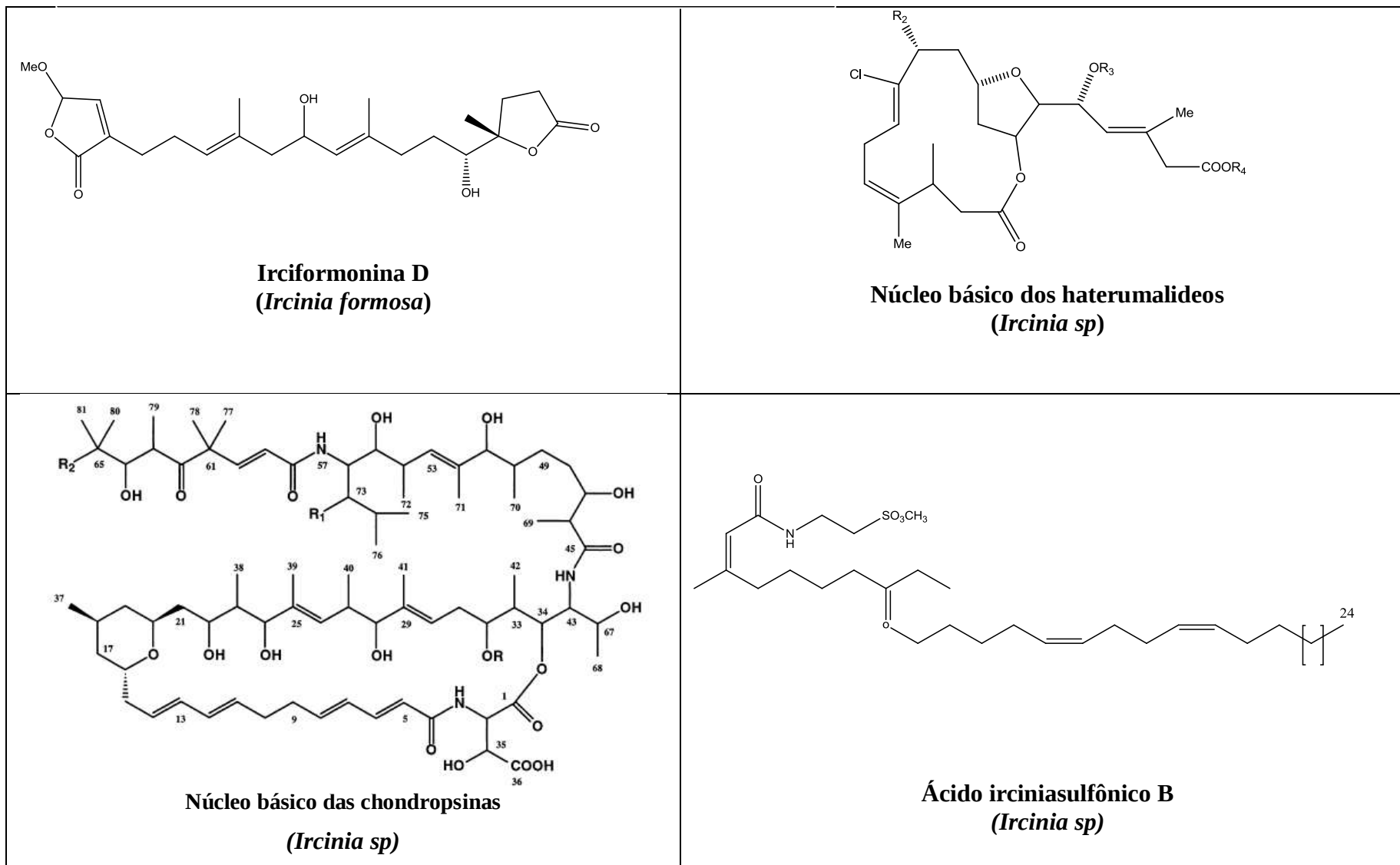


Figura 12. Substâncias químicas isoladas de *Ircinia*.(Contiuação)



Objetivos



II OBJETIVOS

II.1 Objetivos gerais

Contribuir para o conhecimento químico e farmacológico das espécies de algas verde e vermelhas selecionadas no litoral paraibano, pertencentes à família Caulerpacea, Cystocloniaceae e Rhodomela, bem como, contribuir para o conhecimento químico da espongiofauna através da família Irciniidae.

II.2 Objetivos específicos

- Isolar e purificar as substâncias químicas das espécies de algas e esponja em estudo, através de métodos cromatográficos;
- Caracterizar estruturalmente as substâncias isoladas através de métodos espectroscópicos como Espectroscopia no Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais e Espectrometria de Massas.
- Avaliar a citotoxicidade de extratos metanólicos brutos de algas frente a eritrócitos;
- Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* de extratos metanólicos brutos de algas em linhagens de células tumorais de *Ehrlich*;
- Disponibilizar extratos e substâncias isoladas para avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória e do efeito espasmolítico.

CAPÍTULO I: ESTUDO QUÍMICO

Metodologia



III CAPÍTULO I: ESTUDO QUÍMICO

III.1 METODOLOGIA

III.1.2 Métodos Cromatográficos

- **Cromatografia por adsorção:** Na cromatografia em coluna (CC) por adsorção foi empregada gel de sílica 60 da Merck ou da Vetec ($\emptyset$ μ m 63-200). Para cromatografia de camada delgada (CCD) utilizou-se cromatoplasmas de gel de sílica 60 ($\emptyset$ μ m 2-25), MERCK (com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm). Os eluentes utilizados foram: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puros, ou combinados em proporções crescentes de polaridade. A revelação das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foi obtida por exposição à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366nm), e/ou por aspersão com solução de solução de 20% de ácido fosfomolibdico (para identificação qualitativa de substâncias redutoras), clorox (para identificação qualitativa de peptídeos), solução de Dragendorff (para identificação qualitativa de alcaloides) e ninidrina (para identificação qualitativa de aminoácidos e aminas primárias) seguido de aquecimento em estufa por aproximadamente 5 minutos, ou ainda por exposição a vapores de iodo.

- **Cromatografia de exclusão molecular:** Os fracionamentos por cromatografia de exclusão foram efetuados em gel de dextrana Sephadex LH-20 e G-15 da Pharmacia Fine Chemicals, utilizando-se metanol puro ou combinado com diclorometano como fase móvel (modo isocrático).

- **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE $\approx$ HPLC)** As soluções de calibração, os extratos e frações do material marinho foram analisados num aparelho de HPLC, constituído de uma bomba binária e um detector DAD com varredura entre uma faixa de comprimentos de onda entre 190 a 800 nm. As amostras foram eluídas com Metanol e Acetonitrila, utilizando-se coluna cromatográfica de fase reversa analítica (Luna Phenomenex 250 x 4,60 mm, 5 μ m) operada a um fluxo de 1mL/min e injetado um volume de 20 μ L. As separações foram efetuadas em coluna cromatográfica de fase reversa semi-preparativa (Luna Phenomenex 250 x 10,0 mm, 10 μ m) e injetado um volume de 4,5 mL/min. Os solventes empregados apresentavam grau HPLC (MeOH-Tedia e H₂O-Milli-Q) e foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 μ m e degaseificados por sonicação durante 30 min. As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas através de membranas de teflon com poros de 0,45 μ m.

III.1.3 Pontos de fusão

Os pontos de fusão foram determinados sem correção de valores em aparelho com bloco de platina em microscópio óptico tipo “Kofler”, marca REICHERT, modelo R3279, com temperatura que varia de 0-350°C.

III.1.4 Métodos espectroscópicos

- **Espectroscopia na região do infravermelho (IV)** Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em Espectrômetro SHIMADZU, modelo IRPrestige-21, utilizando pastilhas de KBr no Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba (DQ/UFPB).

- **Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de Carbono-13 (RMN ^{13}C)** Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H) e Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C (RMN de ^{13}C), uni e bidimensionais foram obtidos: no Núcleo de Caracterização e Análise da Universidade Federal da Paraíba (NUCAL/UFPB) em espectrômetro Bruker 200 [200 MHz (^1H) e 50 MHz (^{13}C)] e VARIAN Mercury 500 [500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C)]; Bem como, no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC) em espectrômetro Bruker Avance DRX-500, onde foram aplicadas frequências de 500,13 MHz (^1H) e 125,75 MHz (^{13}C), sob um campo magnético de 11,744 T. O tipo de sonda variou conforme o tipo de técnica: 1- sonda dual de 5 mm com detecção direta (experimentos unidimensionais), 2- sonda multinuclear de 5 mm com detecção inversa (experimentos bidimensionais). As amostras foram dissolvidas em alíquotas de 0,6 mL de solvente deuterado: clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD) ou água deuterada (D_2O), comercializados pelas companhias ACROS, Cambridge Isotope Laboratories, Merck ou Aldrich. Os deslocamentos químicos foram expressos δ , pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio (δ 7,27), metanol (δ 3,31) e água (δ 4,80). Nos espectros de carbono-13, os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos centrais dos carbonos-13 dos solventes: clorofórmio (δ 77,23) e metanol (δ 49,17). As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete), q (quarteto), m (multiplete). Os programas utilizados para a aquisição dos dados foram: ^1H , ^{13}C -BB, ^{13}C -DEPT135, COSY, NOESY, HSQC, ^1H , ^{13}C -HMBC. A técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), ângulos de nutação de 135°, CH e CH_3 com amplitudes em oposição aos CH_2 , foi utilizada na determinação do padrão de hidrogenação dos carbonos em RMN ^{13}C , descrito segundo a convenção: C (carbono não-hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico ou metilidênico) e CH_3 .

(carbono metílico). Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração do espectro DEPT 135° do espectro BB.

- **Espectrometria de massa (EM):** Os espectros por EM-MALDI foram registrados num espectrômetro de quadrupolo com analisador de tempo-de-vôo (UltrTOF-Q, Bruker Daltonics, Billerica, USA), pertencente ao Laboratório de Espectrometria de Massas da USP- São Paulo e USP-Campinas, sendo os espectros adquiridos no modo negativo. Condições: voltagem capilar de 3400 V, temperatura e fluxo do gás seco: 180 °C e 4 L/h. Nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador e CF₃CO₂Na foi empregado como padrão de calibração interna e externa. E os espectros por CG-EM foram registrados no equipamento Equipamento CG for mass spectrometer model GC 2010, Shimadzu, acoplado a MS model GC MS - QP 2010 ultra, Shimadzu, pertencente ao laboratório de produtos naturais (LPN), São Paulo, USP, sob coordenação do Prof. Dr. Massuo Jorge Kato.

III. 1.5 Coleta e processamento do material marinho

Amostras de macroalgas bênticas, *Caulerpa mexicana*, *Bryothamnion triquetrum* e *Hypnea musciformis*, foram coletadas respectivamente no litoral das cidades de Pitimbu, João Pessoa (praia do Bessa) e João Pessoa (ponta do Cabo Branco) na Paraíba, durante marés de sizígia (-0,2 a 2,0). Uma vez no laboratório foram lavadas com a água destilada e separada de epífitas e outras algas, e em seguida secas a temperatura ambiente (~25 °C). Todas as espécies de algas foram coletadas e identificadas pelo Prof Dr. George Emmmanuel Cavalcanti de Miranda do Departamento de Biologia Molecular/CCEN/UFPB com número de tombos JPB 13985, JPB 47599 e JPB 5421 (*Caulerpa mexicana*, *Bryothamnion triquetrum* e *Hypnea musciformis* respectivamente). E uma exsiccata de cada espécie foi depositada no herbário Profº Lauro Pires Xavier da UFPB.

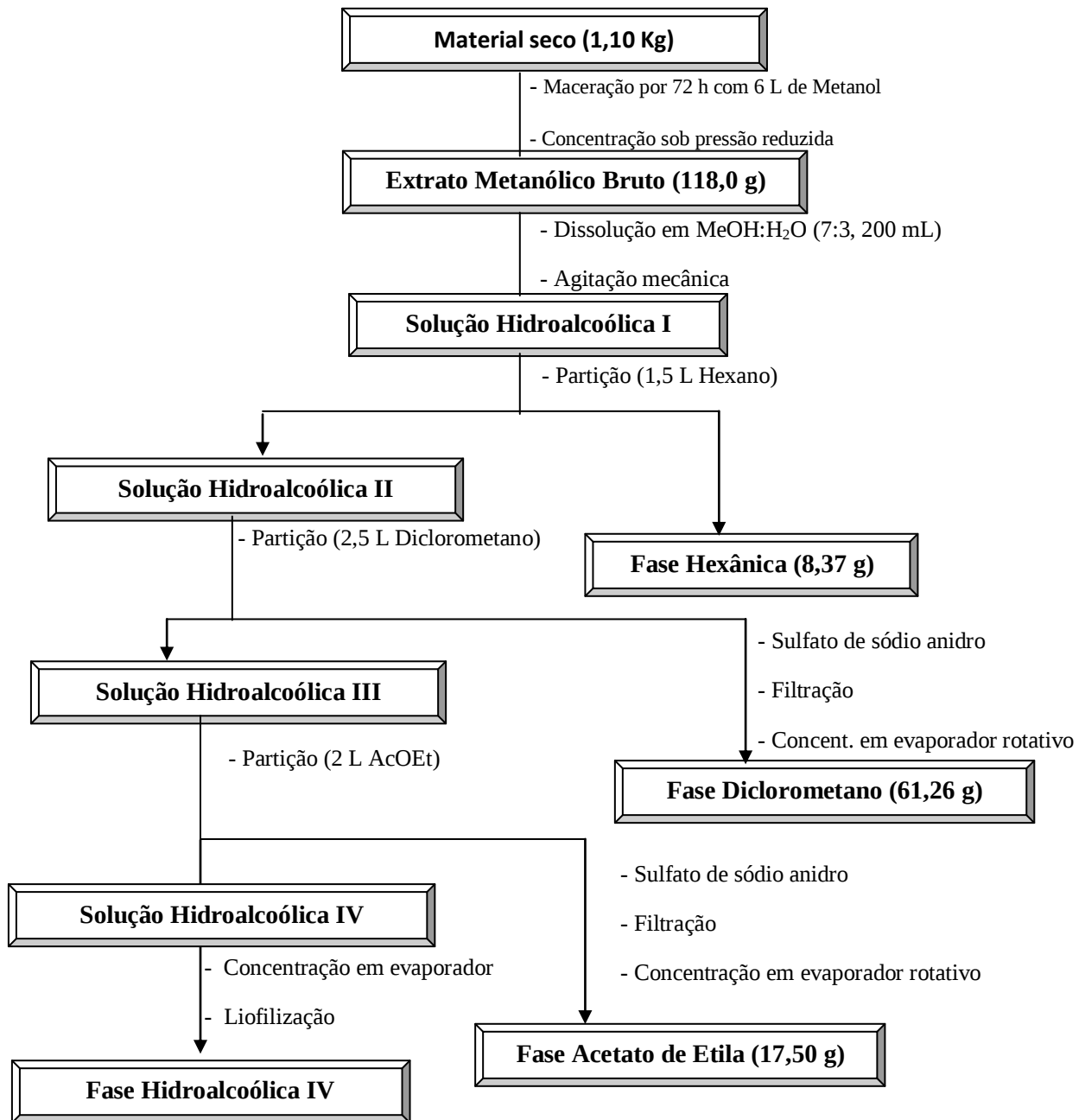
A esponja *Ircinia felix*, foi coletada no litoral paraibano, na praia do Jacarapé-PB PELO BIÓLOGO Prof. Dr. Roberto Mioso e foi identificada pelo zoólogo Dr. Ulisses dos Santos Pinheiro do Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco, com número de tombo UFPE POR 1551,. Uma vez no laboratório, a esponja foi seca e lavada com água destilada, separada de epífitas, e em seguida congelada para posterior extração.

III.1.6 Obtenção dos extratos e seus particionamentos.

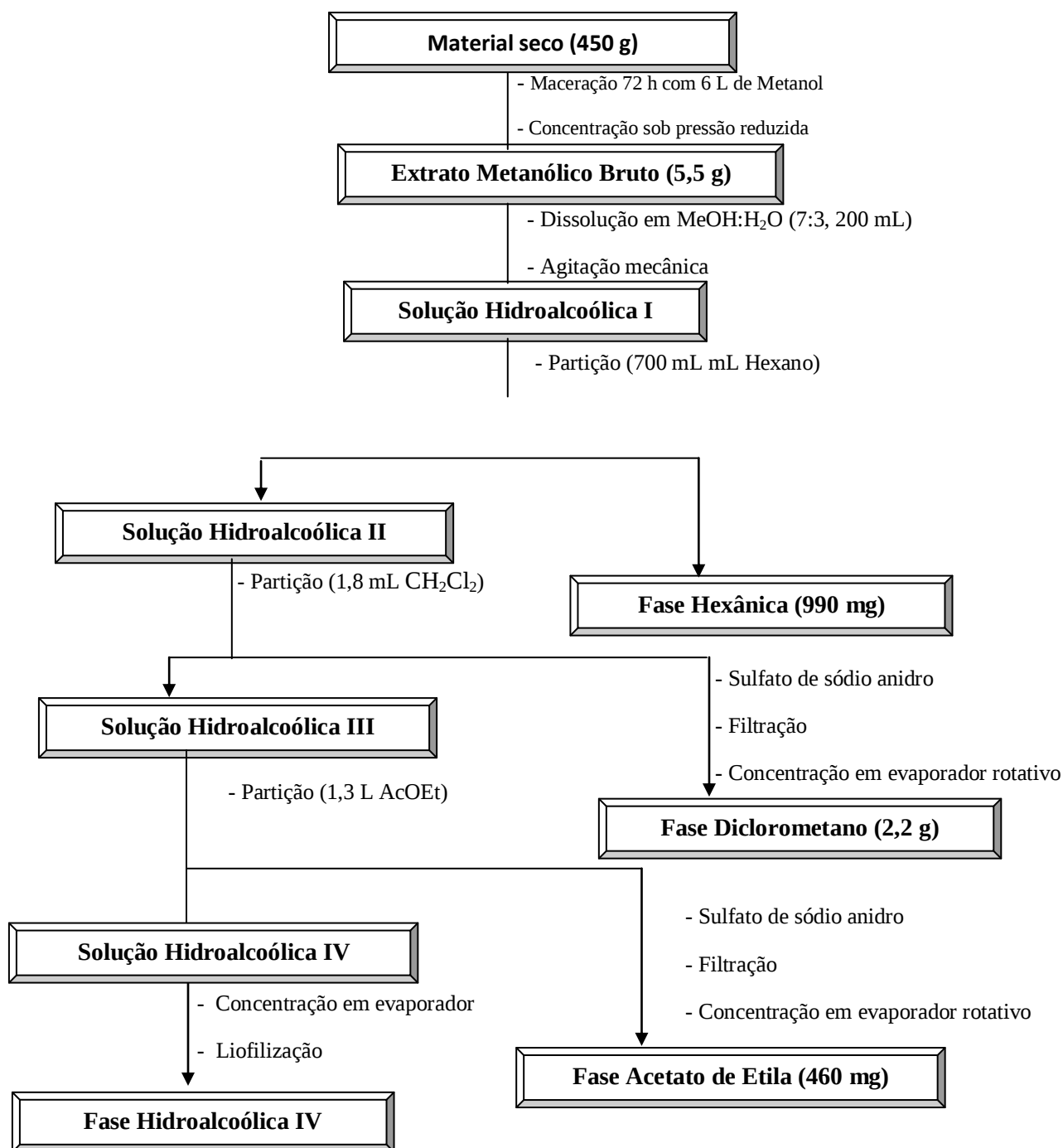
O método de extração escolhido, tanto para as algas como para esponja, foi a extração a frio (maceração exaustiva) com metanol em recipiente de aço inoxidável. As soluções extrativas resultantes, depois de filtradas, foram concentradas com o auxílio de evaporador rotativo, sob pressão reduzida, a uma temperatura não superior a 50 °C, obtendo-se os extratos metanólicos brutos (EMBs).

Os EMBs foram solubilizados em metanol (MeOH) : H₂O (7:3 v/v) sob agitação mecânica, resultando na solução hidroalcoólica I. Esta foi submetida à partição líquido/líquido, em ampola de separação, utilizando-se os solventes hexano (Hex), diclorometano (CH₂Cl₂) e Acetato de Etila (AcOEt) separadamente. As soluções obtidas foram tratadas com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e submetidas à filtração. Após esse processo, os solventes foram evaporados em evaporador rotativo sob pressão reduzida, a temperatura não superior a 50 °C, fornecendo as fases: hexânica, diclorometano e metanólica (ESQUEMA 1, 2, 3 e 4).

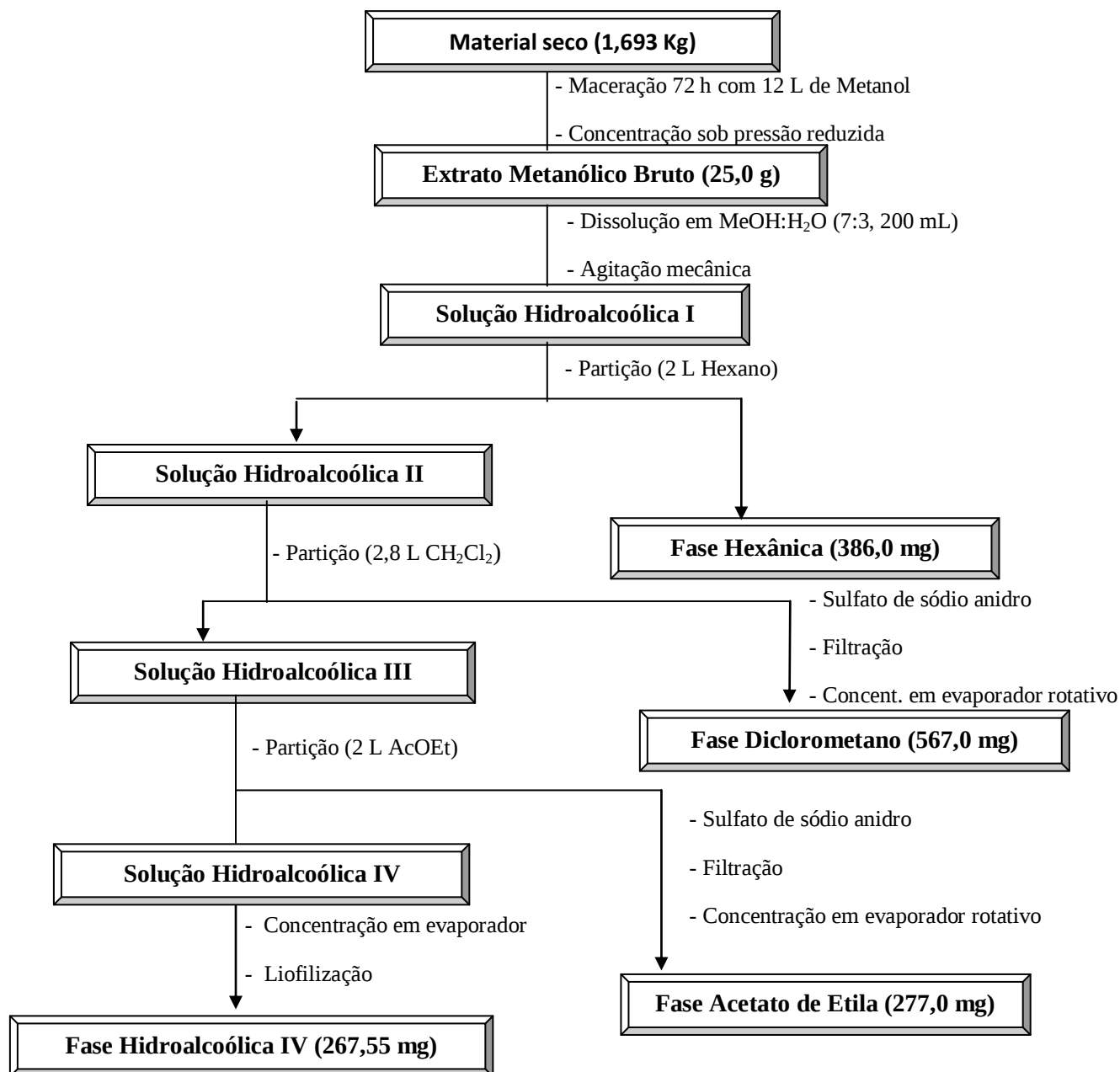
ESQUEMA 1. Obtenção e particionamento do extrato metanólico bruto de *Caulerpa mexicana*.



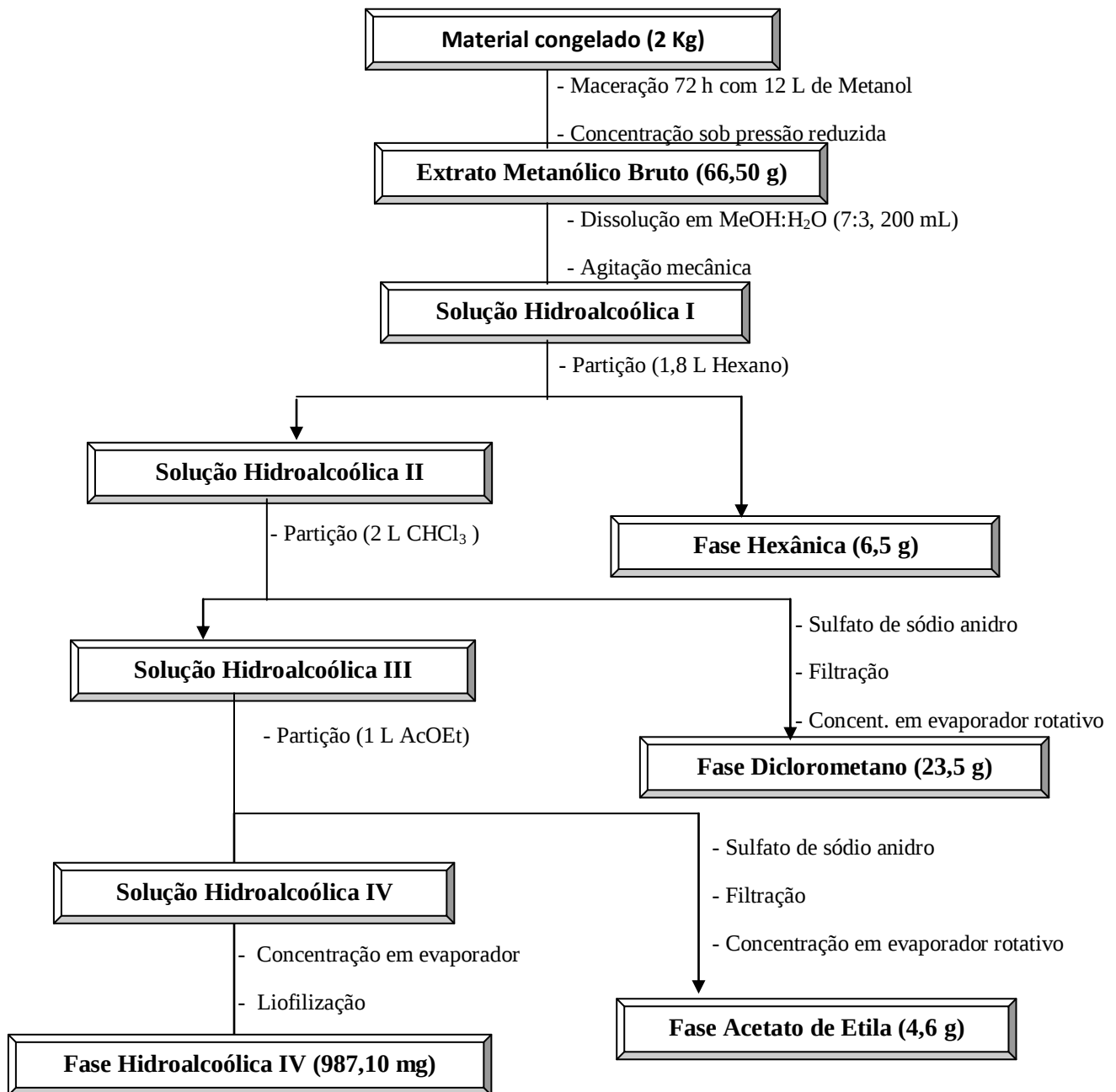
ESQUEMA 2. Obtenção e particionamento do extrato metanólico bruto de *Hypnea musciformis*.



ESQUEMA 3. Obtenção e particionamento do extrato metanólico bruto de *Bryothamnion triquetrum*.



ESQUEMA 4. Obtenção e particionamento do extrato metanólico bruto de *Ircinia felix*.



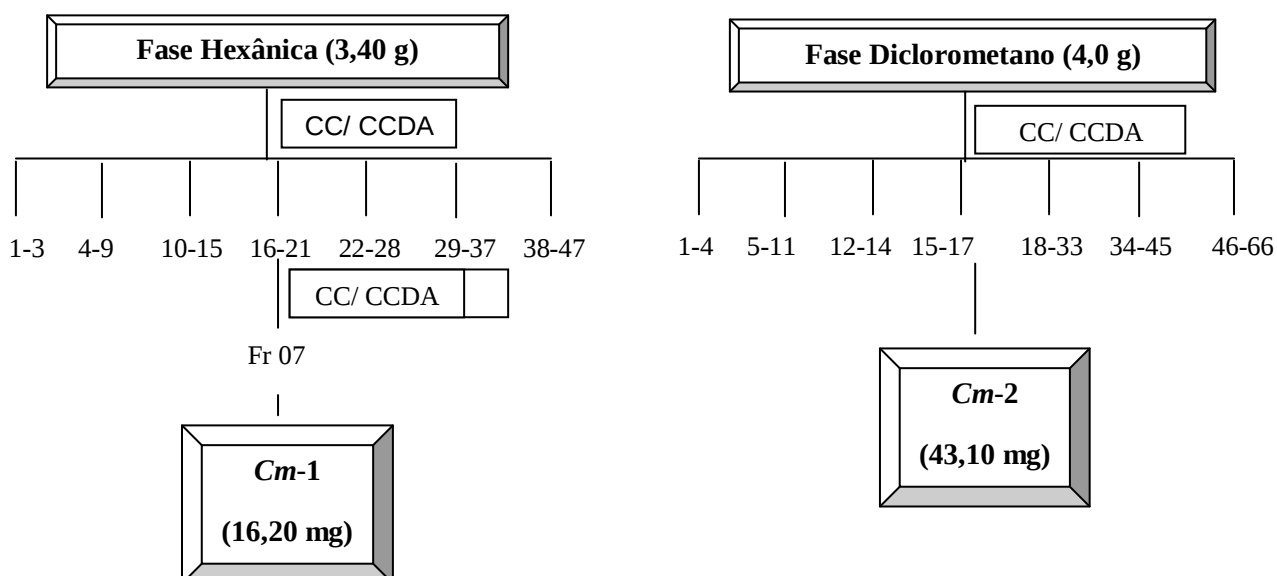
III.1.7 Isolamento dos compostos de *Caulerpa mexicana*.

Uma alíquota da fase hexânica (3,4 g) foi submetida a cromatografia de adsorção em coluna aberta (CC), utilizando sílica gel 60 como fase estacionária e como eluentes os solventes hexano, diclorometano e metanol puros ou em misturas binárias em grau crescente de polaridade, obtendo-se 47 frações de 100 mL, que foram concentradas em evaporador rotativo e reunidas de acordo com seu perfil cromatográfico após Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) e análise em lâmpada ultravioleta e em vapores de iodo.

A fração reunida 16-21 foi submetida novamente a cromatografia em coluna, resultando em 18 frações de 100 mL. Após análise em CCDA a fração 7 apresentou-se como uma única mancha e foi codificada inicialmente como *Cm-1*(16,2 mg).

Uma alíquota da fase diclorometano (4,0 g) foi também submetida a CC, utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluentes os solventes hexano, diclorometano e metanol sozinhos ou em misturas binárias em grau crescente de polaridade, obtendo-se 66 frações de 50 mL, que foram concentradas em evaporador rotativo e reunidas após CCDA de acordo com suas semelhanças cromatográficas. Na CCDA as frações 15, 16 e 17 apresentaram-se como uma única mancha e foram reunidas e codificadas como *Cm-2* (43,10 mg).

ESQUEMA 5. Purificação dos compostos de *Caulerpa mexicana*.



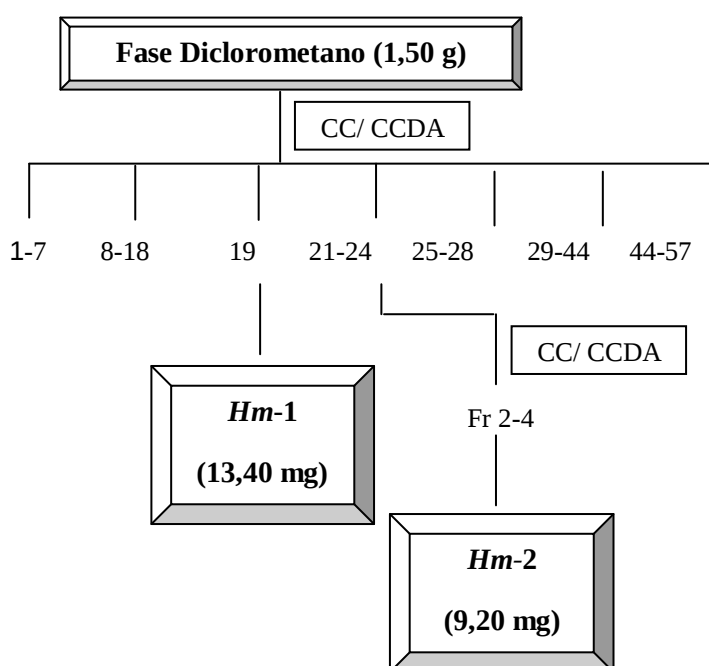
III.1.8 Isolamento dos compostos de *Hypnea musciformis*.

As fases hexânica, diclometânica e acetato de etila foram submetidas à CCDA, e a fase diclorometano por apresentar um melhor perfil cromatográfico após análise em lâmpada ultravioleta e em vapores de iodo, foi a selecionada para o estudo.

Uma alíquota da fase diclorometano (1,5 g) foi submetida a CC (esquema 6), utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluentes os solventes hexano, diclorometano e metanol puros ou em misturas binárias em grau crescente de polaridade, obtendo-se 57 frações de 100 mL, que foram concentradas em evaporador rotativo e reunidas após CCDA, de acordo com seu Rf. Após CCDA a fração 19 apresentou-se como uma única mancha sendo codificada para análise espectral como *Hm-1* (13,40 mg).

A fração reunida 21-24 foi submetida a CC utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluentes os solventes hexano, diclorometano e metanol puros ou em misturas binárias em grau crescente de polaridade, resultando em 14 frações. As mesmas foram analisadas em CCDA e as frações 2, 3 e 4 foram reunidas por apresentarem maior semelhança e o mesmo grau de pureza, e assim foi codificada como *Hm-2* (9,20 mg).

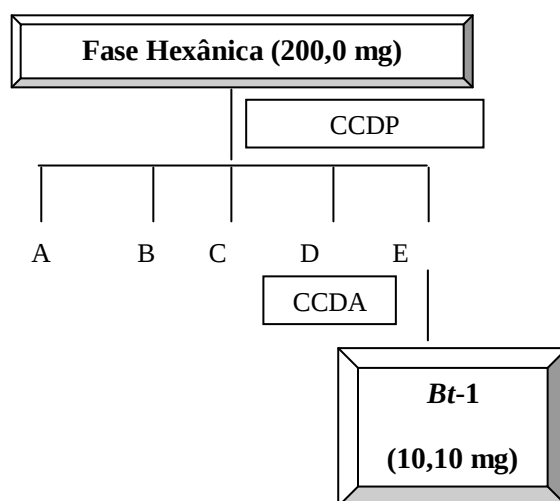
ESQUEMA 6. Purificação dos compostos de *Hypnea musciformis*.



III.1.9 Isolamento dos compostos de *Bryothamnion triquetrum*.

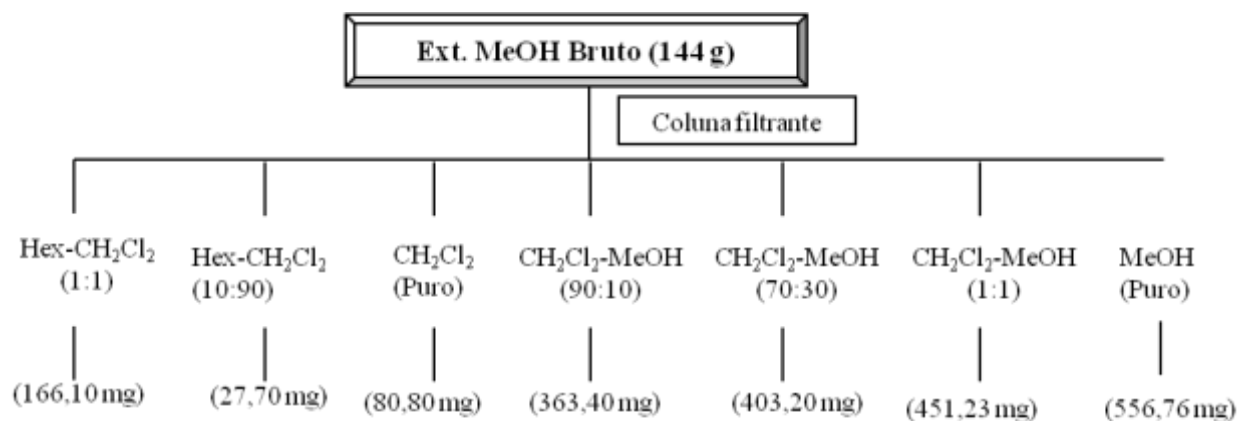
Uma alíquota da fase hexânica (200,0 mg) foi submetida a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) (esquema 7), utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluentes os solventes hexano:diclorometano (99:1), obtendo-se 5 frações, codificadas como A, B, C, D e E. Posteriormente, as amostras foram submetidas em CCDA e a fração E apresentou-se como uma única mancha, ficando codificada como *Bt-1*(10,10 mg).

ESQUEMA 7. Purificação dos compostos de *Bryothamnion triquetrum*.



Em virtude do baixo rendimento obtido das frações após a partição líquido-líquido, a purificação das substâncias presentes nas mesmas não foi bem sucedida, desta forma, na tentativa de se obter um melhor perfil cromatográfico, uma outra alíquota do extrato metanólico bruto (2,5 g), foi submetido a uma coluna filtrante (esquema 8), em funil de placa porosa, utilizando como fase estacionária sílica gel e como eluentes os solventes hexano-diclorometano (1:1), hexano-diclorometano (10:90), diclorometano puro, diclorometano-metanol (90:10), diclorometano-Metanol (70:30), diclorometano-Metanol (1:1) e metanol puro. Todas as frações foram submetidas a CCDA e a fração diclorometano-metanol (90:10) foi a que apresentou melhor perfil cromatográfico, sendo submetida a CCDP, resultando em 5 frações: A, B, C, D e E, que após análise em CCDA, apenas a fração A apresentou uma única mancha, ficando codificada como *Bt-2* (13,30 mg).

ESQUEMA 8. Coluna filtrante com o Extrato Metanólico Bruto de *Bryothamnion triquetrum*.

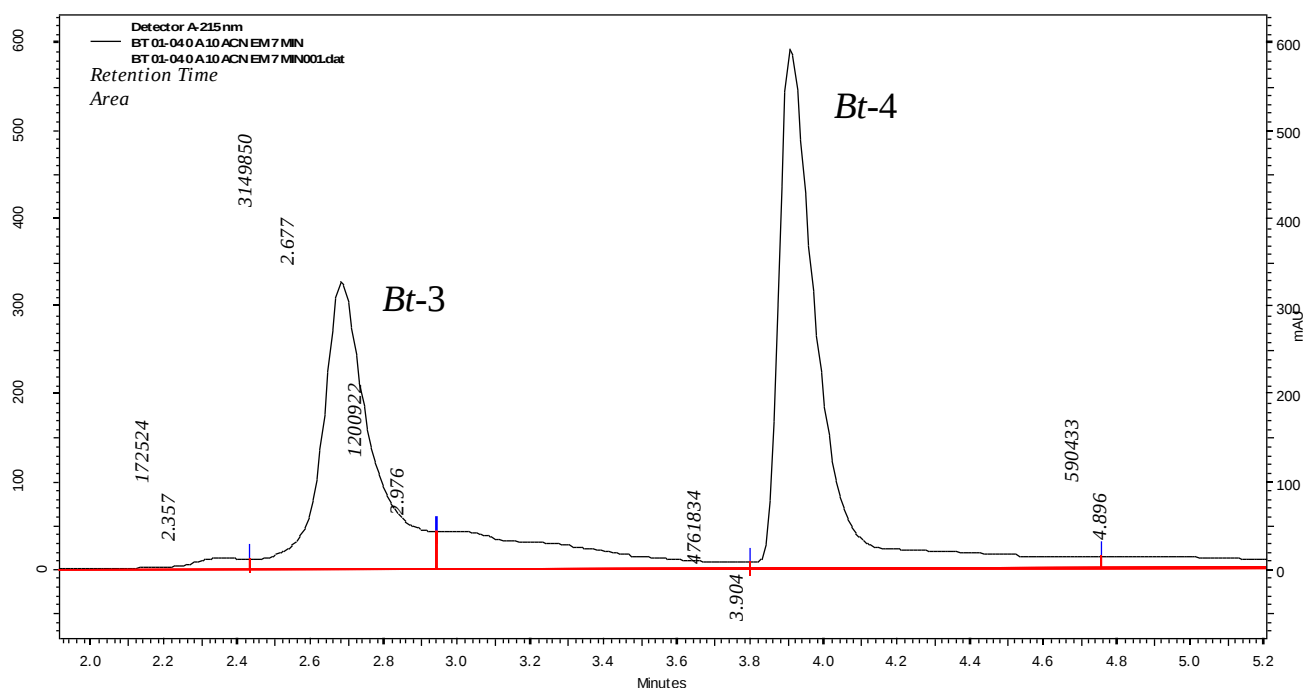


Uma alíquota da fase hidroalcoólica IV (esquema 3) foi submetida a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodo. Para avaliação do perfil cromatográfico foram utilizadas as seguintes condições experimentais: concentração da amostra de 1 mg/mL; fase móvel Acetonitrila (ACN): H₂O: 0,1%, em modo gradiente de 5 a 95% de ACN em 10 min, coluna cromatográfica de fase reversa analítica C₁₈ (Luna Phenomenex 250 x 4,60 mm, 5 µm) operada a um fluxo de 1 mL/min e injetado um volume de 20 µL.

O processo cromatográfico, resultou no isolamento de duas substâncias (Cromatograma 1), através da CLAE com detector de arranjo de diodo em coluna cromatográfica de fase reversa semi-preparativa C₁₈ (Luna Phenomenex 250 x 10,0 mm, 10 µm). A amostra foi preparada a uma concentração de 200 mg/mL; o sistema de eluição foi por gradiente, de 5 a 95% de ACN em 10 min, com 0,1% TFA, em 10 minutos. O fluxo foi mantido a 4,6 mL/min e injetado um volume de 200 µL. Assim, substâncias isoladas foram codificadas como Bt 3 e Bt 4.

Após a cromatografia preparativa, as substâncias Bt-3 e Bt-4 foram reveladas com reagentes específicos para aminoácidos e peptídeos. Após revelação com ninidrina e clorox, a substância Bt-3 se revelou na cor violeta

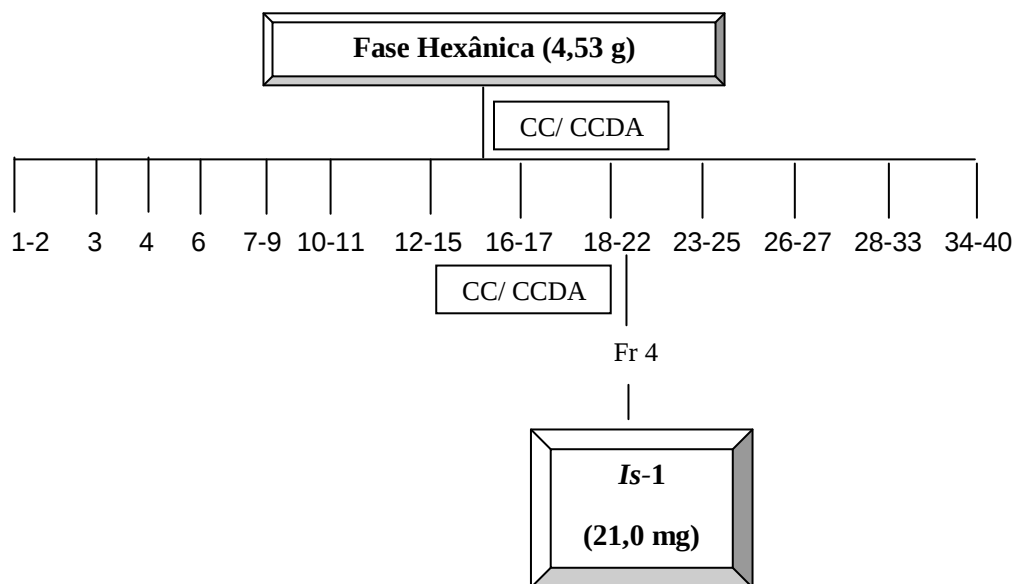
Cromatograma 1. Cromatograma da fase hidroalcoólica IV de *Bryothamnion triquetrum*, na concentração de 200 mg com detector de UV (215 nm).



III.1.10 Isolamento dos compostos de *Ircinia felix*.

Uma alíquota da fase hexânica (4,53 g) foi submetida a CC (esquema 9), utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluentes os solventes hexano, diclorometano e metanol, puros ou em misturas binárias, em grau crescente de polaridade, obtendo-se 40 frações de 100 mL cada, que foram concentradas em evaporador rotativo e reunidas após CCDA. A fração 18-22 foi submetida a CC nas mesmas condições anteriores, resultando em 18 frações de 50 mL cada. Após análise em CCDA a fração 4 apresentou-se como uma única mancha e foi codificada como *Is-1* (21,0 mg).

ESQUEMA 9. Purificação dos compostos de *Ircinia felix*.



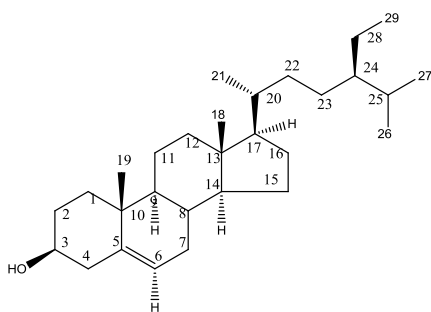
Resultados e Discussão



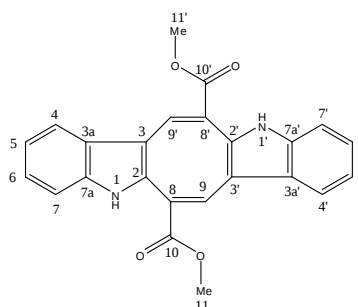
III.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.2.1 Substâncias isoladas neste trabalho

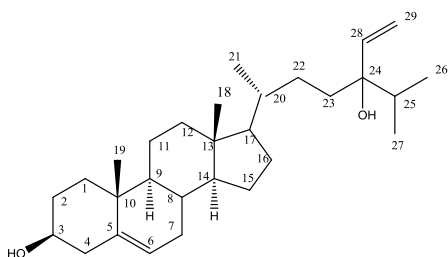
O estudo com as algas *Caulerpa mexicana*, *Hypnea musciformis* e *Bryothamnion triquetrum*, bem como, com a esponja *Ircinea felix* permitiu o isolamento e identificação de sete substâncias:



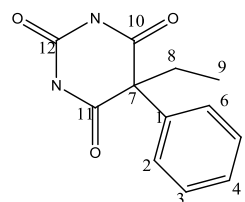
β -sitosterol
(*Caulerpa mexicana*)



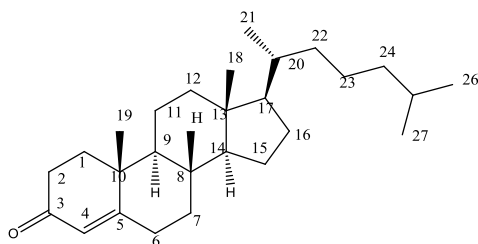
Caulerpina
(*Caulerpa mexicana*)



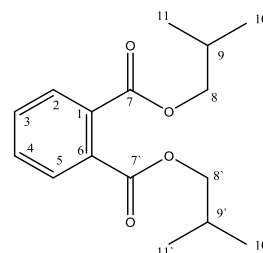
Saringosterol
(*Hypnea musciformis*)



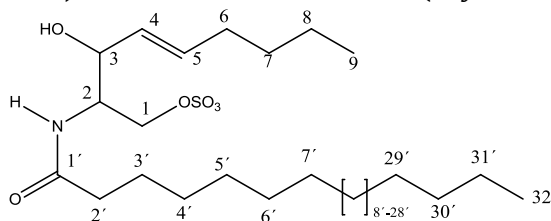
2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona, 5-etil-5-fenil
(*Hypnea musciformis*)



colest-4-en-3-ona
(*Bryothamnion triquetrum*)



Di-isobutilftalato
(*Bryothamnion triquetrum*)



N-[(4E)-3-hidroxi-1-[[sodiooxi]sulfonil]oxi]non-4-en-2-il]dotriacontanamida
(*Ircinea felix*)

III.2.2 Resultados obtidos com *Caulerpa mexicana*.

III.2.2.1 Identificação estrutural de *Cm-1*.

A substância *Cm-1* apresentou-se na forma de cristais brancos, solúveis em diclorometano. A mesma foi identificada através de análise espectral dos dados de RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais e comparação com os dados encontrados na literatura.

