

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**TRIAGEM DE MACROALGAS BÊNTICAS DO LITORAL DE  
SANTA CATARINA BIOMONITORADA PELO ENSAIO DE  
LETALIDADE PARA LARVAS DE *ARTEMIA SALINA* E  
INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DE *PTEROCLADIELLA  
CAPILLACEA***

**CINTIA LHULLIER**

Florianópolis  
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

TRIAGEM DE MACROALGAS BÊNTICAS DO LITORAL DE SANTA CATARINA  
BIOMONITORADA PELO ENSAIO DE LETALIDADE PARA LARVAS DE  
*ARTEMIA SALINA* E INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DE *PTEROCLADIELLA*  
*CAPILLACEA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Miriam de Barcellos Falkenberg

CINTIA LHULLIER

FLORIANÓPOLIS

2005

*“Não há nada como o sonho para criar o futuro.”*

Leonardo da Vinci

## AGRADECIMENTOS

Agradeço sobretudo à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Miriam, por todo o conhecimento e dedicação a pesquisa, mas principalmente por ter acreditado em um sonho e prosseguir nele.

A todos professores do Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina por contribuírem na minha formação.

Agradeço a UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia pela disponibilidade de recursos para realização deste trabalho. Ao CNPq pela bolsa de pesquisa e financiamento do trabalho.

Agradeço imensamente a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Clarice Azevedo Machado pelo incentivo a pesquisa na área de Farmacognosia e pelo carinho e amizade.

Agradeço ao Prof. Dr. Jorge Palermo pelas análises de ressonância magnética nuclear e por toda ajuda científica.

Aos colegas de mestrado, Teo, Giovana, Marcelo, Aline, Patrick, Melissa, Silvana, Sylvania, Lorena e Daiane que me receberam com muito carinho e são grandes amigos.

Aos meus colegas de laboratório, Beatriz e Pablo, mais que colegas, companheiros na pesquisa e ótimos amigos. A Solange por toda ajuda e amizade.

Agradeço profundamente aos meus amigos, Paulinho, Arlene, Pipoca, Lena e Gisele, que além de colegas de Biodança são ótimos companheiros de vida.

A dois amigos especiais, Alzira e Marcos, por tudo.

A Danusa pela amizade, pelo carinho, pela ajuda e principalmente pela felicidade de viver e crescer com muita liberdade.

Agradeço a minha família, a minha irmã, Cristina, pelo carinho. Aos meus pais por acreditarem no meu sonho e principalmente pelo amor.

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	<b>vii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>viii</b>
<b>Lista de tabelas</b> .....	<b>ix</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>xi</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>01</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>04</b>
<b>3. Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>05</b>
3.1. Produtos Naturais Marinhos.....	05
3.1.1. Macroalgas Bênticas.....	09
a) Alimentação.....	10
b) Área Industrial (filacóides).....	11
c) Fertilizantes.....	11
d) Ficobiliproteínas.....	12
e) Compostos com propriedades medicinais.....	12
3.1.1.1. Macroalgas Bênticas no Brasil e no Estado de Santa Catarina.....	17
3.1.1.2. <i>Pterocliadiella capillacea</i> (S.G. Gmelin) Santelices & Hommersand.....	20
3.2. Ensaio de Letalidade para larvas de <i>Artemia salina</i> Leach.....	21
3.3. Ensaio de Atividade Antioxidante.....	23
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	<b>26</b>
4.1. Materiais utilizados.....	26
4.1.1. Material vegetal.....	26
4.1.2. Equipamentos utilizados.....	26
4.1.3. Solventes e reagentes.....	26
4.2. Procedimentos gerais.....	28
4.2.1. <i>Screening</i> de macroalgas bênticas na ilha de Santa Catarina.....	28
4.2.1.1. Coleta do material.....	28

4.2.1.2. Preparo dos extratos.....	28
4.2.1.3. Análise cromatográfica dos extratos.....	28
4.2.1.4. Bioensaio de letalidade para larvas de <i>Artemia salina</i> .....	29
4.2.1.4.1. Preparação das diluições seriadas dos extratos.....	29
4.2.1.4.2. Incubação das larvas com o material.....	29
4.2.1.4.3. Contagem das larvas.....	30
4.2.1.4.4. Análise estatística dos resultados.....	30
4.2.1.5. Ensaio de atividade antioxidante.....	30
4.2.1.5.1. Ensaio fotométrico utilizando DPPH.....	30
4.2.1.5.1.1. Preparação das diluições seriadas dos extratos.....	30
4.2.1.5.1.2. Incubação dos extratos com DPPH.....	31
4.2.1.5.1.3. Cálculo da percentagem de seqüestro.....	31
4.2.2. Investigação fitoquímica da espécie selecionada.....	31
4.2.2.1. Preparação do extrato para investigação fitoquímica.....	31
4.2.2.2. Procedimentos de isolamento.....	32
4.2.2.2.1. Fracionamento do extrato.....	32
a) Partição com solventes e bioensaio com larvas de <i>Artemia salina</i> .....	32
b) Fracionamento do extrato bruto.....	32
c) Obtenção de C2F8.....	33
d) Obtenção de C3F3.....	33
e) Obtenção de C4F1 e C4F9.....	34
4.2.2.2.2. Colunas cromatográficas que não levaram ao isolamento de substâncias.....	34
a) Coluna 2F.....	34
b) Coluna 3F.....	35
c) Coluna 4F.....	35
d) Coluna 5F.....	35
<b>5. Resultados e Discussão.....</b>	<b>38</b>
5.1. <i>Screening</i> de macroalgas bênticas.....	38
5.1.1. Ensaio de letalidade para larvas de <i>Artemia salina</i> Leach.....	39