O espectro de RMN ^1H (Figura 14 pag. 74; tabela 2, p. 73) e sua expansão (Figura 15, pag. 74) mostraram absorções simples e múltiplas na região entre δ_{H} 0,60 e δ_{H} 2,21 característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos de carbono sp^3 presentes em estruturas de esqueleto terpênico (KOJIMA et al., 1990). A análise espectral de RMN ^{13}C mostrou a presença de 29 sinais, o que nos fez saber que *Cm-1* tratava-se de um esteroide. No espectro de RMN ^1H , foi possível observar também, a presença de um multipeto em δ_{H} 3,44 (*m*), que pode ser atribuído a hidrogênio oximetínico da posição 3 de núcleo esteroidal (KOJIMA, 1990). Na expansão do mesmo espectro, mostrou um dupeto em δ_{H} 5,27 ($J= 4$ Hz) típico de hidrogênio olefínico na posição 6 de fitoesteróides (AHMED et al., 1992).

No espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 16, pag. 75; tabela 2, p. 73) e suas expansões (Figura 17 e 18, p. 75 e 76), foi possível confirmar a presença do carbono oximetínico (C-3) pelo deslocamento químico em δ_{C} 71,9. E os sinais para carbonos sp^2 metínico em δ_{C} 121,7 e não hidrogenado em δ_{C} 140,7 foram compatíveis com dupla ligação localizada em C-6 e C-5, respectivamente, sugeridas no espectro de RMN ^1H . Diante das informações, e comparações realizadas com modelo da literatura (TOMAZ, 2008) (Tabela 2, pag. 73) tornaram-se possível identificar a substância como sendo o β -sitosterol (Figura 13), isolado anteriormente no gênero e sendo descrita pela primeira vez em *Caulerpa mexicana*.

Figura 13. Estrutura química do β -sitosterol.

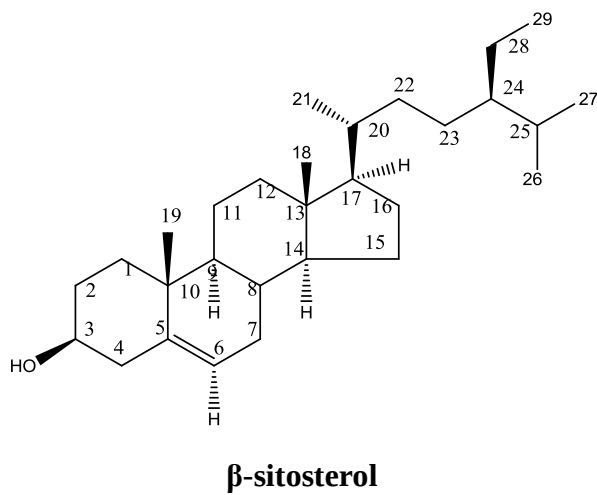


Tabela 2. Dados comparativos de RMN¹³C da substância **Cm-1** (δ , CDCl₃, 50 MHz) com modelos da literatura (δ , C₅D₅N, 100 MHz), (TOMAZ, 2008).

Carbonos	Cm-1	β -sitosterol
C		
5	140,7	140,7
10	36,4	36,4
13	42,2	42,2
CH		
3	71,8	71,7
6	121,7	121,6
8	31,8	31,8
9	50,0	50,1
14	56,7	56,7
17	55,9	56,0
20	36,2	36,1
24	45,7	45,8
25	29,09	29,1
CH₂		
1	37,2	37,2
2	31,6	31,4
4	42,2	42,1
7	31,8	31,9
11	21,0	21,0
12	39,7	39,7
15	24,2	24,3
16	28,2	28,2
22	33,8	34,0
23	26,2	26,0
28	22,9	23,0
CH₃		
18	11,8	11,8
19	19,3	19,3
21	18,8	18,7
26	19,5	19,8
27	18,9	19,0
29	12,2	12,0

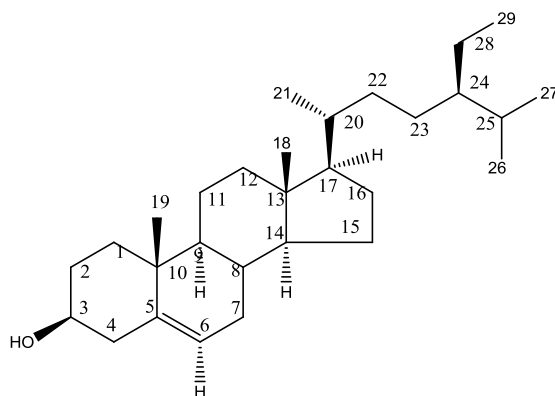


Figura 14. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de **Cm-1**.

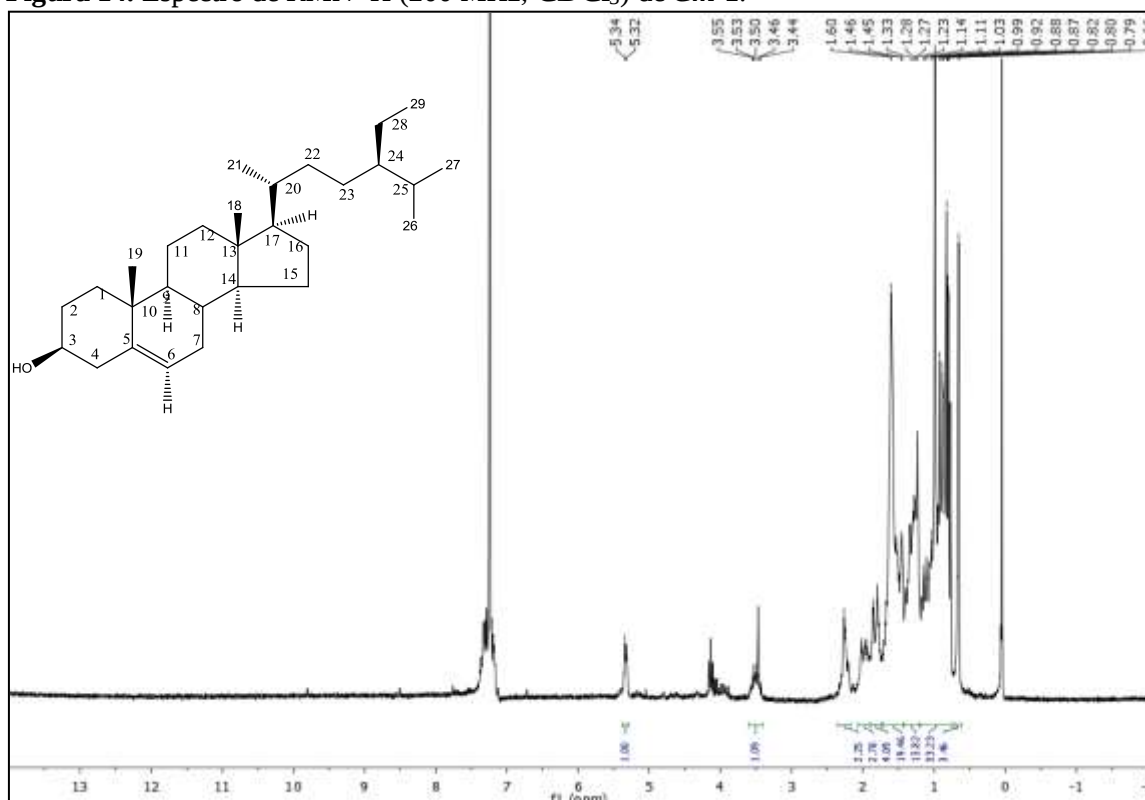


Figura 15. Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de **Cm-1**

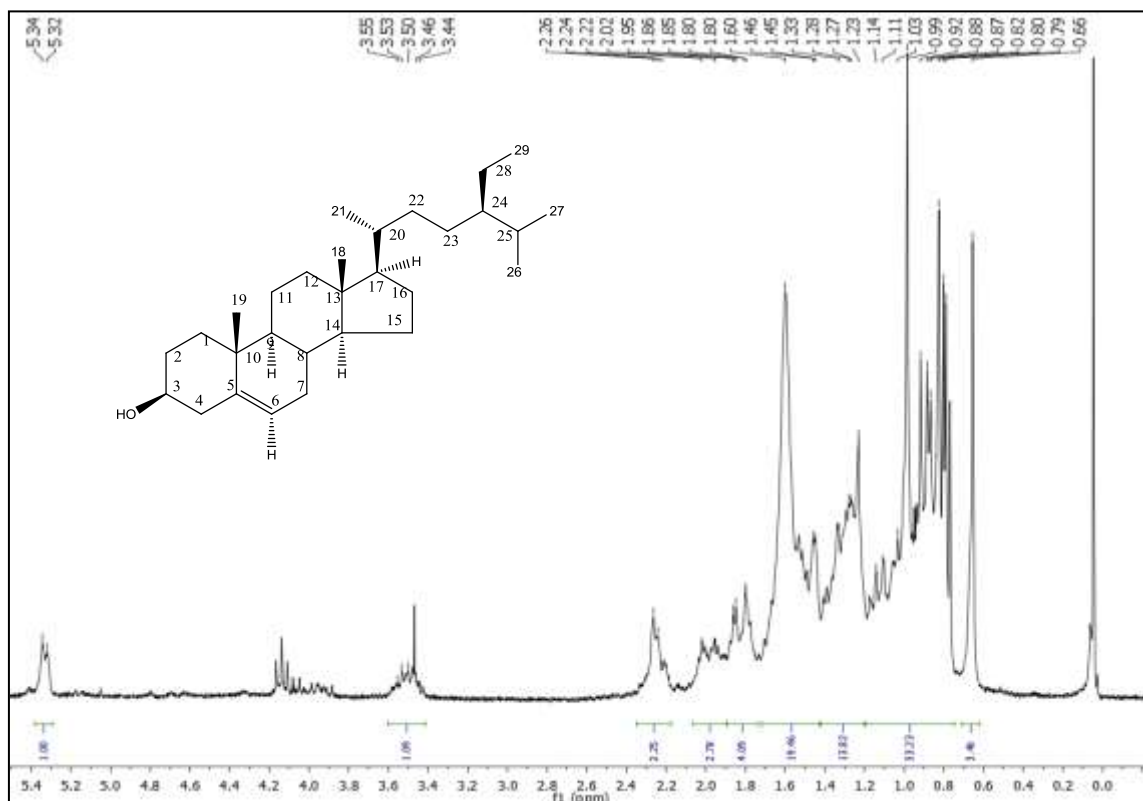


Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) de **Cm-1**.

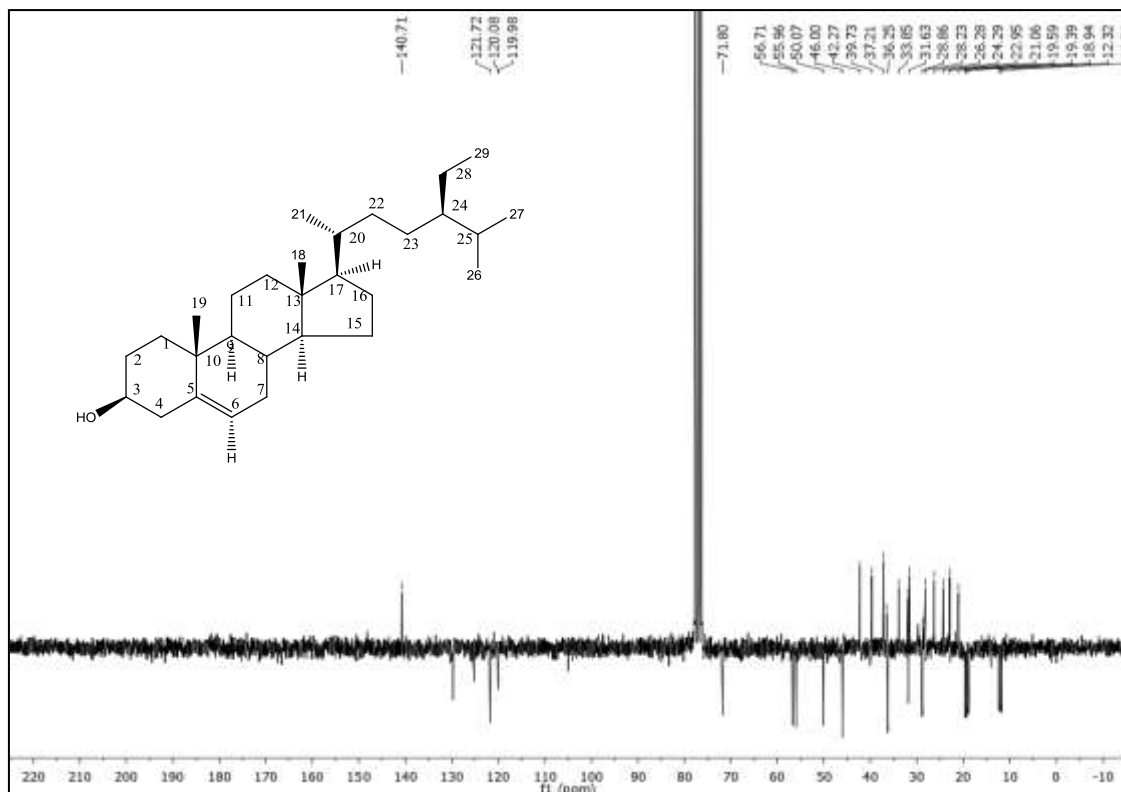


Figura 17. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) de **Cm-1**.

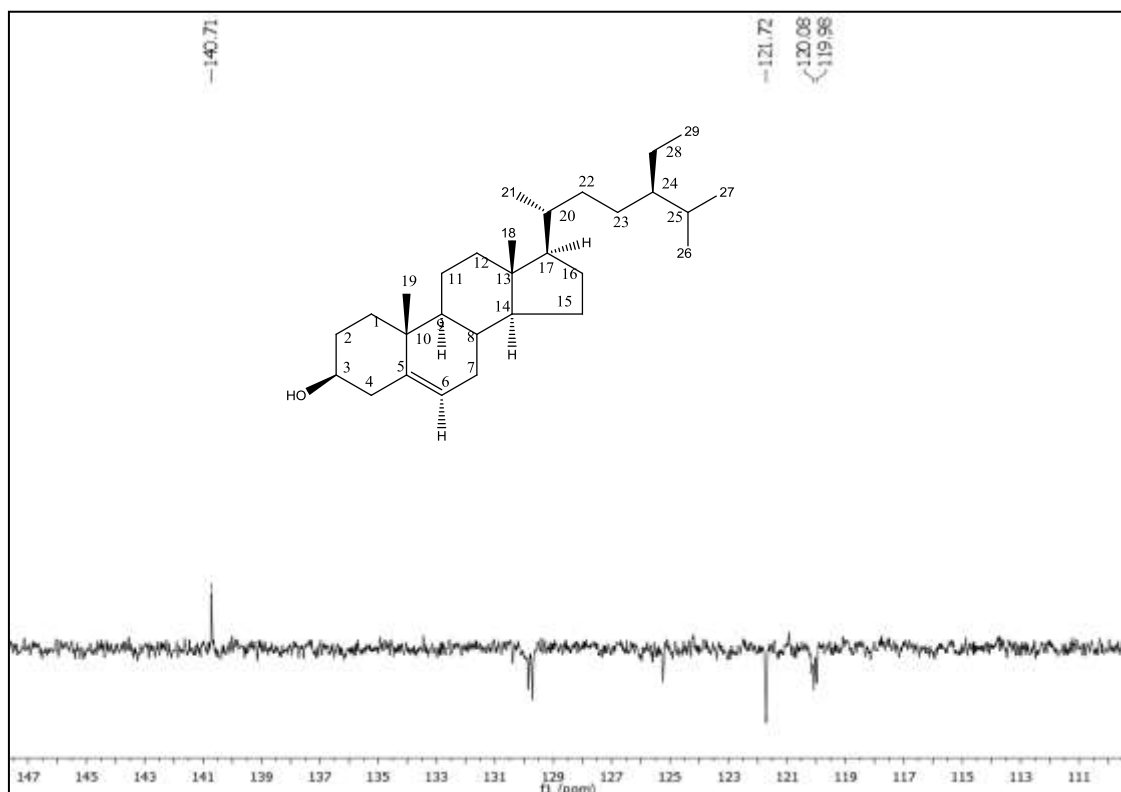
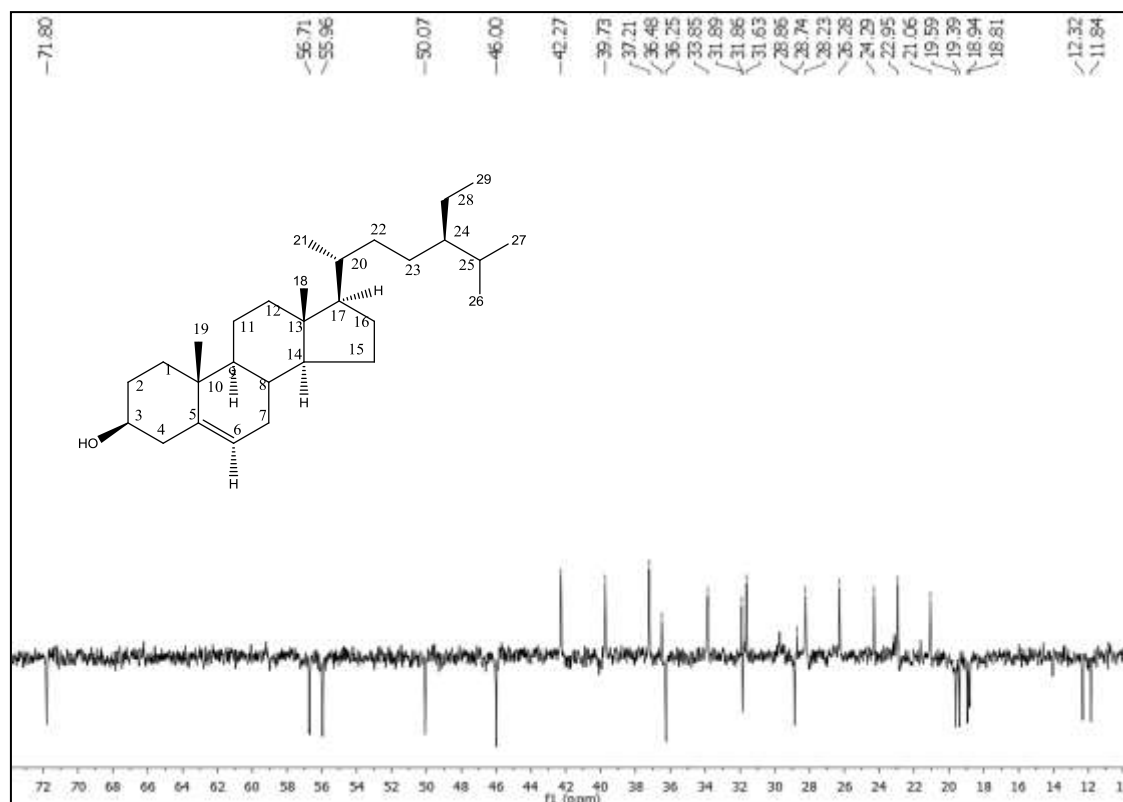


Figura 18. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) de **Cm-1**.



III.2.2.2 Identificação estrutural de *Cm-2*.

A substância *Cm-2* apresentou-se na forma de cristais vermelhos, solúveis em clorofórmio. A identificação foi realizada através de análises espectrais de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais.

O espectro de RMN ^1H (Figura 20, p. 81; p. 83) e sua expansão (Figura 21, p. 81; tabela 3, p. 79) apresentaram sinais em δ_{H} 7,00 a 7,50 característico de núcleo aromático. Analisando a expansão (Figura 21, pag. 81) foi possível observar a presença de dois dupletos largos, para um hidrogênio em δ_{H} 7,41 ($J = 7,6$ Hz, H-4/H-4') e 7,29 ($J = 7,8$ Hz, H-7/H-7') e dois duplos tripletos para um hidrogênio em δ_{H} 7,17 ($J = 1,4$, H-6/H-6' e 7,8 Hz, H-6/H-6') e 7,07 ($J = 1,4$ e 7,8 Hz, H-5/H-5') indicando a presença de anel aromático dissustituído em *orto*. Este espectro sugeriu também a presença de nitrogênio de um núcleo indólico, pela presença do singlete em δ_{H} 9,20, característico da classe dos alcaloides (ANJANEYULU, PRAKASHI e MALLAVADHANI, 1991; ANJANEYULU et al., 1992). A análise do espectro de RMN ^1H revelou ainda, a presença de um singlete em δ_{H} 8,04 (para um hidrogênio aromático), possivelmente de carbono metínico ligado a carbono não hidrogenado e δ_{H} 3,90 (s, 3H) característico de metoxila.

O espectro de RMN ^{13}C -APT de *Cm-2* (Figura 22, pag. 82; tabela 3, p. 79) apresentou 12 sinais, sendo seis para carbonos não hidrogenados, e seis para carbonos metínicos ou metílicos. A presença de sinais entre δ_{C} 111,5 e 123,3 demonstraram a presença de anel aromático, pois são característicos de carbonos monohidrogenados. Na sua expansão (Figura 23, pag. 82) observou-se um sinal em δ_{C} 52,5 característico de metoxila, confirmando a presença deste grupo como visualizado no espectro de RMN ^1H . Entretanto, o sinal em δ_{C} 166,6 sugeriu a presença de uma carbonila de éster.

Por se tratar do isolamento químico de uma substância do gênero *Caulerpa*, no qual já é relatado a presença do alcaloide *bis* indólico caulerpina em todas as espécies relatadas na literatura, foi possível através da comparação (LORENZO, 2010) considerar esta proposta para *Cm-2* (Tabela 4, p. 80). Para a plena confirmação, foram realizados os experimentos de correlações heteronuclear HMQC e HMBC.

O espectro de correlações heteronuclear direta (^1H X ^{13}C -HMQC) (Figura 24, p. 83; tabela 3, p. 79) e suas expansões (Figura 25 e 26, p. 86 e 87) mostraram uma correlação entre os hidrogênios da metoxila em δ_{H} 3,88 (H-11/H-11') com o seu respectivo carbono em δ_{C} 52,5 (C-11/C-11'). Uma correlação com o singlete em δ_{H} 8,04 (H-9/H-9') com o carbono em

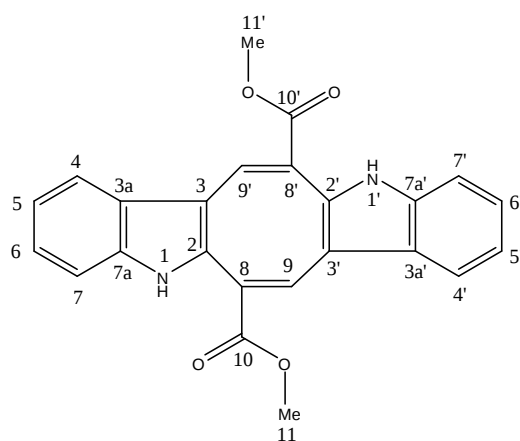
δ_C 142,8 (C-9/C-9'), reafirmando a proposta de se tratar de um hidrogênio metínico. E ainda se observa, as correlações entre os dupletos em δ_H 7,41 (H-4/H-4') com o δ_C 118,0 (C-4/C-4') e δ_H 7,29 (H-7/H-7') com o δ_C 111,5 (C-7/C-7') e os duplo tripletos em δ_H 7,17 (H-6/H-6') com o δ_C 123,3 (C-6/C-6') e δ_H 7,07 (H-5/H-5') com o δ_C 120,7 (C-5/C-5').

O espectro de correlações heteronuclear (1H X ^{13}C -HMBC) (Figura 27, p. 84; tabela 3, p. 79) e suas expansões (Figura 28 e 29, p. 85) a duas (J^2) e três ligações (J^3) mostraram as seguintes correlações: δ_H 8,04 (H-9) com δ_C 166,6 (J^3) atribuído à carbonila (C-10), com δ_C 132,8 (J^3) atribuído ao carbono alfa ao nitrogênio (C-2). O δ_C 137,7 foi atribuído ao C-7a alfa ao nitrogênio por apresentar correlação com δ_H 7,41 (H-4) e δ_H 7,17 (H-6) ambos (J^3), o que permite atribuir δ_H 7,17 para a posição 6.

No núcleo aromático observou-se correlação do δ_H 7,41 (H-4) (J^3) com δ_C 123,3 (C-6) e δ_H 7,17 (H-6) (J^3) com δ_C 118,0 (C-4), assim como δ_H 7,29 (H-7) com δ_C 120,7 (C-5) e δ_H 7,07 (H-5) (J^3) com δ_C 111,5 (C-7). O C-3a teve seu deslocamento químico definido através da correlação δ_C 128,1 (J^3) com δ_H 7,07 (H-5) e δ_H 7,29 (H-7).

Diante do exposto foi possível confirmar que Cm-2 tratava-se do alcaloide bis indólico caulerpina (CLP) (Figura 19).

Figura 19. Estrutura química do alcaloide bis indólico caulerpina (CLP).



Caulerpina

Tabela 3. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C (HMBC) de **Cm-2** registrados em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz).

	<i>HMQC</i>		<i>HMBC</i>	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
2	132,8	-		
3	112,4	-		
3a	128,1	-		
7a	137,7	-		
8	125,4	-		
10	166,6	-		
CH				
4	118,0	7,41 (<i>dl</i> , $J= 7,6$ Hz,1H)		C-6, C-7a
5	120,7	7,07 (<i>dt</i> , $J= 1,4$ e 7,8 Hz,1H)		C-3a, C-7
6	123,3	7,17 (<i>dt</i> , $J= 1,4$ e 7,8 Hz,1H)		C-4, C-7a
7	111,5	7,29 (<i>dl</i> , $J= 7,8$ Hz,1H)		C-3a, C-5
9	142,8	8,04 (<i>s</i> , 1H)		C-2, C-4, C-10
CH₃O				
11	52,5	3,88 (<i>s</i> , 3H)		
C				
2'	132,8	-		
3'	112,4	-		
3a	128,1	-		
7a	137,7	-		
8	125,4	-		
10	166,6	-		
CH				
4	118,0	7,41 (<i>dl</i> , $J= 7,6$ Hz,1H)		C-6', C-7a'
5	120,7	7,07 (<i>dt</i> , $J= 1,4$ e 7,8 Hz,1H)		C-3a', C-7'
6	123,3	7,17 (<i>dt</i> , $J= 1,4$ e 7,8 Hz,1H)		C-4', C-7a'
7	111,5	7,29 (<i>dl</i> , $J= 7,8$ Hz,1H)		C-3a', C-5'
9	142,8	8,04 (<i>s</i> , 1H)		C-2', C-4', C-10'
CH₃O				
11	52,5	3,88 (<i>s</i> , 3H)		

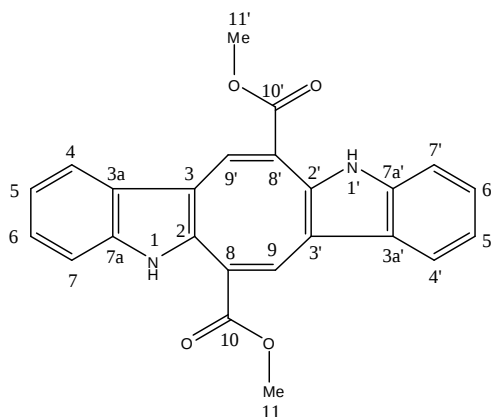


Tabela 4. Dados comparativos de RMN¹³C da substância **Cm-2** (δ , CDCl₃, 50 MHz) com modelos da literatura (δ , CDCl₃, 125 MHz), (LORENZO, 2010).

Carbonos	Cm-2	Caulerpina
2/2'	132,8	132,8
3/3'	112,4	112,5
3a/3a'	128,1	128,3
4	118,0	118,1
5	120,7	120,7
6/6'	123,3	123,3
7/7'	111,5	111,5
7a/7a'	137,7	137,7
8/8'	125,4	125,6
9/9'	142,8	142,9
10/10'	166,6	166,6
11/11'	52,5	52,6

Figura 20. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de **Cm-2**.

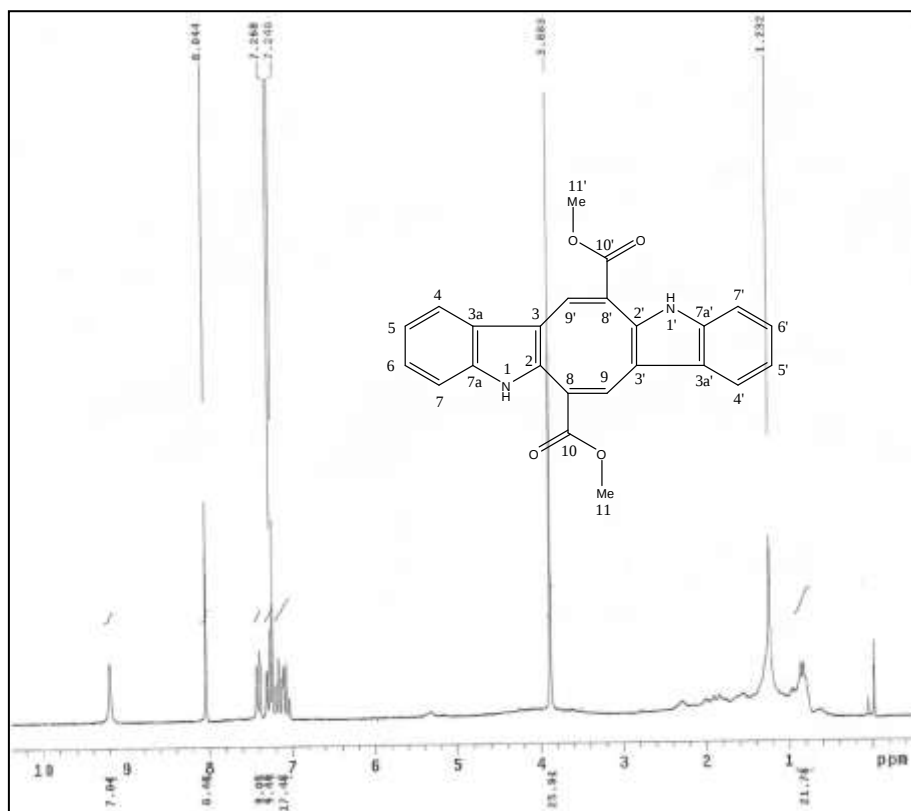


Figura 21. Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de **Cm-2**.

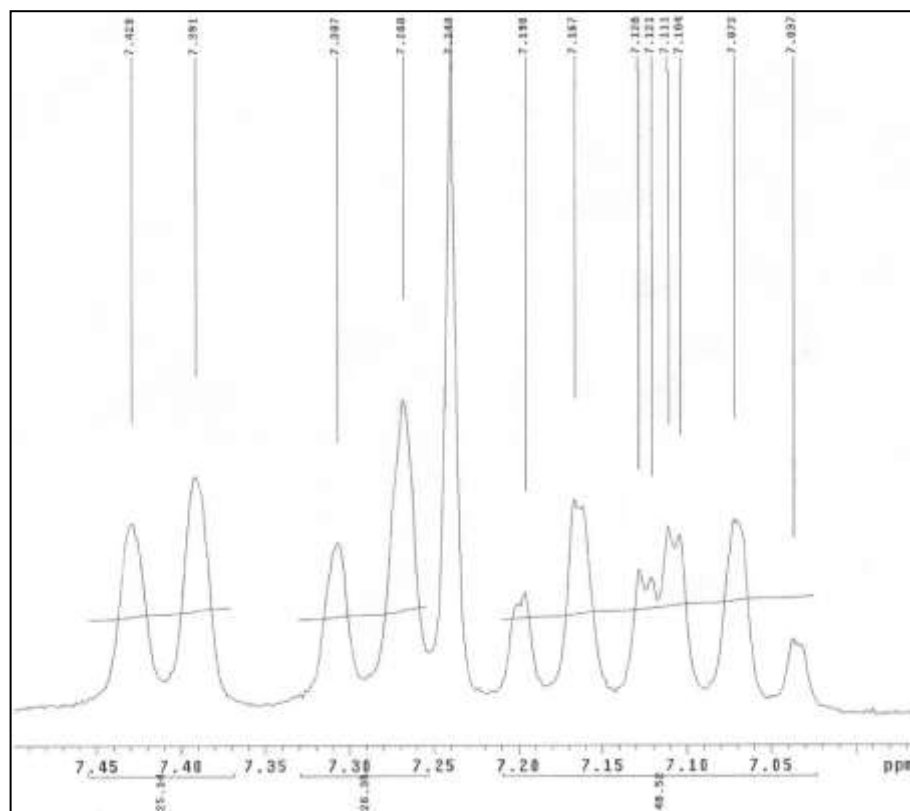


Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de **Cm-2**.

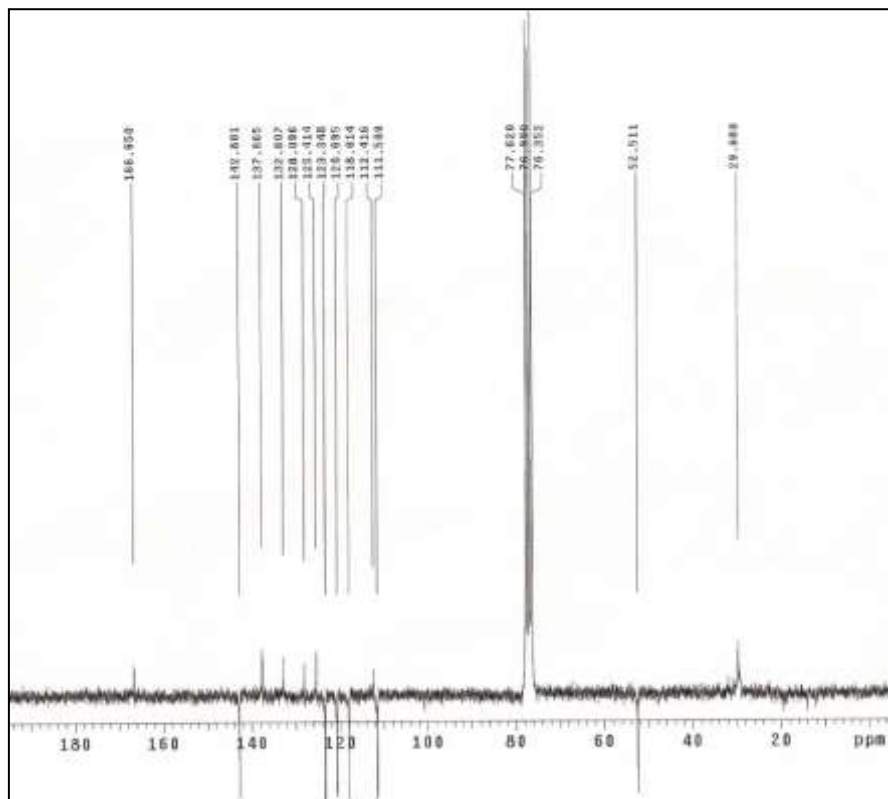


Figura 23. Expansão do Espectro de RMN ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) de **Cm-2**.

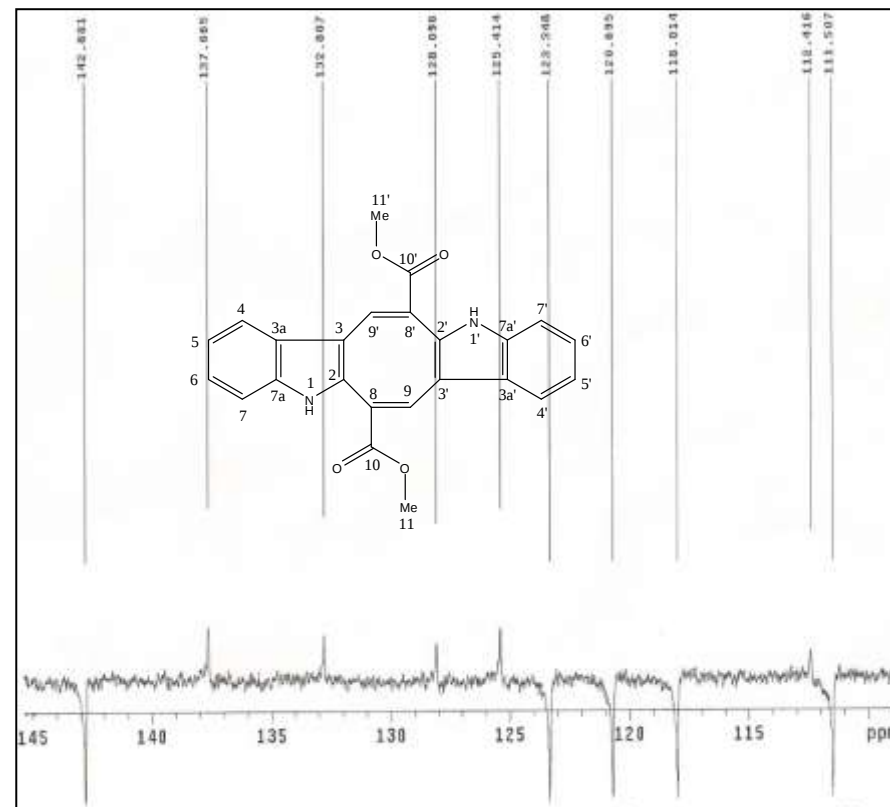


Figura 24. Espectro de HMQC (CDCl_3 , 200 e 50 MHz) de *Cm-2*.

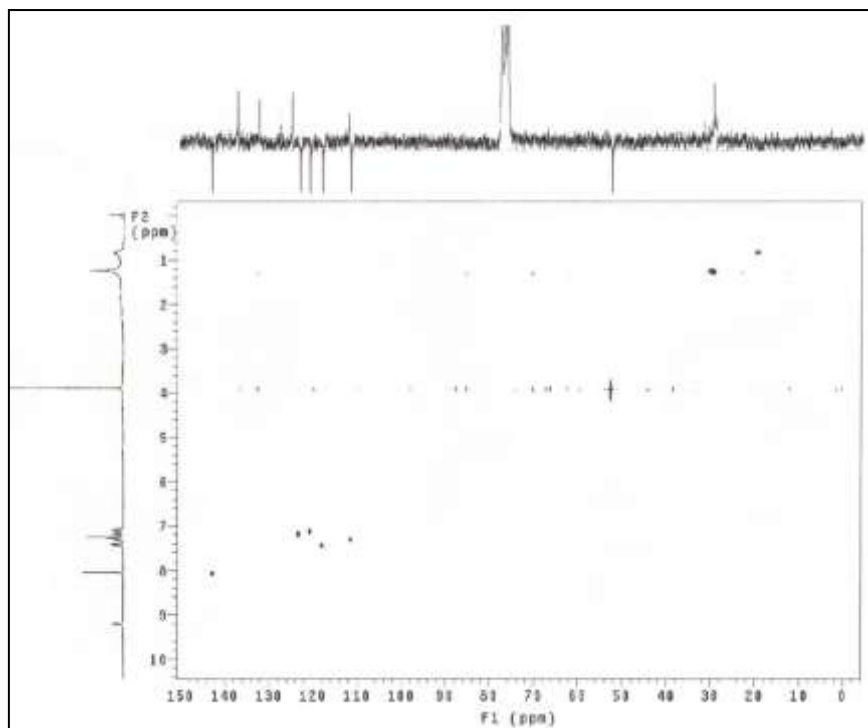


Figura 25. Expansão do Espectro de HMQC (CDCl_3 , 200 e 50 MHz) de *Cm-2*.

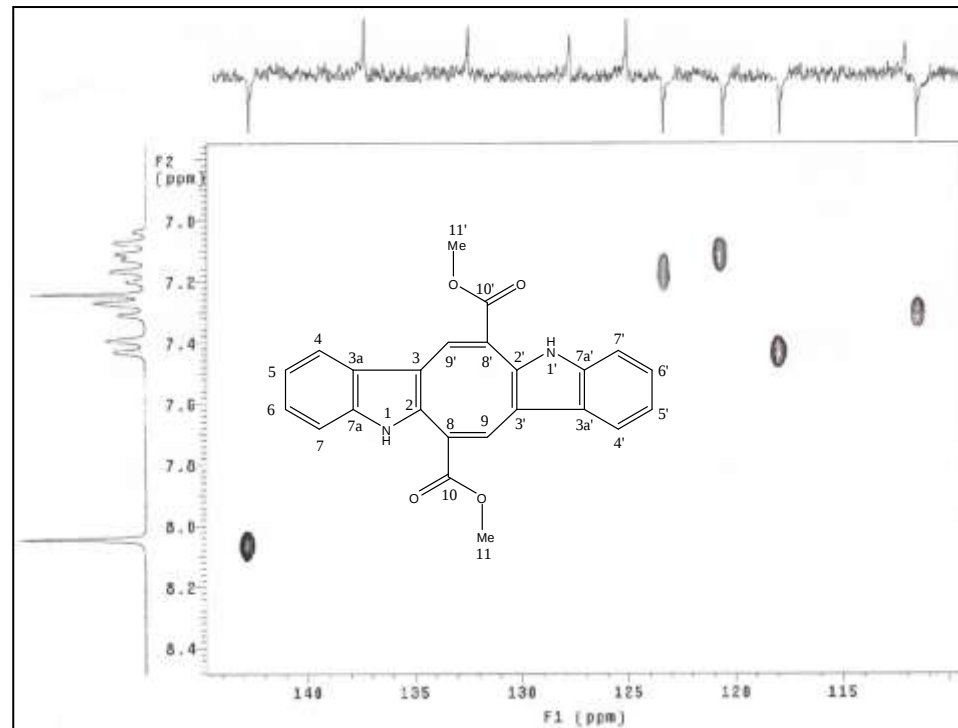


Figura 26. Expansão do espectro NOESY (200 MHz, CDCl₃) de **Cm-2**.

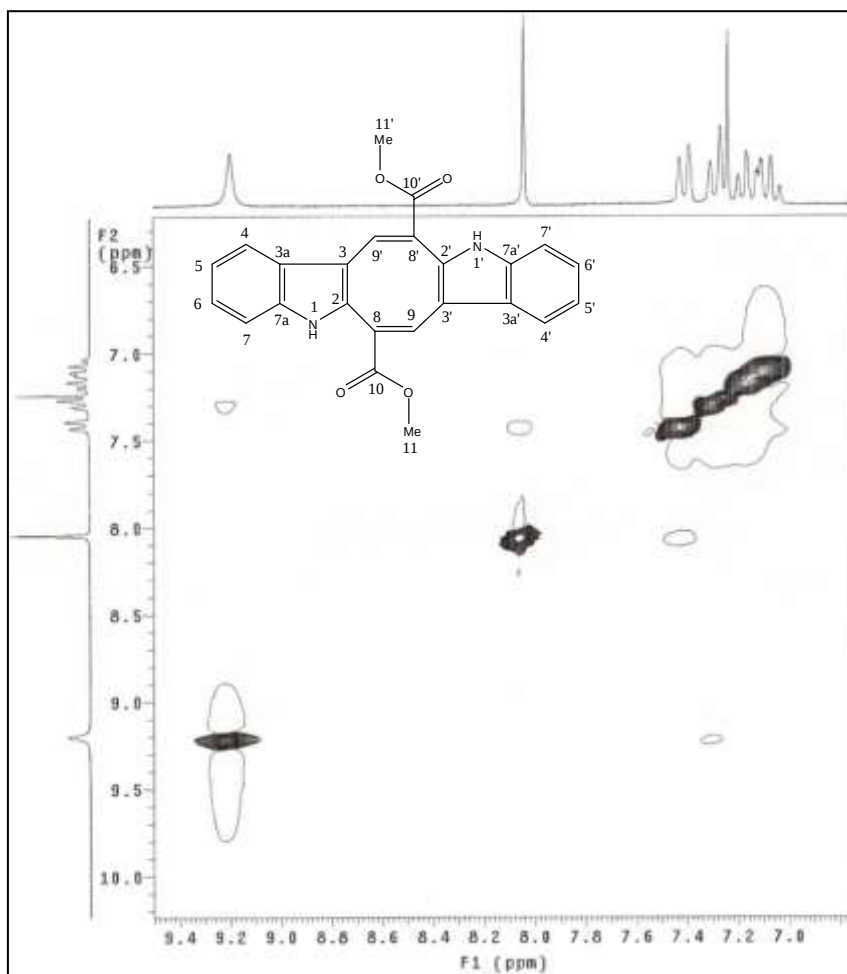


Figura 27. Espectro HMBC (200 e 50 MHz, CDCl₃) de **Cm-2**.

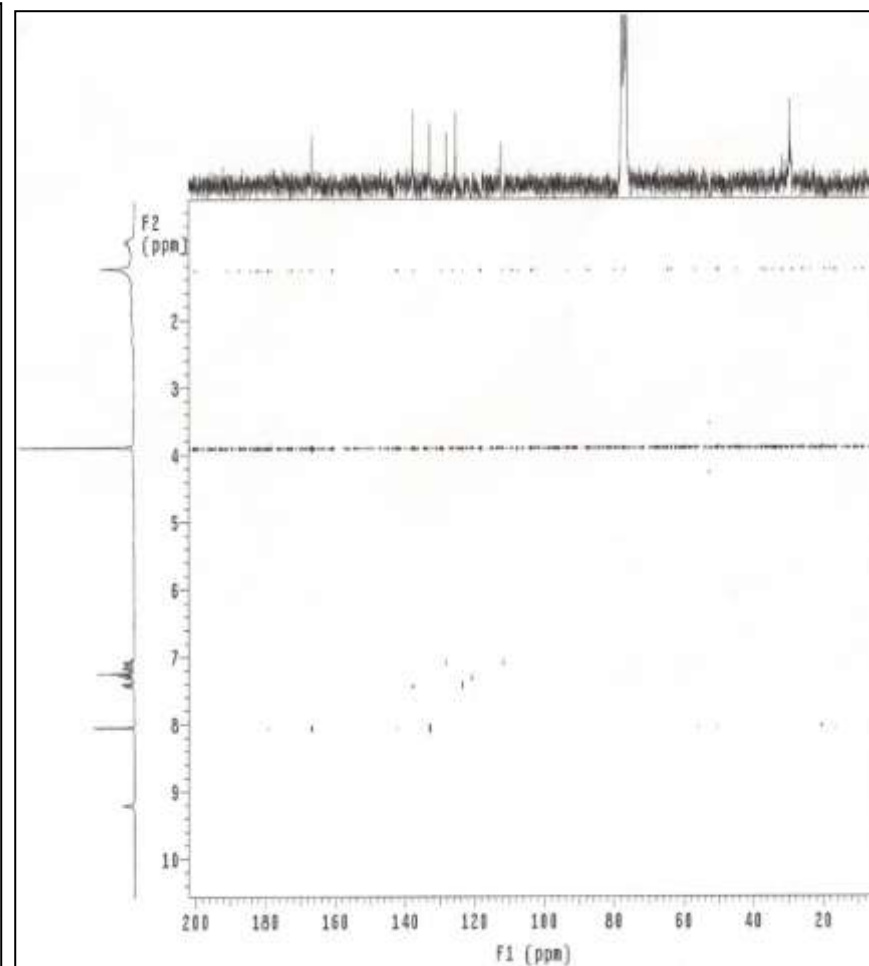
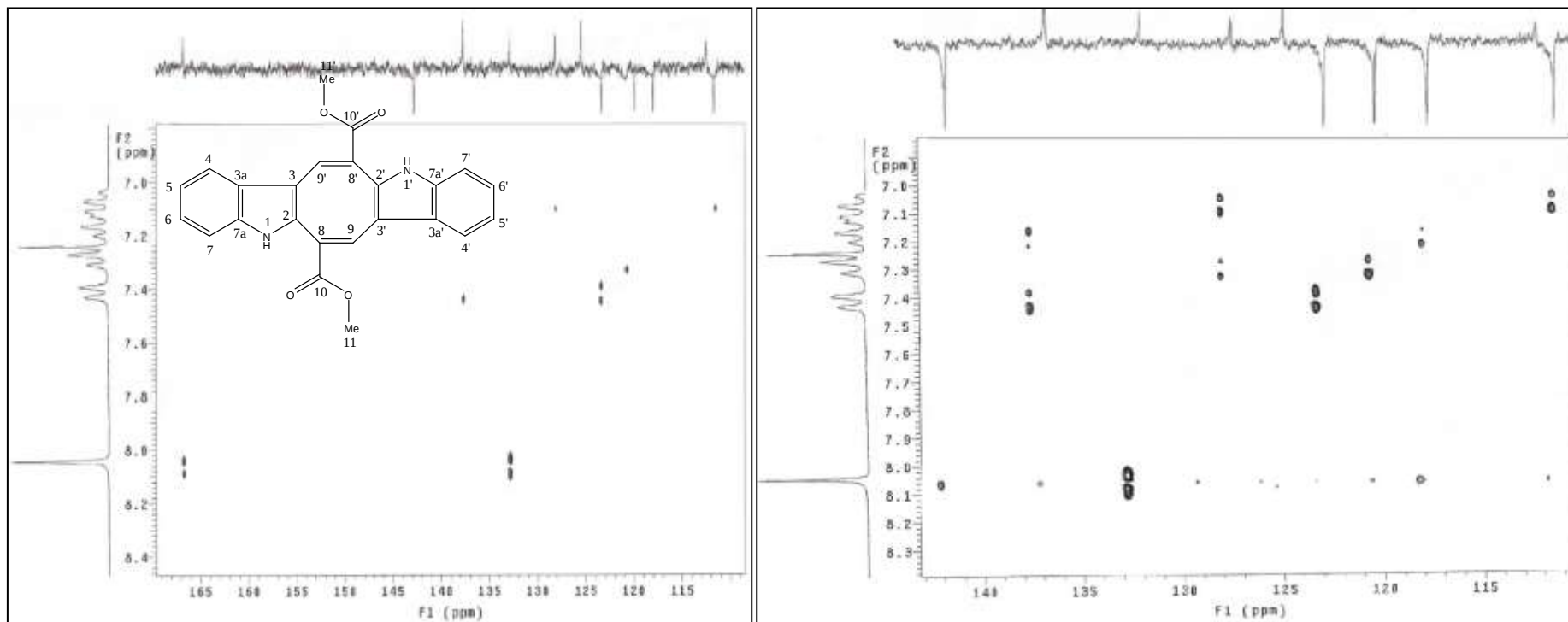


Figura 28. Expansão do espectro HMBC (200 e 50 MHz, CDCl₃) de **Cm-2**. **Figura 29.** Expansão do espectro HMBC (200 e 50 MHz, CDCl₃) de de **Cm-2**.



III.2.3 Resultados obtidos com *Hypnea musciformis*.

III.2.3.1 Identificação estrutural de *Hm-1*.

A substância *Hm-1* apresentou-se como um óleo de coloração amarela, solúvel em diclorometano. A mesma foi identificada através de análise espectral dos dados de RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais e comparação com os dados encontrados na literatura.

Semelhante à substância *Cm-1*, o espectro de RMN ^1H (Figura 32, p. 91; Tabela 5, p. 89) apresentou um conjunto de deslocamentos químicos de alta multiplicidade em δ_{H} 0,65 - 2,26, característicos de hidrogênios metínicos, metílicos e metilênicos, e o espectro de RMN ^{13}C -APT apresentou 29 sinais, indicando que *Hm-1* também tratava-se de um esteroide.

Este dado foi corroborado pela observação de dois singletos em δ_{H} 0,65 (Me-18) e 1,22 (Me-19) e de três dubletos em δ_{H} 0,82 ($J = 6,0$ Hz, 3H), 0,85 ($J = 2,0$ Hz, 3H) e 0,92 ($J = 6,0$ Hz, 3H), que indicam a existência de cinco grupamentos metila (Figura 34, pag. 99).

Na expansão dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (Figura 33 e 34, p. 91 e 92, respectivamente), observou-se um multipeto em δ_{H} 3,49 e um sinal em δ_{C} 71,8 correspondentes ao hidrogênio e carbono oximetínicos que possibilitaram sugerir a presença de função álccol em C-3, muito comum na classe dos esteroides.

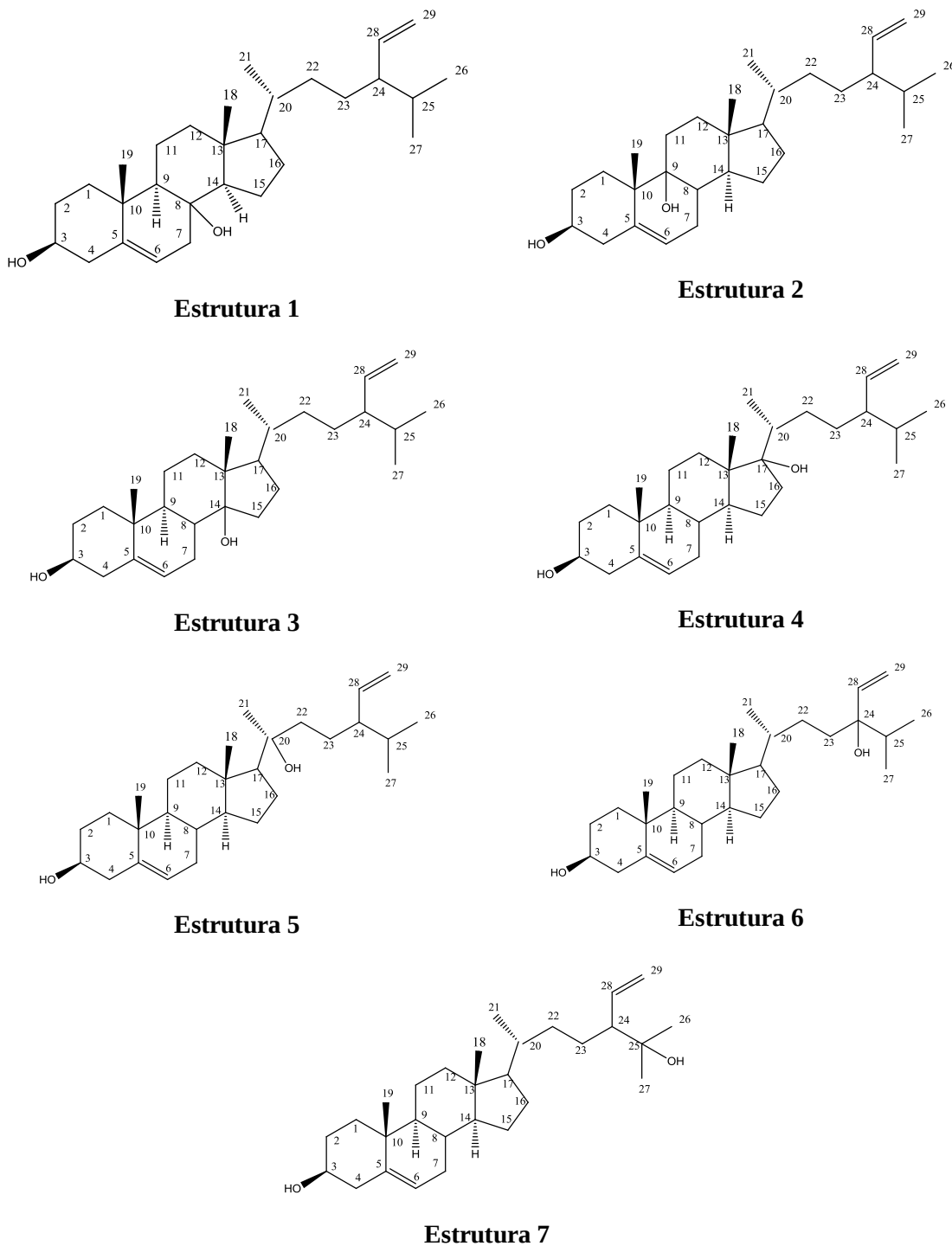
Ainda na expansão do espectro de RMN ^1H (Figura 33, p. 91), um dupeto em δ_{H} 5,32 ($J = 4$ Hz, 1H) permitiram sugerir a presença de um hidrogênio olefínico. Os sinais, no espectro de RMN ^{13}C (Figura 35, p. 92), em δ_{C} 140,6 e 121,6 corroboraram essa afirmação uma vez que são coerentes com dupla ligação localizada em C-5 e C-6.

Ainda na expansão do espectro de RMN ^1H , foi possível analisar um duplo dupeto em δ_{H} 5,71 ($J = 12$ Hz e $J = 18$ Hz, H-28), acoplando *cis* com um dupeto em δ_{H} 5,24 ($J=12$ Hz, H-29) e acoplando *trans* com outro dupeto em δ_{H} 5,11 ($J = 18$ Hz, H-29'). Esses conjuntos de sinais nos fizeram atribuir a presença de um grupo vinila terminal na molécula.

Na expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 36, p. 93; tabela 5, p. 89), foi possível confirmar as sugestões dadas no espectro de RMN ^1H , através dos sinais em δ_{C} 116,3 de carbono metilênico C-29 e em δ_{C} 137,1 de carbono metínico C-28, compatíveis com dupla ligação terminal (AYYAD et al., 2003). Também no espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 36, p. 93) observou-se a presença do deslocamento químico em δ_{C} 89,09 atribuível a carbono oxigenado não hidrogenado (PAVIA et al., 2010). A ausência de outros sinais para carbonos com estas características permitiu sugerir a existência de outra hidroxila para *Hm-1*. Sete

posições no núcleo esteroidal são permitidas para uma hidroxila com esta característica (Figura 30):

Figura 30. Possibilidades estruturais para *Hm-1*.



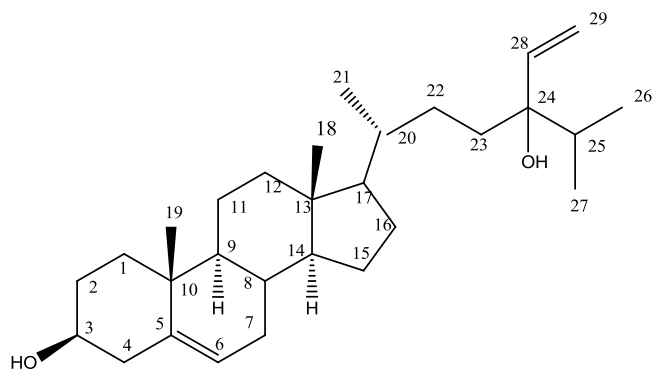
Comparando os dados de RMN ^{13}C de *Hm-1* com os do β -sitosterol (substância similar pelo fato de também apresentar uma hidroxila em C-3 e dupla ligação envolvendo os carbonos C-5 e C-6) é possível constatar semelhanças nos deslocamentos químicos dos

carbonos C-5, C-6, C-9 e C-21. Tal observação permitiu descartar as possibilidades estruturais 1, 2, 3 e 4, visto que, a hidroxila nas posições indicadas em cada estrutura causaria um efeito gama protetor nos carbonos mencionados e isto resultaria em um valor de deslocamento químico menor, o que não ocorre no espectro de RMN ^{13}C -APT de Hm-1.

As possibilidades estruturais 5 e 7 também foram descartadas pela análise da multiplicidade gerada pelos hidrogênios das metilas C-21, C-26 e C-27. A presença da hidroxila em C-20 e C-25 inviabilizaria a formação dos dupletos, observados no espectro de RMN ^1H de Hm-1, para as metilas mencionadas pois ela substituiria o hidrogênio metínico H-20 e H-25.

Desta forma, comparando os dados espectrais com modelos da literatura (AYYAD et al., 2003) (Tabela 6, p. 90), foi possível confirmar que a substância *Hm-1* corresponde a possibilidade estrutural 6, ou seja, o esteroide estigmasta-5,28-dieno-3,24-diol, (3 β)-(24S), mais conhecido como Saringosterol (Figura 31). Isolado em outros produtos marinhos e isolado pela primeira vez em *Hypnea musciformis*.

Figura 31. Estrutura química do esteroide Saringosterol.



Saringosterol

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (200 MHz), ^{13}C (50 MHz) de **Hm-1** registrados em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz).

	δ_{C}	δ_{H}
C		
10	36,46	
13	42,29	
24	89,09	
CH		
5	140,66	
8	35,91	
9	50,05	
14	56,7	
17	55,86	
20	36,17	
28	137,15	5,71 (<i>dd</i> , $J = 12$ e 18 Hz, 1H)
CH₂		
1	37,20	
2	31,53	
4	42,17	
6	121,67	5,32 (<i>d</i> , $J = 4$ Hz, 1H)
7	31,85	
11	21,04	
12	39,7	
15	24,2	
16	28,52	
22	-	
23	28,25	
25	29,67	
29	116,31	5,24 (<i>d</i> , $J = 12$ Hz, 1H) $J =$
29'	116,31	5,11 (18 Hz, 1H)
CH₃		
18	11,84	0,65 (<i>s</i> , 3H)
19	16,66	1,22 (<i>s</i> , 3H)
21	17,68	0,92 (<i>d</i> , $J = 6$ Hz, 3H)
26	19,39	0,85 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz, 3H)
27	18,35	0,82 (<i>d</i> , $J = 6$ Hz, 3H)
C-OH	71,82	-
HO-3	-	3,49 (<i>m</i> , 1H)

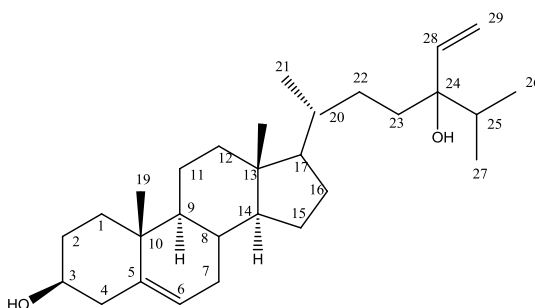


Tabela 6. Dados comparativos de RMN¹³C da substância **Hm-1** (δ , CDCl₃, 50 MHz) com modelos da literatura (δ , CDCl₃, 125 MHz), (Ayyad et al., 2003).

Carbonos	Hm-1	Saringosterol
1	37,20	37,15
2	31,53	32,55
3	71,82	72,47
4	42,17	37,91
5	140,66	141,41
6	121,67	122,38
7	31,85	32,33
8	35,91	36,86
9	50,05	50,76
10	36,46	37,91
11	21,04	21,73
12	39,7	40,40
13	42,29	42,99
14	56,70	57,40
15	24,2	24,96
16	28,52	29,04
17	55,86	56,54
18	11,84	12,51
19	16,66	17,33
20	36,17	36,51
21	17,68	18,37
22	-	32,32
23	28,25	28,92
24	89,09	89,83
25	29,67	29,16
26	19,39	20,05
27	18,35	19,54
28	137,15	137,84
29	116,31	117,00

Figura 32. Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de **Hm-1**.

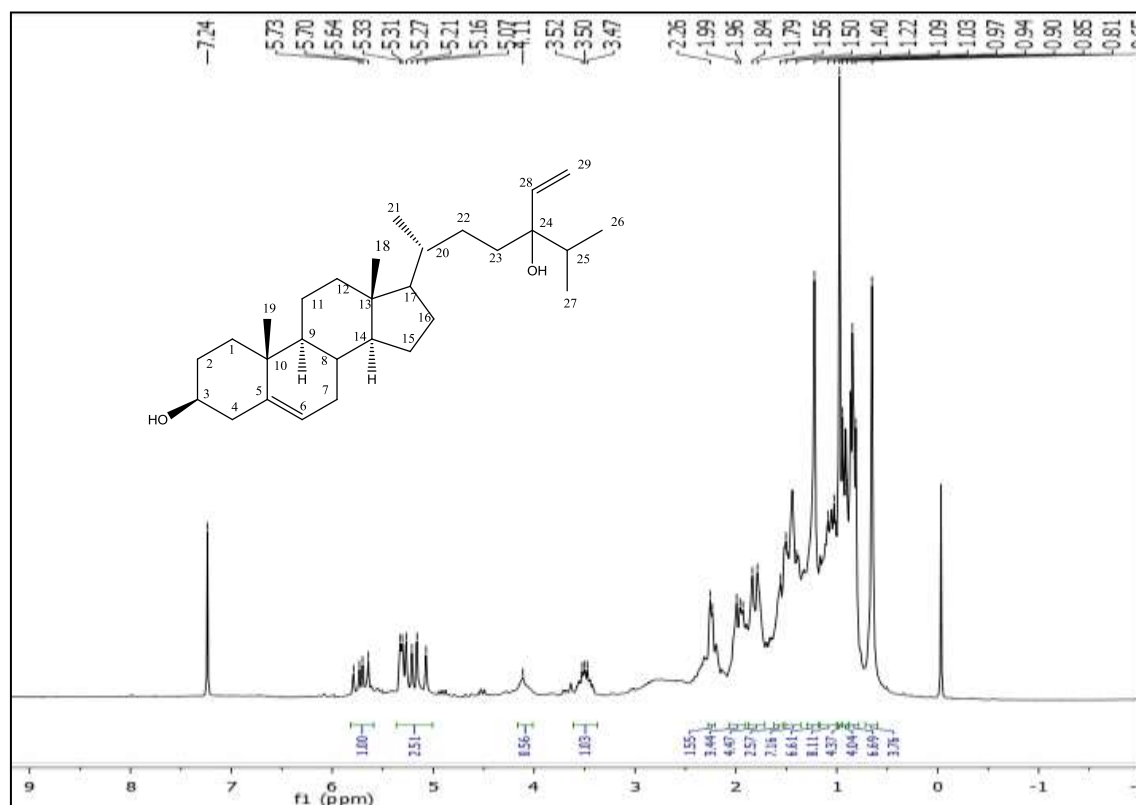


Figura 33. Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de **Hm-1**.

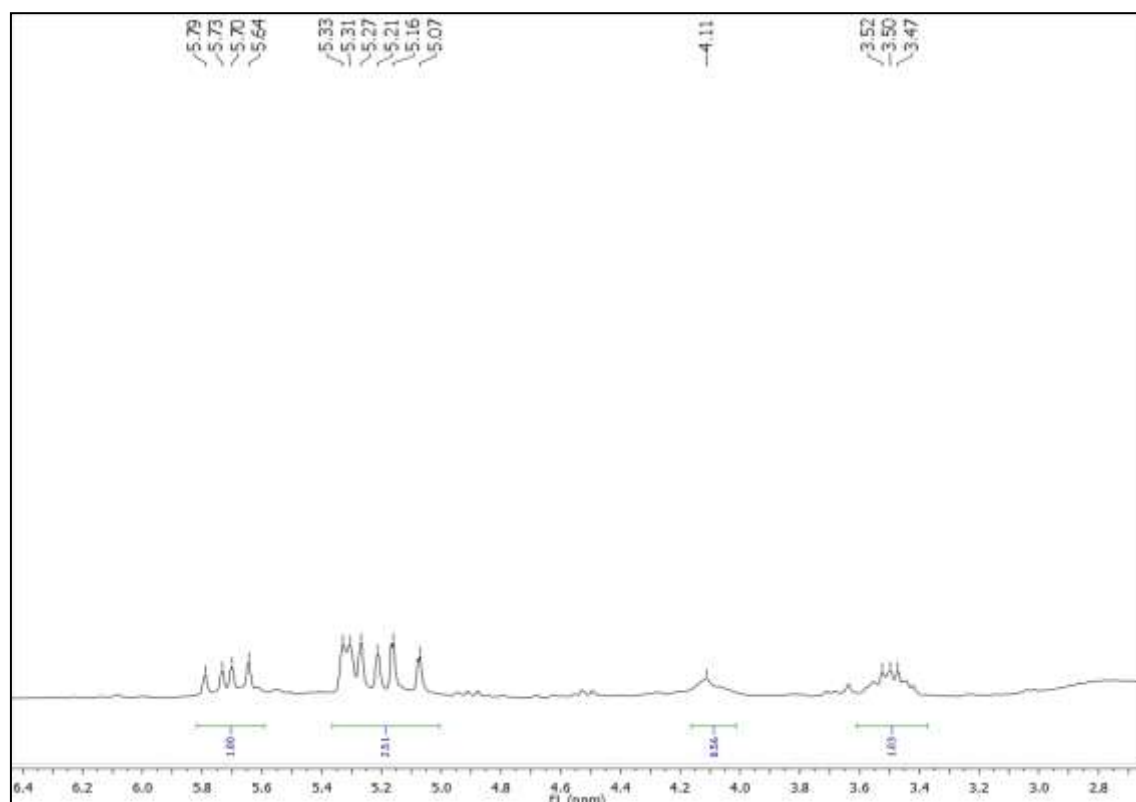


Figura 34. Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de **Hm-1**.

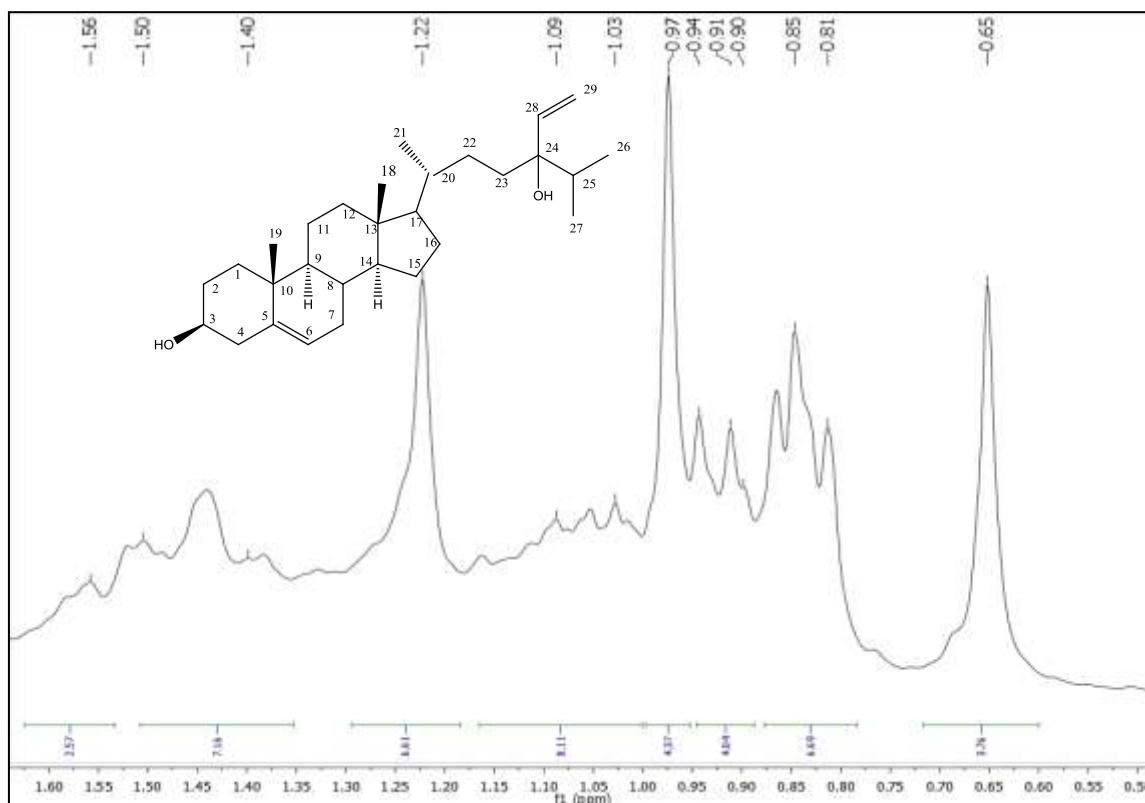


Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) de **Hm-1**.

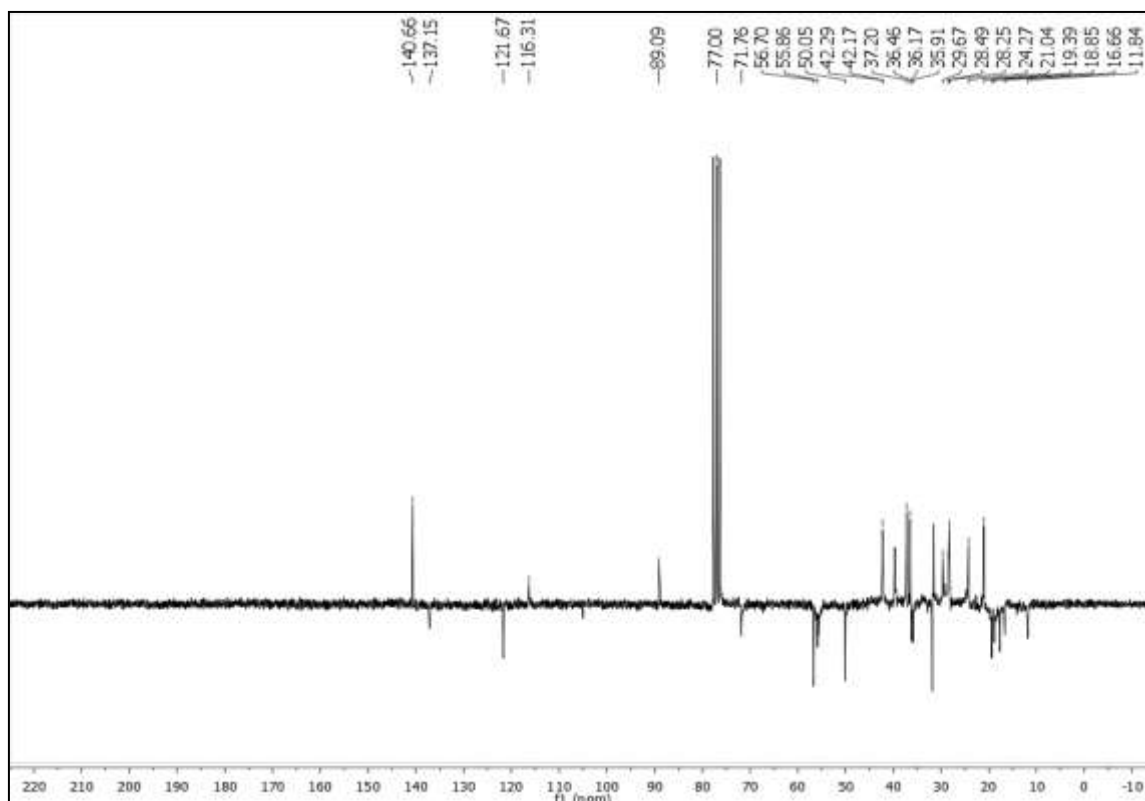


Figura 36. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) de **Hm-1**.

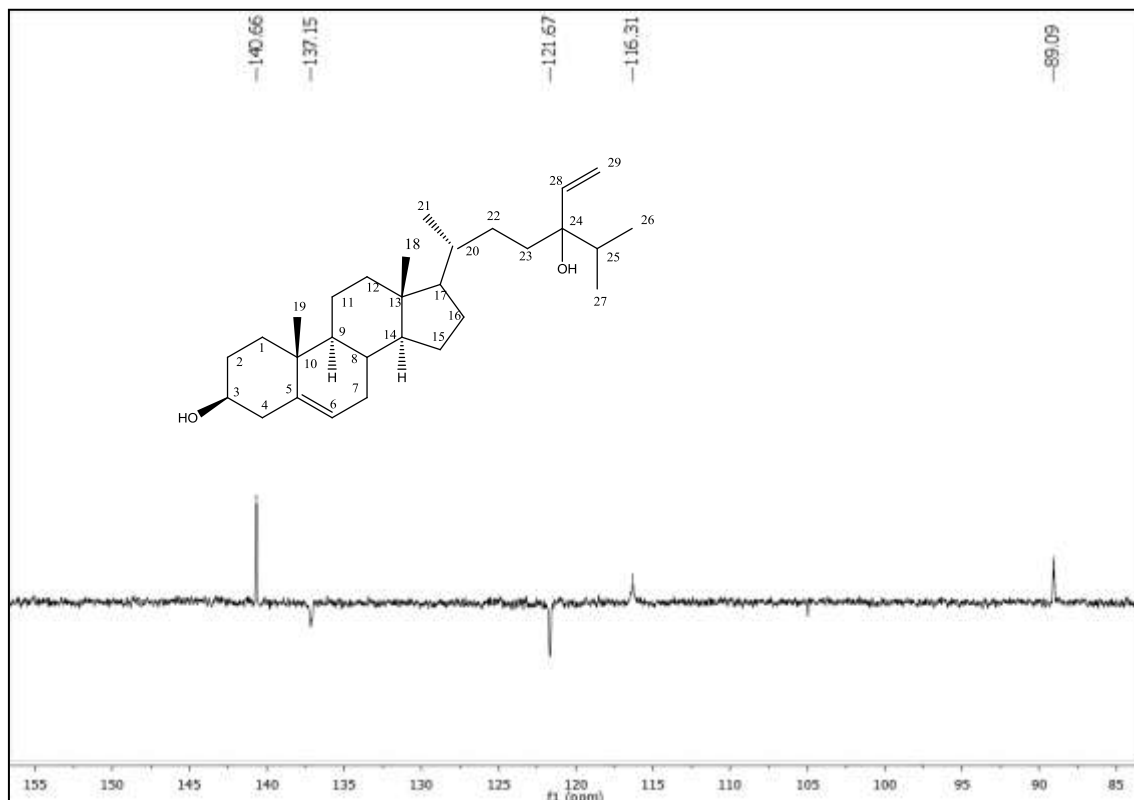
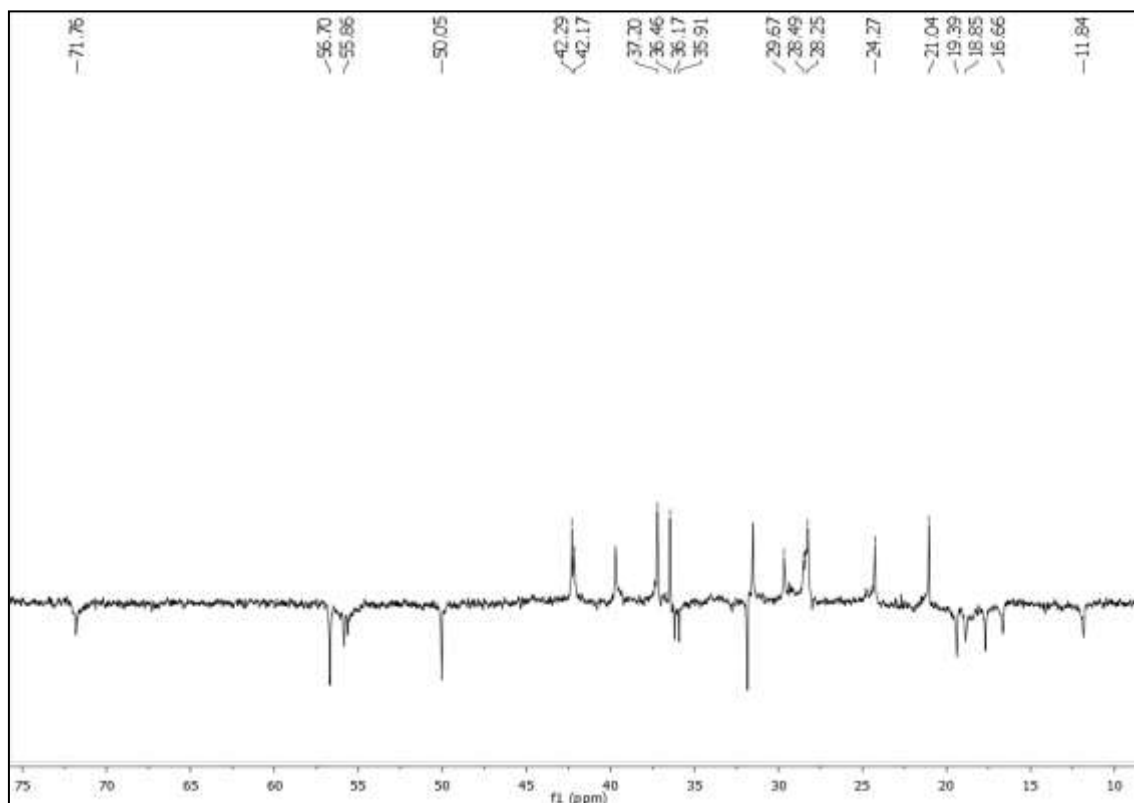


Figura 37. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) de **Hm-1**.



III.2.3.2 Identificação estrutural de *Hm-2*.

A substância *Hm-2* apresentou-se na forma de cristais brancos, solúvel em diclorometano. A mesma foi identificada através de análise espectral dos dados de infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais e CG-EM.

O espectro de absorção na região do infravermelho, obtido em pastilhas de KBr (Figura 40, p. 99), mostrou uma banda larga em 3213 cm^{-1} , sugerindo grupo OH na molécula e uma banda em 3305 cm^{-1} podendo ser um indicativo de NH. O espectro de IV sugeriu ainda, a presença de núcleo aromático em *Hm-2* devido a presença de absorções entre 1408 e 1350 cm^{-1} , característicos de C=C e pela presença da banda em 3086 cm^{-1} referente a C-H de aromáticos. E uma absorção em 1712 cm^{-1} permitiu inferir sobre a presença de uma carbonila (SILVERSTEIN et al., 2007).

No espectro de RMN ^1H (Figura 41, p. 100; Tabela 7, p. 97) e suas expansões (Figuras 42 e 43, p. 100 e 101, foram observados na região de aromáticos, os multipletos em $\delta_{\text{H}} 7,56$ (m, 2H) e $\delta_{\text{H}} 7,25$ (m, 2H), correspondentes aos dois pares de átomos de hidrogênio H-2/H-6 e H-3/H-5 de anel aromático e um terceiro multiplete em $\delta_{\text{H}} 7,22$ (m, 3H) corresponde ao H-4, caracterizando um sistema aromático monossustituído. Na expansão do mesmo espectro, podemos analisar um tripleto em $\delta_{\text{H}} 0,95$ (t, 3H, $J = 7,5\text{ Hz}$, H-9) acoplando com um quarteto em $\delta_{\text{H}} 2,56$ (q, 2H, $J = 7,5\text{ Hz}$, H-8) típico de grupo etil.

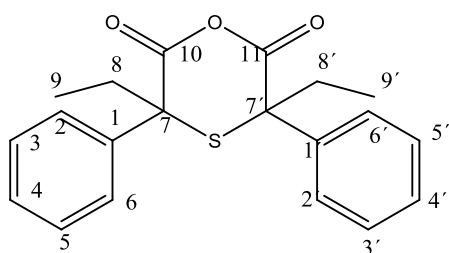
No espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 44, p. 101; Tabela 7, p. 97), e suas expansões (Figuras 45 e 46, p. 102), foi possível observar sinais para carbonos metínicos de aromático entre $\delta_{\text{C}} 138,88$ - $124,19$, e sinais em $\delta_{\text{C}} 29,23$ e $\delta_{\text{C}} 9,5$ de carbonos metilênico e metílico respectivamente, confirmando a proposta do espectro de hidrogênio, da presença de um grupo etil na molécula. Ainda no mesmo espectro, observa-se a presença de carbonila na molécula em $\delta_{\text{C}} 172,58$ e um deslocamento químico em $\delta_{\text{C}} 60,67$ de carbono não hidrogenado.

O espectro de correlação heteronuclear direta (^1H X ^{13}C -HMQC) (Figura 47, p. 103; Tabela 7, p. 97) e suas expansões (Figuras 48 e 49, p. 103 e 104) mostraram a correlação do hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 7,56$ (H-2/6) com o carbono em $\delta_{\text{C}} 126,32$ (C-4/6), do hidrogênio $\delta_{\text{H}} 7,22$ (H-4) com o carbono em $\delta_{\text{C}} 128,84$ (C-4), do hidrogênio $\delta_{\text{H}} 7,25$ (H3/5) com o carbono em $\delta_{\text{C}} 128,01$ e dos hidrogênios $\delta_{\text{H}} 0,95$ (H-9) e $2,56$ (H-8) com carbonos $\delta_{\text{C}} 9,51$ (C-9) e $29,23$ (C-8) metílico e metínico, respectivamente.

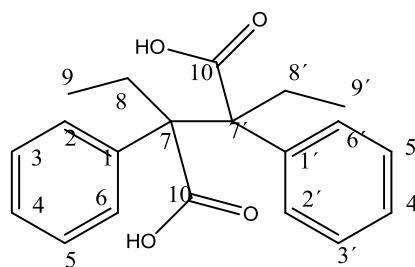
No espectro de correlações heteronuclear (^1H X ^{13}C -HMBC) (Figura 50, p. 104; Tabela 7, pag. 97) e suas expansões (Figuras 51, 52, 53 e 54, p. 105 e 106), mostraram uma correlação do hidrogênio δ_{H} 7,56 (H-2/6) a três ligações do carbono não hidrogenado em δ_{C} 60,67 (C-7), do hidrogênio δ_{H} 2,56 (H-8) a duas ligações do carbono δ_{C} 60,67(C-7) e do carbono em δ_{C} 9,51(C-9) e este mesmo hidrogênio (H-8) a três ligações do carbono da carbonila em δ_{C} 172,58 (C-10) e do carbono em δ_{C} 138,87 (C-1).

Diante das informações analisadas, pode-se ter algumas sugestões das possíveis possibilidades estruturais de *Hm-2* (Figura 38):

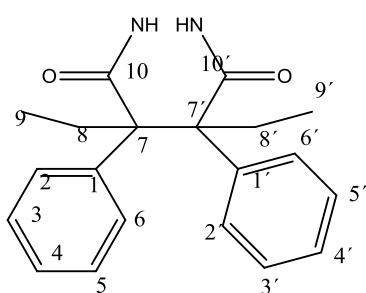
Figura 38. Possibilidades estruturais para *Hm-2*.



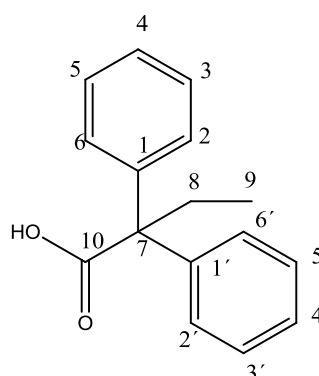
Possibilidade estrutural 1



Possibilidade estrutural 2

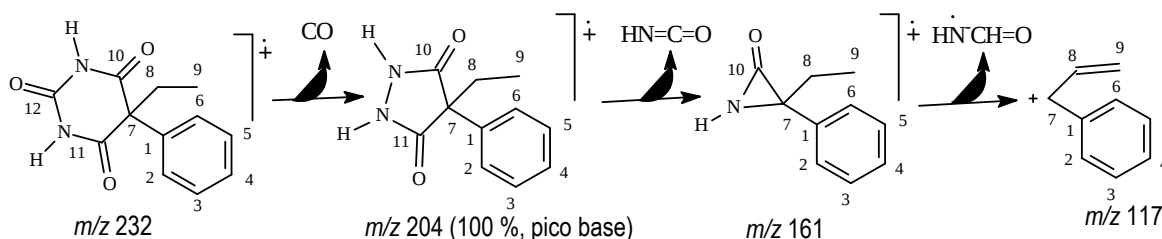


Possibilidade estrutural 3



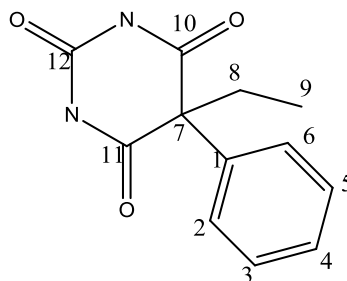
Possibilidade estrutural 4

Entretanto, após a análise da fragmentação da molécula em Cromatografia Gasosa acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) (Figuras 55 e 56, p. 107), foi possível obter a massa molecular (232 u.m.a) caracterizar a estrutura química de *Hm-2*, descartando as possibilidades anteriormente citadas.



Assim, após análise dos dados espectrais e comprando com os valores citados na literatura (LONG; GOLDSTEIN, 1974)(Tabela 8, p. 98), foi possível elucidar a estrutura química de *Hm-2* como sendo o 2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona, 5-etil-5-fenil, mais conhecido como fenobarbital.

Figura 39. Estrutura química do 2,4,6(1H,3H,5H)-pirimidinatriona, 5-etil-5-fenil.



Fenobarbital

Entretanto, mais estudos são necessários para realmente confirmar a produção natural desta molécula, visto que, o fenobarbital trata-se de uma molécula sintética que nunca foi isolada naturalmente. Assim, torna-se imprescindível que se realize também um estudo mais aprofundado sobre a composição química do ambiente aquático em que a alga foi coletada, para assim identificar a presença ou não de possíveis dejetos contaminantes.

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C (HMQC e HMBC) de **Hm-2** registrados em Py-D_5 (δ em ppm e J em Hz).

	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
1	138,88	-		
7	60,67	-		
10	172,58	-		
11	172,58	-		
12	151,19	-		
CH				
2	126,32	7,56 (m)	C-3	C-5, C-6, C-7
3	128,01	7,25 (m)	C-4	C-1
4	128,84	7,22 (m)		C-2, C-6
5	128,01	7,25 (m)	C-4	C-1
6	126,32	7,56 (m)	C-5	C-2, C-7
CH₂				
8	29,23	2,57 (q, $J = 7,5$ Hz)	C-7, C-9	C-1, C-10
CH₃				
9	9,51	0,95 (t, $J = 7,5$ Hz)	C-9	C-7

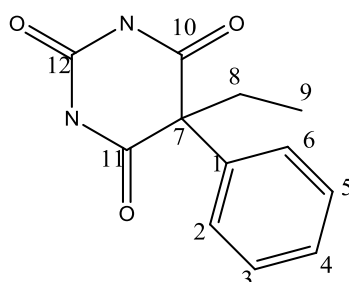


Tabela 8. Dados comparativos de RMN¹³C da substância **Hm-2** (δ , CDCl₃, 50 MHz) com modelos da literatura (CD₃OD, 100 MHz), (LONG; GOLDSTEIN, 1974).

Carbonos	<i>Hm-2</i>	Fenobarbital
1	138,88	139,10
2	126,32	126,40
3	128,01	128,80
4	128,84	129,00
5	128,01	128,80
6	126,32	126,40
7	60,67	61,75
8	29,23	29,90
9	9,51	9,760
10	172,58	173,02
11	172,58	173,02
12	151,19	151,06

Figura 40. Espectro na região do Infravermelho de **Hm-2** (Pastilha de KBr).

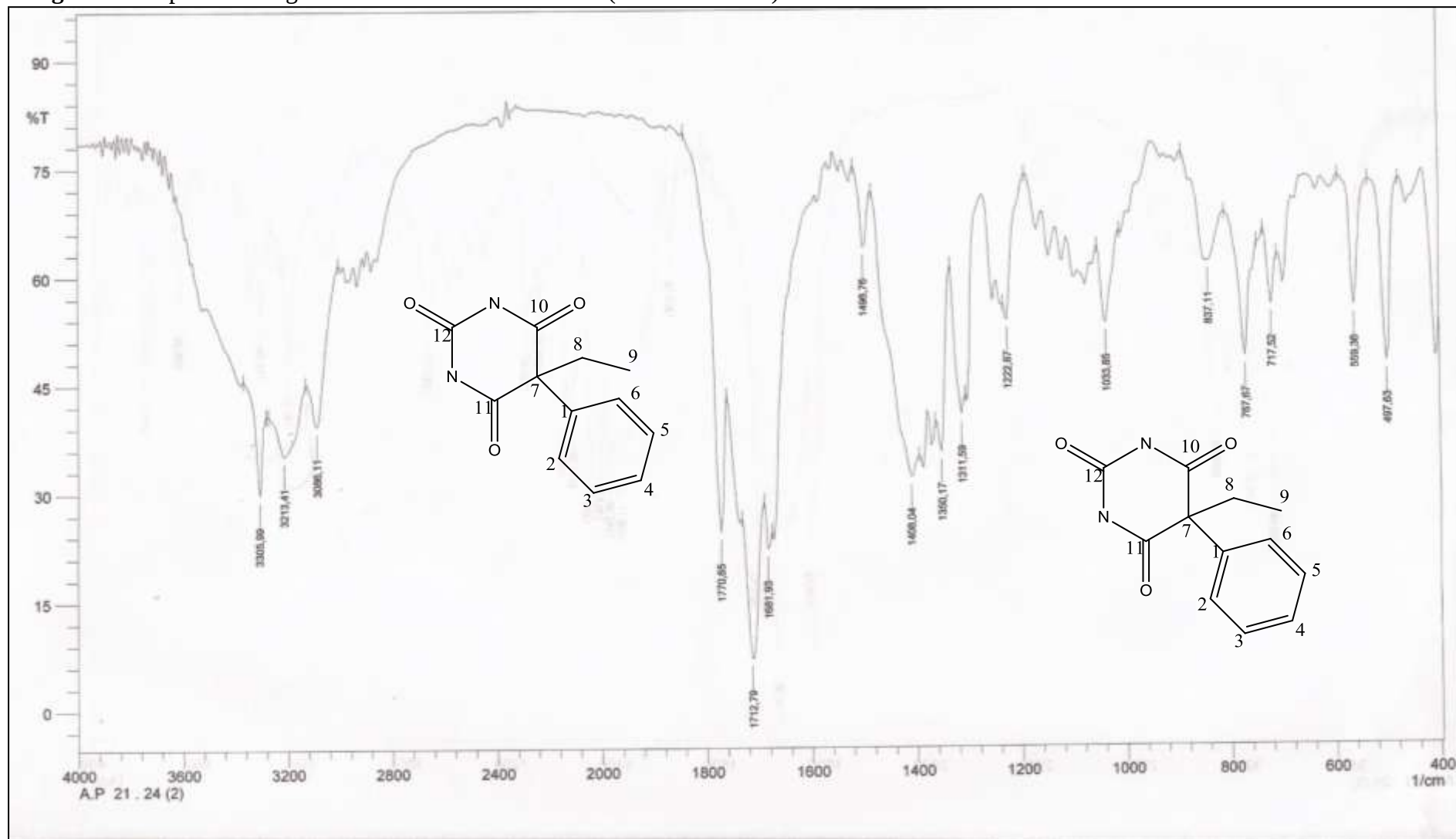


Figura 41. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, Py-D₅) de **Hm-2**.

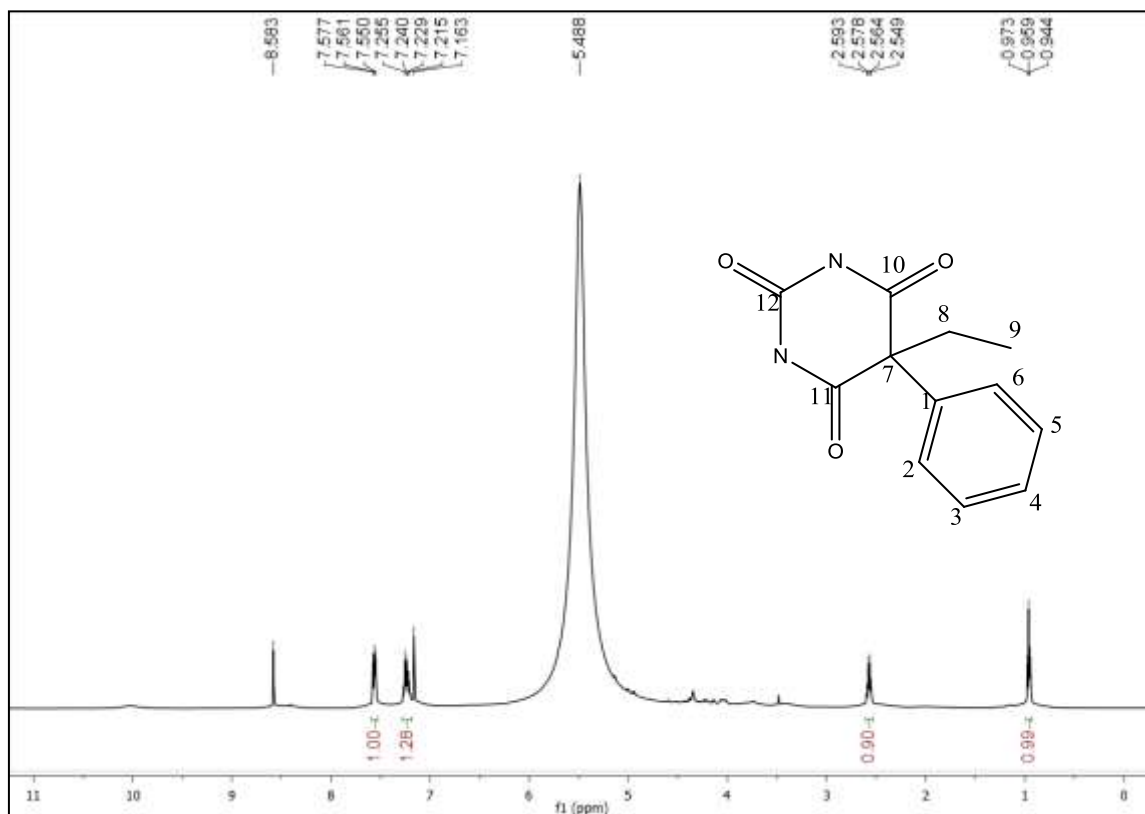


Figura 42. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, Py-D₅) de **Hm-2**.

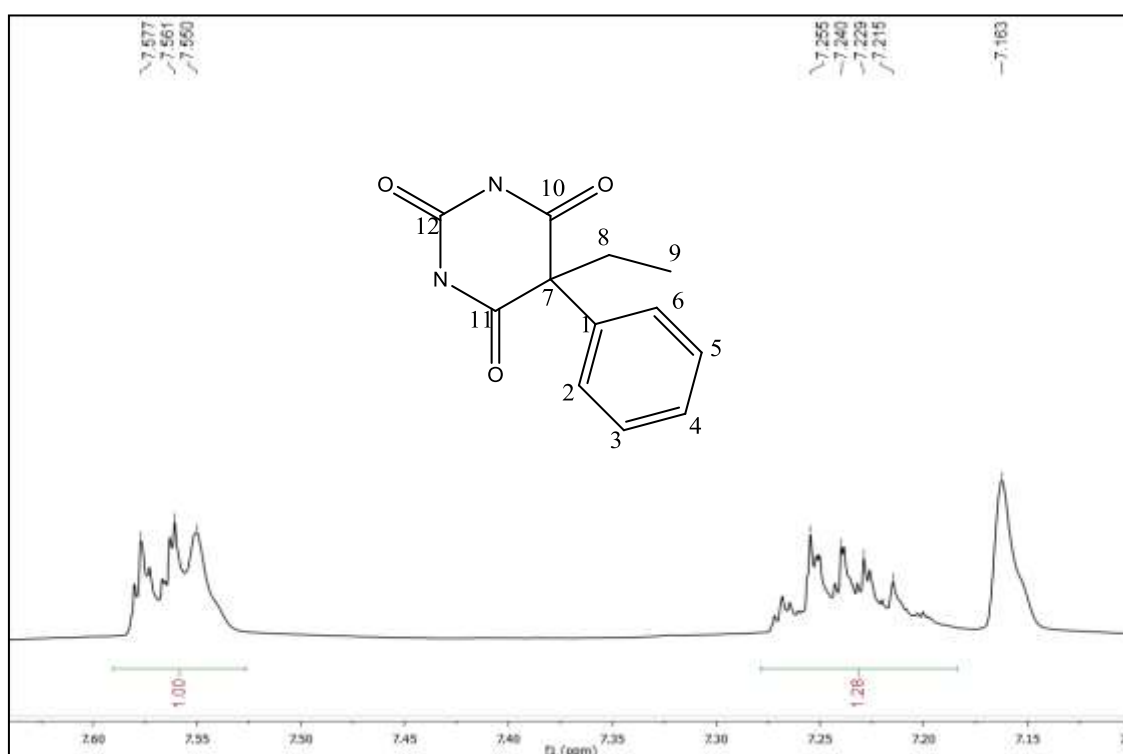


Figura 43. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, Py-D₅) de **Hm-2**.