a) Análise estatística pelo método do qui-quadrado.....	40
b) Cálculo da CL <sub>50</sub> .....	41
5.1.2. Atividade Antioxidante - Ensaio fotométrico utilizando DPPH.....	43
5.1.2.1. Percentagem de seqüestro.....	43
5.1.3. Análise cromatográfica dos extratos.....	44
a) Com padrão de glicolípideo.....	44
b) Com padrão de esteróides.....	47
c) Com padrões de compostos fenólicos.....	49
5.2. Escolha da espécie para investigação fitoquímica.....	49
5.3. Fracionamento do extrato bruto – Ensaio de <i>A. salina</i> da partição.....	50
5.4. Isolamento de substâncias a partir do extrato bruto de <i>Pterocladia</i> <i>capillacea</i> .....	51
5.4.1. Obtenção da substância C2F8.....	51
5.4.2. Obtenção da substância C3F3.....	52
5.4.3. Obtenção das substâncias C4F1 e C4F9.....	52
5.5. Elucidação estrutural das substâncias isoladas.....	53
5.5.1. C2F8.....	53
5.5.2. C3F3.....	66
5.5.3. C4F1 e C4F9.....	69
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>72</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>74</b>

## RESUMO

Os metabólitos de produtos naturais marinhos possuem interessante diversidade estrutural e grande potencial terapêutico. Inicialmente, o conhecimento a seu respeito provinha da culinária e da medicina tradicional da Ásia. No ocidente, as pesquisas de produtos naturais marinhos começaram na década de cinqüenta. Devido à escassa produção científica a respeito de macroalgas bênticas provenientes do litoral catarinense esta dissertação de mestrado visou dar início à investigação de macroalgas bênticas do litoral do estado de Santa Catarina biomonitorada pelo ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* Leach e atividade antioxidante. Algas vermelhas verdes e pardas, num total de 26 amostras, foram coletadas nas faixas de meso e infralitoral nos meses de novembro a dezembro de 2002. Realizou-se a triagem dos extratos etanólicos das macroalgas com a determinação da concentração letal média (CL<sub>50</sub>) para larvas de *Artemia salina* e do percentual de atividade antioxidante utilizando ensaio fotométrico com  $\alpha,\alpha$ -difetil- $\beta$ -picril-hidrazila. Também foi realizada análise por cromatografia em camada delgada utilizando diversos reagentes de detecção e padrões de glicolipídeos, esteróides e flavonóides. *Pterocladia capillacea* foi escolhida para investigação química, sendo realizada nova coleta de material e o extrato bruto etanólico foi fracionado por procedimentos cromatográficos em coluna, em diferentes sistemas. As substâncias isoladas foram encaminhadas para análise por ressonância magnética nuclear. Todos os extratos testados, com exceção de um, apresentaram CL<sub>50</sub> abaixo de 100  $\mu$ g/mL e os extratos das algas vermelhas obtiveram os melhores resultados; para o teste de atividade antioxidante na concentração de 100  $\mu$ g/mL os percentuais de seqüestro de radicais livres variaram entre 22 e 70%. Foram verificadas diferenças de bioatividade entre amostras da mesma espécie coletadas em locais distintos, o que sugere a influência de fatores ambientais. Os perfis cromatográficos apresentaram várias semelhanças para as três classes estudadas, destacando a ausência de manchas com R<sub>f</sub> semelhante ao digalactosil glicerídeo nos extratos de algas do filo Chlorofita e a presença de manchas com R<sub>f</sub> semelhante à quercetina somente nos extratos de Phaeofitas. A escolha da *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmelin) Santelices & Hommersand para posterior investigação fitoquímica foi feita com base nos testes preliminares e na disponibilidade de biomassa em maior quantidade. Do extrato etanólico desta espécie foram isolados o ftalato de di(2-etil) hexila, além de um álcool esteroideal saturado e dois glicolipídeos que não chegaram a ter sua estrutura elucidada. Os resultados dos ensaios de atividade biológica confirmam as macroalgas do litoral catarinense como alvos promissores para futuras investigações químicas e biológicas.

**Palavras-chave:** macroalgas, *Artemia salina* Leach, atividade antioxidante, *Pterocladia capillacea*, Santa Catarina (Brasil)