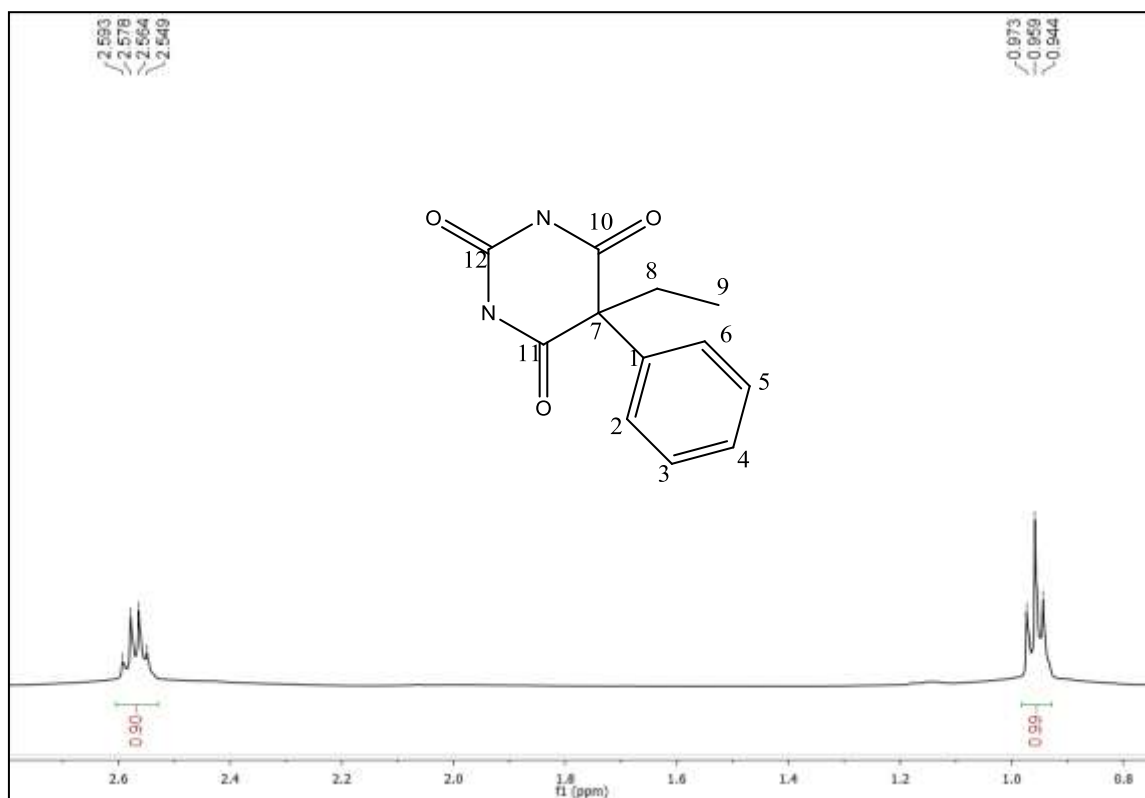


Figura 44. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, Py-D₅) de **Hm-2**.

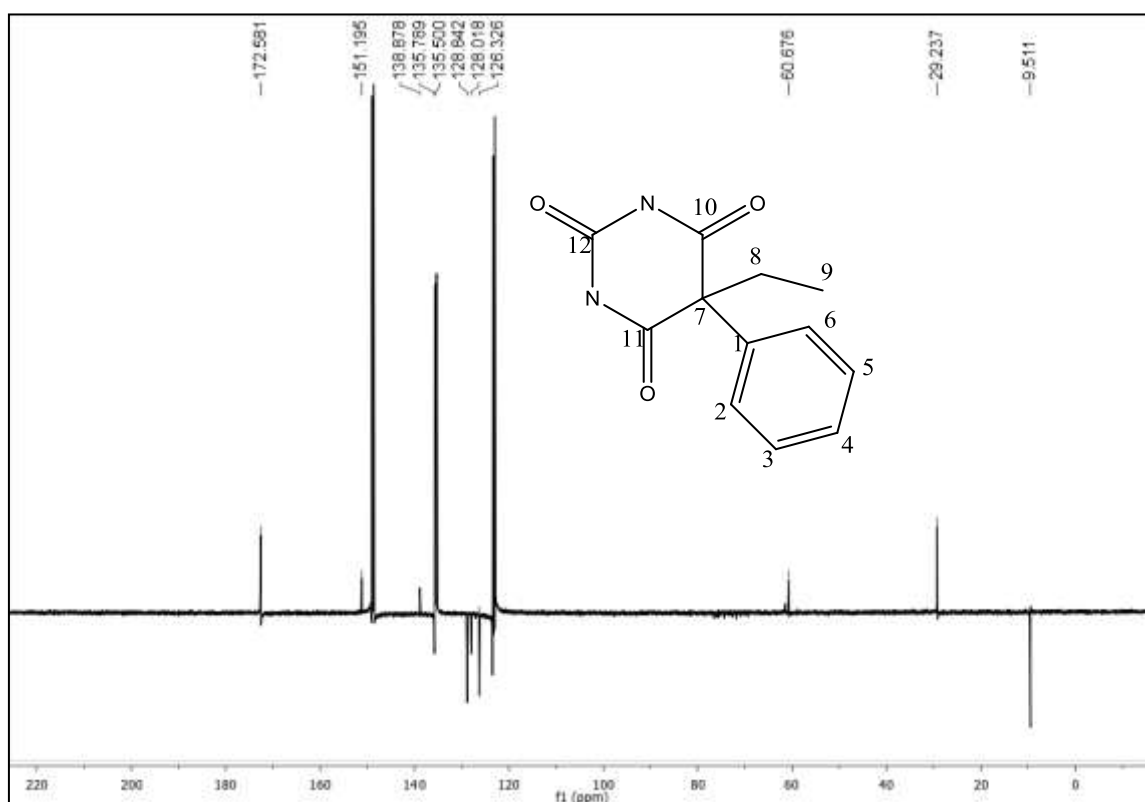


Figura 45. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, Py- D_5) de **Hm-2**.

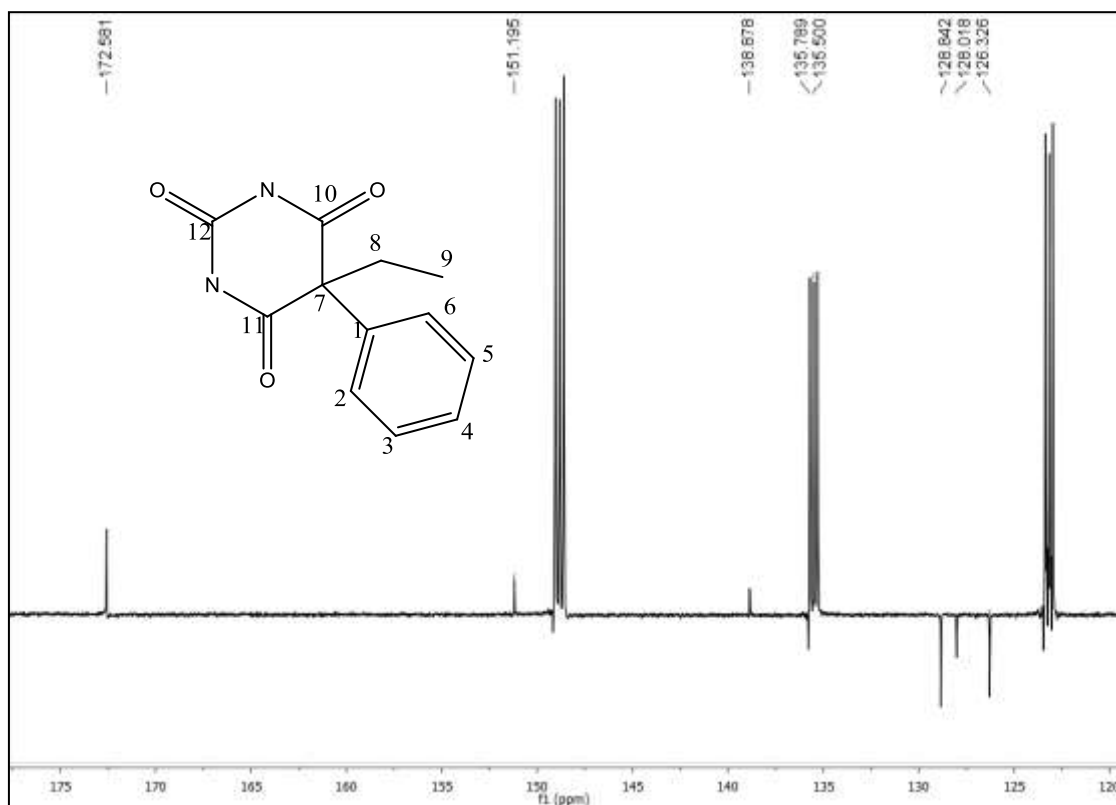


Figura 46. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, Py- D_5) de **Hm-2**.

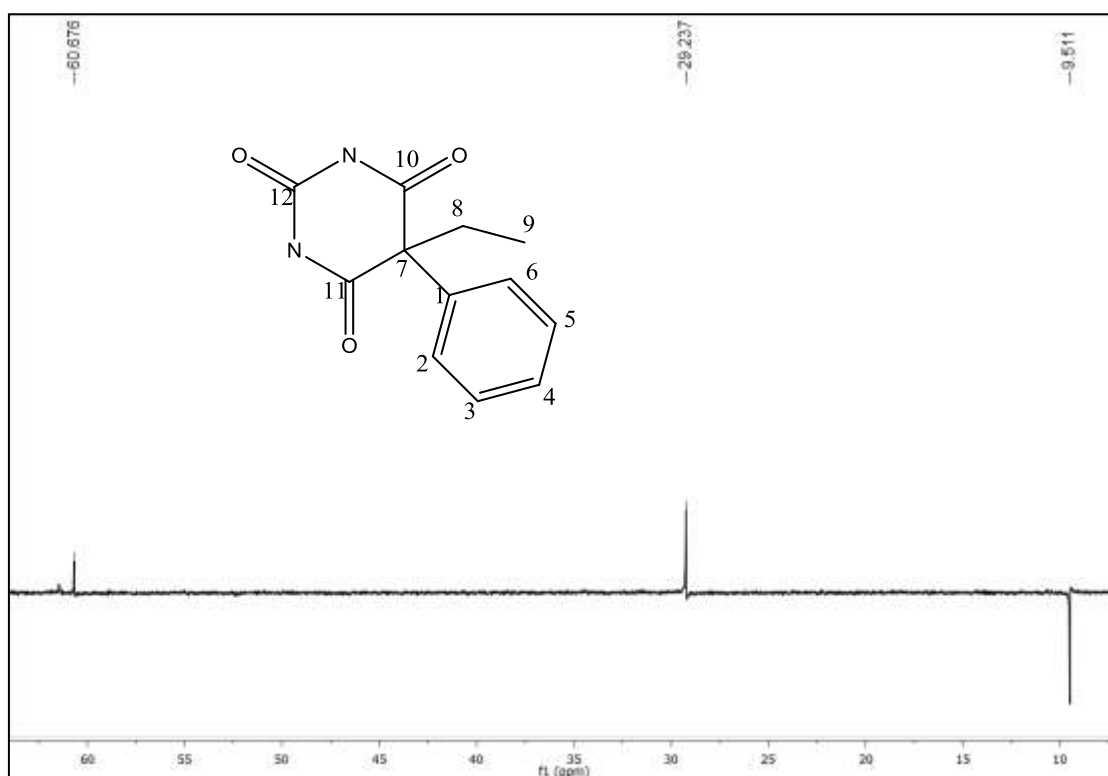


Figura 47. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, Py-D₅) de **Hm-2**.

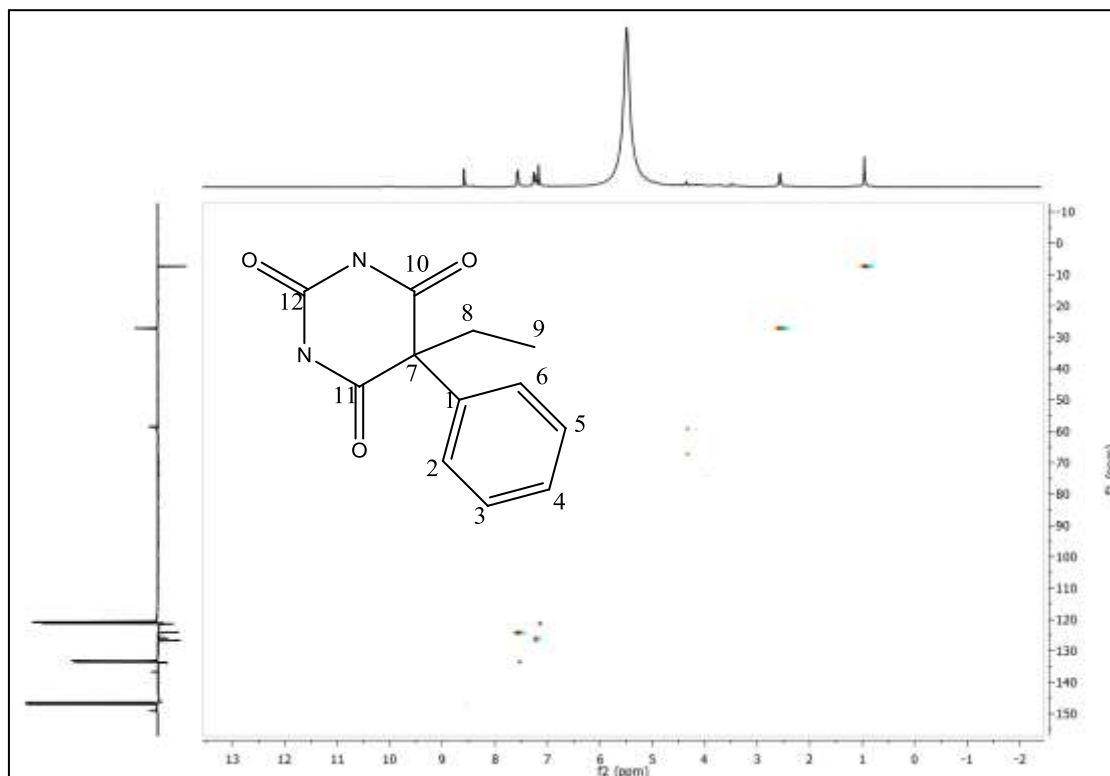


Figura 48. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, Py-D₅) de **Hm-2**.

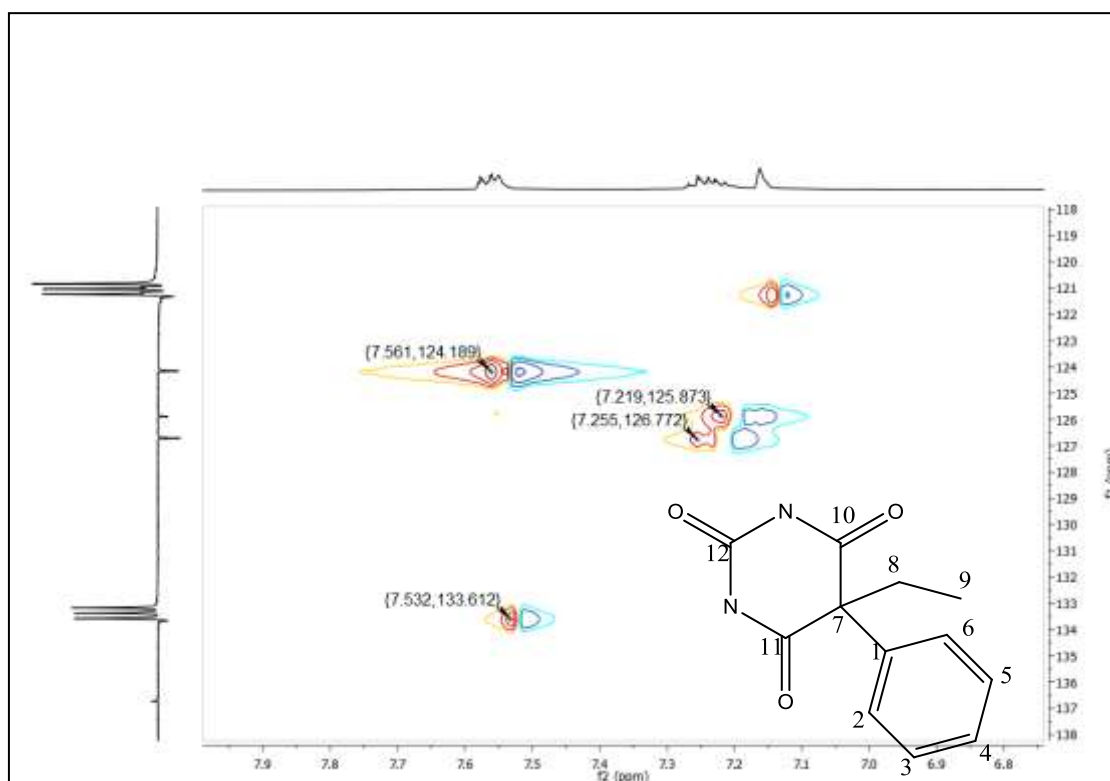


Figura 49. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, Py-D₅) de **Hm-2**.

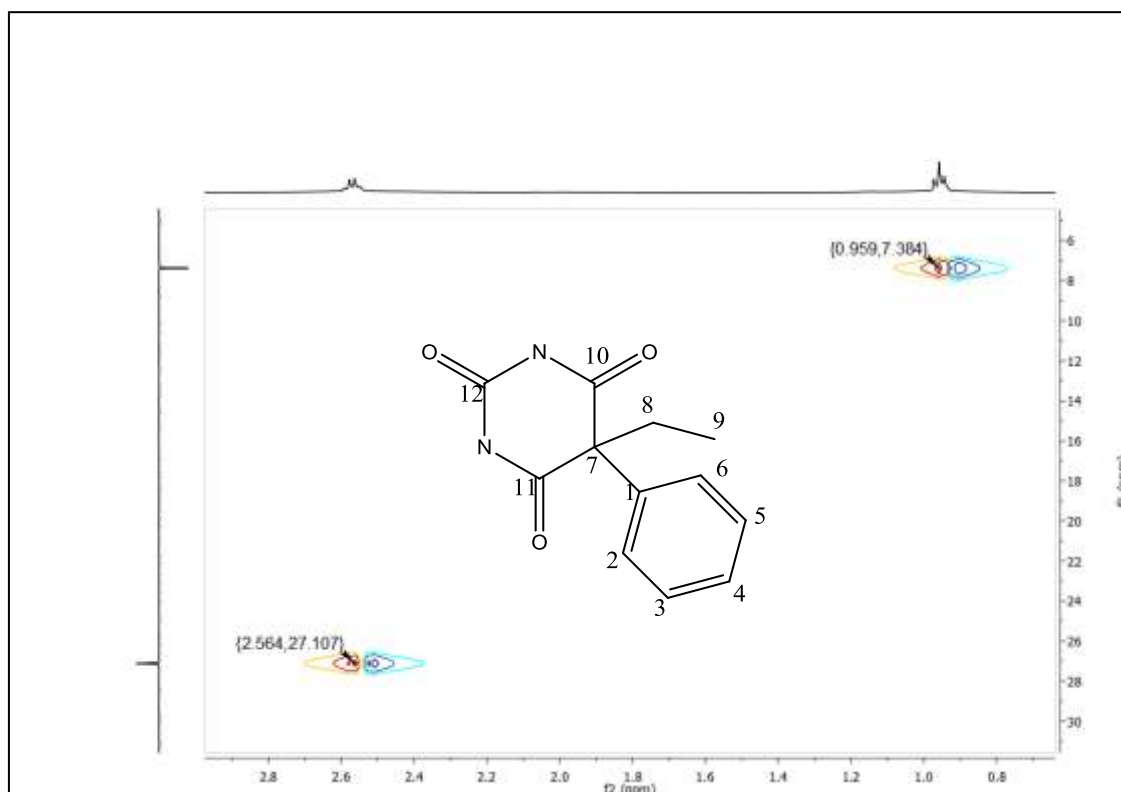


Figura 50. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, Py-D₅) de **Hm-2**.

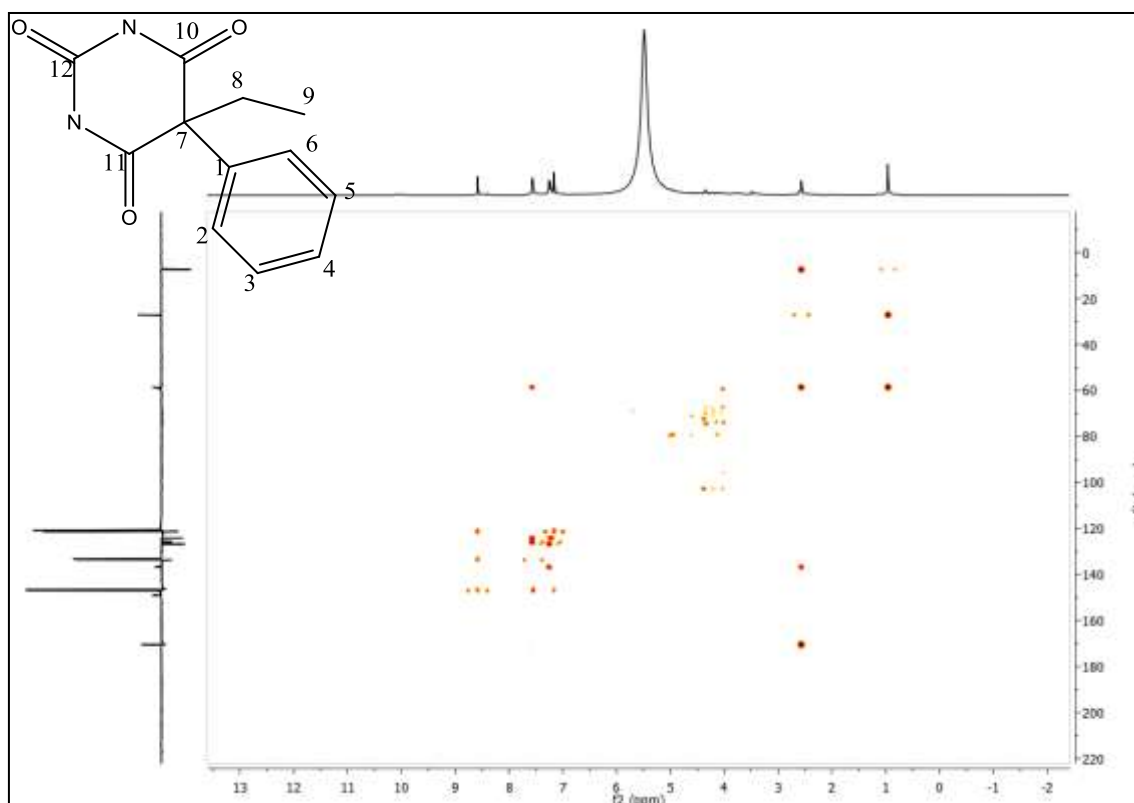


Figura 51. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, Py- D_5) de **Hm-2**.

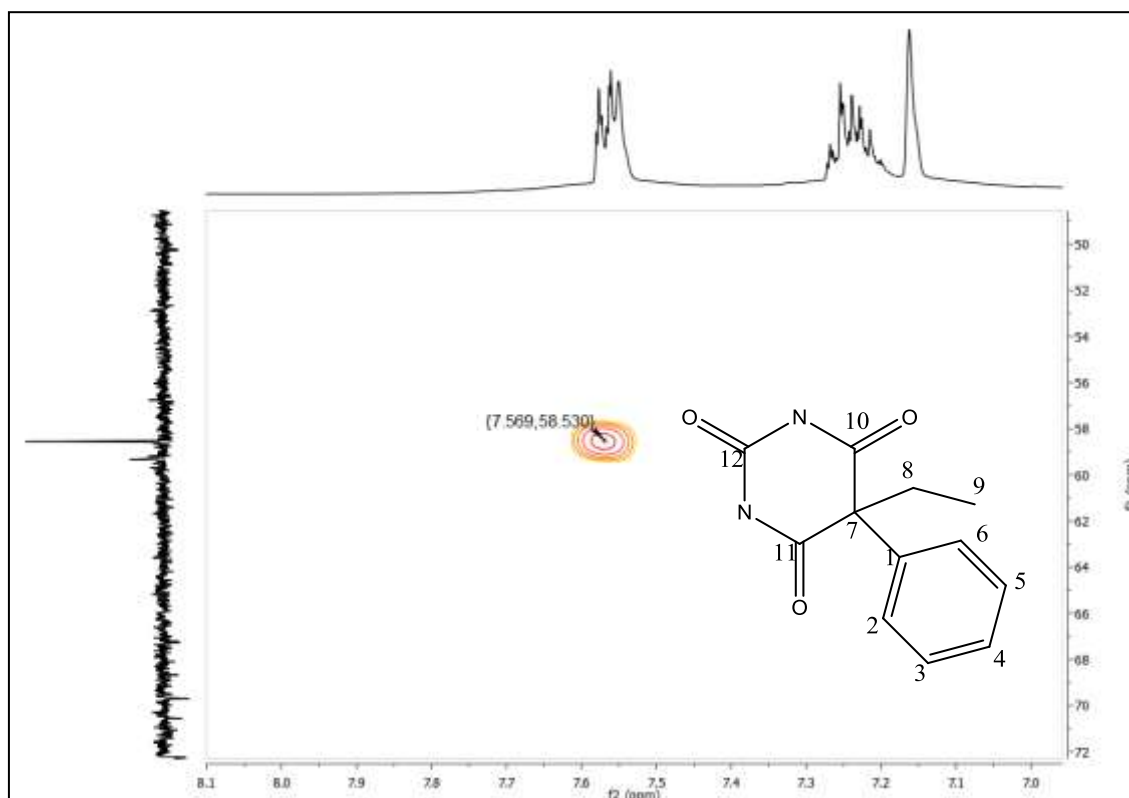


Figura 52. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, Py- D_5) de **Hm-2**.

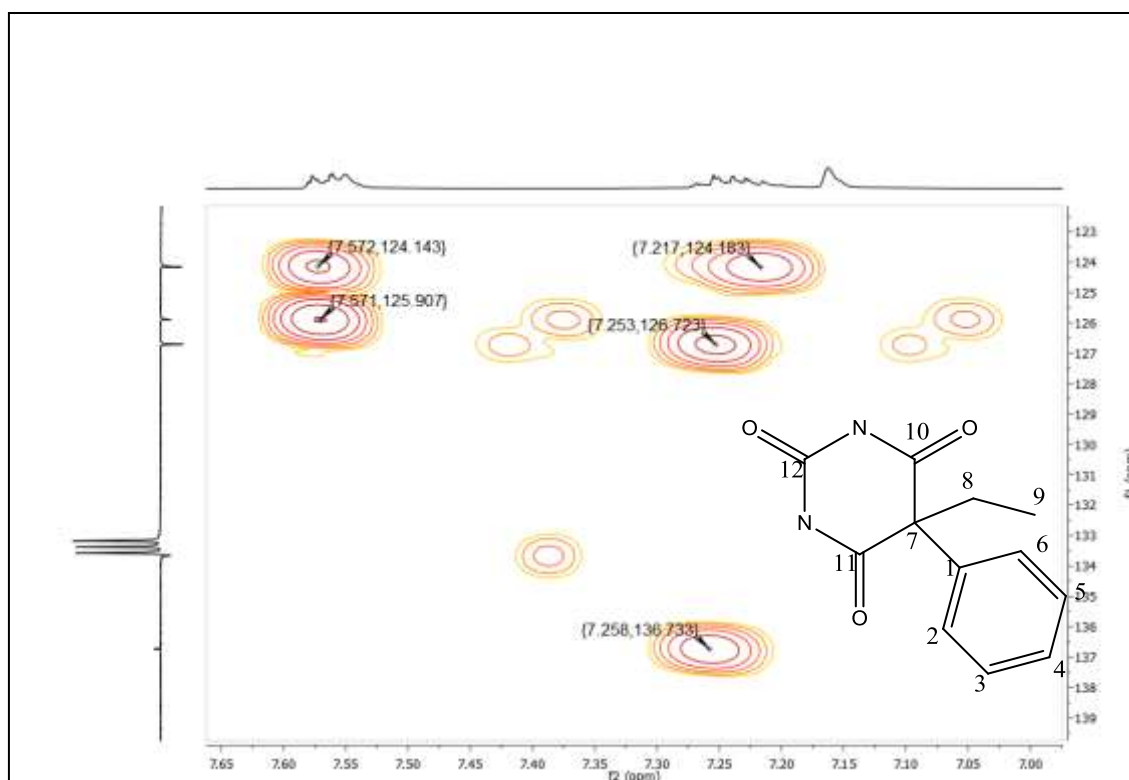


Figura 53. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, Py-D₅) de **Hm-2**.

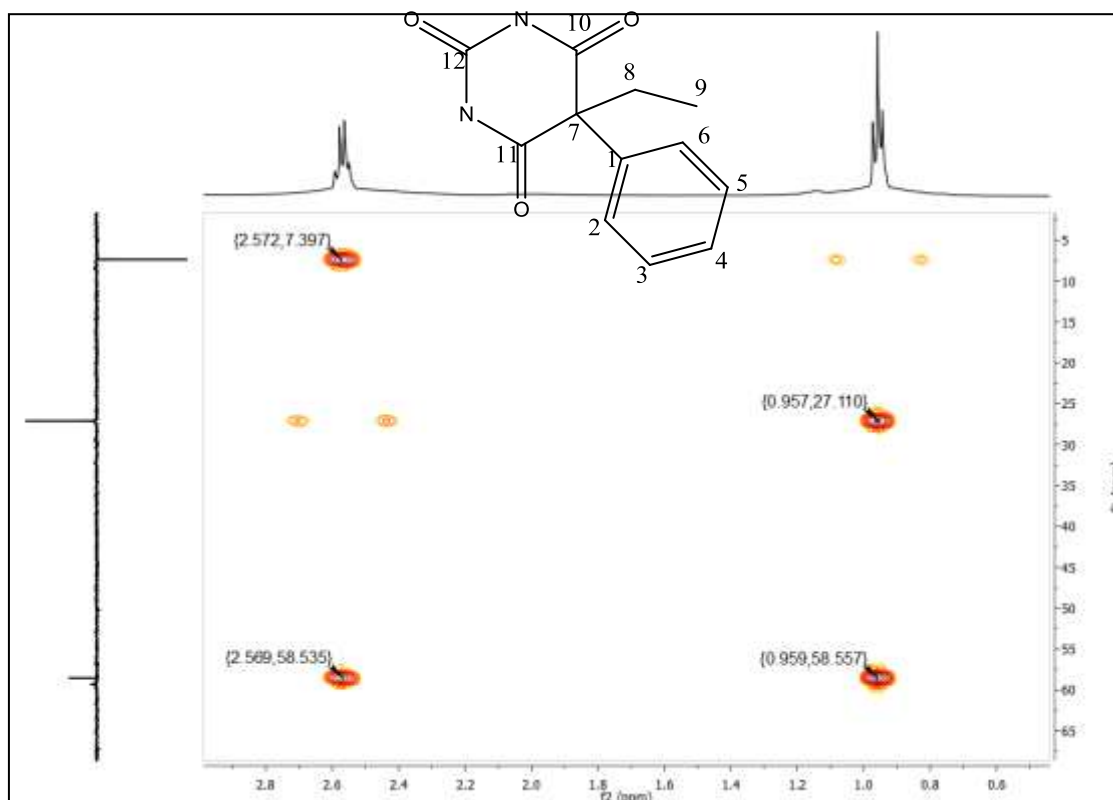


Figura 54. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, Py-D₅) de **Hm-2**.

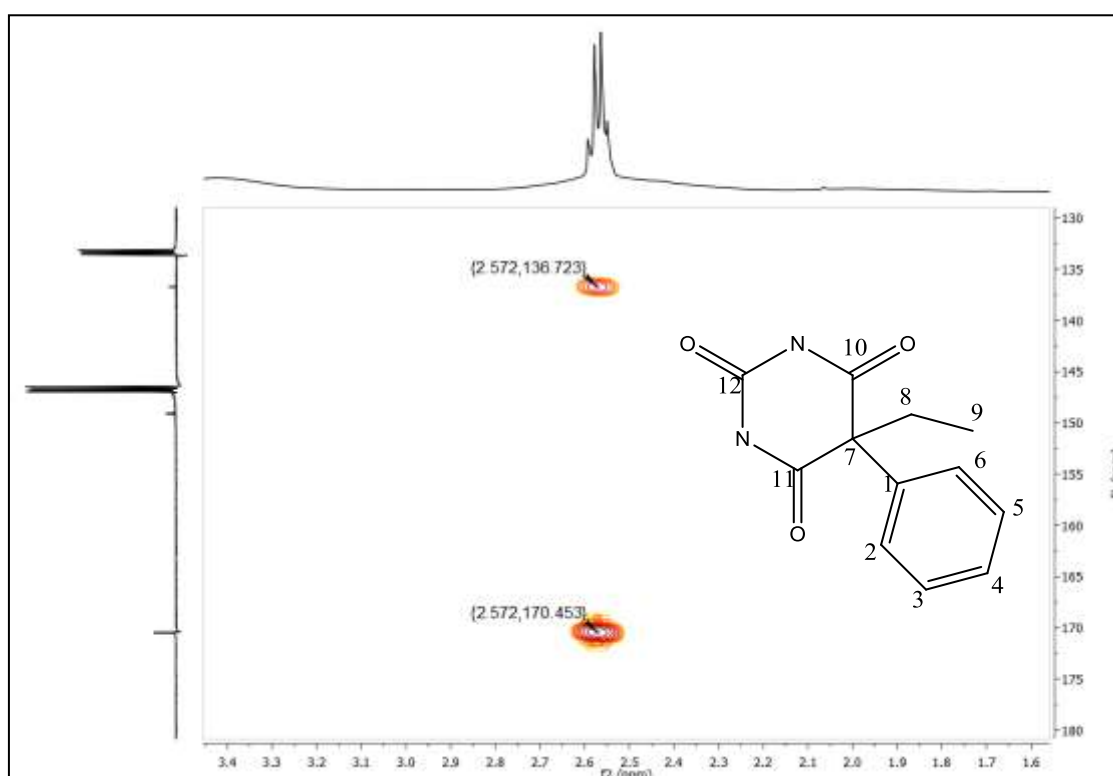


Figura 55. Cromatograma de **Hm-2** obtido em CG-EM.

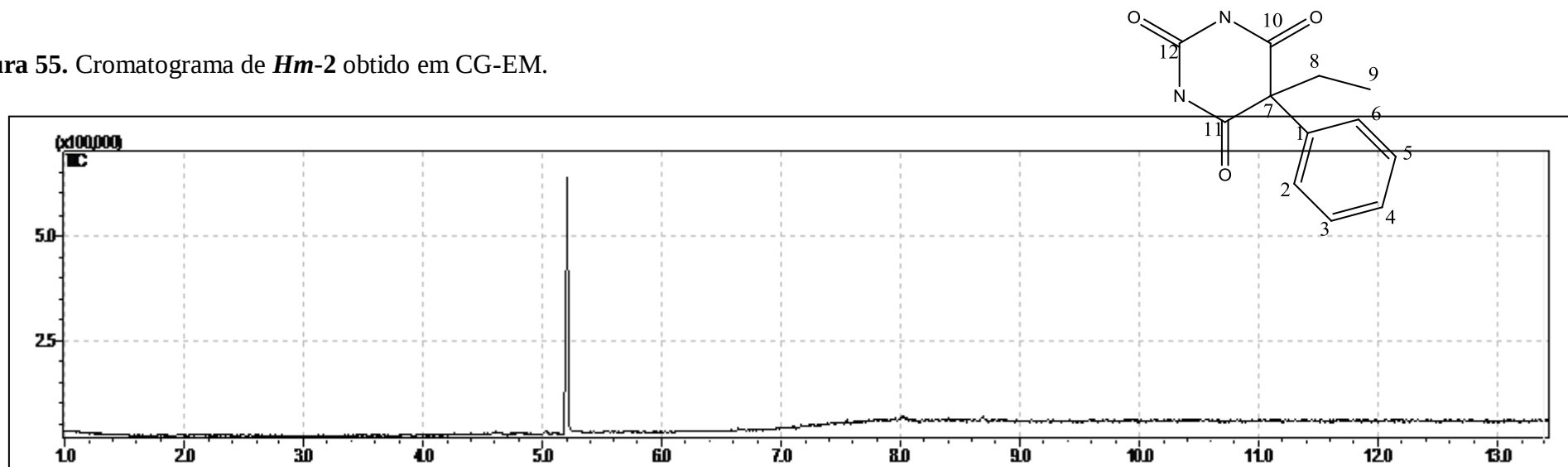
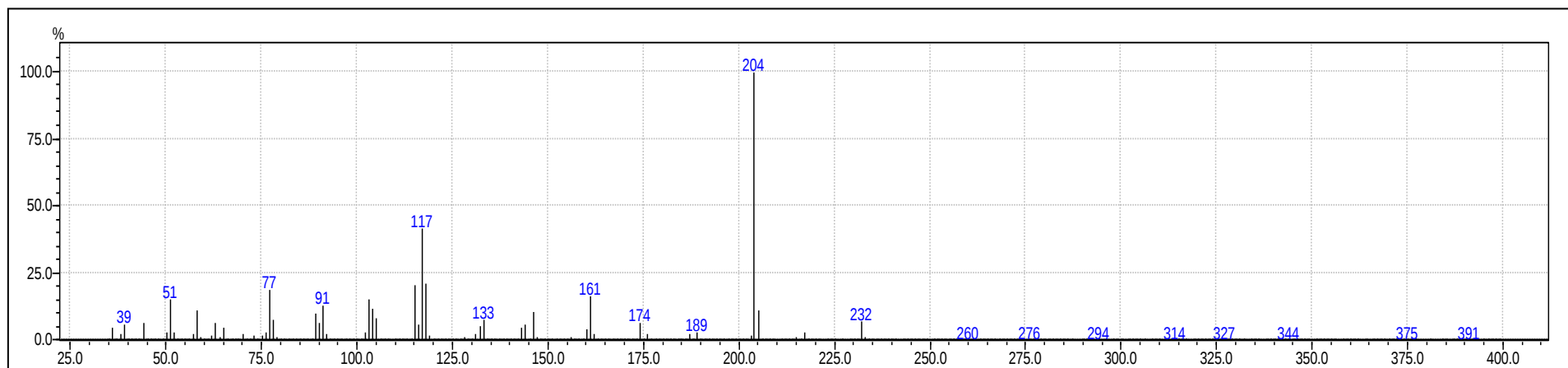


Figura 56. Espectro de massas de **Hm-2**.



III.2.4 Resultados obtidos com *Bryothamnion triquetrum*.

III.2.4.1 Identificação estrutural de *Bt-1*.

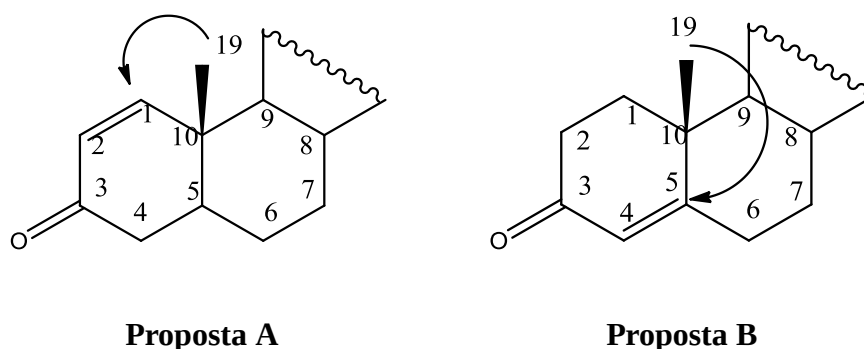
A substância *Bt-1* apresentou-se na forma de um pó branco, solúvel em diclorometano. A mesma foi identificada através de análise espectral dos dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e comparação com os dados encontrados na literatura.

O espectro de RMN ^1H (Figura 59, p. 112; tabela 9, p. 110) e as expansões de *Bt-1* (Figuras 60 e 61, p. 112 e 113), da mesma forma como observadas nas substâncias *Cm-1* e *Hm-1*, apresentaram um conjunto de deslocamentos químicos de alta multiplicidade, característicos de hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos, em δ_{H} 0,63 - 2,40 compatíveis com substâncias que possuem um esqueleto terpênico (KOJIMA et al., 1990). Na expansão do espectro RMN ^1H (Figura 60, pag. 112) foi possível observar a presença de cinco grupamentos metila, pela presença de dois singletos em δ_{H} 0,69 e δ_{H} 1,16 e de dubletos em δ_{H} 0,84 ($J = 2,0$ Hz), δ_{H} 0,85 ($J = 2,0$ Hz) e δ_{H} 0,89 ($J = 6,5$ Hz). Ainda no mesmo espectro, observamos um singlete em δ_{H} 5,70 indicativo da presença de dupla ligação, diferentemente de *Cm-1* e *Hm-1*, não foi possível observar o multipeto referente ao hidrogênio H-3, sendo um indicativo de substituição nesta posição.

Apesar do espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 62, p. 113; tabela 9, p. 110) não ter apresentado todos os sinais, especialmente os deslocamentos químicos dos carbonos não hidrogenados, através do espectro de correlações heteronuclear direta ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC) (Figura 64, p. 114; Tabela 9, p. 110) e suas expansões (Figuras 65 e 66, p. 115), foi possível correlacionar os hidrogênios aos seus respectivos carbonos: o hidrogênios em δ_{H} 5,70 (H-4) com o carbono em δ_{C} 123,59 (C-4); e os hidrogênios das metilas em δ_{H} 0,69 (H-18) com δ_{C} 11,97 (C-18), δ_{H} 0,84 (H-26) com δ_{C} 22,55 (C-26), δ_{H} 0,89 (H-21) com δ_{C} 18,66 (C-21) e δ_{H} 1,16 (H-19) com δ_{C} 17,43 (C-19).

No espectro de correlações heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC) (Figura 67, p. 116; Tabela 9, p. 110) e suas expansões (Figuras 68, 69 e 70, p. 116 e 117), observou-se uma correlação dos hidrogênios da metila em δ_{H} 1,16 (H-19) com um carbono em δ_{C} 171,57 (C-5), o qual é atribuído a carbono β de uma dupla conjugada à carbonila em núcleos esteroidais (FEITOSA, BEZERRA, 2007; WAHIDULLA et al., 1998). Esses dados sugeriram propor duas possibilidades estruturais para a substância *Bt-1*:

Figura 57. Possibilidades estruturais dos núcleos A e B da substância *Bt-1*.



Foi ainda analisando a expansão das correlações heteronucleares ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC) (Figura 62, pag. 113), que foi possível observar uma correlação dos hidrogênios da metila em $\delta_{\text{H}} 1,16$ (H-19) (J^3) com um carbono do tipo CH_2 em $\delta_{\text{C}} 35,66$ (C-1) descartando desta forma a proposta A.

Logo, as demais correlações heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC) (68, 69 e 70, p. 116 e 117), do hidrogênio olefínico em $\delta_{\text{H}} 5,70$ (H-4) (J^3) com um carbono metílico em $\delta_{\text{C}} 32,97$ (C-2), dos hidrogênios da metila em $\delta_{\text{H}} 0,69$ (H-18) a três ligações (J^3) com o carbono em $\delta_{\text{C}} 39,66$ (C-12) e com o carbono em $\delta_{\text{C}} 42,42$ (C-13) a duas ligações (J^2); dos hidrogênios da metila em $\delta_{\text{H}} 0,84$ (H-26) a duas ligações (J^2) com o carbono em $\delta_{\text{C}} 28,01$ (C-25); dos hidrogênios da metila em $\delta_{\text{H}} 0,85$ (H-27) a três ligações (J^3) com o carbono em $\delta_{\text{C}} 22,55$ (C-26) e com o carbono em $\delta_{\text{C}} 39,53$ (C-24) a três ligações (J^3), juntamente com dados comparativos na literatura (LANG, 2006) (Tabela 10, p. 111), foi possível identificar *Bt-1* como sendo o esteroide colest-4-en-3-one (Figura 58), isolado pela primeira vez em *Bryothamnion triquetrum*.

Figura 58. Estrutura química do colest-4-en-3-ona.

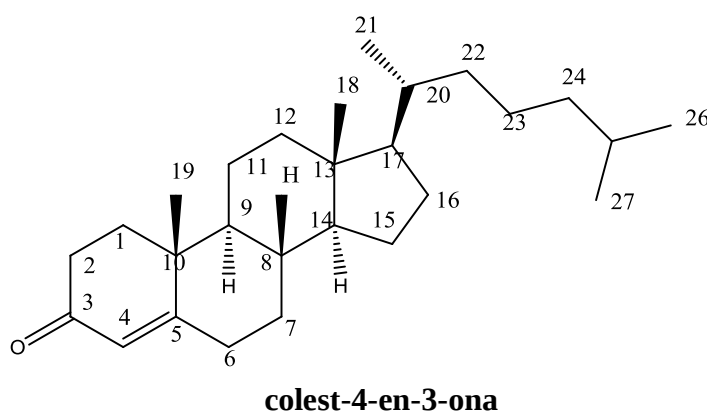
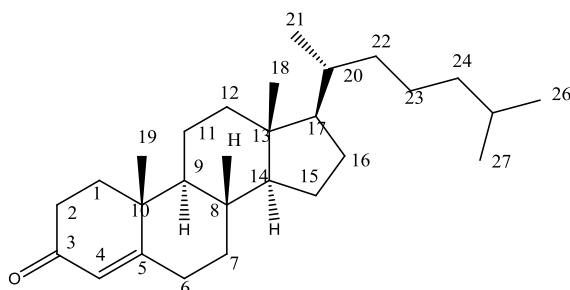


Tabela 9. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C (HMQC e HMBC) de **Bt-01** registrados em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz).

	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
3	-			
5	171,57*			
10	38,62			
13	42,42*			
CH				
4	123,5*	5,70 (s, 1H)		C-2, C-10
8	34,01			
9	53,84			
14	55,88			
17	56,14			
20	35,72			
25	28,01			
CH₂				
1	35,66			
2	32,97			
6	32,08			
7	44,58			
11	21,18			
12	39,66			
15	23,80			
16	28,19			
22	36,15			
23	24,20			
24	39,53			
CH₃				
18	11,97	0,69 (s, 3H)	C-13	C-12, C-14
19	17,43	1,16 (s, 3H)	C-10	C-1, C-5, C-9
21	18,66	0,89 (d, $J= 5,0$ Hz, 3H)	C-20	C-17
26	22,5	0,84 (d, $J= 7$ Hz, 3H)		
27	22,8	0,85 (d, $J= 7$ Hz, 3H)	C-25	C-24, C-26



*Deslocamentos químicos observados nos espectros de HMQC e HMBC.

Tabela 10. Dados comparativos de RMN¹³C da substância *Bt-1* (δ , CDCl₃, 50 MHz) com modelos da literatura (δ , C₅D₅N, 100 MHz), (LANG, 2006).

Carbonos	<i>Bt-1</i>	colest-4-en-3,6-diona
1	35,66	35,5
2	32,97	33,8
3	-	199,1
4	123,5*	125,2
5	171,57*	-
6	32,08	-
7	44,58	43,6
8	34,01	34,0
9	53,84	50,8
10	38,62	39,0
11	21,18	20,7
12	39,66	39,3
13	42,42*	42,3
14	55,8	55,8
15	23,8	23,6
16	28,1	27,8
17	56,1	56,4
18	11,9	11,7
19	17,4	17,3
20	35,7	35,3
21	18,6	18,5
22	36,1	35,9
23	24,2	23,8
24	39,5	39,6
25	28,0	27,8
26	22,5	22,4
27	22,8	22,7

*Deslocamentos químicos observados nos espectros de HMQC e HMBC.

Figura 59. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-1**.

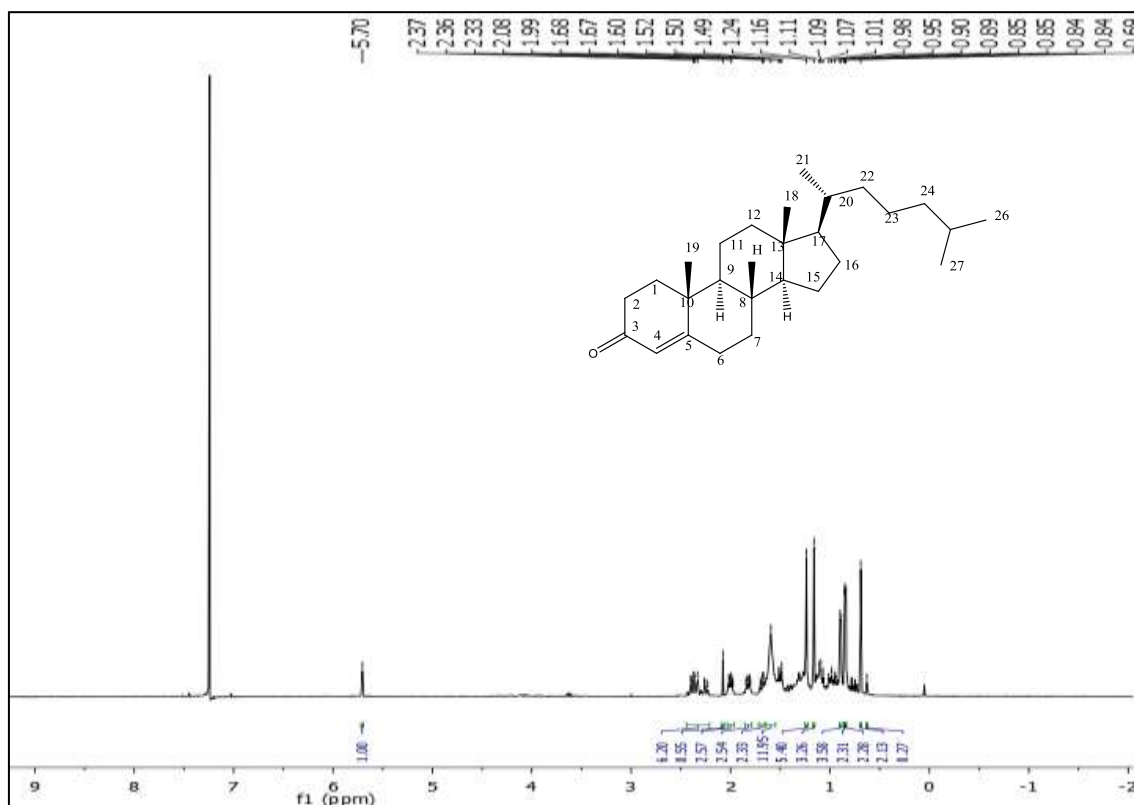


Figura 60. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-1**.

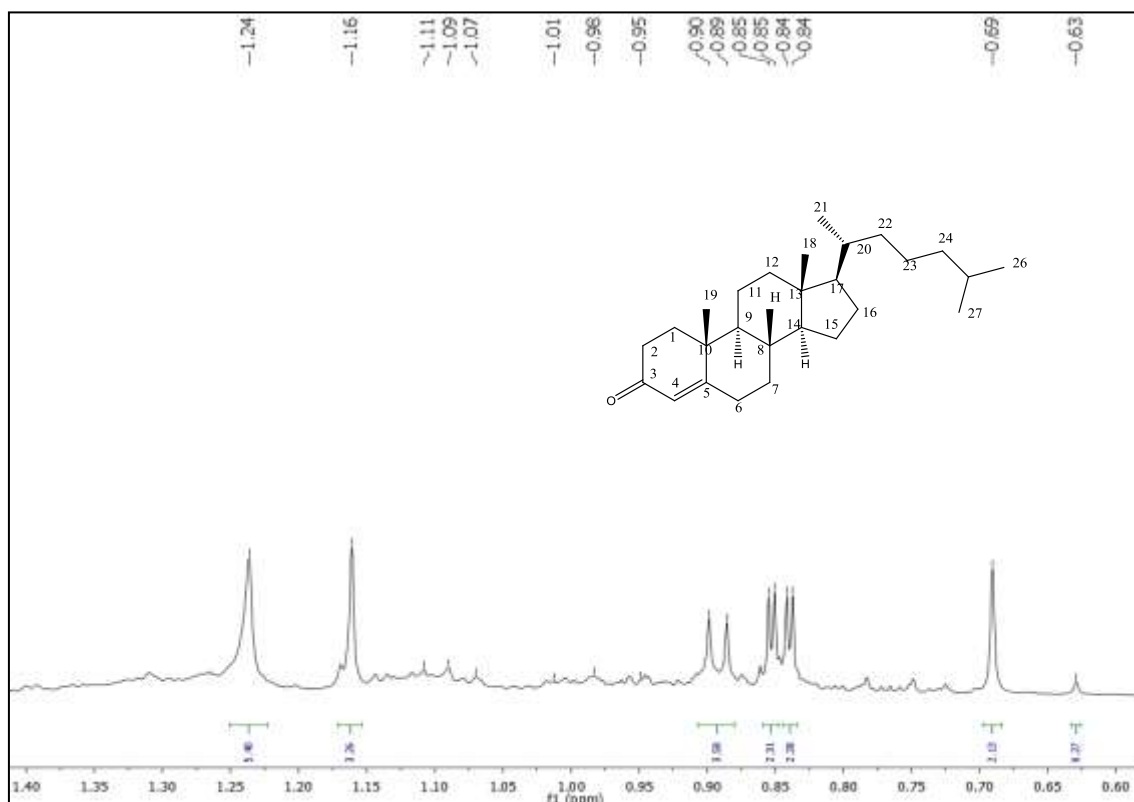


Figura 61. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-1**.

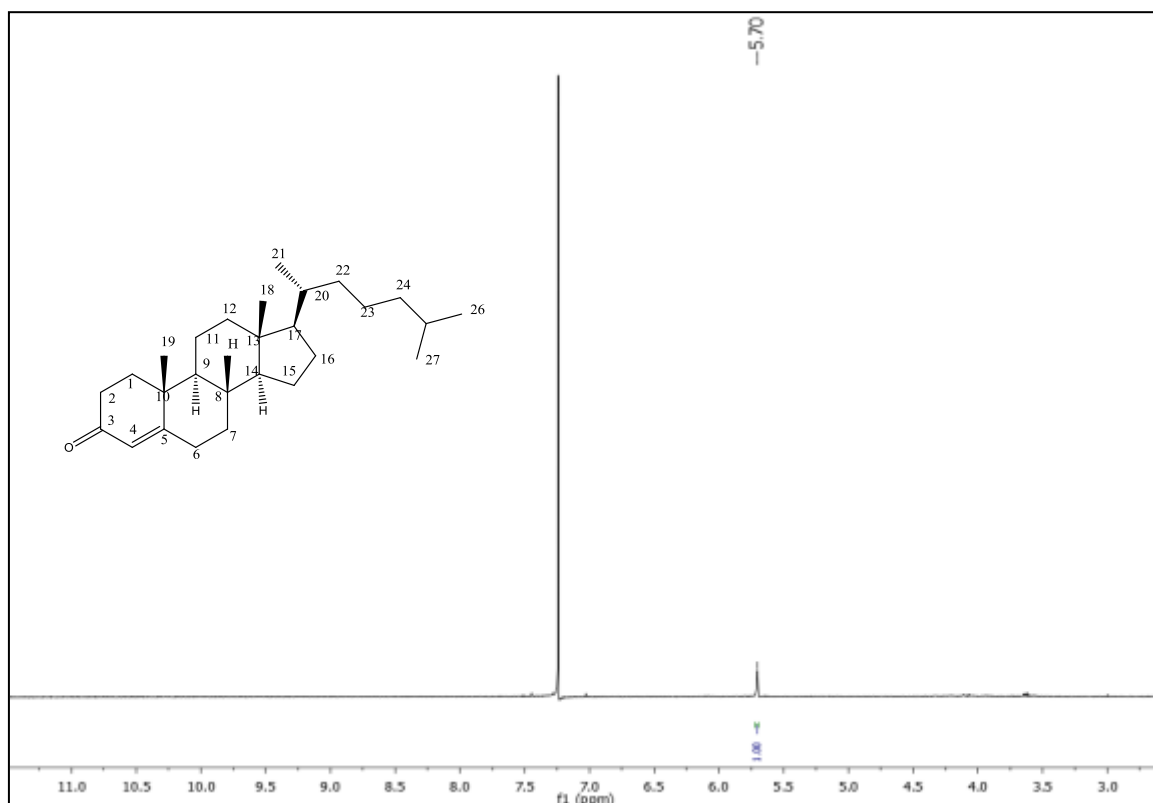


Figura 62. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de **Bt-1**.

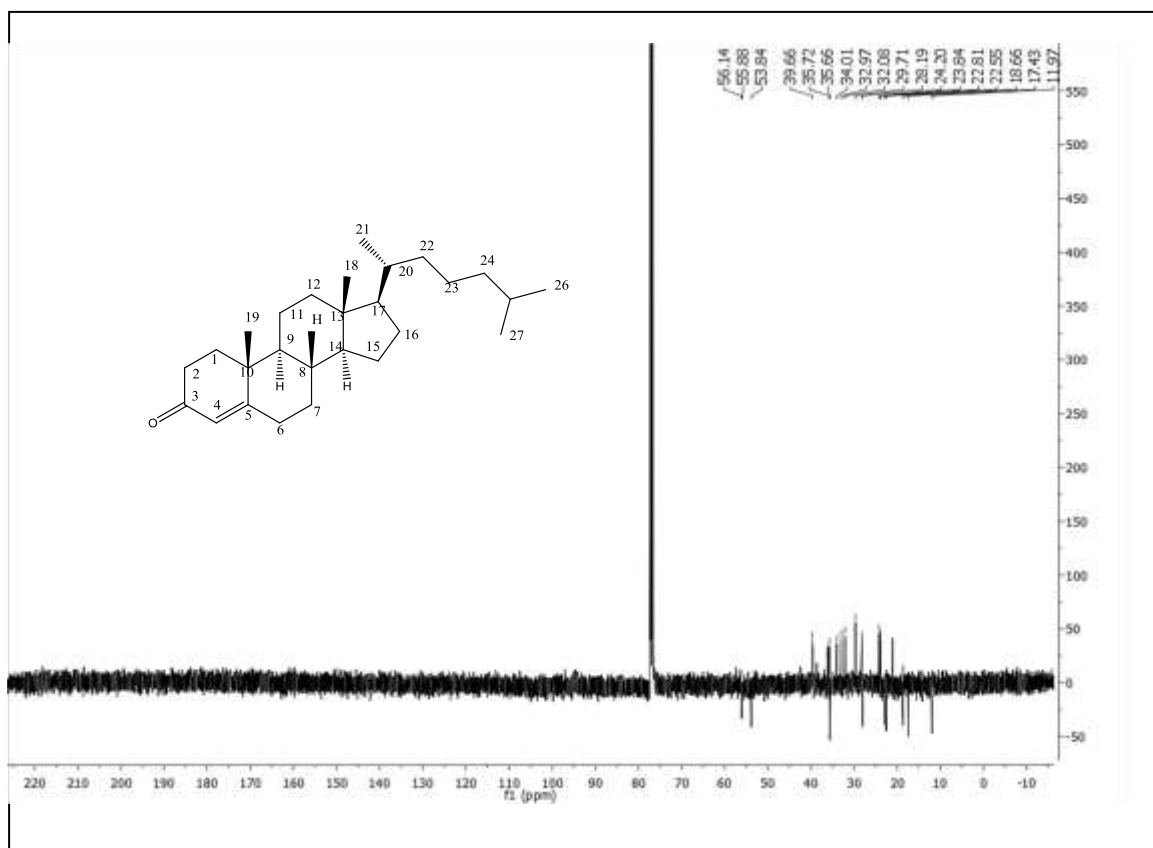


Figura 63. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de **Bt-1**.

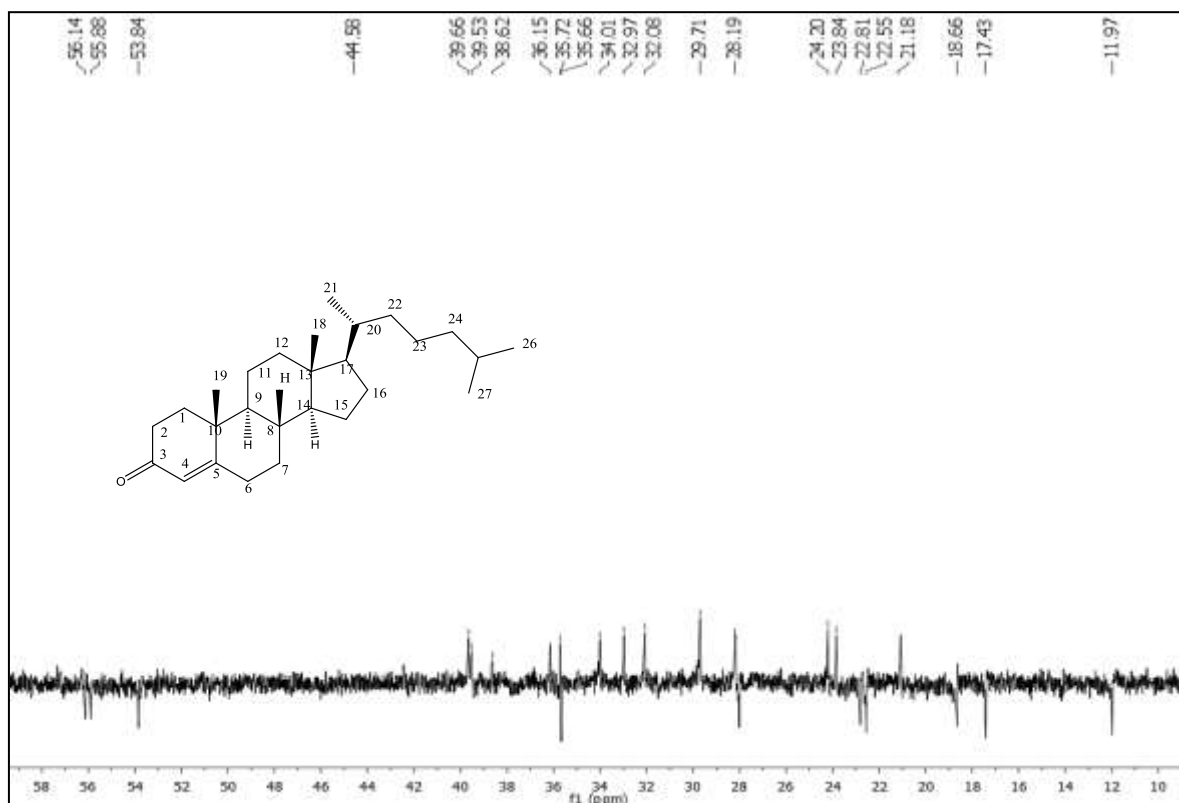


Figura 64. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-1**.

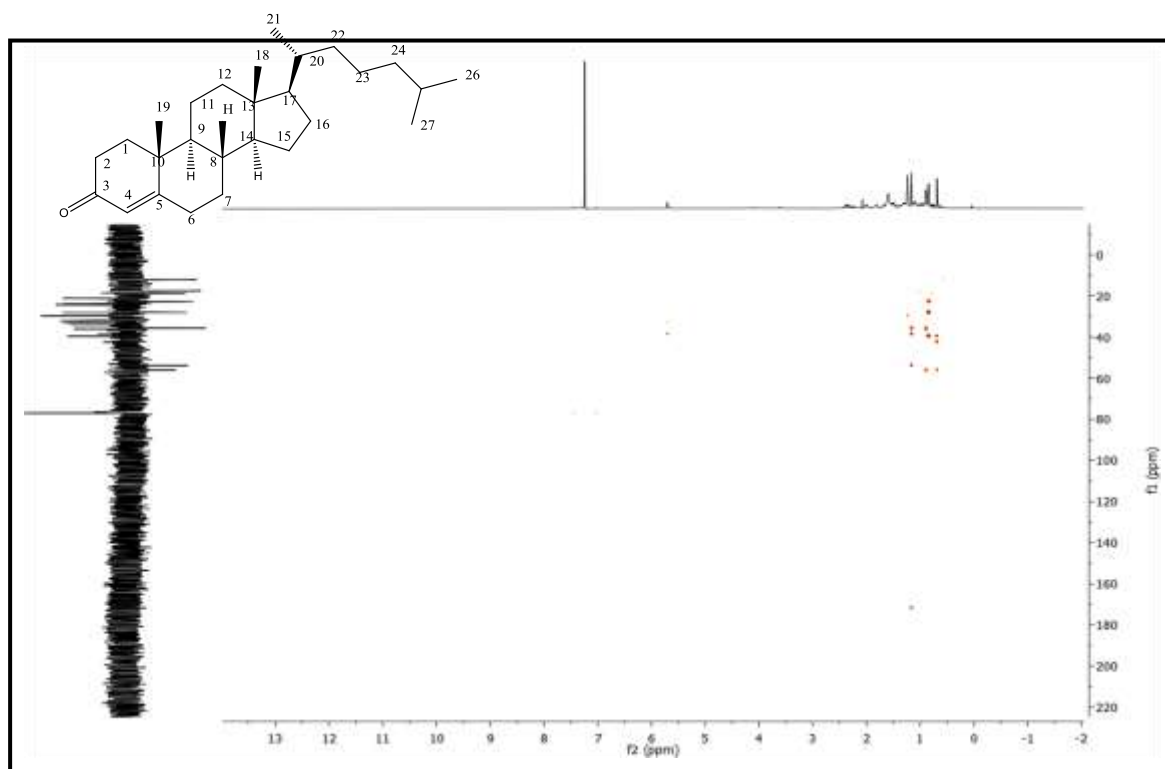


Figura 65. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-1**.

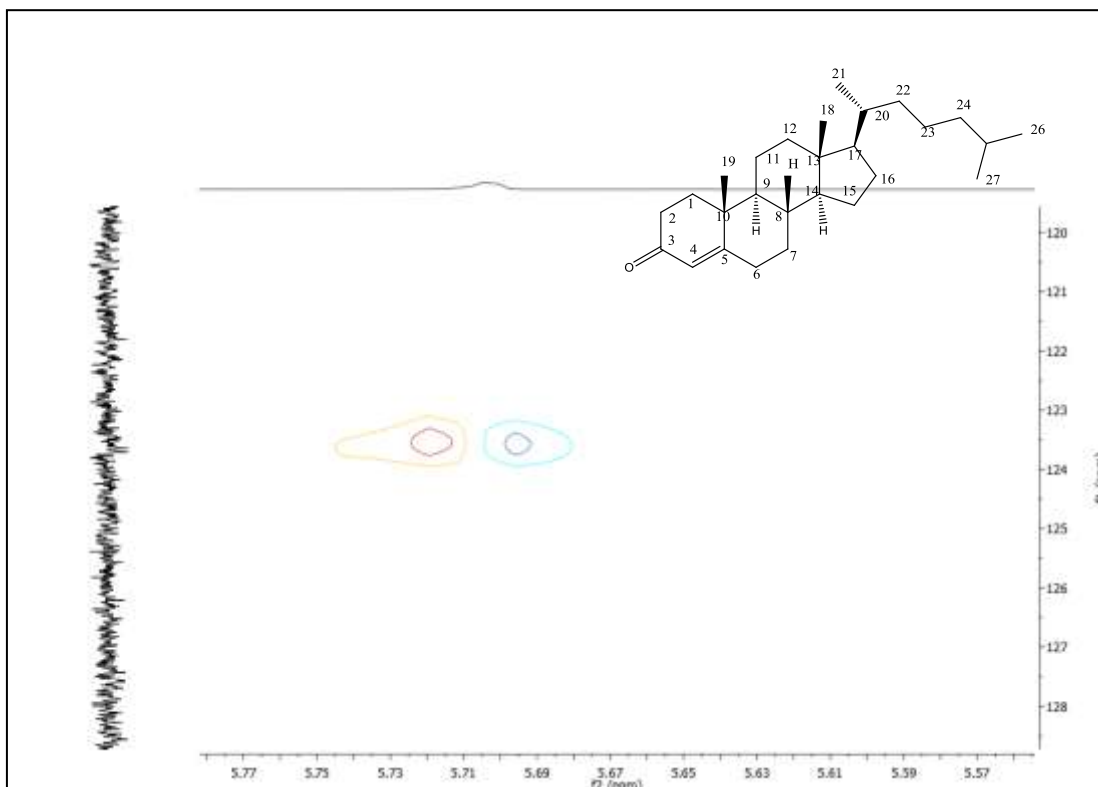


Figura 66. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-1**.

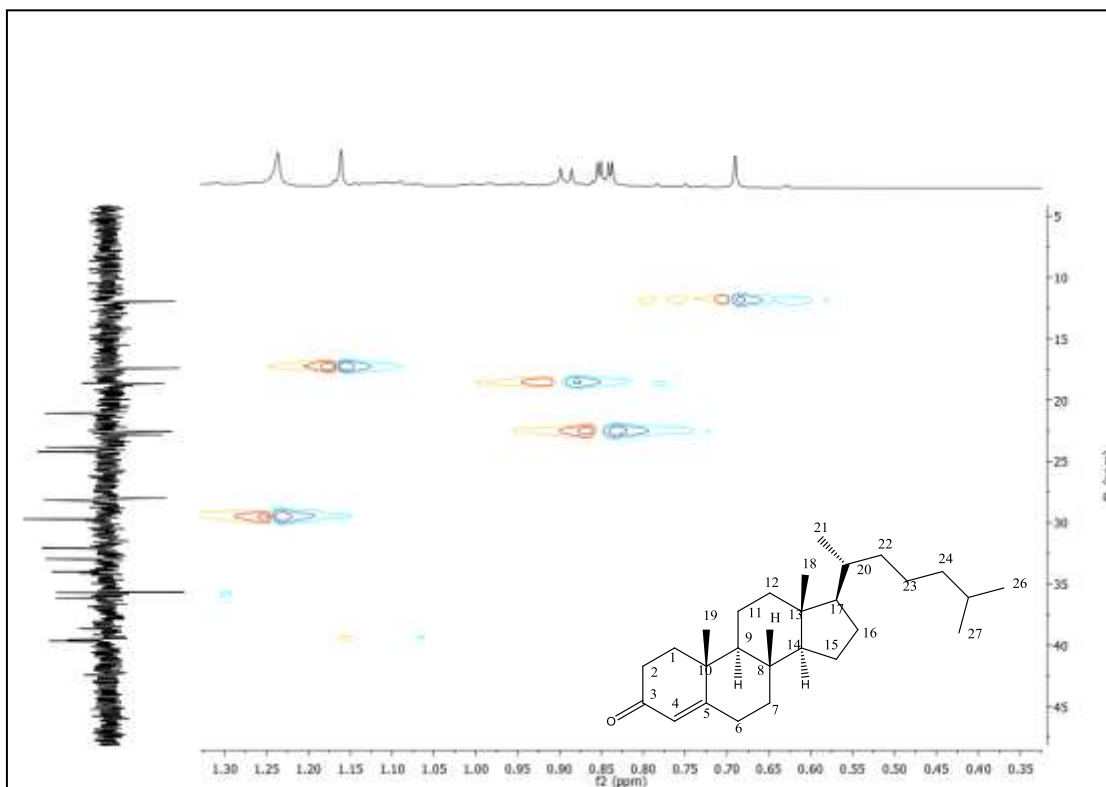


Figura 67. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-1**.

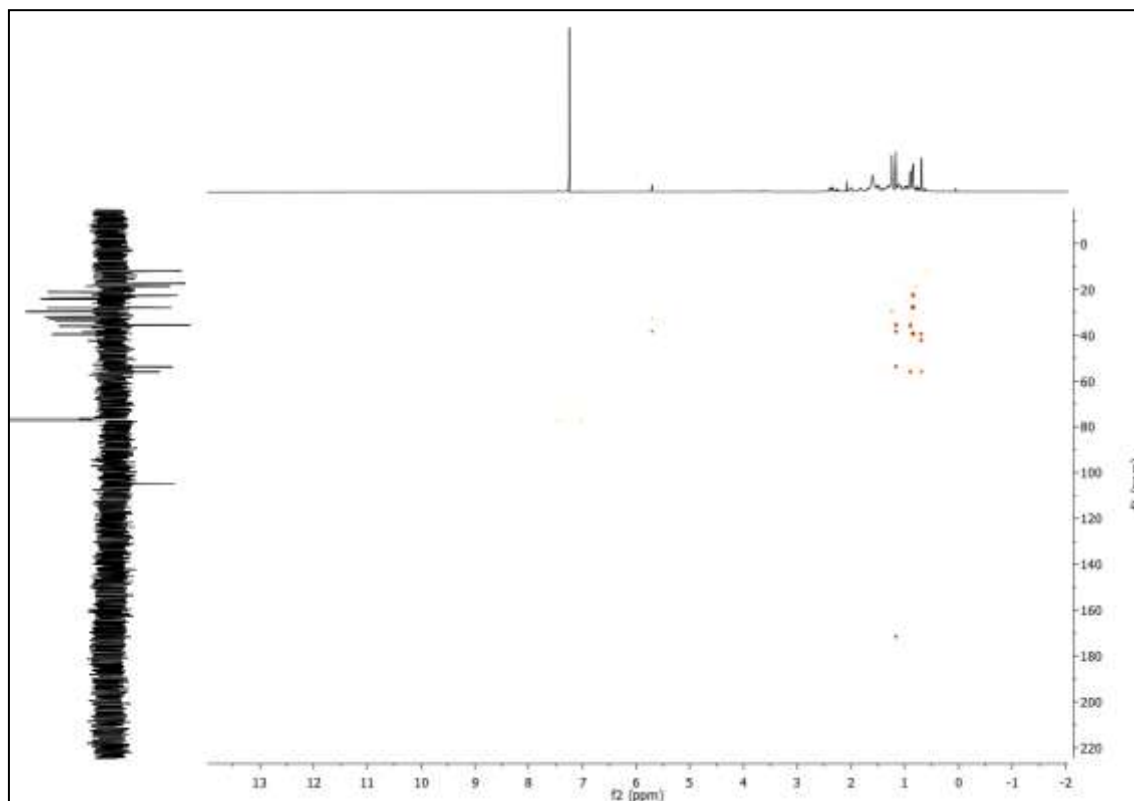


Figura 68. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-1**.

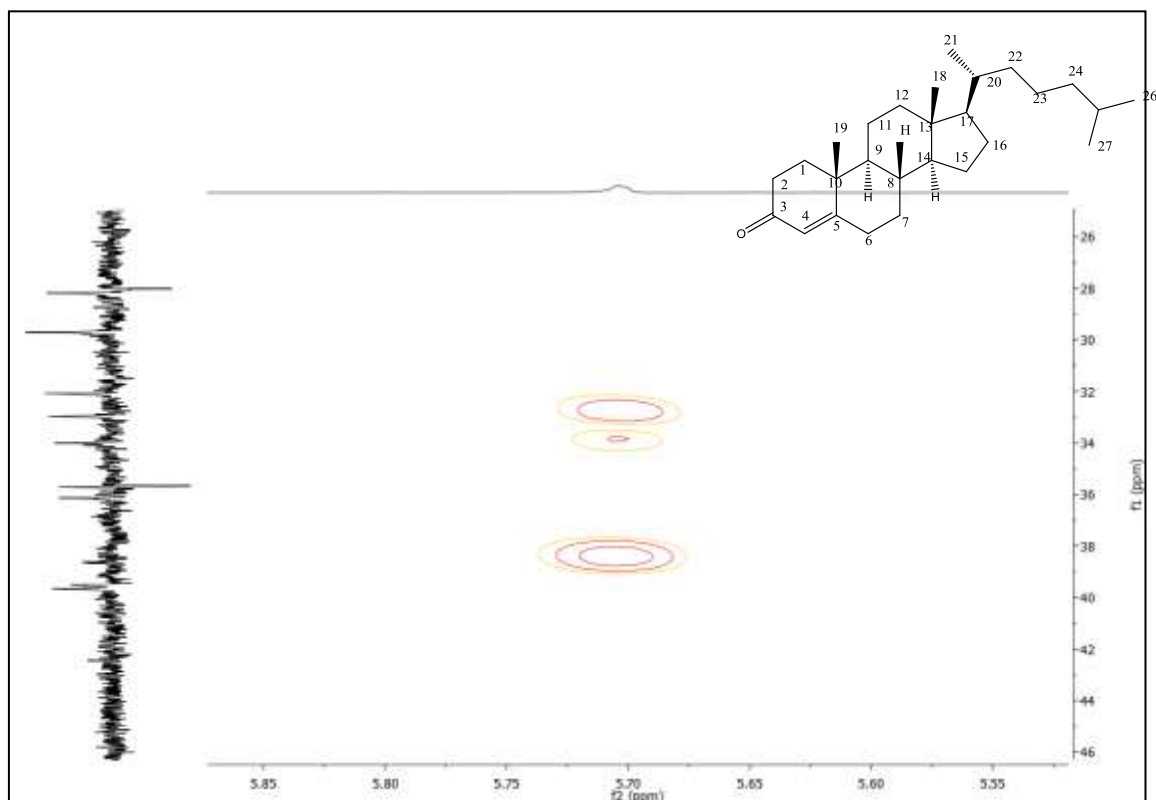


Figura 69. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-1**.

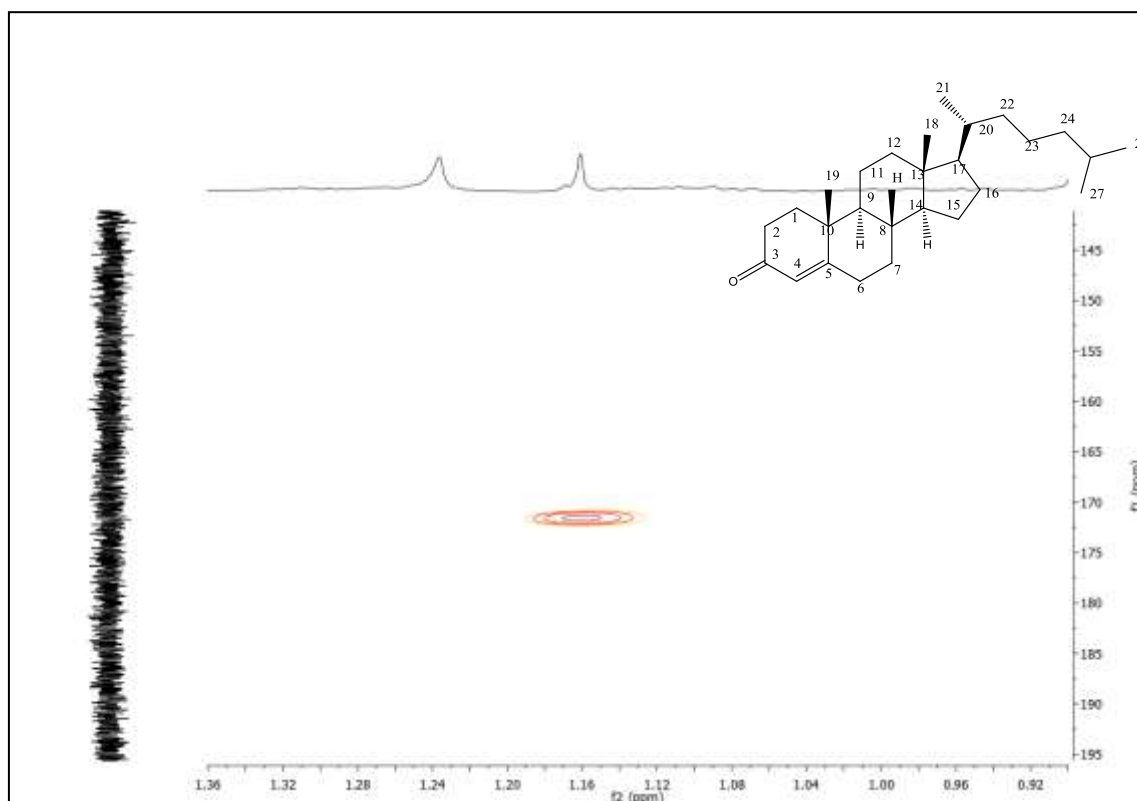
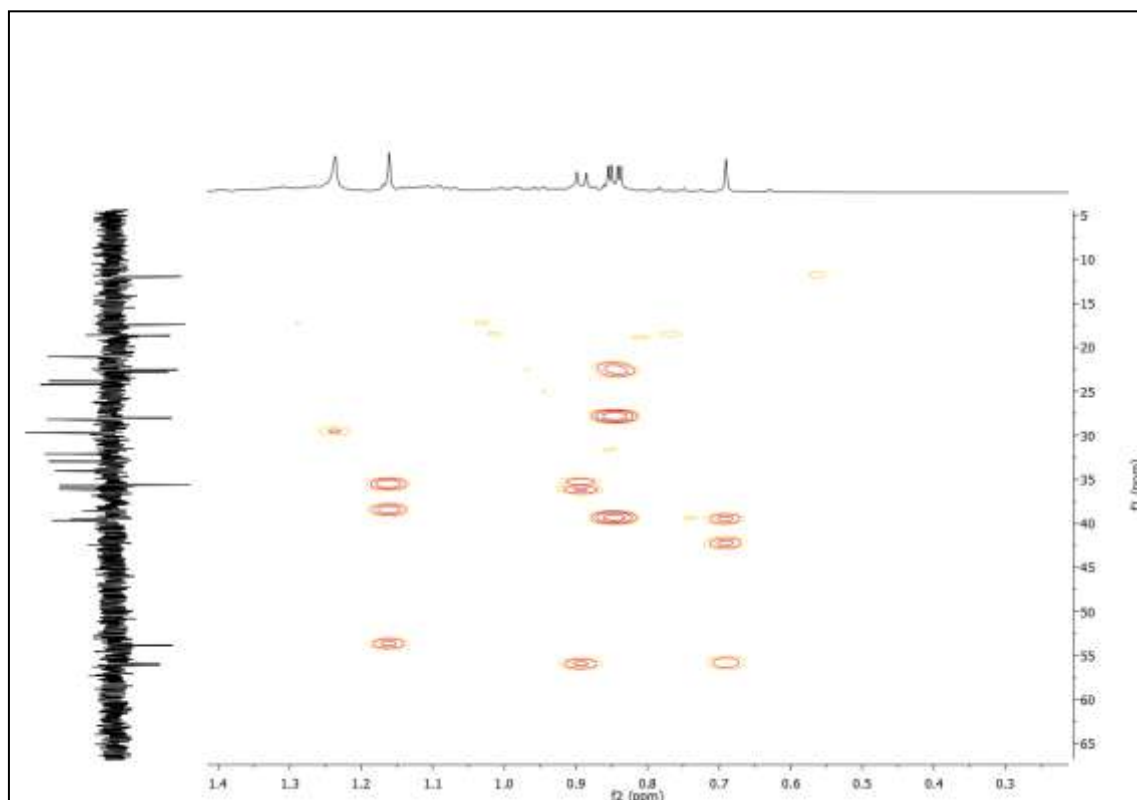


Figura 70. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-1**.



III.2.4.2 Identificação estrutural de Bt-2.

A substância Bt-2 apresentou-se na forma de pó branco, solúvel em clorofórmio. A mesma foi identificada através de análise espectral dos dados de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e comparação com os dados encontrados na literatura.

O espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 73, p. 122; Tabela 11, p. 120), apresentou 10 sinais, entretanto todos eles, para dois carbonos cada. Destes sinais, quatro foram atribuídos a carbonos não hidrogenados, seis a carbonos metínicos, quatro a carbonos metílicos e dois a carbonos metilênicos.

O espectro de RMN ^1H (Figura 74, p. 122; Tabela 11, p. 120), e suas expansões (Figuras 75 e 76 p. 123) de Bt-2, mostraram absorções na região de aromático, característicos de um sistema aromático 1,2 dissustituído, representado por um duplo duplete em δ_{H} 7,70 (H-2), com acoplamento *orto* ($J= 5,5$ Hz) e *meta* ($J= 3,5$ Hz), e outro duplo duplete em δ_{H} 7,51 (H-2/H-4), acoplando *orto* e *meta* ($J= 5,5$ Hz, $J= 3,5$ Hz). No mesmo espectro, foi possível observar a presença de um duplete para dois hidrogênios em δ_{H} 4,07 ($J= 6,5$ Hz, H-8/H-8') e de metila representada pelo duplete em δ_{H} 0,97 (H-10/H-10' e H-11/H-11') com integral para seis hidrogênios. E ainda é visível um septeto em δ_{H} 2,02 ($J= 7$ Hz, H-9/H-9') indicando assim, a presença de grupo isobutil na molécula.

No espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 73, p. 122; Tabela 11, p. 120) observa-se o deslocamento químico em δ_{C} 19,16 (C-10/C-10' e C-11/C-11') confirmando a presença de metila na molécula. E também foi possível perceber a presença de grupo carbonila, pelo deslocamento químico em δ_{C} 167,67 (C-7/C-7').

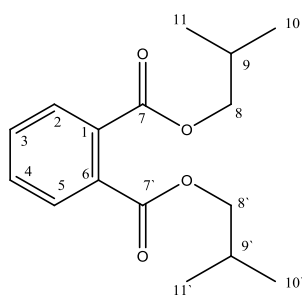
No espectro de correlações heteronuclear (^1H X ^{13}C -HMQC) (Figura 77, p. 124; Tabela 11, p. 1209) e suas expansões (Figura 78 e 79, p. 124 e 125), foi possível observar as correlações diretas dos hidrogênios das metilas δ_{H} 0,97, com seus respectivos carbonos em δ_{C} 19,16, além de mostrar as correlações entre os hidrogênios δ_{H} 4,07 (H-8/H-8') com os carbonos em δ_{C} 71,80 (C-8); os hidrogênios δ_{H} 7,51 com δ_{C} 130,89 (H-3/C-3; H-4/C-4) e os hidrogênios δ_{H} 7,70 com os carbonos em δ_{C} 128,85 (H-2/C-2; H-5/C-5).

O espectro de ^1H x ^{13}C -HMBC (Figura 80, p. 125; Tabela 11, p. 120) e suas expansões (Figuras 81 e 82, p. 126) apresentaram correlação a três ligações dos hidrogênios δ_{H} 4,07 (H-8a/b) com os carbonos das metilas em δ_{C} 19,27, e do hidrogênio do septeto em δ_{H} 2,02 (H-9)

com o carbono também da metila (J^2), reafirmando a proposta do grupo isobutil. Mostrou correlação a três ligações dos hidrogênios de uma das metilas com o carbono da metila vizinha (δ_H/δ_C 0,97/19,27) e a três ligações também com o carbono C-9 em δ_C 27,74. E ainda, a correlação do hidrogênio aromático δ_H 7,70 (H-2 e H-5) com o carbono δ_C 132,43 (C-6 e C-1, respectivamente) (J^2). E por fim, a correlação a três ligações dos hidrogênios δ_H 4,07 (H-8a/b) com o carbono da carbonila em δ_C 167,67 (C-7).

Desta forma, a análise detalhada dos espectros de RMN 1H e ^{13}C uni e bidimensionais e comparação com os dados encontrados na literatura (GLOWINKOWSKI et al., 1997) confirmaram a estrutura de *Bt-2* como sendo o ftalato di-isobutilftalato (Figura 71), isolado pela primeira vez em *Bryothamnion triquetrum*.

Figura 71. Estrutura química do ftalato Di-isobutilftalato.



Di-isobutilftalato

Como mencionado anteriormente, os ftalatos têm sido amplamente aplicada como plastificantes ou solventes na indústria química, entretanto já é comprovado cientificamente que várias espécies de algas vermelhas sintetizam naturalmente esta classe de compostos químicos (GRESSLER et al., 2010; NOGUCHI, et al., 1979; STEFANOV, et al., 1988; SASTRY e RAO, 1995).

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C (HMQC e HMBC) de **Bt-2** registrados em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz).

	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
1	132,43			
6	132,43			
7	167,67			
7'	167,67			
CH				
2	128,85	7,70 (<i>dd</i> , $J= 5,5$ 3 3,5 Hz, 1H)		C-6
3	130,89	7,51 (<i>dd</i> , $J= 5,5$ 3 3,5 Hz, 1H)		
4	130,89	7,51 (<i>dd</i> , $J= 5,5$ 3 3,5 Hz, 1H)		
5	128,89	7,70 (<i>dd</i> , $J= 5,5$ 3 3,5 Hz, 1H)		C-1
9	27,74	2,02 (<i>sept</i> , $J= 7$ Hz, 7H)	C-8, C-10	
9'	27,74	2,02 (<i>sept</i> , $J= 7$ Hz, 7H)	C-8', C-10'	
CH₂				
8	71,80	4,07 (<i>d</i> , $J= 6,5$ Hz, 2H)	C-9	C-7, C-10
8'	71,80	4,07 (<i>d</i> , $J= 6,5$ Hz, 2H)	C-9'	C-7', C-10'
CH₃				
10	19,16	0,97 (<i>d</i> , $J= 6,5$ Hz, 3H)		
10'	19,16	0,97 (<i>d</i> , $J= 6,5$ Hz, 3H)		
11	19,16	0,97 (<i>d</i> , $J= 6,5$ Hz, 3H)	C-9,	C-8, C-10
11'	19,16	0,97 (<i>d</i> , $J= 6,5$ Hz, 3H)	C-9'	C-8', C-10'

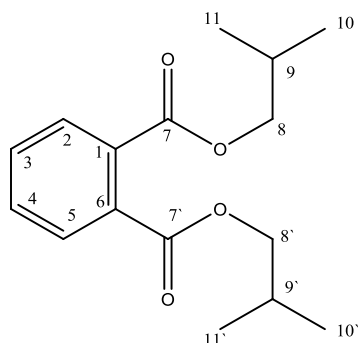


Figura 72. Espectro na região do Infravermelho de **Bt-2** (Pastilha de KBr).

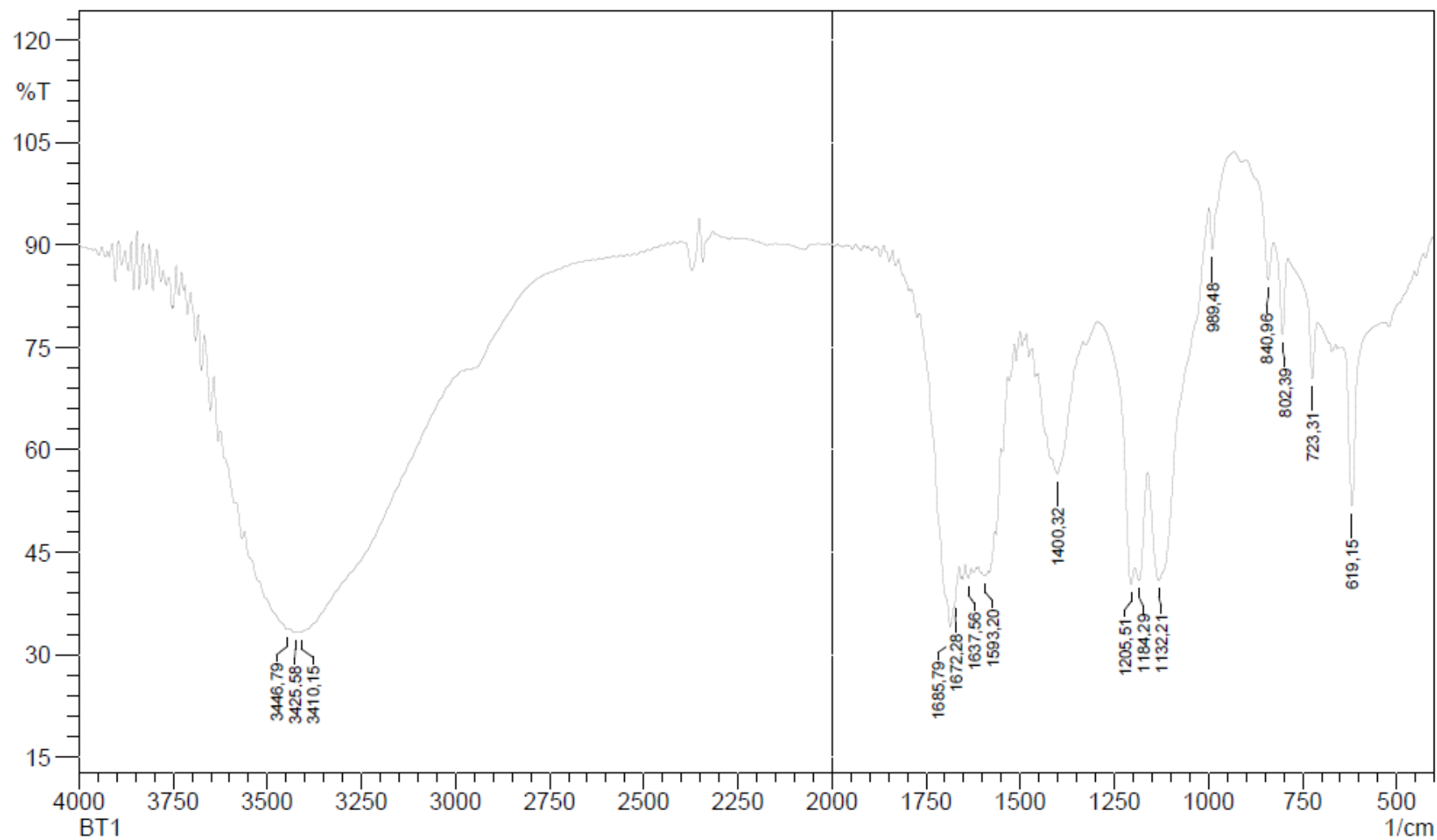


Figura 73. Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CDCl_3) de **Bt-2**.

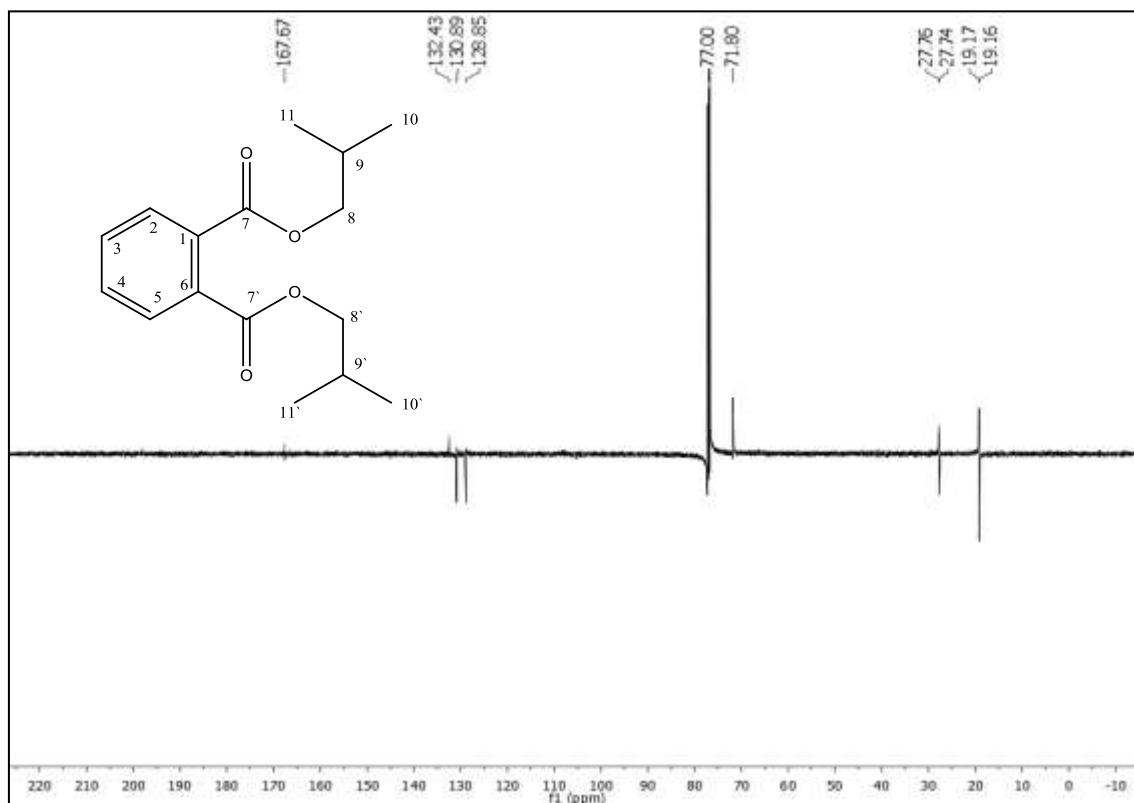


Figura 74. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-2**.

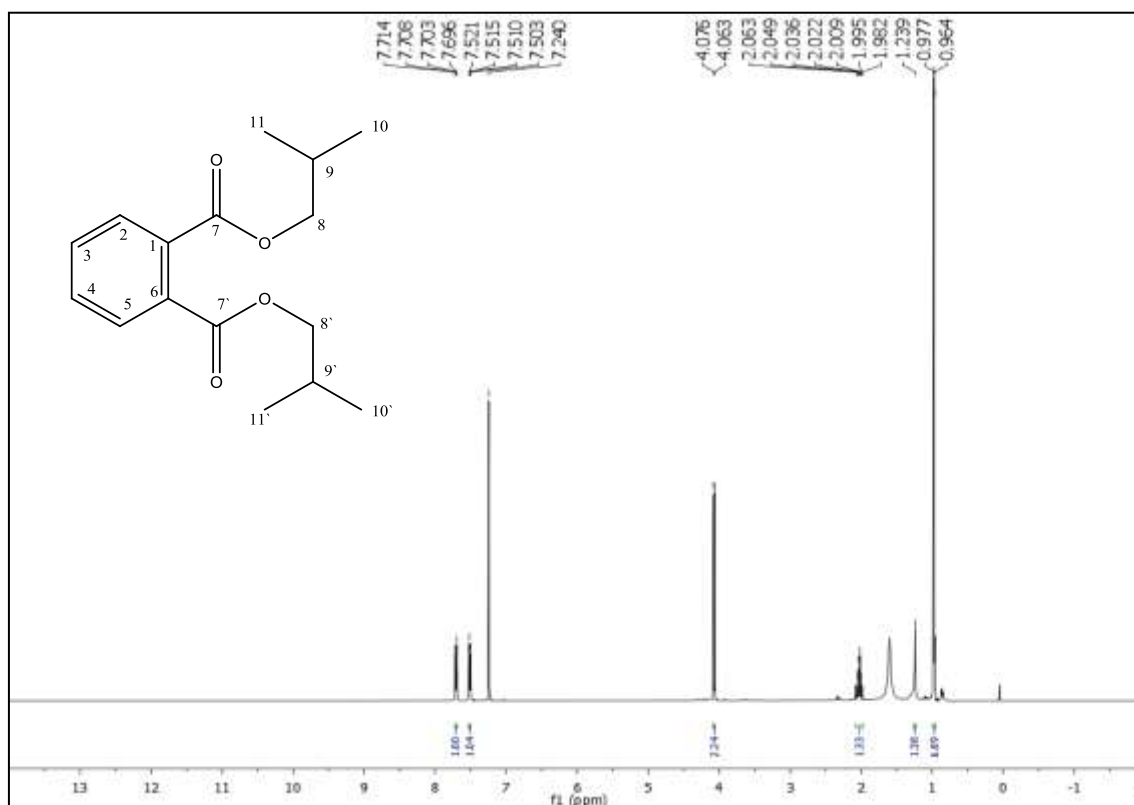


Figura 75. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-2**.