## ABSTRACT

The marine natural products present interesting structural diversity and extraordinary therapeutical potential. The oldest knowledge about this subject came from the eastern cooking and traditional medicine. In western countries, the research of marine natural products had started in the 50's years. Due to poor scientific production concerning macro seaweed from the Santa Catarina's coast this dissertation aimed to perform a screening of green, red and brown algae from Santa Catarina's coast based on brine shrimp assay (lethality to *Artemia salina*) and diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) assay. Material was collected from November to December 2002 in the mesolitoral and infralitoral from coast of Santa Catarina. The ethanolic extracts from 26 macroalgae samples were tested with both assays and analysed by thin layer chromatography (TLC) with different spray reagents and reference substances. *Pterocladia capillacea* was chosen for further chemical investigation and a new collect was performed; its ethanolic extract was fractioned by several chromatographic columns in different systems. The structure of isolated substances was elucidated based on Nuclear Magnetic Resonance spectra. All extracts but one presented average lethal concentration (LC<sub>50</sub>) in the brine shrimp assay below 100 µg/mL and the extracts of red algae presented the lowest values. The free radicals scavenging activity of the extracts varied from 22 to 70% at 100 µg/mL. Differences in the activities were detected between samples of same species from different collect points, suggesting environmental influence. The TLC profiles of extracts presented some similarities for the 3 studied classes, but Chlorophyta extracts showed no spots with similar R<sub>f</sub> as digalactosyl glycerol while just Phaeophyta extracts presented spots with similar R<sub>f</sub> as quercetine. The choice of *Pterocladia capillacea* (S. G. Gmelin) Santelices & Hommersand for phytochemical investigation was due to its low LC<sub>50</sub> in the brine shrimp assay and to biomass availability. From its ethanolic extract four substances were isolated: di(2-ethyl)-hexyl phthalate, a saturated steroidal alcohol and two glycolipids whose structures were not elucidated. The detected activities of most screened algae extracts confirm macro seaweed from the coast of Santa Catarina as promising targets for further investigation.

**Keywords:** macro seaweed, brine shrimp assay, antioxidant activity, *Pterocladia capillacea*, Santa Catarina (Brazil), di(2-ethyl)-hexyl phthalate

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Organismos marinhos com atividades antitumorais, citotóxicas, antivirais e promotoras de tumor.....	7
<b>Tabela 2:</b> Distribuição dos pigmentos e produto de reserva nas diferentes divisões de algas.....	10
<b>Tabela 3:</b> Principais algas marinhas comestíveis (adaptada de WAALAND, 1981).....	10
<b>Tabela 4:</b> Principais fontes e empregos dos filacóides e gênero encontrados..	11
<b>Tabela 5:</b> Algas marinhas Chlorophita e seus respectivos metabólitos conforme revisões publicadas entre 1998 a 2001 (FAULKNER).....	13
<b>Tabela 6:</b> Algas marinhas Phaeophitas e seus respectivos metabólitos conforme revisões publicadas entre 1998 a 2001 (FAULKNER).....	14
<b>Tabela 7:</b> Algas marinhas Rhodophitas e seus respectivos metabólitos conforme revisões publicadas entre 1998 a 2001 (FAULKNER).....	15
<b>Tabela 8:</b> Desenvolvimento da coluna 1.....	32
<b>Tabela 9:</b> Montagem e desenvolvimento da coluna 2.....	33
<b>Tabela 10:</b> Montagem e desenvolvimento da coluna 2F.....	34
<b>Tabela 11:</b> Montagem e desenvolvimento da coluna 3F.....	35
<b>Tabela 12:</b> Algas marinhas coletadas na Ilha do Francês (Jurerê), mesolitoral em 22/11/02.....	39
<b>Tabela 13:</b> Algas marinhas coletadas na praia de Canasvieiras, mesolitoral em 07/12/02.....	39
<b>Tabela 14:</b> Valores de $\chi^2$ calculados para os diferentes extratos no ensaio de letalidade para larvas de <i>A. salina</i> do screening de macroalgas bênticas.....	41
<b>Tabela 15:</b> Valores calculados de CL <sub>50</sub> em relação ao número de larvas de <i>A. salina</i> mortas para os diferentes extratos do <i>screening</i> de macroalgas bênticas.....	42
<b>Tabela 16:</b> Resultados em % de capacidade de seqüestro de radicais livres dos extratos do <i>screening</i> de macroalgas bênticas.....	44

<b>Tabela 17:</b> Valores de $\chi^2$ para o ensaio de letalidade com larvas de <i>A.salina</i> após fracionamento do extrato bruto (experimento piloto).....	51
<b>Tabela 18:</b> Valores de deslocamentos químicos no espectro de RMN de $^1\text{H}$ de C2F8 em relação ao ftalato de di(2-etil) hexila.....	55
<b>Tabela 19:</b> Valores de deslocamentos químicos no espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de C2F8 em relação ao ftalato de di(2-etil) hexila.....	55
<b>Tabela 20:</b> Valores de deslocamentos químicos (ppm) do espectro de $^1\text{H}$ -RMN de C3F3 comparados com dados da literatura.....	67
<b>Tabela 21:</b> Comparação de dados do espectro de $^1\text{H}$ -RMN de C4F1 com dados da literatura.....	70