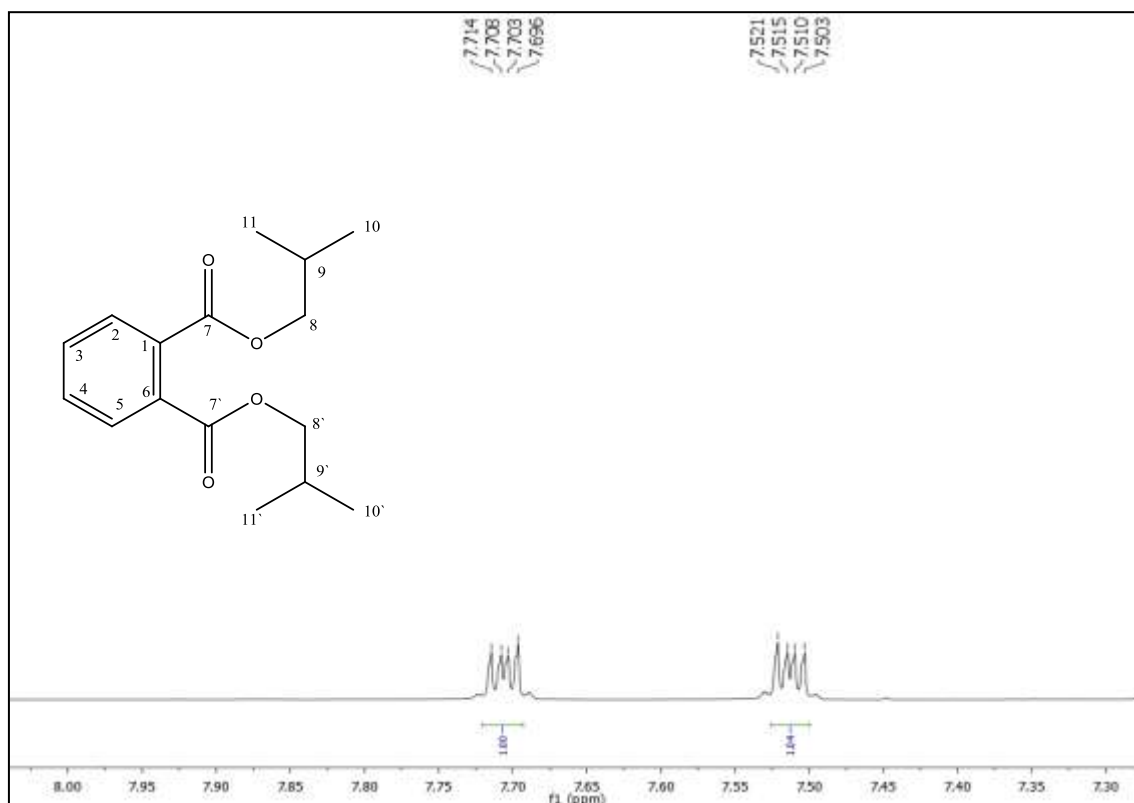


Figura 76. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-2**.

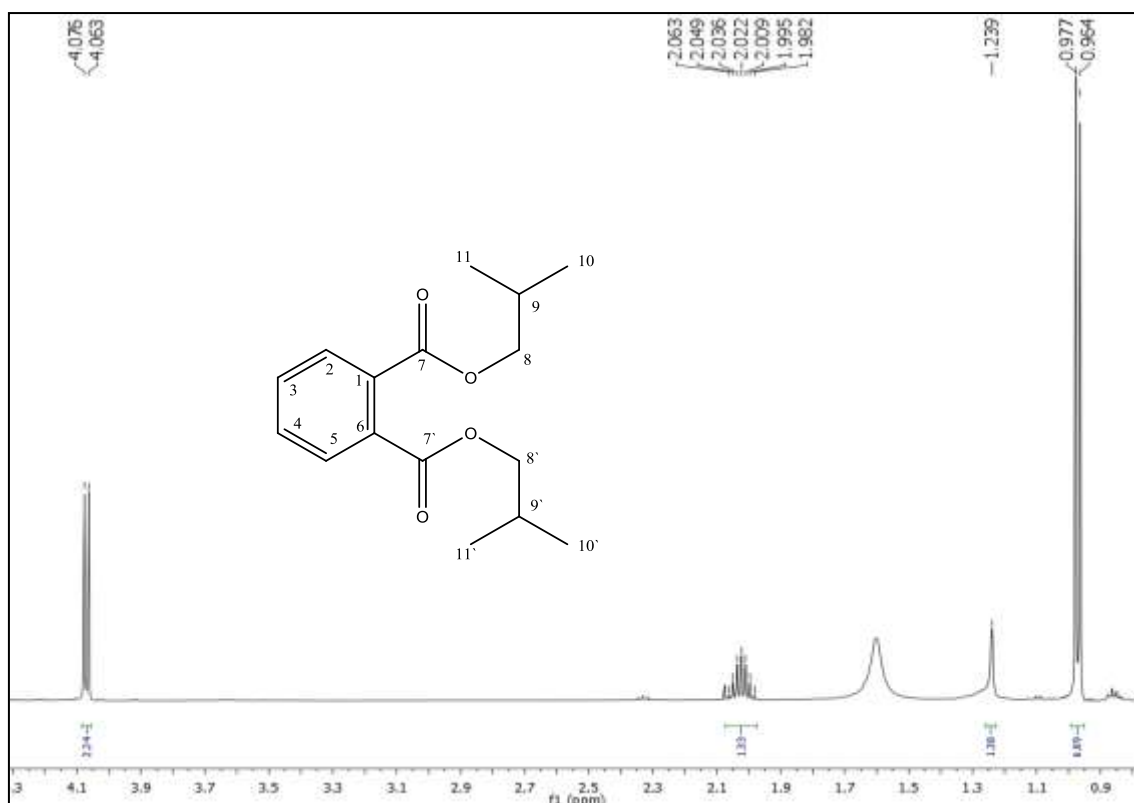


Figura 77. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-2**.

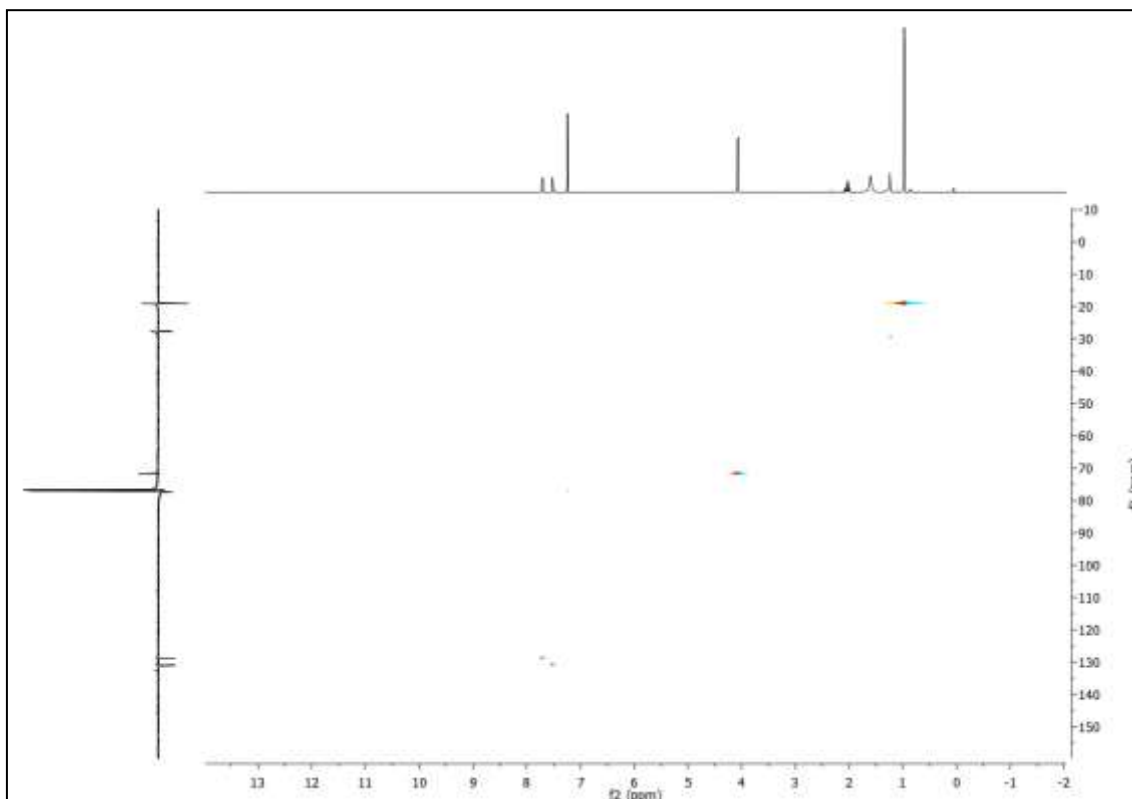


Figura 78. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-2**.



Figura 79. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-2**.

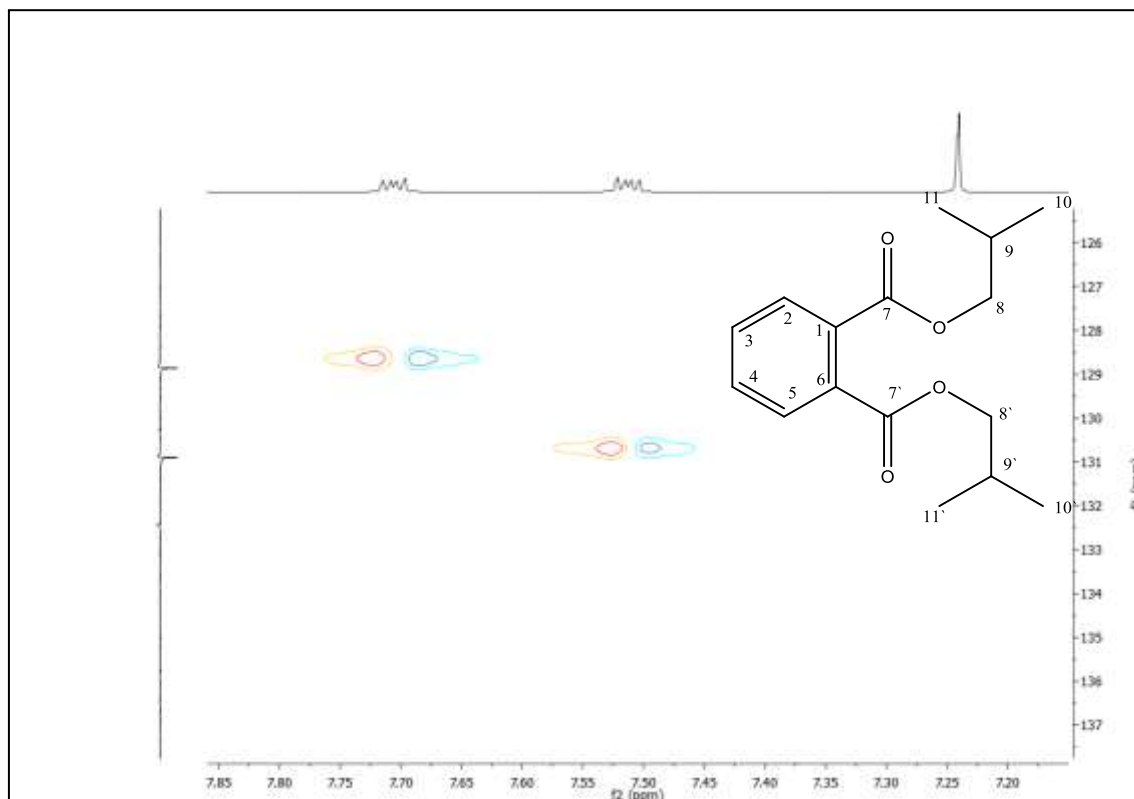


Figura 80. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-2**.

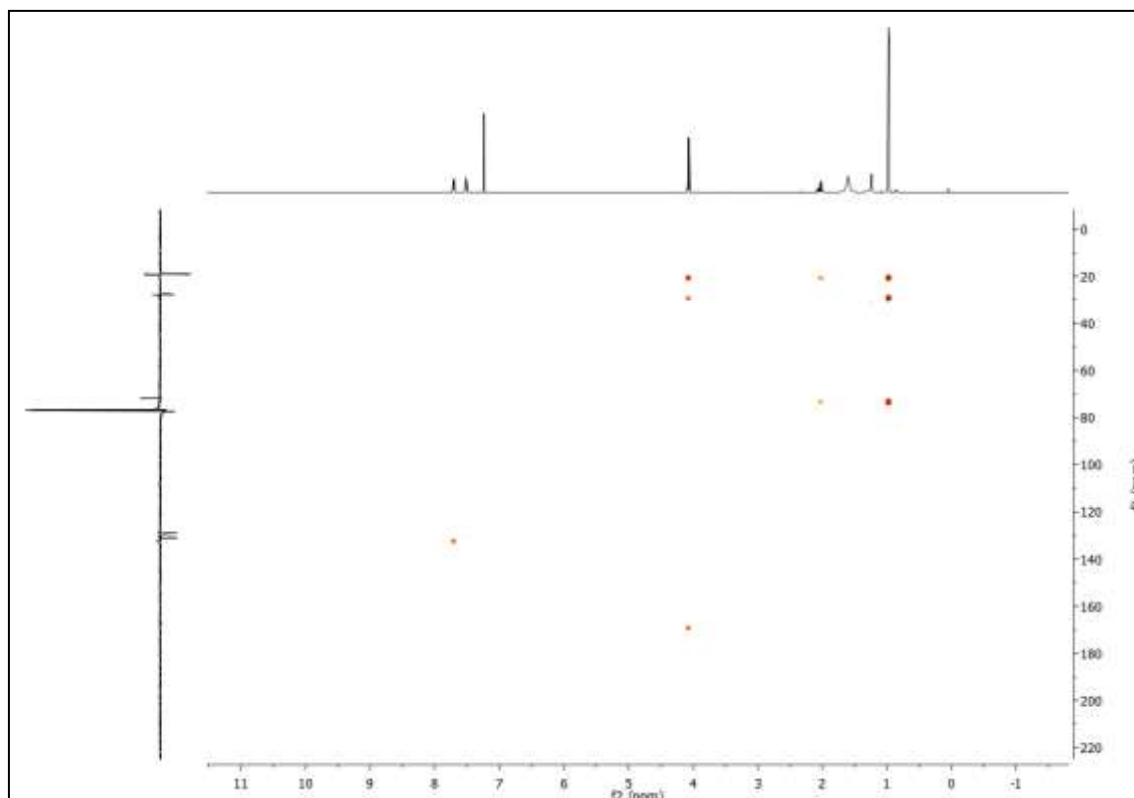


Figura 81. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-2**.

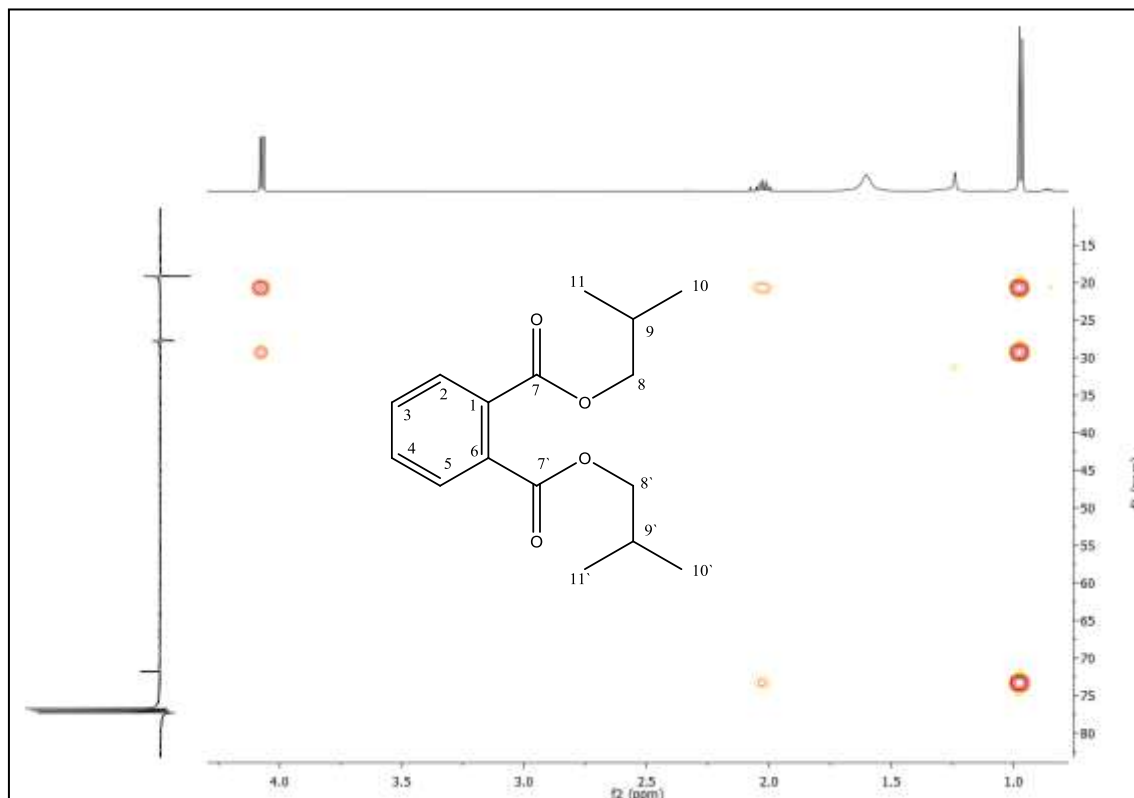
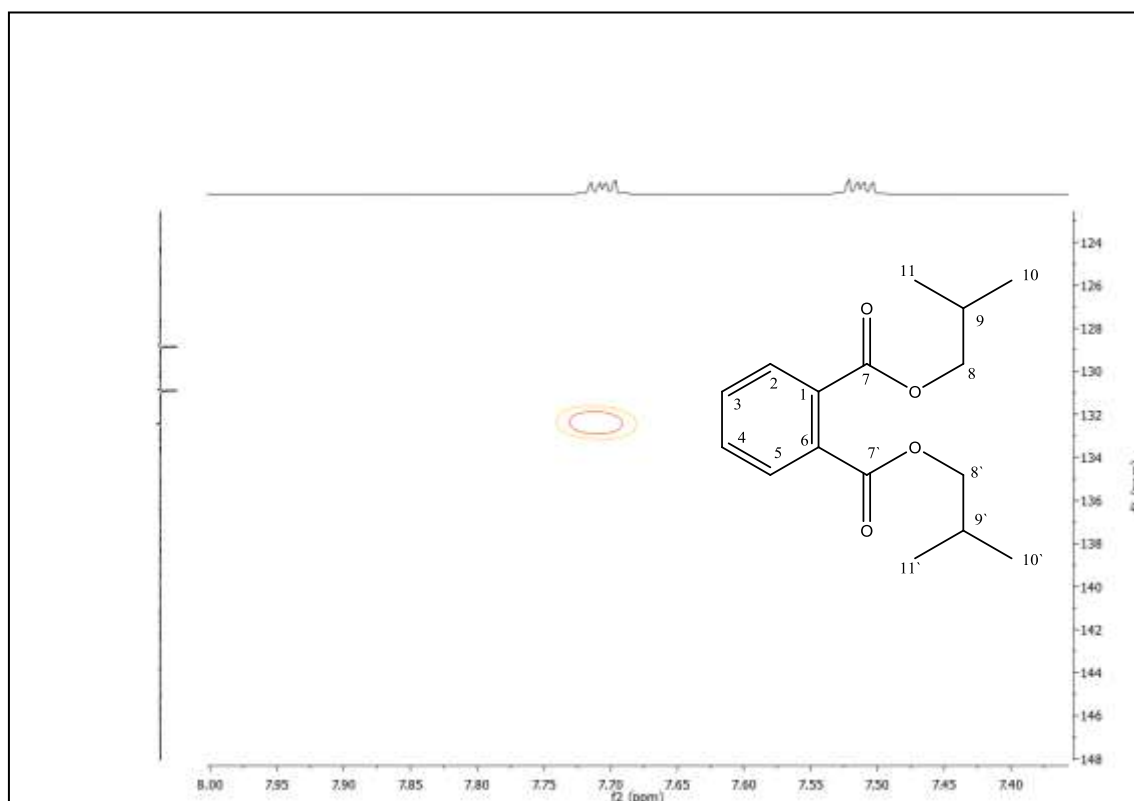


Figura 82. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (500 MHz, CDCl_3) de **Bt-2**.



III. 2.5 Resultados obtidos com *Ircinia felix*.

III.2.5.1 Identificação estrutural de *If-1*.

A substância *I-1* apresentou-se na forma amorfa, solúvel em. A mesma foi identificada através de análise espectral dos dados de Infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, EM-MALDI e comparação com os dados encontrados na literatura.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 86, p. 133;) obtido em pastilhas de KBr, mostrou uma banda larga em 3369 cm^{-1} , sugerindo grupo OH na molécula e duas bandas finas e fortes de estiramento em 2918 cm^{-1} e 2848 cm^{-1} , indicando a presença de carbonos metilênicos e metílicos de cadeia alifática. O espectro de IV mostrou ainda, a absorção em 1616 cm^{-1} permitindo inferir a presença de uma carbonila na molécula (PAVIA et al., 2010).

O espectro de RMN ^1H (Figura 87, p. 134; Tabela 12, p. 132) e suas expansões (Figuras 88 e 89, p. 134 e 135) indicaram a presença de uma ceramida pela existência do sinal de NH em 7,27 (C-2), dos dois hidrogênios diastereotópicos em C-1 (δ_{H} 3,68 (*dd*) e δ_{H} 3,91 (*m*)) e do multipeto para o H-2 (δ_{H} 3,91), como normalmente encontram-se nas ceramidas (ALMEIDA et al., 2012). Ainda no mesmo espectro, pode-se sugerir que a ceramida apresenta uma cadeia lateral característica de esfingosina pela presença de sinais de vários carbonos metilênicos entre δ_{H} 1,25-3,91 e pela presença do tripleto em δ_{H} 0,85 (*t*, $J=7,0$, 3H, H-9/H-32) característico de metila terminal de ácido graxo (WILKE et al., 2010). E o acoplamento de um duplo dupeto em δ_{H} 5,51 (*dd*, $J=15,4$ e $6,3$ Hz, 1H, H-4) e um duplo tripleto em δ_{H} 5,57 (*dt*, $J=15,4$ e $6,8$, 1H, H-5), corresponderam a hidrogênios olefínicos na molécula, onde no espectro de correlação heteronuclear direta ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC) (Figura 95, p. 138; Tabela 12, p. 132) foi possível confirmar a inserção da dupla entre os C-4 e C-5, através das correlações dos hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,57 (H-5) e δ_{H} 5,51 (H-4) com os carbonos em δ_{C} 134,46 (C-5) e δ_{C} 128,97 (C-4), respectivamente.

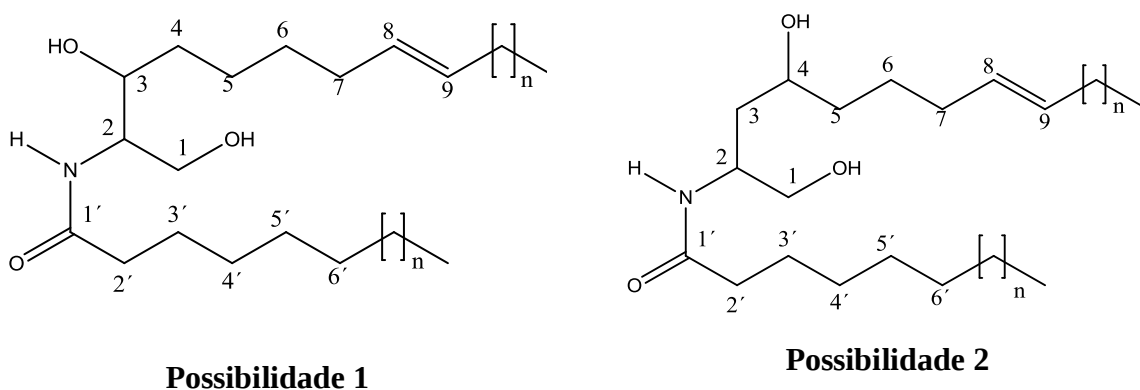
Ainda no espectro de RMN ^1H (Figura 87, p. 134; Tabela 12, p. 132), observou-se além dos sinais dos H-1a/1b (δ_{H} 3,68 e 3,91), um multipeto em δ_{H} 4,29 (*m*, $J=14,0$ Hz, 1H, H-3) sugerindo que este hidrogênio também está ligado a carbono que está sofrendo desproteção de um oxigênio ou de outro heteroátomo (ALMEIDA et al., 2012).

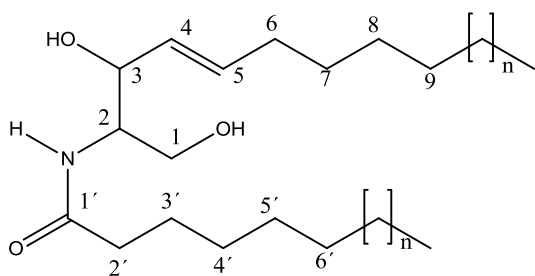
Na análise espectral de RMN ^{13}C -DEPT 135 (Figura 90, p. 135; Tabela 12, p. 132), foi possível confirmar a presença de vários carbonos metilênicos alifáticos, através dos sinais entre δ_{C} 29,40-30,27. Entretanto, alguns sinais para carbonos metílicos e metilênicos encontrados no mesmo espectro, demonstrou a possibilidade de impureza na amostra. No espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 92, p. 136; Tabela 12, p. 132) observou-se um sinal em δ_{C} 174,39 (C-1') indicativo de carbonila e três sinais de carbonos oxigenados ou ligados a outro heteroátomo em δ_{C} 54,95 (C-2), δ_{C} 62,58 (C-1) e δ_{C} 74,48 (C-3), confirmando a hipótese da ceramida.

O espectro de correlação heteronuclear direta (^1H X ^{13}C -HMQC) (Figura 95, p. 138; Tabela 12, p. 132) mostrou as correlações do multipeto em δ_{H} 4,29 (H-3), o duplo dupeto em δ_{H} 3,68 (H-1) e o hidrogênio em δ_{H} 3,91 (H-2) com os carbonos ligados a heteroátomo em δ_{C} 74,48 (C-3), δ_{C} 62,28 (C-1) e δ_{C} 54,95 (C-2), respectivamente. A expansão do espectro de correlação heteronuclear direta (^1H X ^{13}C -HMQC) (Figura 96, p. 138), mostrou também as correlações dos hidrogênios metilênicos entre δ_{H} 1,0-1,53 com os respectivos carbonos alifáticos entre δ_{C} 29,40-30,27, e a correlação dos hidrogênios das metilas em δ_{H} 0,85 (H-9/H-32') com seu respectivos carbonos em δ_{C} 14,33.

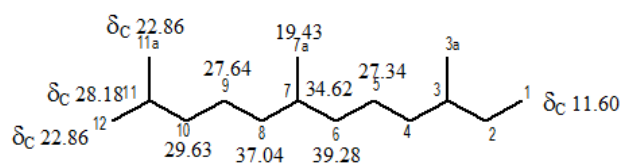
Diante do exposto e comparando com os dados da literatura (ALMEIDA et al., 2012) foi possível atribuir as seguintes possibilidades estruturais para *If*-1 (figura 110):

Figura 83. Possibilidades estruturais para *If*-1.





Possibilidade 3

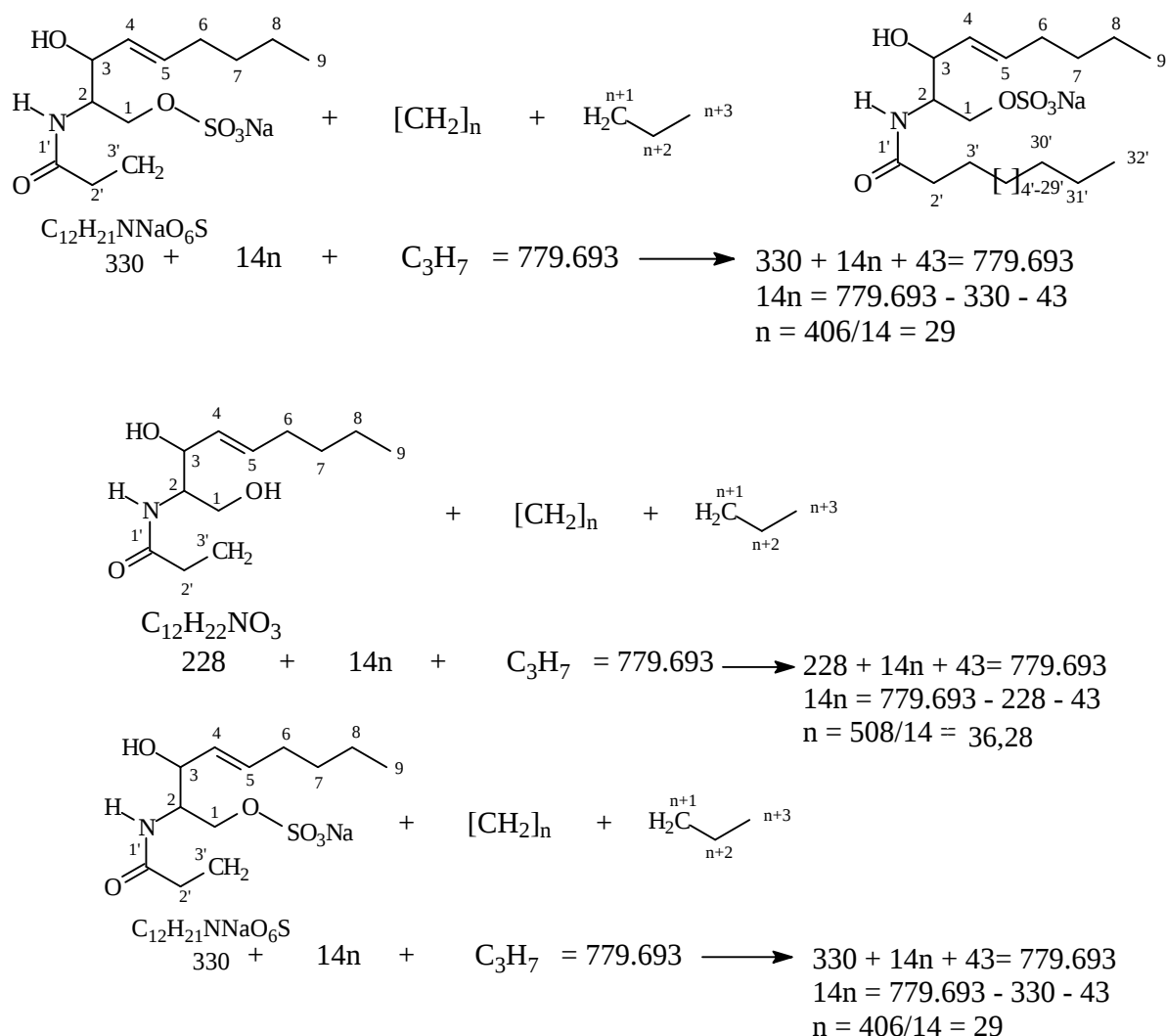


Possibilidade do contaminante

O espectro de correlações heteronuclear ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC) (Figura 97, p. 139; Tabela 12, p. 132), e suas expansões (Figuras 98, 99, 100 e 101, p. 139, 140 e 141), a duas (J^2) e três ligações (J^3) mostraram as seguintes correlações: o hidrogênio em δ_{H} 2,24 (H-2') com δ_{C} 174,39 (J^2) atribuído à carbonila (C-1') e o hidrogênio em δ_{H} 3,68 (H-1) também com a carbonila em δ_{C} 174,39 (J^4). Foi possível analisar também a correlação do hidrogênio em δ_{H} 3,68 (H-1) (J^3) com δ_{C} 74,48 (C-3), descartando a possibilidade 2. E as correlações em δ_{H} 5,51 (H-4) (J^2) com δ_{C} 74,48 (C-3) e do hidrogênio em δ_{H} 5,57 (H-5) (J^3) com 74,48 (C-3) confirmando que a possibilidade estrutural mais próxima era a 3, justamente com as correlações em δ_{H} 2,04 (H-6) (J^2) com δ_{C} 128,97 (C-4) e δ_{H} 2,04 (H-6) (J^3) com δ_{C} 134,46 (C-5).

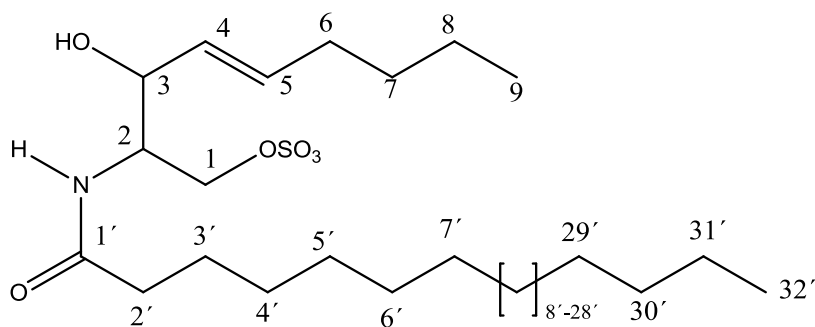
Através do Espectrômetro de Massas por Ionização por Dissociação a laser assistida por matriz (EM-MALDI) foi possível obter os fragmentos necessários que indicaram o pico do íon molecular como sendo $\text{M}^{\bullet-}$ 779,693 u.m.a (Figura 102 e 103, p. 142 e 143), o que possibilitou atribuir a fórmula molecular $\text{C}_{44}\text{H}_{86}\text{NNaO}_6\text{S}$, e assim através de equações de primeiro grau identificou-se a presença de um grupo sulfóxido ligado ao C-1, bem como, definiu o tamanho da cadeia lateral, a qual é constituída por 32 átomos de carbono.

Figura 84. Análise do pico do íon molecular de *If*-1.



Diante das informações tornou-se possível identificar a substância *If*-1 como uma ceramida sulfonilada N-[(4E)-3-hidroxi-1-[[sodiooxi]sulfonil]oxi]non-4-en-2-il]dotriacontanamida (Figura 112), a qual está sendo descrita pela primeira vez na literatura.

Figura 85. Estrutura química do N-[(4E)-3-hidroxi-1-[[sodiooxi]sulfonil]oxi}non-4-en-2-il]dotriacontano.



N-[(4E)-3-hidroxi-1-[[sodiooxi]sulfonil]oxi}non-4-en-2-il]dotriacontanamida.

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) e correlações entre sinais de ^1H x ^{13}C (HMQC e HMBC) de **If-1** registrados em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz).

	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
1'	174,39	-		
CH				
2	54,95	3,91 (m)		
3	74,48	4,29 (m)		
4	128,97	5.51 (dd, $J= 15.4$ e 6.3 Hz)	C-3, C-5	C-6
5	134,46	5.57 (dt, $J= 15.4$ e 6.8 Hz)	C-4, C-6	C-5
CH₂				
1	62,58	3.68 (dd, $J= 14.0$ e 6.5 Hz)		C-3
6	32,53	2.04 (q, $J= 6.8$ Hz)	C-5, C-7	C-4
7	32,14	1.38		
8	22,89	1.25		
2'	36,87	2,24 (t, $J= 7.4$)	C-1', C-3'	
3'	26,00	1.63 (m)		
(CH ₂) _n	30,27-29,40	1.50 – 1.00		
n+1	32,14	1.38		
n+2	22,87	1.25		
CH₃				
9	14,33	0.85 (t, $J= 7.0$)		C-7
n+3	14,33	0.85 (t, $J= 7.0$)		
NH	-	7,27 (s)		

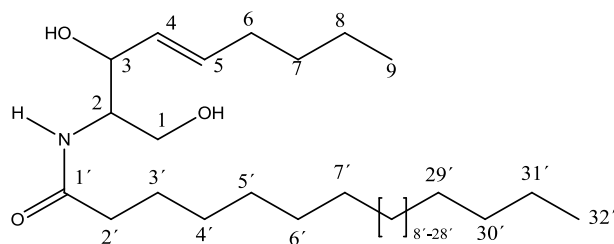


Figura 86. Espectro na região do Infravermelho de **If-1** (Pastilha de KBr).

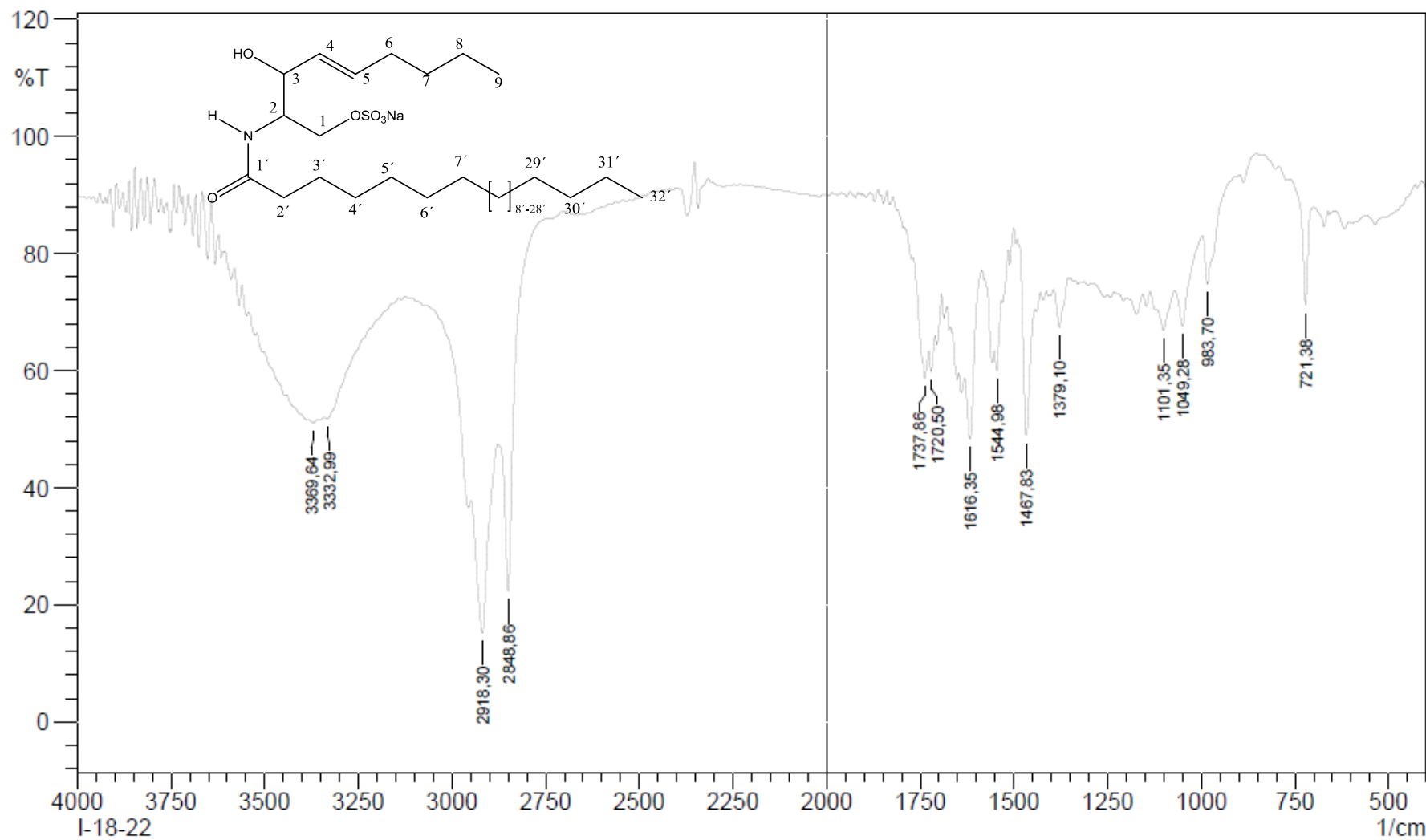


Figura 87. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de *If-1*.

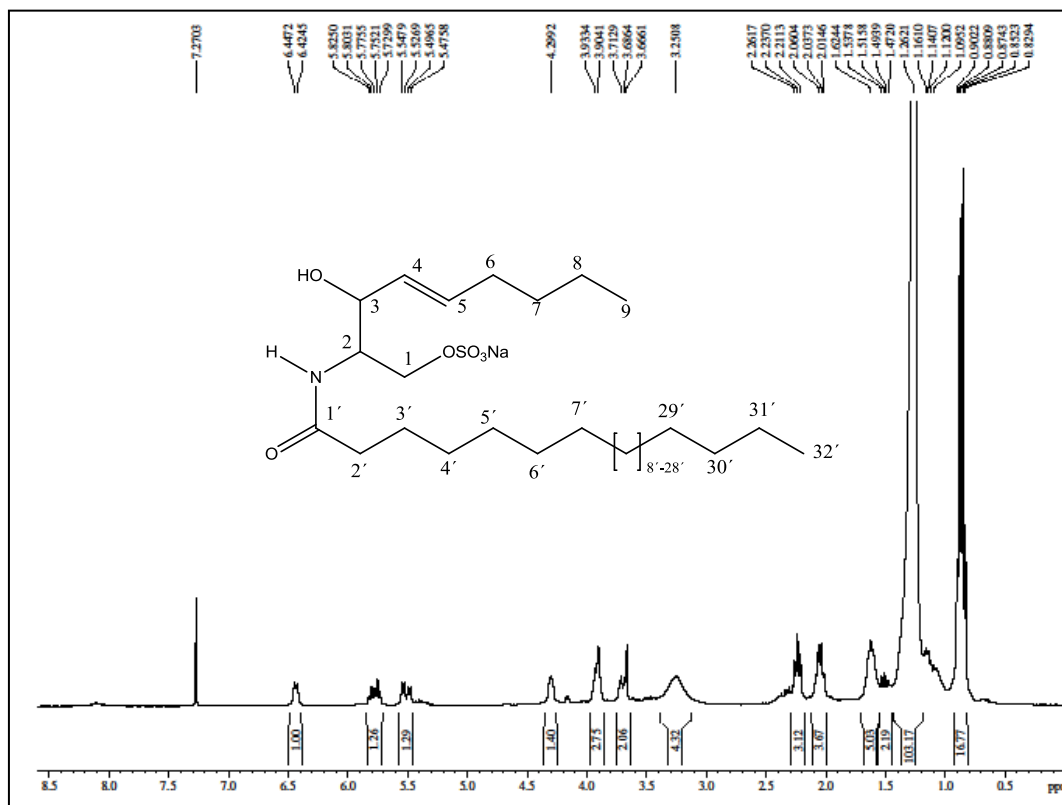


Figura 88. Expansão de espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de *If-1*.

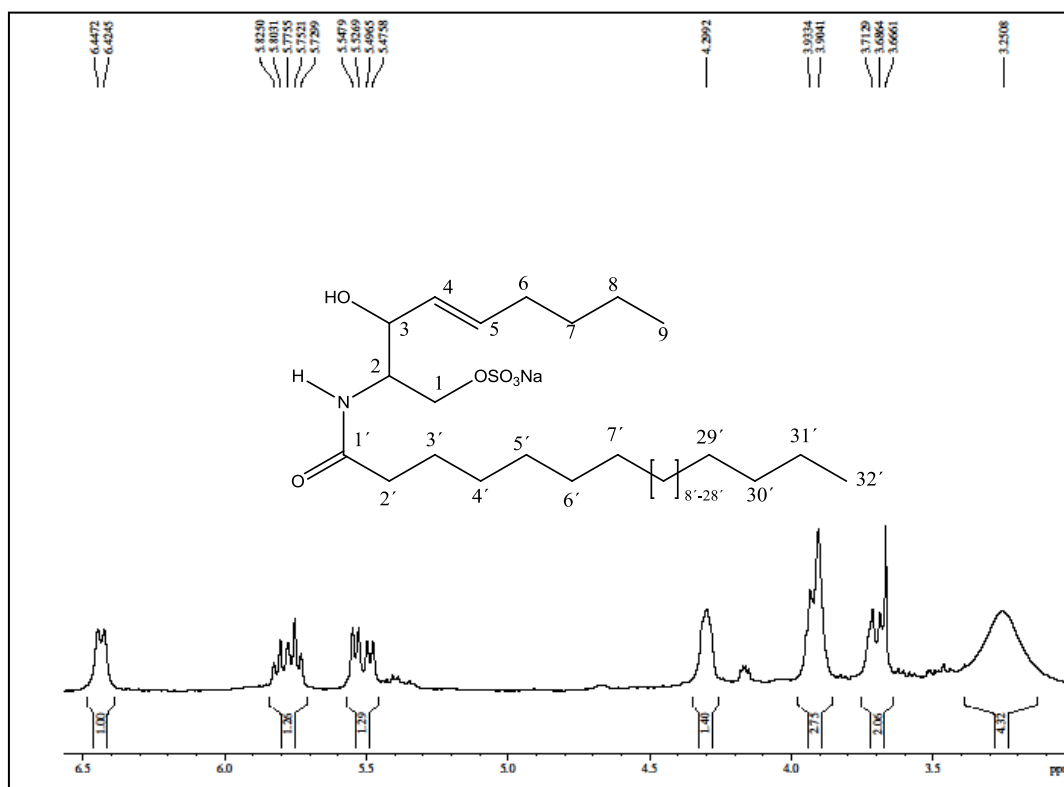


Figura 89. Expansão de espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de *If-1*.

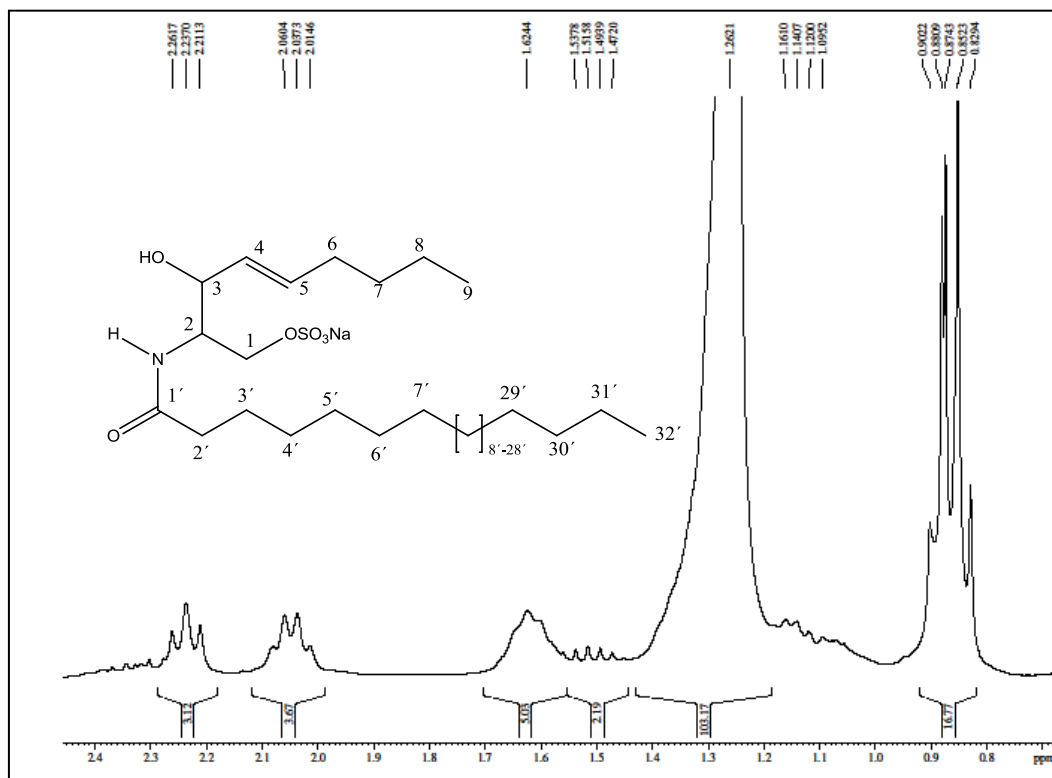


Figura 90. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (75 MHz, CDCl_3) de *If-1*.

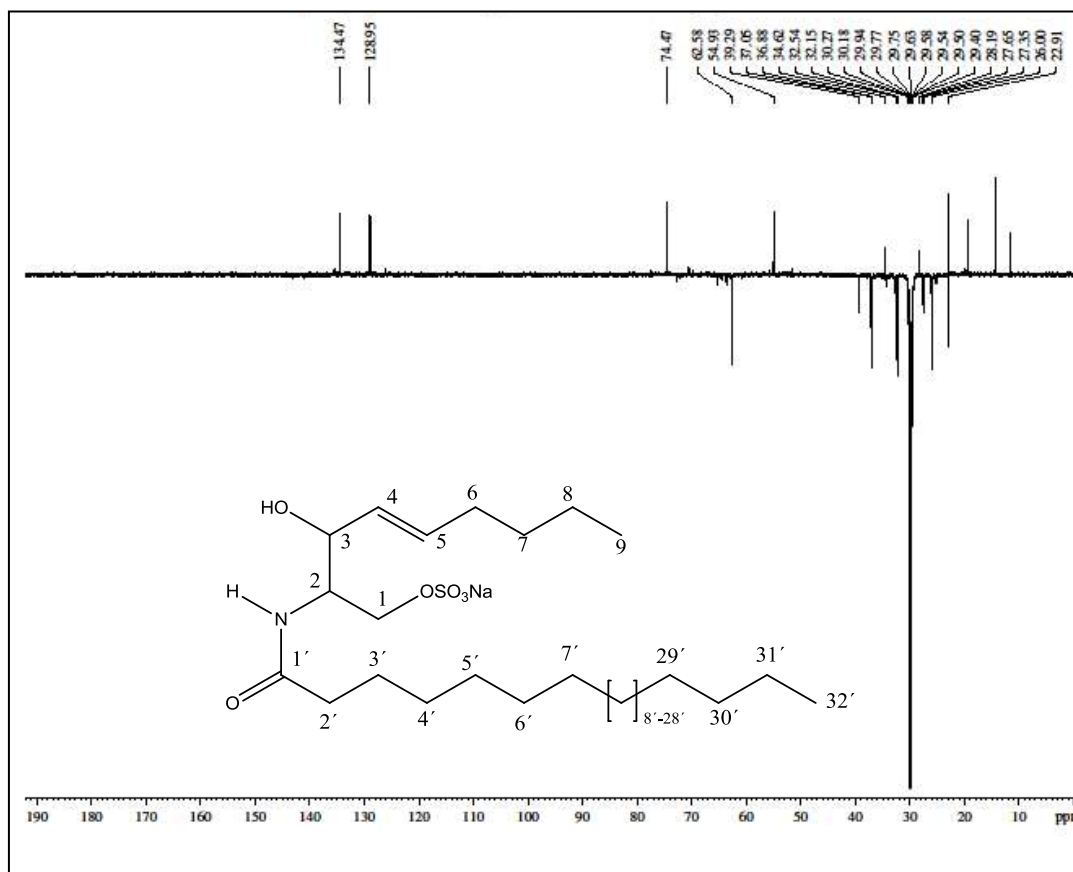


Figura 91 . Expansão do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (75 MHz, CDCl_3) de *If-1*.

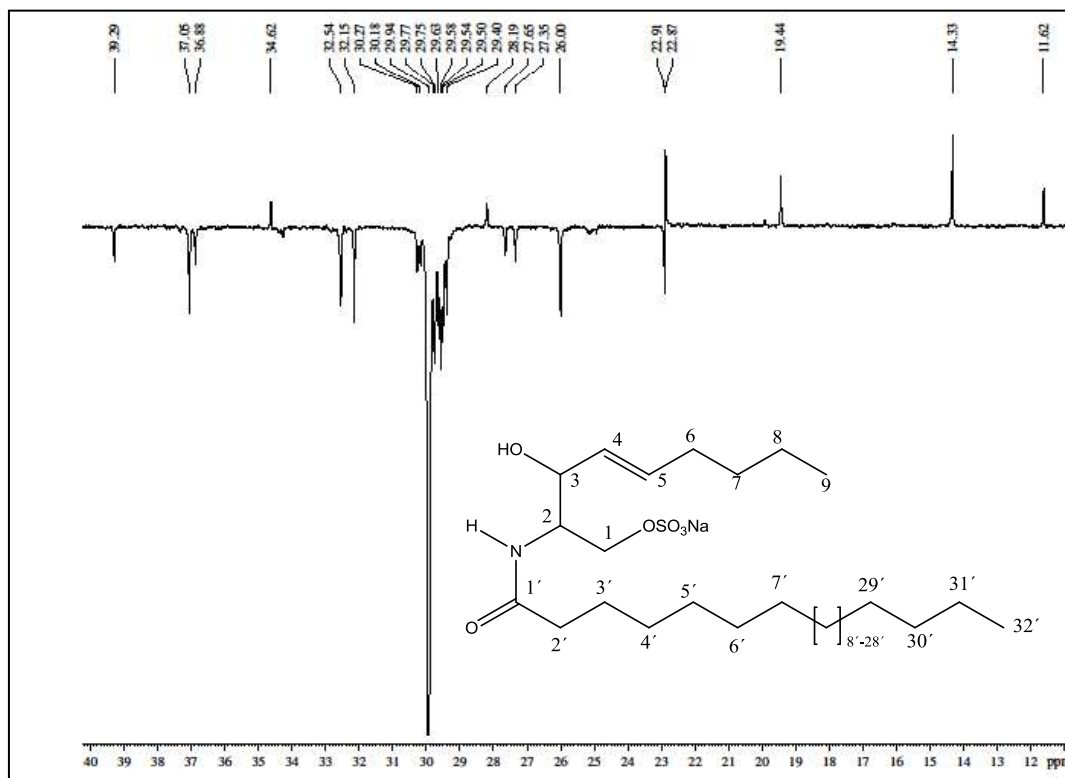


Figura 92. Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) de *If-1*.

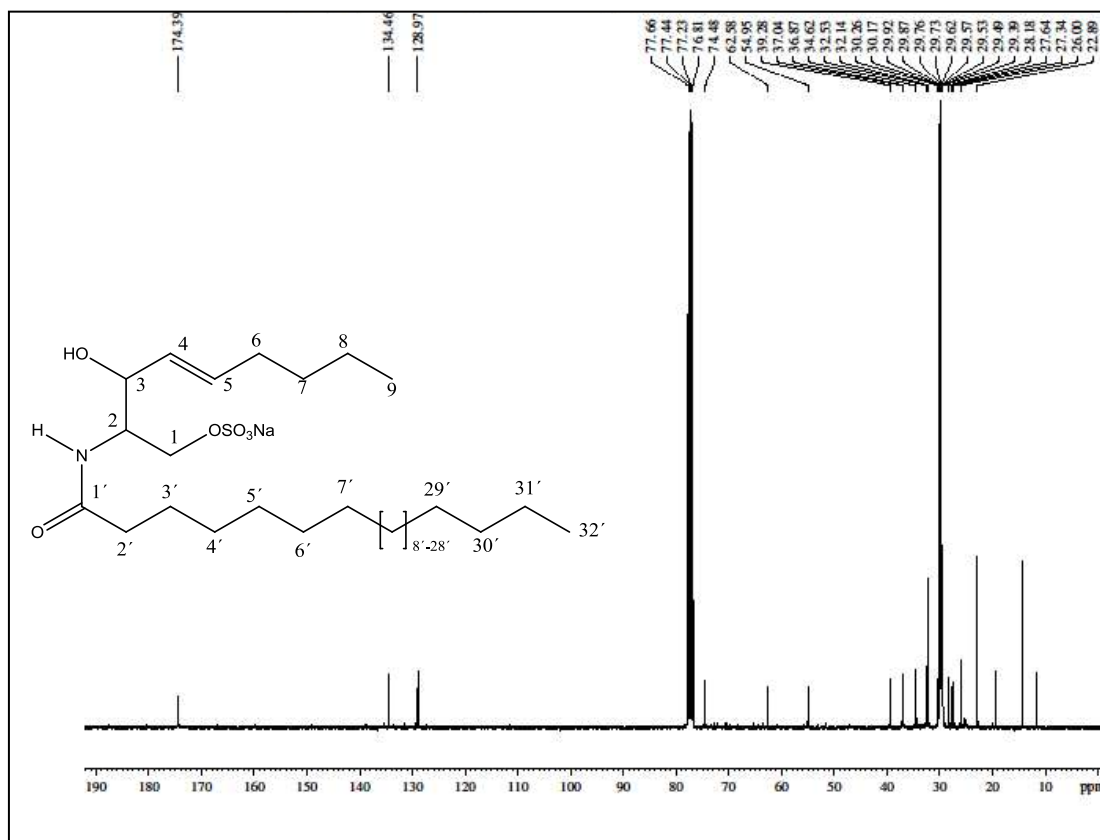


Figura 93. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) de *If*-1.

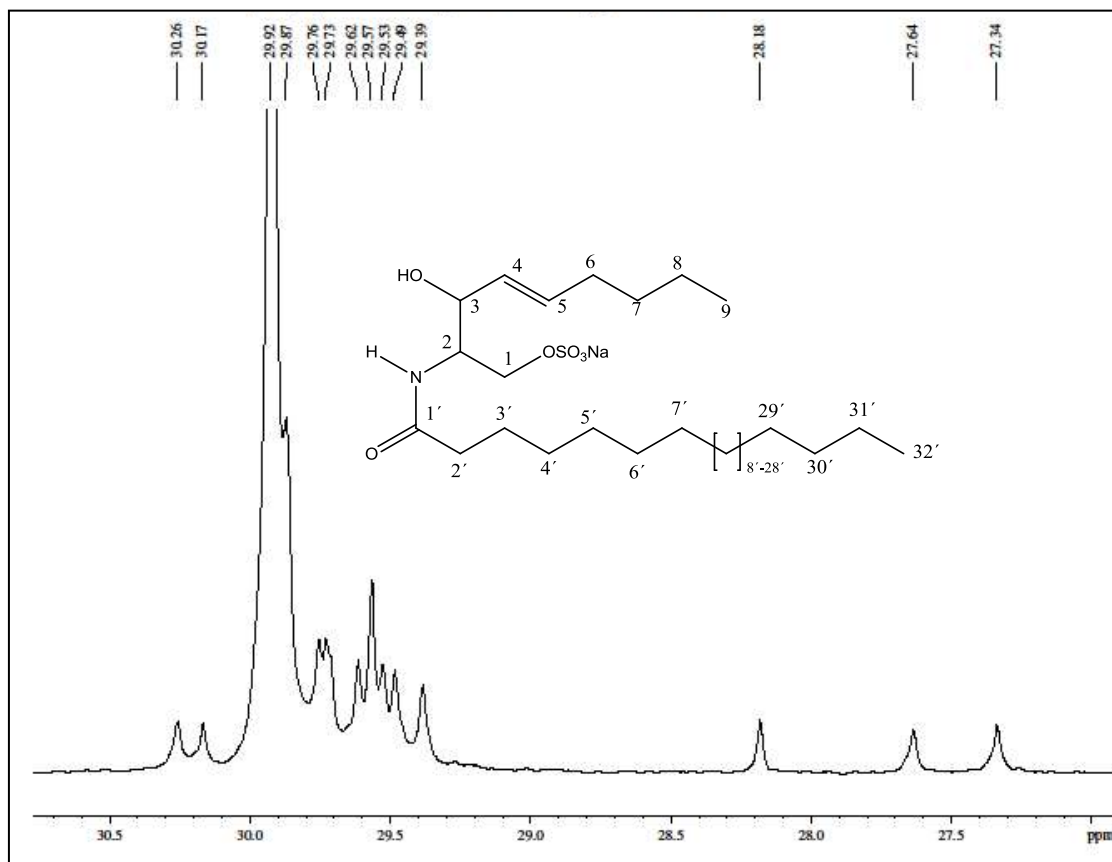


Figura 94. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) de *If*-1.

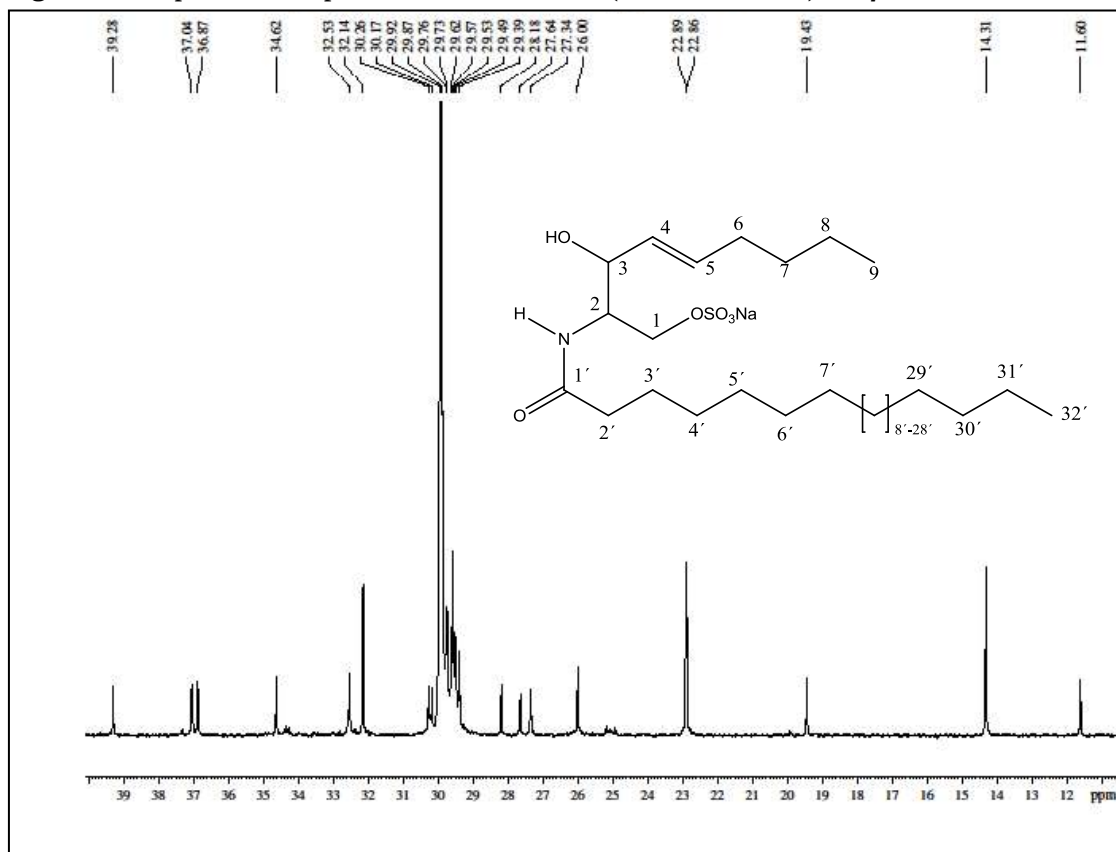


Figura 95. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (300 MHz, CDCl_3) de *If-1*.

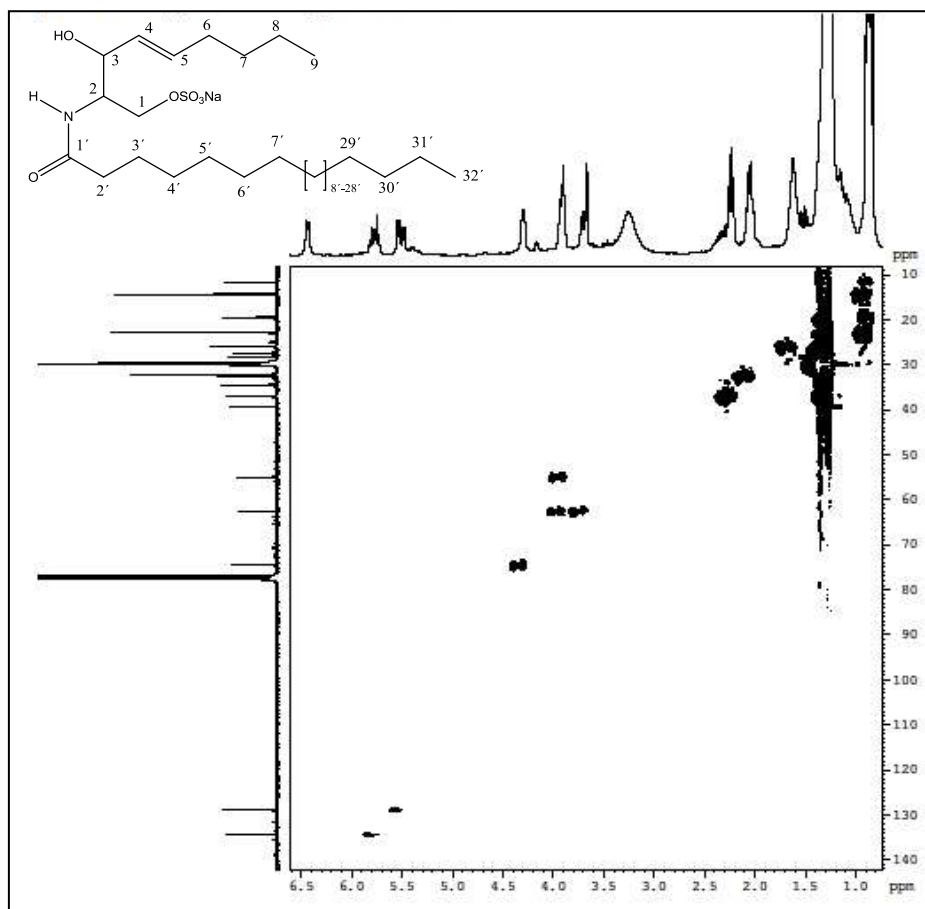


Figura 96. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMQC (300 MHz, CDCl_3) de *If-1*.

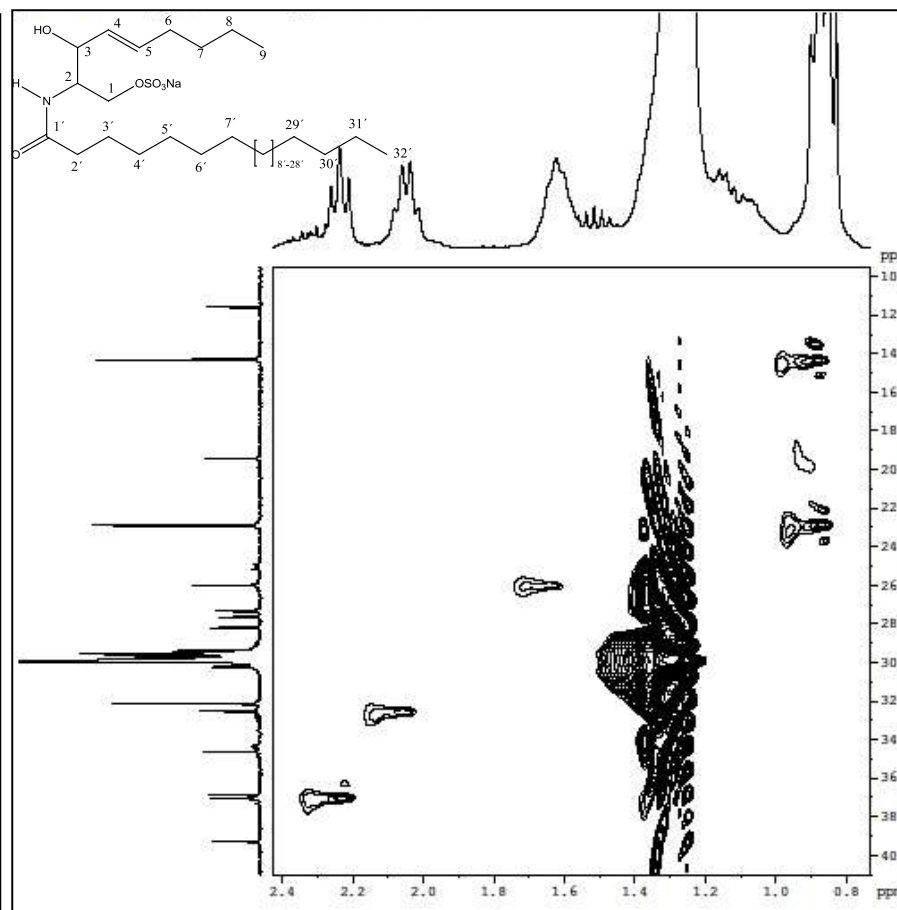


Figura 97. Espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (300 MHz, CDCl_3) de **If-1**.

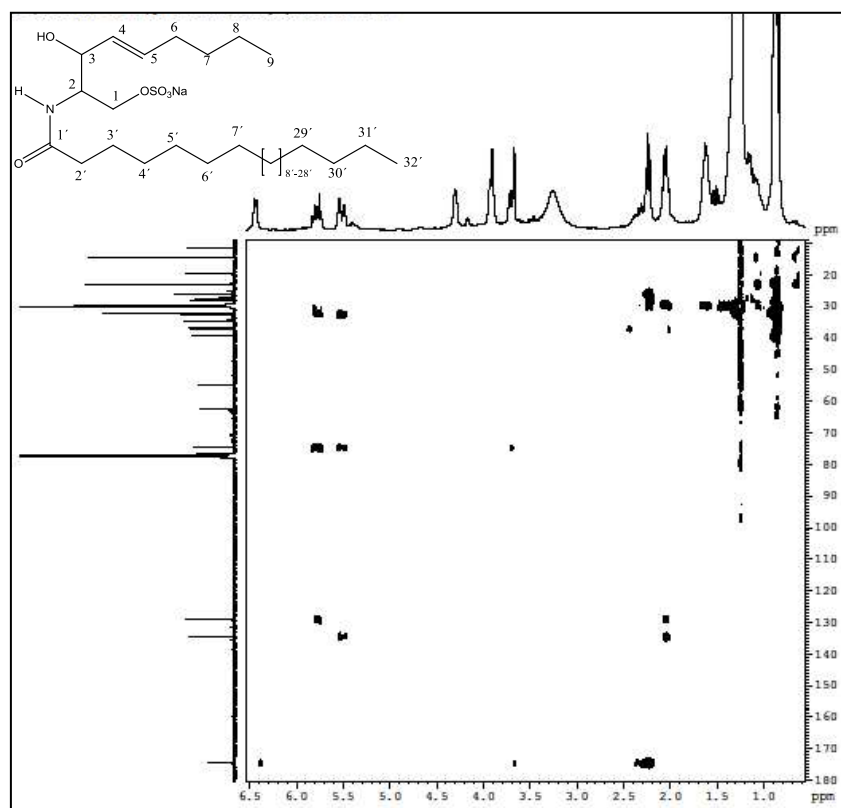


Figura 98. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (300 MHz, CDCl_3) de **If-1**.

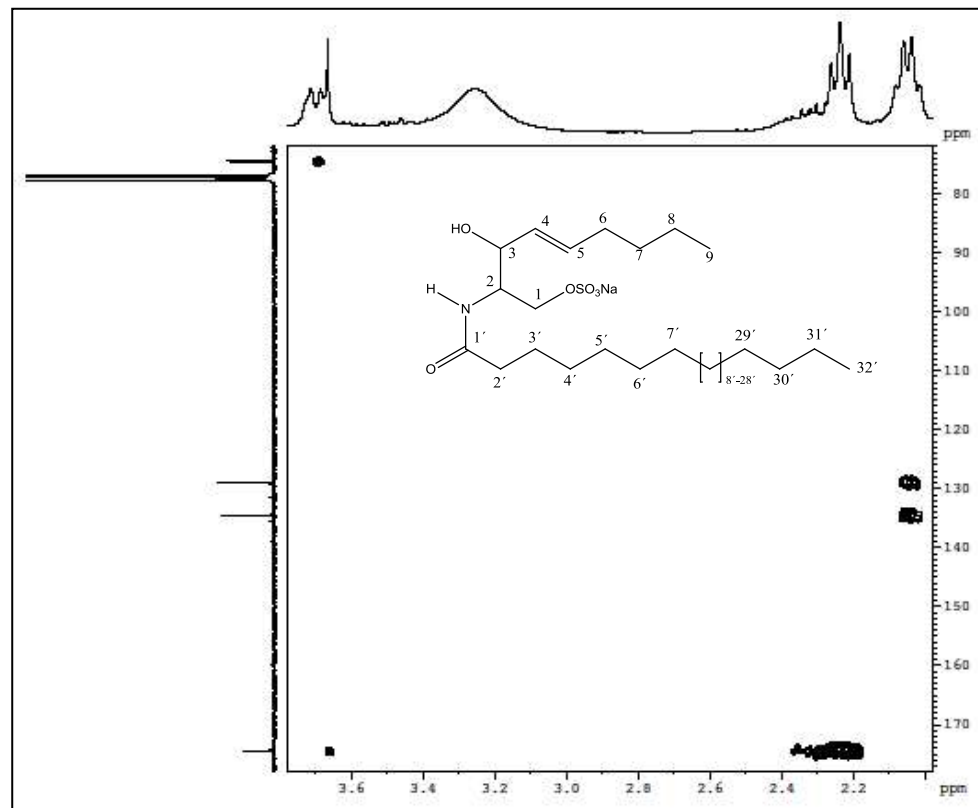


Figura 99. Expansão do espectro RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (300 MHz, CDCl_3) de *If-1*. **Figura 100.** Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (300 MHz, CDCl_3) de *If-1*.

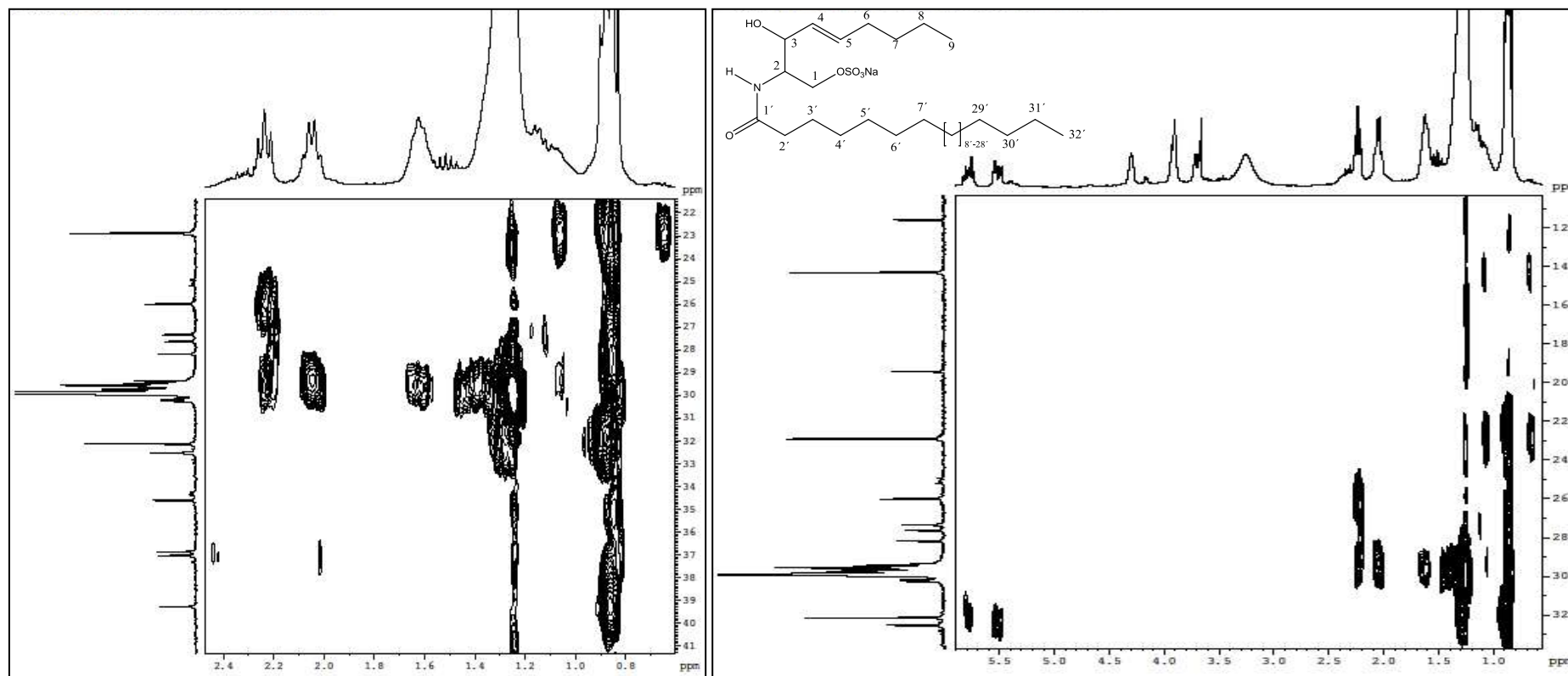


Figura101. Expansão do espectro de RMN ^1H X ^{13}C -HMBC (300 MHz, CDCl_3) de **If-1**.

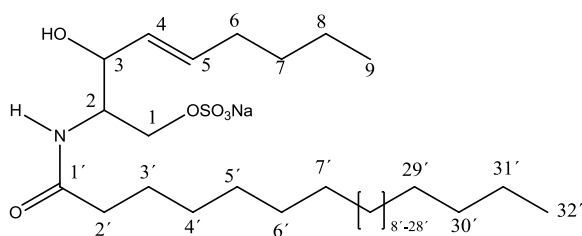
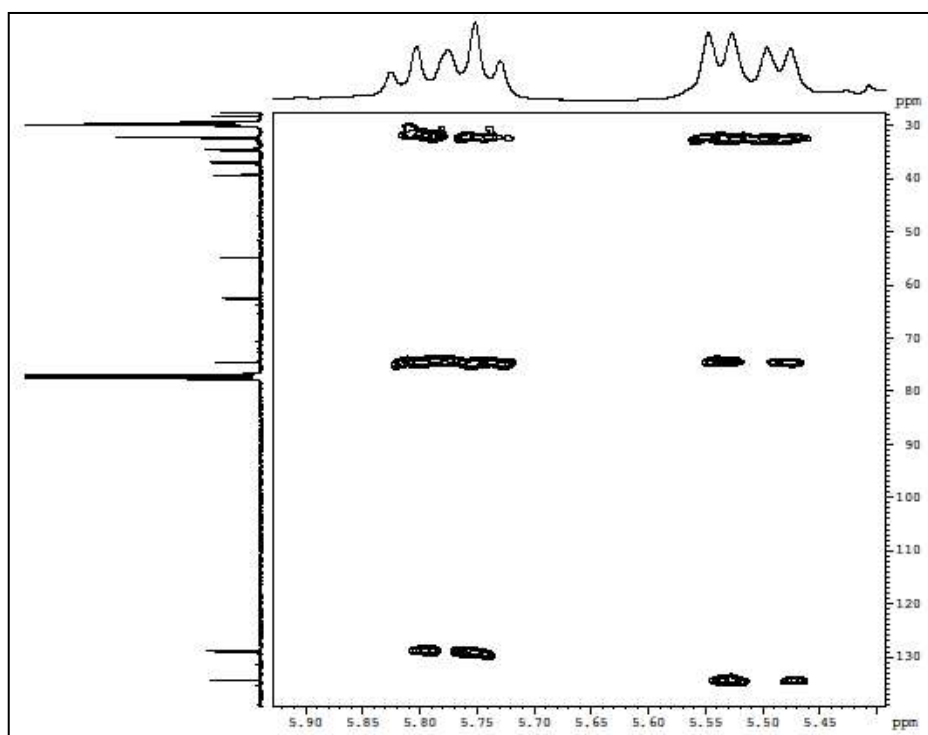


Figura102. Espectro de massas (EM-MALDI) de *If-1*.

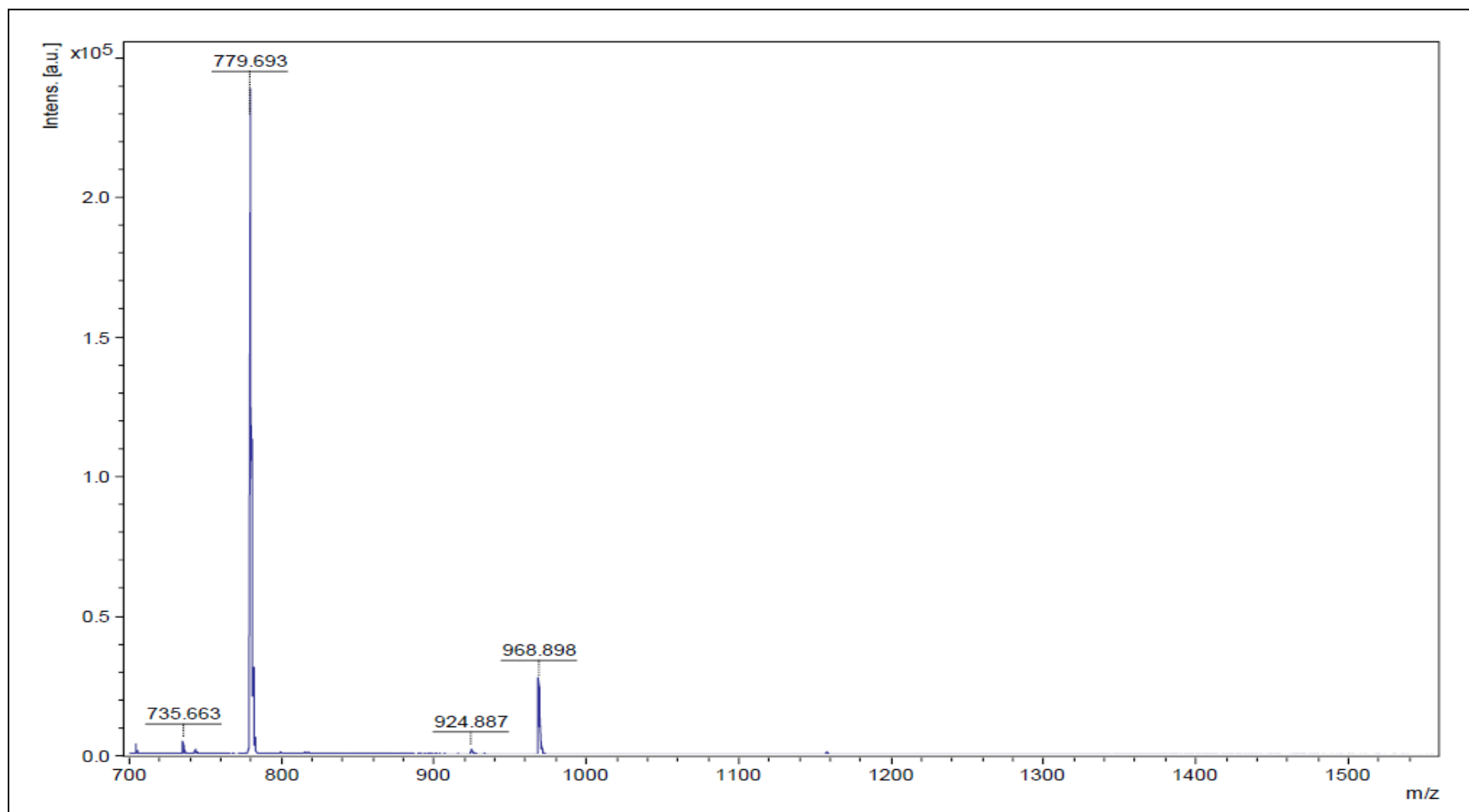
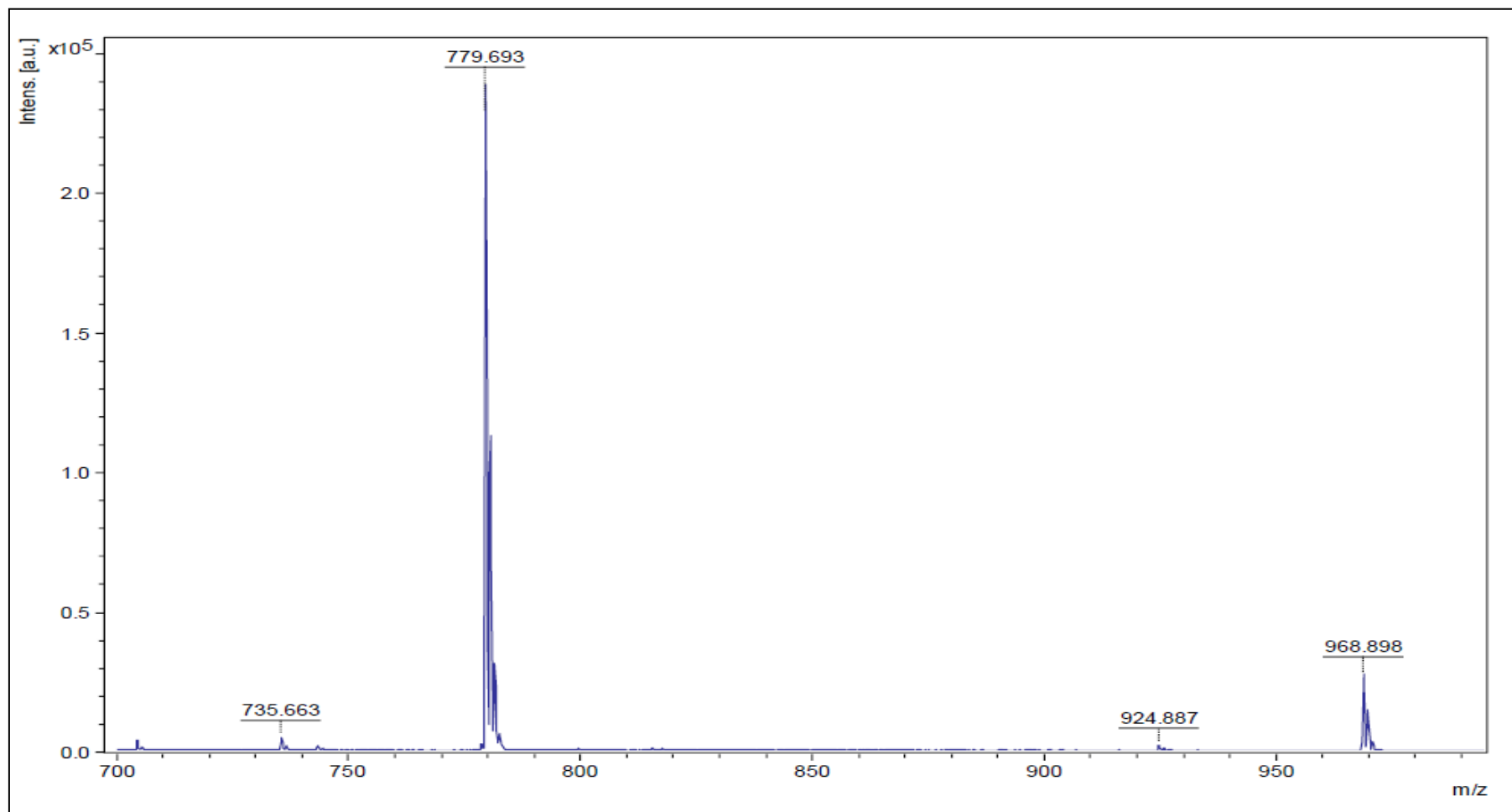


Figura103. Espectro de massas (EM-MALDI) de *If-1*.



CAPÍTULO II: ESTUDO FARMACOLÓGICO

Metodologia



IV. CAPÍTULO II: ESTUDO FARMACOLÓGICO

IV.1 METODOLOGIA

IV. 1.1 Avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de camundongos Swiss.

Os ensaios para avaliação da citotoxicidade foram realizados com os extratos brutos de *Bryothamnion triquetrum* (EMB_{BT}) e *Hypnea musciformis* (EMB_{HM}) no Laboratório de Ensaios Toxicológicos (LABETOX/UFPB), com a supervisão da Prof^a Dr^a Mariana Vieira Sobral Castelo Branco.

Os ensaios para avaliação da citotoxicidade em eritrócitos foram realizados segundo Kang et al. (2009), com algumas modificações. Os eritrócitos foram obtidos de sangue fresco de camundongos Swiss coletado do *sinus orbital*. A agulha foi heparinizada (heparina sódica - Parinex® - Hipolabor) para prevenir coagulação. Para obter a suspensão de eritrócitos, 1 mL de sangue total foi solubilizado em 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e então centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos. O plasma sobrenadante foi descartado e esse processo repetido por duas vezes. Os eritrócitos foram finalmente ressuspensos em PBS, obtendo-se então a suspensão de eritrócitos a 0,5% (v/v) que foi utilizada para o ensaio de hemólise. EMB_{HM} e EMB_{BT} foram solubilizados em DMSO (5%) e preparado em PBS, no dobro das concentrações desejadas. A cada 100 µL dessas soluções foi adicionado 100 µL da suspensão de eritrócitos, em quadruplicata. Os controles positivo e negativo foram também utilizados, pela incubação de eritrócitos em uma solução de 0,1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich®) em PBS (2 mL) e DMSO (5%) em PBS (2 mL), respectivamente. A placa de 96 poços foi mantida sob agitação suave por 60 minutos. Após esse período, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante cuidadosamente removido. Após remoção, foi adicionado a cada poço 200 µL de solução de Triton X-100 (0,1%) e a placa cuidadosamente agitada. A quantidade de hemólise causada pela solução do Triton X-100 (0,1%) foi determinada espectrofotometricamente a 415 nm e serviu como prova inversa para determinação da CH₅₀ (concentração do extrato que produz 50% de hemólise) dos EMB_{HM} e EMB_B utilizando a seguinte fórmula:

$$\%Hemólise = \frac{A_{Tx} - A_{óleo}}{A_{Tx}} \times 100$$

Onde:

A_{TX} = Absorbância do poço contendo controle positivo com Triton-X

A_{oleo} = Absorbância do poço contendo a concentração dos EMB_{HM} e EMB_B

IV.1.2 Avaliação da atividade antitumoral *in vitro* em linhagens de *Ehrlich*.

Para os ensaios *in vitro* foi utilizada a linhagem de carcinoma ascítico de Ehrlich, gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA/UNICAMP). As células foram mantidas na cavidade peritoneal de camundongos Swiss (*Mus musculus*) no Biotério Prof. Thomas George, sendo realizado repique semanal.

As células da linhagem carcinoma ascítico de *Ehrlich* foram utilizadas para o ensaio de avaliação da atividade antitumoral *in vitro*. As células foram coletadas da cavidade peritoneal do camundongo por 7 dias de inoculação, solubilizadas com 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e em seguida centrifugadas à 1.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Nutricell[®]) suplementado com 25 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich[®]) e 10% de soro bovino fetal (SBF) (Nutricell[®]). As células tumorais foram então semeadas (2×10^5 células/poço) em placas de 96 poços (BD/Labware[®]) e incubadas com diferentes concentrações (10 -640 µg/mL) dos EMB_{HM} e EMB_B por 24 h (37 °C e 5 % CO₂). Os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Mallinckrodt CHEMICALS[®]) e então em meio RPMI-1640 suplementado. A concentração final de DMSO nos meios em teste e no controle foi de 0,5%. O experimento foi realizado em quadruplicata e repetido duas vezes. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio) (Sigma-Aldrich[®]).

O MTT é um corante amarelo, que é reduzido por enzimas mitocondriais e citoplasmáticas a um composto azul denominado formazan, insolúvel em solução aquosa. A redução do sal tetrazólio MTT, principalmente pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SLATER; SAWYER; STRAULI, 1963), é muito utilizada em ensaios de avaliação de sobrevivência e proliferação celular, uma vez que somente as células viáveis reduzem o MTT (amarelo) para o formazan (azul), o qual, uma vez solubilizado, pode ser

quantificado espectrofotometricamente, sendo assim, a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis presentes (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986).

O ensaio de redução do sal de tetrazólio foi realizado como descrito por Melo et al. (2003), com algumas modificações. Na placa de 96 poços com as células sob 24 h de tratamento, foram adicionados 10 µL de MTT (5 mg/mL) em cada poço. Após incubação por 4 h (37 °C e 5% CO₂), o sobrenadante foi cuidadosamente removido e adicionou-se aos 96 poços, 100 µL de etanol absoluto para solubilizar o formazan produzido. A placa foi então agitada por 15 minutos e a absorbância lida em 570 nm. O cálculo da concentração da droga que produz 50% de inibição no crescimento celular (CI₅₀) foi realizado através da determinação da percentagem de células viáveis com base na seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{DO_{\text{células tratadas}} - DO_{\text{Branco}}}{DO_{\text{controle negativo}} - DO_{\text{Branco}}}$$

Onde:

DO_{Células tratadas} = Densidade óptica dos poços com o produto teste

DO_{Controle negativo} = Densidade óptica dos poços do controle negativo

DO_{Branco} = Densidade óptica dos poços contendo apenas o meio de cultura

Para os ensaios *in vitro* com eritrócitos, foram realizados três experimentos em triplicata. Os valores de CH₅₀ foram calculados através da expressão dos resultados como uma porcentagem dos controles, e foram determinados graficamente a partir das curvas concentração-resposta por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%.

Resultados e Discussão



IV. 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.2.1 Resultados farmacológicos obtidos com *Caulerpa mexicana*

Ambientes marinhos são fontes de alcalóides indólicos e bis-indólicos de grande variedade estrutural tais como hyrtiosin B, topsentins, tjipanazoles B, caulersina, e caulerpina. Numerosos compostos destas classes têm sido isolados de esponjas e algas apresentando um amplo espectro de fatores biológicos (JANOSIK; JOHNSON e BERGMAN, 2002).

Os núcleos indólicos são uma extensa e larga família de compostos alvo de especial interesse nas áreas tanto da química como da farmacologia e, provavelmente, são os compostos heterociclos mais amplamente distribuídos na natureza, presente, por exemplo, no aminoácido triptofano e o precursor da 5-HT dentre outros (JOULE; MILLS e SMITH, 1998).

A CLP, alcalóide bis-indólico, isolada de diferentes algas (verdes e vermelhas) mostrou moderada atividade antitumoral, atuando como um regulador de crescimento das plantas e, também, em inibir bomba de multiresistência a xenobióticos em algas (SU; ZHU; ZENG e XU, 1997; SCHROEDER, et al. 1998). É a substância mais abundante em espécies de *Caulerpa* e está presente num nível de 1mg/g de alga seca (VEST; DAWES e ROMEO, 1983). Estudos anteriores relatam sua síntese bem como obtenção de novos análogos (AGUILAR, GERTRUDES, 1970; TALAZ, SARACOGU, 2010).

Recentemente nosso grupo através de um estudo químico-farmacológico mostrou sua potencialidade anti-inflamatória e antiespasmódica (resultados abaixo) levando-nos a sugerir-la como forte candidata a estudos voltados para o desenvolvimento de novos protótipos de fármacos.

IV.2.1.1 Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório

Em virtude do promissor perfil farmacológico, realizou-se estudos preliminares dos extratos hexânico (HE), clorofórmico (CE), acetato de etila (AE) e metanólico (ME), obtidos a partir de *Caulerpa mexicana*¹. Foram realizados os ensaios *in vivo*, por via oral, de contorções abdominais induzidas por ácido acético (COLLIER *et al.*, 1968) e ensaios de edema de orelha induzida por capsaicina e peritonite induzida por carragenina (FERRANDIZ *et al.*, 1991). O primeiro ensaio foi realizado para avaliar a atividade antinociceptiva dos

extratos e da caulerpina (CLP). Este ensaio embora pouco específico possui a vantagem de ser bastante sensível e permitir evidenciar atividades antinociceptivas (LE BARS *et al.*, 2001). O segundo ensaio realizado (ensaio de edema de orelha induzida por capsaicina e peritonite induzida por carragenina) teve como objetivo investigar a atividade anti-inflamatória em modelos de inflamação aguda (FERRANDIZ *et al.*, 1991). Os resultados obtidos anteriores nesses ensaios, indicaram que os extratos e fases testadas bem como a caulerpina², podem exercer atividade anti-inflamatória, provavelmente, por inibição da migração celular, devido à inibição da COX, principalmente, e/ou outros mediadores inflamatórios.

Desta forma, para verificar o mecanismo de ação pelo qual caulerpina induz antinocicepção, bem como para comprovar se a mesma apresenta atividade antiinflamatória foi realizado ensaio *in vitro* de inibição de cicloxigenase. De acordo com os resultados obtidos, caulerpina foi capaz de inibir, significativamente apenas COX-2, na concentração de 0,2 µM, sugerindo assim que o mecanismo de ação da caulerpina envolva a inibição de prostaglandinas produzidas por COX-1. O fármaco de referência utilizado como padrão neste ensaio foi a indometacina que é capaz de inibir tanto COX-1 como COX-2, na mesma concentração (SOUZA *et al.*, 2009).

Analisando a estrutura da caulerpina (Figura 19) é notada a presença de dois grupos indóis (potente núcleo farmacofórico). Possivelmente esse grupo seja responsável pela atividade farmacológica deste alcaloide aqui apresentada, uma vez que esse núcleo é comum também a indometacina, um AINE não-seletivo. A literatura relata que o grupo indol possui ampla variedade de propriedades biológicas como antiinflamatório, dentre outras atividades (Radwan *et al.*, 2007; Bhati; Kumar, 2008). Como caulerpina, as substâncias ajmalina, annomontina e reserpina são exemplos de alcaloides indólicos descritos na literatura, ativos em modelos de inflamação (RADWAN *et al.*, 2007).

Por apresentar grupamentos químicos em comum com a indometacina e por apresentar atividade antinociceptiva/antiinflamatória, pode-se sugerir que a caulerpina possa estar inibindo a COX de forma semelhante à indometacina, ou seja, através de ligações fortes tempo-dependente com esta enzima. Para verificação dessa hipótese, modificações

²Ensaio realizado pelo alunode mestrado Éverton Tenório de Sousa sob a orientação da Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira (LaFI-UFAL)(SOUZA *et al.*, 2009).

moleculares na estrutura da CLP estão sendo realizadas no nosso laboratório (resultados não divulgados).

Diante esses resultados, o nosso grupo desenvolveu um Pedido de Patente “Uso do composto marinho caulerpina e composições farmacêuticas contendo os mesmos, no tratamento de doenças de dores inflamatórias e como inibidores da ciclooxigenase”. A presente invenção é relacionada a uma composição farmacêutica contendo a caulerpina, para tratamento de doenças de origem inflamatória, a exemplo das diferentes formas de artrite, preferencialmente a artrite reumatóide, osteo-artrite, Lúpus, psoríase, doença de Crohn, asma, COPD, melanoma, doença de Alzheimer, mal de Parkinson e câncer, além da dor aguda e/ou crônica, incluindo a dor neuropática, associada aos distúrbios citados e/ou a qualquer manifestação álgica (i.e. dolorosa) dependente da participação da ciclooxigenase (COX). Conforme descrito, a CLP componente desta invenção é capaz de inibir o processo inflamatório e da dor, por um mecanismo via inibição da COX (Pedido de Depósito da Patente: PI1009162-9 Publicado na Revista da Propriedade Industrial nº 2169 em 31/07/2012, referente aos despachos 2.1).