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> <i>Pterocladia capillacea</i> .....	21
<b>Figura 2:</b> Esquema do fracionamento do extrato etanólico bruto de <i>Pterocladia capillacea</i> .....	37
<b>Figura 3:</b> CCD algas verdes.....	46
<b>Figura 4:</b> CCD algas pardas.....	46
<b>Figura 5:</b> CCD algas vermelhas.....	46
<b>Figura 6:</b> CCD algas verdes.....	48
<b>Figura 7:</b> CCD algas pardas.....	48
<b>Figura 8:</b> CCD algas vermelhas.....	48
<b>Figura 9:</b> CCD algas pardas.....	49
<b>Figura 10:</b> CCD do grupo de frações da coluna 2.....	51
<b>Figura 11:</b> CCD do grupo de frações da coluna 3.....	52
<b>Figura 12:</b> CCD do grupo de frações da coluna 4.....	52
<b>Figura 13:</b> Estrutura parcial de C2F8.....	54
<b>Figura 14:</b> Estrutura química do ftalato de di(2-etil) hexila.....	55
<b>Figura 15:</b> Espectro de RMN de próton de C2F8, em CDCl <sub>3</sub> (500 MHz).....	56
<b>Figura 16:</b> Espectro de RMN de próton de C2F8, em CDCl <sub>3</sub> (500 MHz) com deslocamentos químicos.....	57
<b>Figura 17:</b> Expansão do espectro de RMN de próton de C2F8, em CDCl <sub>3</sub> (500 MHz).....	58
<b>Figura 18:</b> Expansão do espectro de RMN de próton de C2F8, em CDCl <sub>3</sub> (500 MHz).....	59
<b>Figura 19:</b> Expansão do espectro de RMN de próton de C2F8, em CDCl <sub>3</sub> (500 MHz).....	60
<b>Figura 20:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de C2F8, em CDCl <sub>3</sub> (125 MHz).....	61
<b>Figura 21:</b> Expansão do espectro de RMN de <sup>13</sup> C de C2F8, em CDCl <sub>3</sub> (125 MHz).....	62
<b>Figura 22:</b> Expansão do espectro de RMN de <sup>13</sup> C de C2F8, em CDCl <sub>3</sub> (125 MHz).....	63

<b>Figura 23:</b> Teste com solventes químicos.....	65
<b>Figura 24:</b> Teste com material laboratório.....	65
<b>Figura 25:</b> Espectro de RMN de próton de C3F3, em CDCl <sub>3</sub> (500 MHz).....	68
<b>Figura 26:</b> Espectro de RMN de próton de C4F1, em CDCl <sub>3</sub> (500 MHz).....	72

**LISTA DE ABREVIATURAS**

$^{13}\text{C}$ -RMN – ressonância magnética nuclear de carbono 13

$^1\text{H}$ -RMN – ressonância magnética nuclear de próton

*A. salina* – *Artemia salina*

AcOEt – acetato de etila

ADN – ácido dexossiribonucleico

CCD - cromatografia em camada delgada

$\text{CDCl}_3$  – clorofórmio deuterado

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  – diclorometano

$\text{CHCl}_3$  – clorofórmio

Chx - ciclohexano

$\text{CL}_{50}$  – concentração letal média

CLC - cromatografia líquida em coluna

DPPH -  $\alpha,\alpha$ -difenil- $\beta$ -picrilhidrazila

EtOH – etanol

FDB - ftalato de di-*n*-butila FDEH - ftalato de di(2-etil)-hexila

$\text{H}_2\text{O}$  – água

$\text{HCOOH}$  – ácido fórmico

MeOH - metanol

$R_f$  – fator de retenção

RMN – ressonância magnética nuclear

STX – saxitoxina

TBARS - ácido tibarbitúrico

TTX – tetrodoxina

## 1. INTRODUÇÃO

Produtos naturais marinhos vêm sendo estudados há mais de um século. Inicialmente, o conhecimento provinha da culinária e da medicina tradicional oriental, envolvendo, por exemplo, o uso de algas como anti-helmíntico (HALSTEAD, 1965). Já no ocidente, as pesquisas na área de produtos naturais marinhos começaram na década de cinquenta com o trabalho pioneiro de Bergman (BERGMAN et al., 1951).

Nos anos sessenta, o aumento da necessidade de outros fármacos para controlar novas doenças, bem como a resistência de microorganismos à terapêutica já existente, representava um estímulo à procura de novas fontes não convencionais de produtos naturais marinhos bioativos (KELECOM, 2002). As pesquisas iniciais concentraram-se em toxinas marinhas, em parte, por causa dos numerosos envenenamentos e intoxicações alimentares sofridas pelos soldados americanos no Pacífico durante a Segunda Guerra Mundial (HALSTEAD, 1965).

Após quarenta anos de pesquisas intensas, considera-se que a química de produtos marinhos atingiu uma maturidade (KELECOM, 2002). Em revisão realizada na década de noventa, observa-se uma tendência para a procura de metabólitos secundários de microorganismos marinhos e fitoplâncton (FAULKNER, 1998), com relativa diminuição na pesquisa de fontes convencionais de produtos naturais marinhos, como macroalgas e octocorais.

Entretanto, durante o ano de 1999, uma revisão envolvendo pesquisas da Europa, Japão, Austrália e Estados Unidos (MAYER, 2001), concluiu que produtos naturais marinhos provenientes de algas com atividade citotóxica estão entrando nas fases II e III de estudos clínicos, apesar da diminuição da produção científica referente à investigação química de novos produtos provenientes de algas marinhas.

No Brasil, 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 (KELECOM, 1997).

Os estudos brasileiros concentraram-se principalmente em invertebrados (Equinodermos, Celenterados, Poríferas, Tunicados e Moluscos) e em algas pardas, mas algas verdes e vermelhas e algumas espécies de peixes também tiveram uma atenção especial. O estudo de 60 organismos diferentes levou ao isolamento de mais de 110 metabólitos identificados, como esteróides, diterpenos e sesquiterpenos, além de terpenos superiores, lipídeos, derivados da dibromotirosina, etc. (KELECOM, 1997).

No estado de Santa Catarina poucos trabalhos foram realizados na área de investigação química de macroalgas bênticas. Há estudos de universidades de outros estados com espécies provenientes do litoral catarinense, como o estudo com *Sargassum stenophyllum* Martius (DUARTE et al., 2001), além de outros iniciados recentemente com objetivo de isolar carragenanos e agar-agar ou de biomonitoramento de poluição das águas marinhas.