IV.2.1.2 Efeito espasmódico da Caulerpina

Também foi avaliado o efeito espasmolítico da CLP, em íleo de cobaia³. Os resultados obtidos indicam, que a caulerpina inibiu as contrações fásicas induzidas por carbacol ($IC_{50} = 7,0 \pm 1,9 \times 10^{-5} M$), histamina ($IC_{50} = 1,3 \pm 0,3 \times 10^{-4} M$) e da serotonina ($IC_{50} = 8,0 \pm 1,4 \times 10^{-5} M$) de uma forma não seletiva. Além disso, caulerpina inibiu as contrações cumulativas induzidas por serotonina, de uma forma dependente da concentração ($pD'2 = 4,48 \pm 0,08$), deslocando com inclinação a curvas para a direita com redução da E_{max} , e sugerindo um antagonismo não competitivo. O alcaloide também relaxou o íleo pré-contraído pelo KCl ($EC_{50} = 9,0 \pm 0,9 \times 10^{-5} M$) e carbacol ($EC_{50} = 4,6 \pm 0,7 \times 10^{-5} M$) de um modo dependente da concentração. Este efeito foi provavelmente devido à inibição do influxo de Ca^{2+} , através de canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v), uma vez que a caulerpina ligeiramente inibiu as contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante sem Ca^{2+} , deslocando a curva para a direita e com a redução da E_{max} . De acordo com esses resultados, o efeito

³Ensaio realizado pelo aluno de mestrado Luiz Henrique A. Cavalcante Silva sob a orientação da Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante (Departamento de Fisiologia e Patologia, UFPB) (CAVALCANTE-SILVA et al., 2013).

espasmolítico da caulerpina em íleo de cobaia, parece envolver a inibição do influxo de Ca^{2+} através de Ca_v . No entanto, outros mecanismos não são descartados.

IV.2.1.3 Citotoxicidade *in vitro* de caulerpina em linhagens de células tumorais humanas.

O objetivo desta etapa do trabalho foi verificar a citotoxicidade *in vitro* de substâncias em linhagens de células tumorais humanas⁴. As células testadas foram: NCI-H358M (carcinoma brônquio-alveolar – humano), PC-3/M (câncer de próstata – humano) e OVCAR-8 (câncer de ovário – humano) obtidas através de doação do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Bethesda, MD). Para fazer os testes a caulerpina foi diluídas em DMSO nas concentrações estoques de 5mg/mL e 1mg/mL. A citotoxicidade foi obtida através do método do MTT (MOSMANN, 1983).

O ensaio consiste em uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2 tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) para formazan, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável (MOSMANN, 1983), permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células vivas. Inicialmente foi realizado um screening onde a caulerpina foi testada em concentração única (5 µg/mL), em duplicata (quadro 6) e foi observado que a caulerpina não apresentou atividade citotóxica promissora nas linhagens celulares NCI-H358M, PC-3/M e OVCAR-8, visto que, a substância somente será considerada com potencial citotóxico promissor quando houver taxa de inibição a partir de 60% em no mínimo 2 linhagens celulares avaliadas, o que não foi observado com a caulerpina.

⁴Ensaio realizado pela Profa. Dra. Claudia O. Pessoa (UFC)

Quadro 6. Screening da atividade citotóxica da caulerpina em linhagens de células tumorais humanas. Doxirrubicina (Dox) foi usada como controle positivo. A tabela esta apresentando a inibição da proliferação (%) realizado em duplicata pelo método do MTT após 72 horas de incubação.

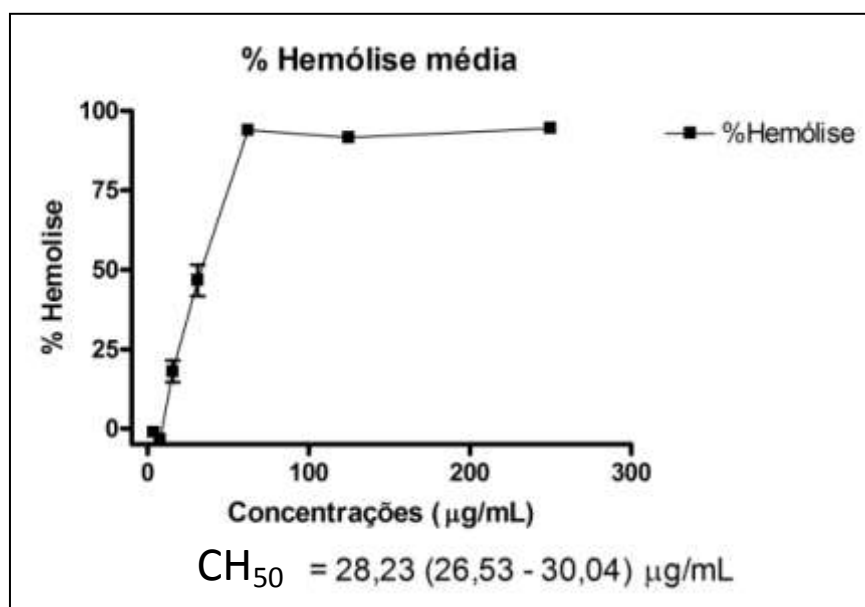
Amostra		NCI H385N	SD	OVCAR-8	SD	PC-3M	SD
Nº	Identificação	GI% (média)		GI% (média)		GI% (média)	
1	LQAL1	37,22%	6,08%	28,10%	2,51%	29,73%	2,96%
2	DOX	28,94%	15,51%	0,54%	2,83%	33,44%	5,40%

IV.2.2 Resultados farmacológicos obtidos com *Hypnea musciformis*

IV.2.2.1 Citotoxicidade em eritrócitos de camundongos Swiss e atividade antitumoral *in vitro* em linhagens de *Ehrlich*

A citotoxicidade do Extrato Metanólico Bruto (EMB_{HM}) de *Hypnea musciformis* foi avaliada frente a eritrócitos de camundongos Swiss. Durante a avaliação, observou-se que a porcentagem de hemólise aumentou de maneira dependente de concentração após o tratamento. O valor de CH₅₀ obtido foi de 28,23 (26,53 - 30,04) µg/mL (Gráfico 1).

Gráfico 1. Avaliação da citotoxicidade do extrato metanólico bruto de *Hypnea musciformis* em eritrócitos de camundongos Swiss.



Efeitos citotóxicos de diferentes substâncias podem estar relacionados com danos à membrana celular ou alterações em sua permeabilidade (HADNAGY; MARSETZ; IDEL, 2003). Sabendo-se que a membrana eritrócítica é uma estrutura delicada que pode ser significativamente alterada por interações com drogas (AKI; YAMAMOTO, 1991) o teste de hemólise *in vitro* é usado como método de triagem para toxicidade de substâncias estimando o dano, que podem induzir *in vivo*, nos eritrócitos (SCHREIER et al., 1997).

O valor de CH_{50} obtido do EMB_{HM} neste ensaio, demonstra que este produto foi ativo contra eritrócitos, uma vez que, segundo Santos Júnior e colaboradores (2010), um produto natural em estudo, para não apresentar atividade hemolítica, deve apresentar CH_{50} maior que 1250 $\mu\text{g/mL}$.

Tal atividade corrobora com achados na literatura, uma vez que estudos indicam que alguns metabólitos, tais como terpenoides presentes em *H. musciformis*, podem causar mudanças na membrana de células vermelhas sanguíneas e subsequentemente produzir hemólise (NG; LI; YEUNG, 1986; GRINBERG et al., 1997; ZHANG et al., 1997).

Na avaliação da atividade antitumoral *in vitro* do EMB_{HM} , a citotoxicidade foi avaliada frente a células de Tumor Ascítico de *Ehrlich*. A CI_{50} foi maior do que 2000 $\mu\text{g/mL}$. Desta forma, o resultado obtido sugere que o extrato metanólico bruto de *H. musciformis*, não apresenta atividade citotóxica frente esta linhagem de célula tumoral.

IV. 2.3 Resultados farmacológicos de *Bryothamnion triquetrum*

IV. 2.3.1 Citotoxicidade em eritrócitos de camundongos Swiss e atividade antitumoral *in vitro* em linhagens de *Ehrlich*

A citotoxicidade do Extrato Metanólico Bruto (EMB_{BT}) de *Bryothamnion triquetrum*, foi avaliada frente eritrócitos de camundongos Swiss. No experimento foram testadas concentrações de até 1000 $\mu\text{g/mL}$ não ocorrendo morte das células (hemólise) mostrando que o valor de CH_{50} foi de 3,71 $\mu\text{g/mL}$.

O resultado obtido sugere que EMB_{BT} apresenta baixa toxicidade frente eritrócitos, células estas comumente afetadas por drogas presentes na corrente sanguínea.

Entretanto, na avaliação da atividade antitumoral *in vivo* do EMB_{BT} em células de Tumor Ascítico de *Ehrlich*, a CI_{50} foi maior do que 2000 $\mu\text{g/mL}$. Desta forma, o resultado

obtido sugere que o extrato metanólico bruto de *B. triquetrum*, não apresenta atividade citotóxica frente esta linhagem de célula tumoral.

IV.2.3.2 Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório

O extrato metanólico bruto de *Bryothamnion triquetrum* (BT- MeOH) também foi avaliado quanto as possíveis atividades antinociceptiva e anti-inflamatória em modelos murinos⁵. Grupos de camundongos Swiss de ambos os sexos (25-30 g) foram utilizados durante todo o experimento. O potencial antinociceptivo do BT-MeOH foi avaliado por meio dos ensaios seguintes: contorção induzida por ácido acético, de ensaio de placa quente e de glutamato e de nocicepção induzida por formalina. A atividade anti-inflamatória de BT - MeOH foi investigada utilizando o teste de peritonite induzida por zimosana-A . Os testes foram conduzidos usando 100 mg/kg (v.o) de BT - MeOH , 33,3 mg/kg (v.o.) de dipirona , 35,7 mg/ kg (v.o.) de indometacina e 5,7 mg/kg (s.c.) de morfina . O extrato e todos os medicamentos padronizados foram administrados 40 min antes do estímulo nociceptivo/inflamatório. No teste de contorção induzida por ácido acético, BT-MeOH e dipirona inibiu a resposta nociceptiva em 55,9 % ($22,2 \pm 2,0$ contorções , $p < 0,01$) e 80,9 % ($9,6 \pm 2,1$ contorções , $p < 0,01$). No teste da placa quente, o BT-MeOH não aumentou o tempo de latência dos animais no momento avaliado. Além disso, o BT-MeOH inibiu a nocicepção induzida por glutamato em 50,1 %. Entretanto, BT - MeOH não inibiu a fase neurogênica em nocicepção induzida por formalina. A fase inflamatória foi inibida em 53,1 % ($66,8 \pm 14,2$ s ; $p < 0,01$) . Indometacina inibiu a fase inflamatória em 60,2 % ($56,8 \pm 8,7$ s , $p < 0,01$). No ensaio de peritonite induzida por zimosana, BT-MeOH inibiu 55,6 % ($6,6 \pm 0,2 \times 10^6$ leucócitos/ml, $p < 0,01$) a migração de leucócitos, enquanto a indometacina inibiu 78,1 % ($3,2 \pm 0,1 \times 10^6$ leucócitos/ml, $p < 0,01$). Com base nos resultados obtidos no presente estudo, foi concluído que o BT-MeOH tem atividades antinociceptiva periférico e anti-inflamatórias. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para confirmar essas propriedades.

⁵Ensaio realizado pelo aluno de mestrado Luiz Henrique A. Cavalcante Silva sob a orientação da Profa. Dra. Magna Suzana A. Moreira (LaFI-UFAL)(CAVALCANTE-SILVA et al., 2012).

Considerações finais



V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos neste estudo, confirma-se que os perfis de esteroides de algas vermelhas, são na sua maioria, relativamente simples e presentes em diversas espécies de algas, inclusive verdes, como em *Caulerpa mexicana*. Entretanto, a simplicidade das estruturas químicas, não descarta a importância das mesmas, visto que, relatados na literatura demonstraram suas importantes propriedades anti-inflamatórias (HANDA; CHAWLA; SHARMA, 1992), cardiotônicas (KELLY; SMITH, 1996), precursores da vitamina D e como anticoncepcionais orais (ARNSON; AMITAL; SHOENFELD, 2007). Estudos também demonstraram que o estigmasterol e o sitosterol, por exemplo, associados a outros esteroides, são efetivos no tratamento da hiperplasia benigna de próstata (HBP), doença que atinge acima de 50% dos homens com idade superior a 50 anos (CECHINEL FILHO, 2000).

Este trabalho também contribuiu através do isolamento do Di-isobutilftalato, com um sério estudo de isolamento de ftalatos naturais, que vem se realizando com as algas vermelhas em algumas partes do mundo. Estudos estes iniciados nos anos 70 (NOGUCHI, et al., 1979) e que até os anos atuais vem trazendo resultados significativos (GRESSLER et al., 2010).

Enfim, o isolamento neste trabalho da ceramida sulfonilada N-[(4E)-3-hidroxi-1-[[[(sodiooxi)sulfonil]oxi]non-4-en-2-il]dotriacontanamida da esponja marinha *Ircinia felix*, comprovou que muitos compostos isolados de ambientes marinhos possuem estruturas químicas únicas e bem diferentes daqueles encontradas em fontes naturais terrestres, apresentando as diversas atividades biológicas. Este fato motiva as pesquisas que levam ao desenvolvimento de novos métodos de isolamento e de síntese orgânica, bem como a importância ecológica e da atividade farmacológica destes produtos marinhos. Portanto, o isolamento de uma nova macromolécula traz sempre novas perspectivas de descoberta de um novo fármaco.

Diante do exposto, os experimentos com as algas marinhas têm demonstrado mais uma vez sua grande importância, podendo também mencionar o ponto de vista econômico e ambiental, pois as algas podem realizar a manutenção do equilíbrio biológico nos ambientes aquáticos, ocasionando a continuidade da fauna existente, que pode ser utilizada pela humanidade não apenas como fonte de moléculas bioativas, mas também como fonte de alimento e de matéria-prima.

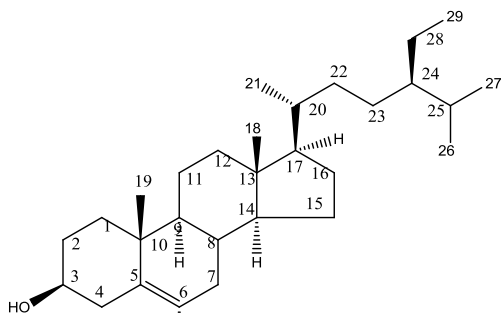
A importância das algas marinhas na América Latina, como recurso renovável, também vem crescendo continuamente porque seus volumes cada vez maiores de extração geram importantes divisas econômicas para o país produtor. Outros países da América do Sul estão muito mais adiantados que o Brasil na produção e extração de algas, embora o país seja reconhecido como avançado em nível acadêmico (CABRAL et al., 2001).

Conclusão

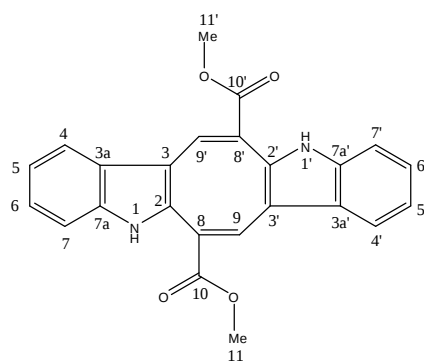


VI. CONCLUSÃO

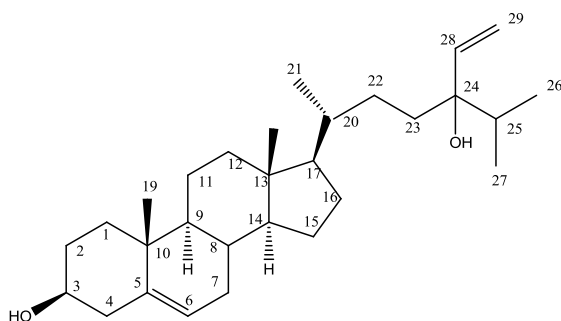
- Através de métodos cromatográficos usuais e técnicas espectroscópicas de IV, RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional e Massas, foi possível isolar e identificar sete substâncias:



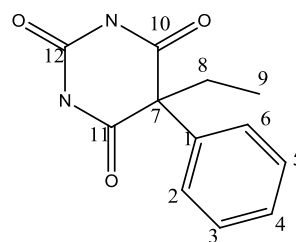
β -Sitosterol
Caulerpa mexicana



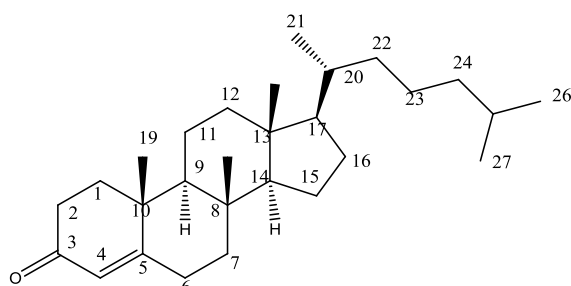
Caulerpina
Caulerpa mexicana



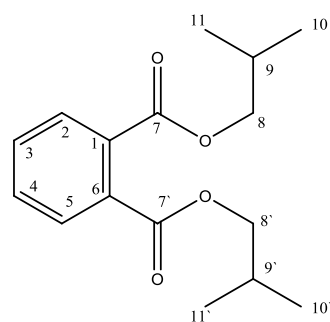
Saringosterol
Hypnea musciformis



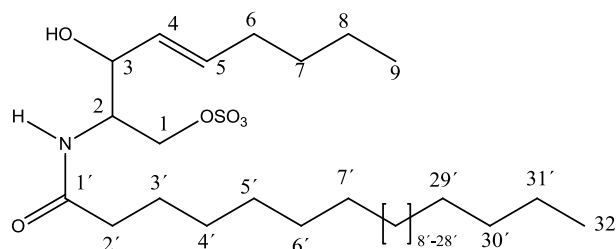
Fenobarbital
Hypnea musciformis



Colest-4-em-3-ona
Bryothamnion triquetrum



Di-isobutilftalato
Bryothamnion triquetrum



N-[(4E)-3-hidroxi-1-[(sodiooxi)sulfonil]oxi]non-4-en-2-il]dotriacontanamida
Ircinea felix

- O extrato metanólico bruto de *Hypnea musciformis* se apresentou ativo contra eritrócitos e o extrato metanólico bruto de *Bryothamnion triquetrum* apresentou baixa toxicidade;
- Os extratos metanólicos brutos de *Hypnea musciformis* e *Bryothamnion triquetrum* em linhagens de células tumorais de *Ehrlich in vitro*, não apresentaram atividade;
- A substância isolada caulerpina e os extratos de *Caulerpa mexicana* e *Bryothamnion triquetrum* foram disponibilizados ao Laboratório de farmacologia e Imunidade (LAFI-UFA) e para o Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFRN para avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, e apresentaram resultados significativos;
- A substância isolada caulerpina foi disponibilizada ao Laboratório de Farmacologia do Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos UFPB, o qual apresentou efeito espasmolítico no íleo de cobaia; A mesma também foi disponibilizada ao Laboratório de Farmacologia da UFC, para avaliação da sua toxicidade em linhagens de células tumorais humanas e não apresentou resultado satisfatório.

Referências



REFERÊNCIAS

- ABRANTES, J. L.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, D.; PEREIRA, R. C.; FREDERICO FONTES, C.L.; TEIXEIRA, V. L.; MORENO SOUZA, T. L.; PAIXÃO, I. C. The effects of the diterpenes isolated from the Brazilian brown algae *Dictyota affinis* and *Dictyota menstrualis* against the herpes simplex type-1 replicative cycle. **Planta Medica**, v.76(4), p. 339-44, 2010.
- AFAQ-HUSAIN, S.; SHAMEEL, M.; USMANGHAMI, K.; AHMAD, M.; PERVEEN, S.; AHMAD, V. U. Brominated Sesquiterpene Metabolites of *Hypnea Pannosa* (Gigartinales, Rhodophyta). **Journal of Applied Physiology**, v. 3 (2), p. 11-113, 1991.
- AGUILAR, S.; GERTRUDES. Dep. of Bot., Univ. of Hawaii, Honolulu, HI, USA. **Journal of the Chemical Society** [Section] C: Organic. 1970.
- AHMED, W.; AHMAD, Z.; MALIK, A. Stigmasterol galactoside from *Rhynchosia minima*. **Phytochemistry**, v. 31, 1992.
- AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis. Flow microcalorimetric approaches. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, p. 133-138, 1991.
- ALBUQUERQUE, M. R.; CAMPOS-TAKAKI; KOENING, M. L. Detection of antimicrobial activity in marine seaweeds. **Revista Instituto de Antibióticos**, v. 21, p. 127-138, 1983.
- ALMEIDA, J.G.; MAIA, A. I.V.; WILKE, D. V.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; CLAIR, J. J. L.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, O. D. L. Palyosulfonoceramides A and B: Unique Sulfonlated Ceramides from the Brazilian Zoanthids *Palythoa caribaeorum* and *Protopalythoa variabilis*, **Marine Drugs**, v.10, p.2846-2860, 2012.
- ALMEIDA, A. M. P.; BERLINCK, R.G. S Alcaloides alquilpiridínicos de esponjas marinhas. **Química Nova**, v. 20 (2), p. 170-185, 1997.
- ALVES, M. G. C. F.; DORE, C. M. P. G.; CASTRO, A. J. G.; NASCIMENTO, M. S.; CRUZ, A. K. M.; SORIANO, E. M.; BENEVIDES, N. M. Barros.; LEITE, E. L. Antioxidant, cytotoxic and hemolytic effects of sulfated galactans from edible red alga *Hypnea musciformis*. **Journal of Applied Physiology**, v. 24, p. 1217-1227, 2012.
- AMICO, V.; ORIENTE, G.; PIATTELLI, M.; TRINGALI, C.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; MAYOL, L. Caulerpenyne, an unusual sesquiterpenoid from the green alga *Caulerpa prolifera*. **Tetrahedron Letters**, v. 38, p. 3593-3596, 1978.
- AMSLER, C. D. **Algal Chemical Ecology**. Springer: Berlin, 2008.

ANJANEYULU, A. S. R. ; PRAKASHI, C. V. S.; MALLAVADHANI, U. V. Sterols and terpenes of the marine green algal species *Caulerpa racemosa* and *Codium decorticatum*. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 68 8, p. 480, 1991.

ANJANEYULU, A. S. R.; PRAKASH, C. V. S.; RAJU, K. V.S. & MALLAVADHANI U. V. Isolation of new aromatic derivatives from a marine algal species *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**. v. 55 (4), p. 496-499, 1992.

ARA, J.; SULTANA, V.; EHTESHAMUL-HAQUE, S.; QASIM, R.; AHMAD, V. U. Cytotoxic activity of marine macro-algae on *Artemia salina* (Brine Shrimp). **Phytother Res**, v. 13 (4), p. 304-307, 1999.

ARECES, A.J.; MARTÍNEZ-IGLESIAS, J.C. Dinámica, estacionalidad, y efectos de la epifauna colonizadora sobre el cultivo de la agarófita *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. **Avicennia**, v. 10, p. 43-59, 1993.

ARNSON, Y.; AMITAL, H.; SHOENFELD, Y.; Vitamin D and autoimmunity: new etiological and therapeutic considerations. **Ann Rheum Dis**, v. 66, p. 1137-42, 2007.

AYYAD, S. E. N.; BADRIA, F. A. Caulerpine: an antitumor indole alkaloid from *Caulerpa racemosa*. **Alexandria Journal of Pharmaceutical**, v. 8 (3), p. 217-219, 1994.

AYYAD, S. E. N.; Sowellim, S. Z. A.; El-Hosini, M. S.; Abo-Atia, A. The Structural Determination of a New Steroidal Metabolite from the Brown Alga *Sargassum asperifolium*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58c, p. 333-336, 2003.

BABU, M.; TRIVEDI, G. K.; MATHUR, H. H. DIKETOSTEROID FROM MARINE RED ALGA HYPNEA MUSCIFORMIS. **Phytochemistry**, v. 28(11), p. 3237–3239, 1989.

BABU, J. M.; MATHUR, H. H.; TRIVEDI, G. K.; An hydroxy diketosteroid from the marine red alga *Hypnea musciformis*. **Phytochemistry**, v. 29 (6), p. 2029-2031, 1990.

BLACMAN, A. J.; WELLS, R. J. Flexilin and tritarin, terpene 1,4-diacetoxy 1,3-dienes from two *Caulerpa* species. **Tetrahedron Letters**, v. 33, p. 3063-3064, 1978.

BLUNT, J. W. et al. **Marine Natural Products**. Nat. Prod. Rep., Londres, v. 27, p. 2010.

BOTANY. University of Hawaii at Manoa. **Algae: invasive Alien Hypnea musciformis**. **J. V. Lamouroux 1813**, 2001.

BRAYNER, S.; PEREIRA, S. M. B.; BANDEIRA-PEDROSA, M. E. Taxonomia e distribuição do gênero *Caulerpa* Lamouroux (Bryopsidales - Chlorophyta) na costa de Pernambuco e Arquipélago de Fernando de Noronha, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 22(4), p. 914-928, 2008.

- CABRAL, I. S. R.; SHIRAHIGUE, L. D.; ARRUDA, L. F.; CARPES, S. T.; OETTERER, M. Produtos Naturais De Algas Marinhas E Seu Potencial Antioxidante E Antimicrobiano. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 181-192, 2011.
- CALVETE, J. J.; COSTA, F. H. F.; SAKER-SAMPAIO, S.; MURCIANO, M. P. M.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S. The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 57, p. 343–350, 2000. **Marine Drugs**, 10, 1977-1992, 2012.
- CAPON, R. J.; CHISALBERTI, E. L.; JEFFERIES, P. R. Metabolites of the green algae, *Caulerpa* species. **Phytochemistry**, v. 22 (6), p. 1465-1467, 1983.
- CARVALHO, F. A. F. Bionomia bentica do complexo recifal no litoral do estado da Paraíba, com ênfase nas macrófitas. Tese (doutorado). **Departamento de Oceanografia Biologias**, Instituto Oceanográfico – Universidade de São Paulo. São Paulo. 134 p, 1983.
- CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; CORREIA, A. C. C.; BARBOSA-FILHO, J. M., SILVA, B. A.; SANTOS, B. V. O.; LIRA, D. P.; SOUSA, J. C. F; MIRANDA, G. E. C.; CAVALCANTE, F. A.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Spasmolytic Effect of Caulerpine Involves Blockade of Ca^{2+} Influx on Guinea Pig Ileum. **Marine Drugs**, v. 11, p. 1553-1564, 2013.
- CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; MATTA, C. B. B.; ARAÚJO, M. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIRA, D. P.; SANTOS, B. O. S.; MIRANDA, G. E. C.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Crude Methanolic Extract of Red Alga *Bryothamnion triquetrum*. **Marine Drugs**, v. 10, p. 1977-1992, 2012.
- CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**, 23(5), p. 680-685, 2000.
- CHEN, C. Y. Biosynthesis of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) from red alga *Bangia atropurpurea*. **Water Research**, v. 38, p. 1014–1018, 2004.
- COLLIER, H. O.J; DINNEN, J. C.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Britshi Journal of Pharmaceutical Chemotherapy**, v. 32, p. 295-310, 1968.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C. & EPIFANIO, R. A. Organismos Marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico & Perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 3, 2009.
- DELLAI A.; MARICIC I.; KUMAR V.; ARUTYUNYAN S.; BOURAOU A.; NEFZI A. Parallel chirimolacyclopeptide B and their analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, p. 19-20, 2010.

DUQUE, C., BONILLA, A., BAUTISTA, E., and ZEA, S. Exudation of low molecular weight compounds (thiobismethane, methyl isocyanide, and methyl isothiocyanate) as possible chemical defense mechanism in the marine sponge *Ircinia felix*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29(5), p. 459-467, 2001.

ECHAVARRIA, B.;FRANCO, A.; MARTINEZ, A. Evaluation of antioxidant activity and determination of phenolic compounds content in extracts from Colombian Caribbean macroalgae. **Vitae**, v.16 (1), 2009.

EMURA, C.; HIGUCHI, R.; MIYAMOTO, T. Irciniasulfonic acid B, a novel taurine conjugated fatty acid derivative from a Japanese marine sponge, *Ircinia* sp. **Tetrahedron**, v. 62, p. 5682–5685, 2006.

FALLARERO, A.; LOIKKANEN, J. J.; MÄNNISTÖ, P. T.; CASTAÑEDA, O.; VIDAL, A. Effects of aqueous extracts of *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux and *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe on hydrogen peroxide and methyl mercuryinduced oxidative stress in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. **Phytomedicine**, v. 10, p. 39–47, 2003.

FALLARERO, A.; PELTOKETO, A.; LOIKKANEN, J.; TAMMELA, P.; VIDAL, A.; VUORELA, P. Effects of the aqueous extract of *Bryothamnion triquetrum* on chemical hypoxia and aglycemia-induced damage in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. **Phytomedicine**, v. 13, p. 240–245, 2006.

FATTORUSSO,E.; MAGNO,S: SANTACROCE, C.; SICA, D.; IMPELLIZZERI, G.; MANGIAFICO, S.; ORIENTE, G.; PIATTELLI, M.; SCIUTO, S. Constituents of red algae. Part 2. Sterols of some red algae. **Phytochemistry**, v. 14, p. 1579–1582, 1975.

FEITOZA, C. M.; BEZERRA, M. Z. B. Constituintes Químicos de *Philodendron imbe* Schott. **Quimica Nova**, v. 30(1), p. 41-44, 2007.

FERNANDEZ, L. E.; VALIENTE, O. G.; GARCIA, R.; CASTRO, H. V.; MACHYTKA, D.; SOLDOS-MADYA, V.; NESZMÉLYI, A. A ¹H- and ¹³C-n.m.r. study of an agar polysaccharide from *Bryothamnion triquetrum*. **Carbohydrate Research**, v. 163, p. 143-147, 1987.

FERRANDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Antiinflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Inflammation Research**, v. 32, p. 283-288, 1991.

FOLMER, F.; JASPARS, M.; SCHUMACHER, M.; DICATO, M. & DIEDERICH, M. Marine natural products targeting phospholipases A2. **Biochemical Pharmacology**, v. 15, p. 12-80, 2010.

GLOWINKOWSKI, S.; JURGA, S.; SUCHANSKI, W.; SZCZESNIAK, E. Local and global dynamics in the glass-forming di-isobutyl phthalate as studied by ^1H NMR. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 7, p.313-317, 1997.

GOSAVI, K.; BABU, J. M.; MATHUR, H. H.; BHADBHADE, M. Isolation and x-ray structure of a new 3,6-diketo steroid from red alga *Hypnea musciformis*. **Chemistry letters**, v. 7, p. 519, 1995.

GRESSLER, V.; FUJII, M. T.; YOKOYA, N. S.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. **Identificação de ftalatos naturais em espécies de algas vermelhas marinhas coletadas no estado do Espírito Santo, Brasil**. Resumo publicado na 33a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010.

GRINBERG, L. N.; NEWMARK, H.; KITROSSKY, N.; RAHAMIM, E.; CHEVION, M.; RACHMILEWITZ, E. A. Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 54(9), p. 973-978, 1997.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G.M. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: <http://www.algaebase.org>. Acesso em: 08de janeiro de 2013.

HADNAGY, W.; MARSETZ, B.; IDEL, H. Hemolytic activity of crystalline silica – Separated erythrocytes versus whole blood. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 206 (2), p. 103-107, 2003.

HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; FERNANDEZ, J. C.C. **Esponjas Marinhas da Bahia**. Guia de campo e laboratório. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2011.

HANDA, S. S.; CHAWLA, A. S.; SHARMA, A. K.; **Fitoterapia**, v. 63, p. 3, 1992.

HANDLEY, J. T.; BLACKMAN, A. J. Monocyclic diterpenes from the marine alga *Caulerpa trifaria* (Chlorophyta). **Australian Journal of Chemistry**, v. 53(1), p. 67-71, 2001.

HAYEE-MEMON, A.; SHAMEEL, M.; USMANGHANI, K.; AHMAD, M.; AHMAD, V. U. Phytochemical Examination of *Hypnea valentiae* (Gigartinales, Rhodophyta). **Pakistan Journal of Botany**, v. 23 (1), 1991.

IMPELLIZZERI, G.; MANGIAFICO, S.; ORIENTE, G.; PIATTELLI, M.; SCIUTO, S.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; SANTACROCE, C.; SICA, D.; Constituents of red algae. Part i. Amino acids and low molecular weight carbohydrates of some marine red algae. **Phytochemistry**, v. 14, p. 1549–1557, 1975.

JANOSIK, T.; JOHNSON, A.; BERGMAN, J. Synthesis of the marine alkaloids rhopaladins A, B, C and D, **Tetrahedron**, 58 (14), p. 2813 – 2819, 2002.

JOULE, J. A.; MILLS, K.; SMITH, G. F., *Indoles: Reactions and Synthesis*. Stanley Thomes, **Cheltenham**, p. 305., 1988.

KELECOM, A. Marine Natural products in Brazil. Part1. Isolation and structural determination. **Journal of the Brazilian Association for the advancement of science**, v.49,(5/6), p. 321-330, 1997.

KELLY, R. A.; SMITH, TW. **Pharmacological Treatment of Heart Failure**, 9 ed, McGraw-Hill Comp, 1996.

KEVEKORDES, K.; HOLLAND, D.; HAUBNER, N.; JENKINS, S.; KOSS, R.; ROBERTS, S.; RAVEN, J.A.; SCRIMGEOUR, C.M.; SHELLY, K.; STOJKOVIC, S.; BEARDALL, J. Inorganic carbon acquisition by eight species of *Caulerpa* (Caulerpacae, Chlorophyta). **Phycologia** v. 45, p. 442-449, 2006.

KHOTIMCHENKO, S. V. Fatty Acid Composition of Green Algae of the Genus *Caulerpa*. **Botanica Marina**,v. 38 (6), p. 509-512, 1995.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2351–2355, 1990.

KOSSUGA, M. H. **Metabólitos secundários bioativos de invertebrados marinhos: Isolamente, Determinação Estrutural e Atividades Biológicas**. Tese. Intituto de Química de São Carlos. 2008

LAM, D. W.; ZECHMAN, F. W. Phylogenetic analyses of the Bryopsidales (Ulvophyceae, Chlorophyta) based on RUBISCO large subunit gene sequences. **Journal of Phycology**, v. 42, p. 669-678, 2006.

LANG, K. L. **Investigação Química e Biológica da Alga vermelha *Acanthophora Spicifera* (Vahl) Borgesen**. Disseratção da Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. Animal models of nociception. **Pharmacology Review**, v. 53 (4), p. 597-652, 2001.

LI, Z.; WANG, B.; ZHANG, Q.; QU, Y.; XU, H.; LI, G. Preparation and antioxidant property of extract and semipurified fractions of *Caulerpa racemosa*. **Journal of Applied Physiology**, v. 24, p. 1527-1536, 2012.

LIMA, R. F. Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. **Journal of Pharmacology**, v. 56, p. 1415-1421, 2004.

LIU, A.; LIU, D.; LIANG, T.; YU, X.; FENG, M.; YAO, L. Caulerprenylols A and B, two rare antifungal prenylated para-xylenes from the green alga *Caulerpa racemosa*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 2491–2494, 2013 a.

LIU, D.; MAOA, S.; ZHANG, H.; YU, X.; FENG, M. Caulerprenylols Racemosins A and B, two novel bisindole alkaloids from the green alga *Caulerpa racemosa*. **Fitoterapia**, v. 91, p. 15–20, 2013b.

LONG, R. C.; GOLDSTEIN, J. H. Carbon-13 NMR Spectra of Enriched Phenobarbital, Pentobarbital, and Dilantin. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 16, p. 228-234, 1974.

LORENZO, V. P. **Estudo Fitoquímico com fins farmacológicos da Alga Bentônica *Caulerpa racemosa***. Dissertação da Universidade Federal da Paraíba. 2010.

LUCENA, L. A. F.; KANAGAWA, A. I.; MARTINS, G. J. M.; TARGINO, C. H.; MIRANDA, G. E. C.; HORTA, P. A. Levantamento da Flora do Infralitoral do Município de Pitimbu, Litoral Sul do Estado da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5(2), p. 585-587, 2007.

MAIA, R. M.; MOURA, C. W. N.; BISPO, V. S.; SANTOS, J. L. A.; SANTANA, R. S.; MATOS, H. R. Avaliação do sequestro do óxido nítrico (NO) pelo extrato metanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* (Gmelin) Howe. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20(4), p. 489-493, 2010.

MARINHO-SORIANO, E.; PINTO, E.; YOKOYA, N. S.; COLEPICCOLO, P.; TEIXEIRA, V. L.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. Avanços na pesquisa de bioativos de algas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21(2), 2011.

MATTA, C. B. B.; SOUZA, E. T.; QUEIROZ, A. C.; LIRA, D. P.; ARAÚJO, M. V.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; MIRANDA, G. E. C.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SANTOS, B. O.; ALEXANDRE-MOREIRA, S. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activity from Algae of the Genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**, 9(3), 2011.

MENDES, G. S.; BRAVIN, I. C.; Yoneshigue-Valentin, Y.; YOKOYA, N. S.; VILLELA, M. T. Anti-HSV activity of *Hypnea musciformis* cultured with different phytohormones **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22(4), p. 789-794, 2012.

MENESES, P.; NAVARRO, J. N.; T. GLONEK. ALGAL PHOSPHOLIPIDS BY ³¹P NMR: COMPARING ISOPROPANOL PRETREATMENT WITH SIMPLE CHLOROFORM/METHANOL EXTRACTION. **Int. Journal of Biochemistry**, v. 25, (6), p. 903-910, 1993.

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

MULLER, W.E.G., **Sponges (Porifera)**. ISBN 354000968X, Springer-Verlag BerlinHeidelberg, p.1-33/ 36-88, 2003

MUNRO, M. H. G.; BLUNT, J. W.; **Marine Literatura DataBase (MarinLit)**, University of Canterbury, New Zealand, 2009.

NAKAMURA, H.; YAMAGUCHI, S.; HAYASHI, T.; BABA, M.; OKADA, Y.; TANAKA, J.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; OKUYAMA, T. Studies on the biological activities of marine algae(III). Antitumor promoting activity and inhibitory effect of aldose reductase. **Natural Medicine**, v. 51 (2), p. 162-169, 1997.

NASCIMENTO-NETO, L. G.; CARNEIRO, R. F.; SILVA, S. R.; SILVA, B. R.; ARRUDA, F. V. S.; CARNEIRO, V. A.; TEIXEIRA, E. H.; NAGANO, C. S. Characterization of Isoforms of the lectin isolated from the Red Algae *Bryothamnion Seaforthii* and its pro-Healing effect. **Marine Drugs**, v.10, p. 1936-1954, 2012.

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

NG, T. B.; LI, W. W.; YEUNG, H. W. A steryl glycoside fraction with hemolytic activity from tubers of *Momordica cochinchinensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 18, p. 55-61, 1986.

NIELSEN, P. G.; CARLE, J. S.; CHRISTOPHERSENC, C. Final structure of caulerpicin, a toxic mixture from the green alga *Caulerpa raceniosa*. **Phytochemistry**, v. 21, p. 1643-1645, 1982.

NOGUCHI, T.; IKAWA, M.; UEBEL, J. J.; ANDERSEN, K. K. **Lipid constituents of the red algae *Ceramium rubrum*. A search for antimicrobial and chemical defense substances**. In: Hoppe HA, Levring T, Tanaka Y, editors. Marine algae in pharmaceutical science. New York: Walter de Gruyter & Co. 1979.

NOVOA, A. V., MOTIDOME, M.; MANCINI-FILHO, J.; LINARES, A. F.; TANAE, M. M.; TORRES, L. M. B.; LAPA, A. J. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37(3), p. 373-382, 2001.

OLIVEIRA-CARVALHO, M. F. **Taxonomia, distribuição geográfica e filogenia do gênero *Codium stackhouse* (Bryopsidales-Bhlorophyta) no litoral brasileiro**. Tese do Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2008.

OLIVEIRA-CARVALHO, M. F.; PEREIRA, S. M. B.; ZICKEL, C. S. Florística e distribuição espaço-temporal das clorofíceas bentônicas em trechos recifais do litoral norte do Estado de Pernambuco – Brasil. **Hoehnea** v. 30 (3), p. 201-212, 2003.

PATRÍCIO, C.; LIMA, P. **Estudo de extratos de uma esponja marinha com atividade neurobiológica**. Relatório de Projeto: Bolsas Universidade de Lisboa /Fundação Amadeu Dias, 2011.

PAUL, V. J.; FENICAL, W. Diterpenoid metabolites from pacific marine algae of the order Caulerpales (Chlorophyta). **Phytochemistry**, v. 24 (10), p. 2239-2243, 1985.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4 ed. Cengage Learning: são Paulo, 2010.

PAWLIK, J. R.; MCFALL, G.; ZEA, S. Does the odor from sponges of the genus *Ircinia* protect them from fish predators? **Journal of Chemical Ecology**, v. 28(6), p. 1103-1115, 2002.

PEREZ, R. M.; AVILA, J. G.; PEREZ, S.; MARTINEZ, A.; MARTINEZ, G. Antimicrobial activity of some american algae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29 (1), p. 111-116, 1990.

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

PINTO, V. P. T.; DEBRAY, H.; DUS, D.; TEIXEIRA, E. H.; OLIVEIRA, T. M.; CARNEIRO, V. A.; TEIXEIRA, A. H. TEIXEIRA.; FILHO, G. C. Lectins from the Red Marine Algal Species *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum* as Tools to Differentiate Human Colon Carcinoma Cells. **Advances in Pharmacological Sciences**, 2009.

PREMANATHAN, M.; KATHIRESAN, K.; CHANDRA, K.; BAJPAI, S. K. In vitro anti-vaccinia virus activity of some marine plants. **Journal of Medical Research**, v. 99(5), p. 236-238, 1994.

PREMANATHAN, M.; KATHIRESAN, K.; CHANDRA, K. Antiviral evaluation of some marine plants against semliki forest virus. **International Journal of Pharmacology**, v. 33 (1), p. 75-77, 1995.

PROKSCH, P.; EDRADA-EBEL, R.; EBEL, R. Drugs from the Sea-Opportunities and Obstacles. **Marine Drugs**, v.1 (1), p. 5-17, 2003.

PUJOLA, C. A.; RAYB, S.; RAYB, B.; DAMONTEA, E. B. Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 412-6, 2012.

RADWAN, M. A. A.; RAGAB, E. A.; SABRY, N. M. EL-SHENAWY, S. M. Synthesis and biological evaluation of new 3-substituted indole derivatives as potential anti-inflammatory and analgesic agents. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3832-3841, 2007.

RASHID, M. A.; GUSTAFSONB, K. R.; BOYDB, M. R. New chondropsin macrolide lactams from marine sponges in the genus *Ircinia*. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 1623–1626, 2001.

RAUB, M. F.; CARDELLINA II, J. H.; SCHWEDE, J. G. The green algal pigment caulerpin as a plant growth regulator. **Phytochemistry**, v. 26(3), p. 619-620, 1987.

RIBEIRO, S. M. **Ecologia química de esponjas marinhas: multifuncionalidade, variação congênica, intrapopulacional, latitudinal e estádios de vida**. Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense. 2008.

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

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

SCHENKMAN, R. P. F. *Hypnea musciformis* (Rhodophyta): influência ecológica sobre o crescimento. **Journal of Phycology**, v. 25, 1989.

SCHREIER, H.; GAGNÉ, L.; BOCK, T.; ERDOS, G. W.; DRUZGALA, P.; CONARY, J. T.; MÜLLER, B. W. Physicochemical properties and in vitro toxicity of cationic liposome cDNA complexes. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 72, p. 215-223. 1997.

SCHRODER, H. C.; BADRIA, F. A.; AYYAD, S. N.; BATEL, R.; WEINS, M.; HASSENEIN, H. M. A.; KURELEC, B.; MULLER, W. E. G. ENVIRON. **Toxicology and Pharmacology**, 5, pp. 119–126, 1998.

SCHWEDE, J. G.; CARDELLINA II, J. H.; GRODE, S. H.; JAMES JR, T.R.; BLACKMAN, A. J. Distribution of the pigment caulerpin in species of the green alga *Caulerpa*. **Phytochemistry**, v. 26(1), p. 155-158, 1987.

SILVA, P. C.; BASSON, P. W.; MOE, R. L. Catálogo das algas marinhas bentônicas do Oceano Índico. **Botânica** v. 79, 1996.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMS, J. J.; FENICAL, W.; WING, R.M.; RADLICK, P. Marine natural products. I. Pacifenol, a rare sesquiterpene containing bromine and chlorine from the red alga, *Laurencia pacifica*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, p. 3774–3775, 1971.

SIMS, J.J.; LIN, G. H. Y.; WING, R. M. Marine natural products. X. Elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga *Laurencia elata*. **Tetrahedron Lett**, v. 39, p. 3487–3490, 1974.

SOUSA, M. B.; PIRES, K. M. S.; ALENCAR, D. B.; SAMPAIO, A. H.; SAKER-SAMPIO, S. α -, β -caroteno e α -tocoferol em algas marinhas in natura α - and β -carotene, and α -tocopherol in fresh seaweeds. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28(4), p. 953-958, 2008.

SRIDHAR, P.; LAKSHMI, V. V.; POLASA, H. REDDY, V. S.; RAO, C. P.; SRIMANNARAYANA, G. Biological activity of some marine algal extracts. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 13(2), p. 90-91, 1984.

STAM, W. T.; OLSEN, J. L.; ZALESKI, S. F.; MURRAY, S. N.; BROWN, K. R.; WALTERS, L. J. A forensic and phylogenetic survey of *Caulerpa* species (*Caulerpales*, *Chlorophyta*) from the Florida coast, local aquarium shops, and e-commerce: establishing a proactive baseline for early detection. **Journal of Phycology**, v. 42, p. 1113-1124, 2006.

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

STEFANOV, K.; KONAKLIEVA, M.; BRECHANY, E. Y.; CHRISTIE, W. W. Fatty acid composition of some algae from the black sea. **Phytochemistry**, v. 27, 1988.

SU, J.-Y.; ZHU, Y.; ZENG, L.-M.; XU, X.-H. A New Bisindole from Alga *Caulerpa serrulata*, **Natural. Products Reports**, v. 60 (10), p. 1043 –1044, 1997.

SU, B. N; MUSICO, R.; PARK, E. J.; SANTARSIERO, B. D.; MESECAR, A. D.; FONG, H. H. S.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Isolation and characterization of bioactive principles of the leaves and stems of *Physalis philadelphica*. **Tetrahedron**, v. 58, p. 3453-3466, 2010.

SUZUKI, M.; MATSUO, Y.; TAKAHASHI, Y.; MASUDA, M. Callicladol, a novel cytotoxic bromotriterpene polyether from a Vietnamese species of the red algal genus *Laurencia*. **Chemistry Letters**, v. 11, p. 1045–1046, 1995.

TALAZ, O.; SARACOGLU, N., A study on the synthesis of structural analogs of bis-indole alkaloid caulerpin: a step-by-step synthesis of a cyclic indole-tetramer **Tetrahedron**, v. 66 (10), p. 1902 –1910. 2010.

TAKADA, N.; SATO, H.; SUENAGA, K.; ARIMOTO, H.; YAMADA, K.; UEDA, K.; Uemura, D. Isolation and Structures of Haterumalides NA, NB, NC, ND, and NE, Novel Macrolides from an Okinawan Sponge *Ircinia* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 40, p. 6309-6312, 1999.

TAYLOR, W. R. **Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas**. Ann Arbor: The University of Michigan Press, 1960.

TEIXEIRA, E.H.; NAPIMOGA, M. H.; CARNEIRO, V. A.; OLIVEIRA, T. M.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; SOUZA, J. B.; HAVT, A.; PINTO, V. P. T.; GONÇALVES, R. B.; CAVADA, B. S. In vitro inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1001-1006, 2007.

TEIXEIRA, V. L. **A cura que vem do mar**. Série Oceanos. São Paulo: Scientific American, v. 4, p. 77-82, 2009.

THANGAM, T. S.; KATHIRESAN, K. Repellency of marine plant extracts against the mosquito aedes aegypti. **International Journal of Pharmacology**, v. 31(3), p. 321-323, 1993.

TITTLE, I.; NETO, A. I. "*Expedição Açores 1989*": **Algas marinhas Benthic (algas) registrou do Faial e do Pico**, v. 12, 1994.

TOMAZ, A. C. A.; NOGUEIRA, R. B. S. S.; PINTO, D. S.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V.; LEITÃO DA-CUNHA, E. V. Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham.& Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18(1),p.47-52, 2008.

USMANGHANI, K. SHAMEEL, M.; SUALEH, M.; KHAN, K. H.; MAHMOOD, Z. A. **Fitoterapia**, v. 55(2), p. 73-77, 1984.

VEST, S. E.; DAWES, C. J.; ROMEO, J. T. Distribution of caulerpin and caulerpicin in eight species of the green alga *Caulerpa* (Caulerpales). **Botanica Marina**, v. 26, p. 313-316, 1983.

VIDAL, A. Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 509-600, 2006.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v.27 (1), p. 139-145, 2004.

WAHIDULLA, S.; D'SOUZA, L.; GOVENKER, M. Lipid constituents of the red alga *Acantophora spicifera*. **Phytochemistry**, v. 48(7), p. 1203-1206, 1998.

WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; ARAÚJO, R. M.; SILVA, W. M. B.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V. Pro-apoptotic activity of lipidic a-

amino acids isolated from *Protopalythoa variabilis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 7997–8004, 2010.

WYNNE, M.J. A checklist of benthics marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: first revision. **Nova Hedwigia Beiheft** v. 129, p. 1-152, 2005.

XU, S. H.; CEN, Y. Z.; ZENG, L. M. Isolation and identification of red prisms from *Caulerpa sertularioides*. **Huaxue Shijie**, v. 20(5), p. 265-266, 1998.

ZE, S., PARRA, F. J., MARTÍNEZ, A., and DUQUE, C. Production of bioactive furanosesterterpene tetronic acids as a possible internal chemical defense mechanism in the sponge *Ircinia felix* (Porifera Demospongiae). **Queensland Museum**, v. 44, p. 687-696, 1999.

ZHANG, A.; ZHU, Q. Y.; LUK, Y. S.; HO, K. Y.; FUNG, K. P.; CHEN, Z. Y. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. **Life Sciences**, v. 61, p. 383-394, 1997.

ZUBIA, M. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, México. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, p. 449-458, 2007.

ANEXO

Publicações decorretentes deste trabalho