A nível mundial, a procura de novos fármacos vem sendo cada vez mais intensa, principalmente por metabólitos ativos provenientes de fontes naturais. Atualmente, a produção bibliográfica a respeito de produtos naturais marinhos vem crescendo de maneira notável, como mostram os dados levantados no ano de 2002, referentes à pesquisa bibliográfica englobando 5 anos (LHULLIER e FALKENBERG, 2002).



É importante ressaltar que estudos sobre produtos naturais marinhos são realizados principalmente em países asiáticos e da Oceania. O Brasil possui pouca produção científica sobre investigação química de metabólitos ativos de organismos marinhos, inclusive em relação a macroalgas bênticas.

Devido à escassa produção científica a respeito de macroalgas bênticas provenientes do litoral catarinense e ao fato de metabólitos provenientes de produtos naturais marinhos possuírem uma interessante diversidade estrutural (KELECOM, 1991) além de grande potencial terapêutico, esta dissertação de mestrado visa dar início à investigação fitoquímica de algas bênticas do litoral do estado de Santa Catarina (SC) biomonitorada pelo ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* Leach e atividade antioxidante.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GERAIS

Realizar estudos preliminares com vista à seleção de espécies de macroalgas bênticas do litoral de Santa Catarina promissoras para investigação fitoquímica e iniciar a investigação de uma espécie escolhida.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma triagem de extratos de macroalgas bênticas com base na avaliação cromatográfica, na atividade antioxidante e no ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* Leach;
- Selecionar um dos extratos para posterior investigação;
- Realizar fracionamento cromatográfico do extrato da espécie de macroalga bêntica escolhida, com biomonitoramento pelo ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* Leach;
- Isolar e elucidar a estrutura das substâncias.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. PRODUTOS NATURAIS MARINHOS

Os oceanos cobrem mais 70% da superfície terrestre e são habitados por cerca de 200.000 espécies de plantas e invertebrados marinhos e milhões de microorganismos. A evolução e a sobrevivência destas espécies resultaram em organismos que produzem substâncias únicas com funções ecológicas e fisiológicas diversas (PINTO et al., 2002).

A história do estudo de produtos naturais marinhos demonstra que por volta de 1960 houve um grande investimento por parte das indústrias farmacêuticas na busca de substâncias bioativas a partir dos organismos que vivem nos oceanos. Além da popularização do mergulho autônomo e do desenvolvimento de equipamentos para coleta em maiores profundidades, a descoberta de grandes quantidades de prostaglandinas em um octocoral (*Plexaura homomalla*) despertou o interesse nas pesquisas em produtos naturais marinhos (WEINHEIMER; SPRAGGINS, 1969; VALMSEN et al., 2001; SCHNEIDER et al., 2002).

Pode-se dizer que a química de produtos naturais marinhos era incipiente na década de 1970, que se desenvolveu rapidamente nos anos 80 e amadureceu na década passada. Em 1975 já existiam três linhas paralelas de pesquisa: estudo de toxinas marinhas, de substâncias com potencial medicinal e de química na ecologia marinha (FAULKNER, 2000).

No início, houve um grande interesse por toxinas, devido à biotoxicidade encontrada pelas tropas americanas no Pacífico durante a Segunda Guerra Mundial. Mas, após três décadas de pesquisa, observam-se substâncias com atividade cardiovascular, antiviral, antitumoral, antimetabólica, antifúngica, citotóxica, neurotóxica, antiinflamatória e antibiótica (KELECOM, 1991).

Em relação às toxinas, poucas são usadas com fins medicinais, mas principalmente como ferramentas em estudos neurofisiológicos e em pesquisas moleculares de neuroreceptores. A tetrodotoxina (TTX), isolada primeiramente do ovário de um peixe, *Fugus rubipes* (YOKOO, 1950), mas caracterizada como de origem bacteriana (YASUMOTO et al., 1989) e a saxitoxina (STX), obtida do mexilhão *Saxidomus giganteus* (SCHUETT; RAPOPORT, 1962), mas proveniente da dieta com um dinoflagelado *Gonyaulax* spp. (HASHIMOTO, 1979) são exemplos de neurotoxinas marinhas não proteicas que bloqueiam canais de sódio especificamente, promovendo paralisia do sistema nervoso periférico (SHIMIZU, 1978).

Outras potentes toxinas são as palitoxinas poli-hidroxiladas com ação bloqueadora de canais iônicos (KAUL, 1981) isoladas do zoantídeos do gênero *Palythoa* (MOORE; SCHEUER, 1971); as latrunculinas, macrolídeos citotóxicos isolados de esponjas (KASMAN et al., 1985); a lofotoxina, diterpeno com efeito paralisante proveniente de um celenterado; o glicosídeo esteroidal com atividade ictiotóxica e repelente de tubarão isolado do peixe *Pardachirus pavoninus* (TASHIBANA et al., 1984); os alcalóides indólicos neurotóxicos do tipo surugatoxina isolados do molusco *Babylonia japonica* (KOSUGE et al., 1982), mas de origem bacteriana (KOSUGE et al., 1985) e uma série de saponinas neurotóxicas produzidas por estrelas-do-mar e pepinos-do-mar (BURNELL; APSIMON, 1983).

Já em relação às substâncias com atividades cardiovasculares, as esponjas marinhas são as maiores fontes destes metabólitos. Temos como exemplo, a xestoquinona (quinona pentacíclica) da *Xestospongia sapra* que possui uma forte atividade inotrópica e inibe a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NAKAMURA et al., 1985). A atividade vasodilatadora é associada a uma série de alcalóides 1-oxo-quinolizidina, as xestoessponginas (ENDO et al., 1986) e aos nucleosídeos doridosina, isoguanisina e espongosina (KAUL, 1982). Ainda com relação à atividade anti-hipertensiva temos o 12-epi-scalaradial, um sesterpeno isolado da *Hyrtilos erecta* (QUINN et al., 1980).

Anêmonas do mar também são fontes de polipeptídeos cardiotônicos, como a antopleurina-A da *Anthopleura elegantissima* com efeitos inotrópicos

e cronotrópicos (KAUL; DAFTARI, 1986). Outros celenterados produzem compostos cardiotoxícos como as palitoxinas (KAUL, 1981) e o ácido subergórgico (sesquiterpeno) da gorgônia *Subergorgia suberosa* (GROWEISS et al., 1985).

O aumento das fundações para a pesquisa do câncer e os desafios para um tratamento eficiente para infecções por herpes e para a AIDS levaram à descoberta de grande número de substâncias de origem marinha com atividades antitumorais, citotóxicas, antivirais e promotoras de tumores. Atualmente esta é a área que mais vem crescendo na química de produtos marinhos (MAYER; LEHMANN, 2001). Entre muitas substâncias já descobertas, temos alguns exemplos clássicos apresentados na tabela 1.

**Tabela 1:** Organismos marinhos com atividades antitumorais, citotóxicas, antivirais e promotoras de tumor.

	<b>Organismo</b>	<b>Substâncias ativas</b>	<b>Referência</b>
Antitumoral	Esponja	espongotimidina espongogouridina ara-A	COHEN, 1963
	Octocoral <i>Telestoa riisei</i> <i>Clavularia inflata</i>	punaglandinas clavulonas bromo-indovulonas	BAKER et al., 1963 IGUCHI et al., 1986
	Briozoa <i>Bugula neritina</i>	briostatina-1	PETTIT et al., 1982
	Tunicado <i>Trididemnum solidum</i>	didemnima-B	RINEHART et al., 1981
	Tunicado	eudistominas	MUNRO et al., 1989
	Esponja <i>Mycale</i> sp	micalamida-A	PERRY et al., 1988
Antiviral	Tunicado	eudistomina-C	RINERART, 1989
	Esponja <i>Mycale</i> sp	micalamida-A	MUNRO et al., 1989
	Esponja <i>Dysdea avara</i>	avarol	MINALE et al., 1974
Citotóxica	Tunicado <i>Trididemnum solidum</i>	didemnima-B	RINEHART et al., 1981
	Esponja <i>Dysdea avara</i>	avarol	MINALE et al., 1974
Promotora de tumor	Dinoflagelado	ácido ocadaico	SUGANUMA et al., 1988
	Alga verde-azulada <i>Lyngbya majuscula</i>	lingbitatoxina-A	CARDINELLA et al., 1979

Muitas substâncias de origem marinha possuem mais de uma atividade. Os derivados prolina do ácido caínico e do ácido domóico, ambos isolados primeiramente de uma alga vermelha (MURAKAMI et al., 1953; TAKEMOTO et al., 1966) possuem atividade anti-helmíntica. O ácido caínico é utilizado como modelo experimental para doença de Huntington (SCHEUER, 1989). Já o ácido domóico é um potente agonista glutamatérgico induzindo sintomas neurológicos, como a amnésia (HOCKIN, 1989).

Em relação a substâncias com atividade antiinflamatória, novos compostos têm sido descobertos. O sesterpeno manoalido, da esponja *Luffariella variabilis* (DE SILVA; SCHEUER, 1980), inibiu a síndrome induzida por fenilquinona (JACOBS et al., 1985) e mostrou-se mais potente que a indometacina, mas menos que a hidrocortisona e atua inibindo irreversivelmente a enzima fosfolipase A. Similarmente, as pseudopterossinas, uma série de diterpenos glicosilados da gorgônia *Pseudopterogorgia elisabethae* (LOOK et al, 1986), exibiram atividades antiinflamatórias e analgésicas (FENICAL, 1987).

O estudo de substâncias químicas produzidas pelas espécies marinhas é uma ferramenta fundamental para a compreensão da evolução e da manutenção das comunidades marinhas nos diferentes oceanos (HAY; FENICAL, 1997). Apesar de haver estudos em ecologia química terrestre, somente no início dos anos 80 é que o papel ecológico de substâncias orgânicas do ambiente marinho começou a ser desvendado (PAUL, 1993; PAWLIK, 1993; HAY, 1996; MILLAR; HAYNES, 1998).

A química de produtos naturais marinhos é um campo que cresce rapidamente, principalmente nos últimos 25 anos. Novas técnicas estão surgindo e programas de ecologia marinha estão sendo propostos. Imagina-se que em 2025 a química de produtos naturais marinhos ainda esteja envolvida com elucidação estrutural, mas já contribuindo na área de engenharia genética (FAULKNER, 2000). Este caminho antevê que as maiores contribuições para o futuro vão resultar dos estudos associados entre microorganismos marinhos e biotecnologia, levando para a comunidade científica o potencial dos oceanos (KELECOM, 1991).

### 3.1.1. MACROALGAS BÊNTICAS

Algas são organismos pertencentes a grupos polifiléticos que possuem clorofila **a** e um talo não diferenciado em raiz, caule ou folhas, com hábito predominantemente aquático. Neste ambiente, as algas podem fazer parte dos *bentos* (indivíduos fixos no substrato) ou *plâncton* (indivíduos suspensos na água). A faixa litorânea que as algas bênticas habitam pode estar dividida em: supralitoral, mesolitoral e infralitoral. O supralitoral corresponde à faixa mais alta do litoral, nunca ficando submerso. O mesolitoral pode estar temporariamente descoberto nas marés-baixas. Já o infralitoral corresponde à faixa que nunca fica exposta ao ar (HORTA, 2000).

As algas seriam os organismos mais antigos do planeta, havendo evidências de sua existência no período pré-cambriano (3,5 bilhões de anos, aproximadamente). As algas possivelmente foram as responsáveis pela produção e acúmulo de oxigênio na atmosfera primitiva e hoje se sabe que são organismos que deram origem a todos os outros vegetais existentes atualmente (HORTA, 2000).

Harvey (1836) classificou as algas baseando-se na sua composição pigmentar e esta persiste até hoje. Dentre as principais linhagens eucarióticas podemos citar: Chlorophyta (algas verdes), Euglenofita (alga flagelada), Rhodophyta (algas vermelhas) e Phaeophyta (algas pardas), Bacillariofita (diatomáceas) e Dinofita (dinoflagelados). Além da classificação proposta por Harvey, temos o sistema de classificação baseado na distribuição dos pigmentos e os produtos de reserva (tabela 2) (LEE, 1989). Neste trabalho de revisão vamos focalizar nos três grupos mais estudados, algas verdes, pardas e vermelhas.

**Tabela 2:** Distribuição dos pigmentos e produto de reserva nas diferentes divisões de algas.

Divisão	Clorofilas	Ficobilinas	Carotenóides	Produto de reserva
Chlorophyta (verdes)	<i>a,b</i>		beta-caroteno, luteína, violaxantina, zeaxantina	amido
Phaeophyta (pardas)	<i>a,c1,c2</i>		beta-caroteno, fucoxantina, violaxantina, zeaxantina	laminarina e manitol
Rhodophyta (vermelhas)	<i>a,d</i>	<i>b-,r-</i> e <i>c</i> -ficoeritrina aloficocianina <i>c-</i> e <i>r</i> -ficocianina	beta-caroteno, luteína, anteraxantina, zeaxantina	amido das florídeas

As algas marinhas bentônicas são organismos que possuem uma grande importância econômica na sociedade mundial, entre outros, na alimentação humana e animal, na área industrial (filacóides), como fertilizante, além das ficobiliproteínas e compostos com propriedades medicinais.

### a) Alimentação

Algas marinhas vêm sendo utilizadas como alimento há mais de 10 mil anos no Japão. Atualmente, os povos orientais utilizam-nas amplamente na alimentação, sendo os principais gêneros apresentados na tabela 3. Através de análise química de várias algas, verificou-se a presença de proteínas, vitaminas (A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e C), sais minerais (cálcio, iodo e ferro) e uma grande quantidade de polissacarídeos.

**Tabela 3:** Principais gêneros de algas marinhas comestíveis para humanos (adaptada de WAALAND, 1981).

Algas verdes	Algas pardas	Algas vermelhas
<i>Monostroma</i>	<i>Laminaria</i>	<i>Porphyra</i>
<i>Caulerpa</i>	<i>Undaria</i>	<i>Palmaria</i>
<i>Enteromorpha</i>	<i>Alaria</i>	<i>Gracilaria</i>
<i>Ulva</i>	<i>Eisenia</i>	<i>Gelidium</i>
	<i>Ecklonia</i>	<i>Euclima</i>

A alga vermelha *Porphyra* spp. (nori) é utilizada no preparo de sushi enquanto *Euclima* spp. (agar-agar) é apreciada como alimento pelos povos da China e Malásia. Entre algas pardas, *Laminaria japonica* (kombu) é utilizada no preparo de carnes, peixes e sopas na China e a *Undaria*



*pinnatifida* (wakame) é usada como ingrediente de sopas e molhos pelos povos do Japão e China (HORTA, 2000).

Macroalgas bênticas também são usadas como alimentos para gado, ovelhas, cavalos, porcos e aves domésticas, em áreas onde são abundantes. Para regiões mais distantes da costa, as algas são secas e acrescidas como suplemento à dieta regular dos rebanhos, movimentando mais de 15 bilhões de dólares por ano (MCHUGH, 1987).

### b) Área Industrial (ficocolóides)

Os filacóides são substâncias mucilaginosas (polissacarídeos coloidais) extraídas da parede celular das algas marinhas, sendo utilizadas em soluções aquosas, formando géis. São classificados em alginato, ágar e carragenano que, conforme suas propriedades físicas, têm um emprego determinado (tabela 4).

**Tabela 4:** Principais tipos e empregos dos ficocolóides em diversos gêneros de macroalgas.

<b>Tipo de ficocolóide</b>	<b>Substância</b>	<b>Gênero</b>	<b>Emprego</b>
Alginato (algas pardas)	polímeros do ácido L-glucurônico e D-manurônico	<i>Macrocystis</i> <i>Laminaria</i> <i>Ascophyllum</i>	Indústria têxtil, de tintas e cerveja
Carragenanos (algas vermelhas)	polímeros de D-galactose	<i>Chondrus</i> <i>Euchema</i> <i>Gigartina</i> <i>Iridaea</i> <i>Hypnea</i>	Indústria farmacêutica, cosmética, de tintas e alimentícia
Agar (algas vermelhas)	polissacarídeos de D- e L-galactose	<i>Gelidium</i> <i>Gracilaria</i> <i>Pterocladia</i>	Indústria farmacêutica, cosmética, de tintas, alimentícia e de meios de cultura para biologia molecular (agarose)

### c) Fertilizantes

O valor das algas como fertilizantes é demonstrado principalmente em fazendas próximas ao mar. As algas são coletadas, ou é aproveitado o material encontrado na praia. Contribuem como fontes de nitrogênio e

potássio, mas apresentam baixo teor de fósforo. As algas calcárias são utilizadas em solos com pH ácido, como corretivo em vários países como Inglaterra, Escócia, Irlanda e Dinamarca. Sua exploração, entretanto, deve ser acompanhada de estudos planejados para verificar os efeitos em outros recursos biológicos de importância econômica (HORTA, 2000).

#### **d) Ficobiliproteínas**

As ficobiliproteínas ou ficobilinas são proteínas que contêm pigmentos fluorescentes, encontradas principalmente nas algas pardas. O produto mais importante é a r-ficoeritrina extraída de várias espécies de *Porphyra*. Estas substâncias necessitam de técnicas sofisticadas de separação e purificação, sendo utilizadas como marcadores fluorescentes nas áreas de bioquímica e histoquímica (HORTA, 2000).

#### **e) Compostos com propriedades medicinais**

Preparações com base de algas são usadas há séculos pelas populações devido às propriedades medicinais. Algas pardas, como *Laminaria* spp, são efetivas na cura do bócio, devido ao alto teor de iodo (0,19 – 0,47 g%). Algumas algas são usadas como vermífugos e outras para combater o escorbuto, como *Porphyra* sp. Atualmente, muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de isolamento de compostos que tenham ação farmacológica.

Em várias revisões realizadas por FAULKNER (1998, 1999, 2000 e 2001) foram compilados dados de artigos sobre produtos naturais marinhos de 1996 até 1999. Em relação às algas marinhas bentônicas houve um crescimento na descoberta de substâncias inicialmente encontradas em organismos mais evoluídos, mas que eram provenientes da dieta com algas marinhas. Também ocorreu a descoberta da simbiose entre algas e microorganismos marinhos levando a produção de novos metabólitos.

##### **e.1) Algas verdes**

Por serem organismos com poucos pigmentos e substâncias de reserva, as algas clorofitas possuem poucos metabólitos com atividade farmacológica. Houve significativo aumento na descoberta de novos compostos no ano de 1997 e atualmente os estudos têm-se concentrado na síntese destes compostos (tabela 5) (FAULKNER, 2001).

**Tabela 5:** Algas marinhas do filo Chlorophyta e seus respectivos metabólitos conforme revisões publicadas entre 1998 a 2001 (FAULKNER).

Ano	Alga	Metabólito
1996	<i>Ulva fasciata</i>	eritro-esfingo-4,8-dieno-N-palmitato
	<i>Dictyosphaeria sericea</i>	dictiosfaerina
	<i>Bryopsis</i> sp.	kahalalidos A, B, F e G
	<i>Halimeda tuna</i>	halitunal
1997	<i>Tuemoya</i> sp.	cicloartenol sulfatado
	<i>Dictyochloris fragrans</i>	sulfonoquinovosil dipalmitoil
	<i>Caulerpa serrulata</i>	caulesina
	<i>C. sertularioides</i>	sertularamida
	<i>Cologlossa lepieurii</i>	$\alpha$ -1-gliceril-D-manosideo-4-amônio
1998	<i>Caulerpa taxifolia</i>	glicoglicerolipídeos e enóis (E) e (Z)
	<i>Halimeda xishaensis</i>	halimedina ciano-cis-triazina
	<i>Schizochytrium aggregatum</i>	7-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-2"-sulfato
1999	<i>Ulvella lens</i>	dibromometano
	<i>Ulva lactata</i>	2,4,6-tribromofenol
	<i>Bryopsis</i>	kahalalido K
	<i>Caulerpa serrulata</i>	caulesina sintética

## e.2) Algas pardas

Macroalgas pardas possuem ácidos graxos e seus derivados como seus compostos majoritários. Depois das algas vermelhas, são o filo de algas bênticas mais estudadas no mundo. Em 1996 houve um declínio no número de artigos reportando novos metabólitos de algas pardas, havendo uma recuperação nos anos seguintes (tabela 6).

**Tabela 6:** Algas marinhas do filo Phaeophyta e seus respectivos metabólitos conforme revisões publicadas entre 1998 a 2001 (FAULKNER).

Ano	Alga	Metabólito
1996	<i>Laminaria digitata</i>	(1'S, 2'R, 6 S) e (1'S, 2'R, 6 R)-lamoxireno
	<i>Cutleria mulifida</i>	(+)-multifidena
	<i>Desmarestia viridis</i>	(+)-viridieno
	<i>Scytosiphon lamentaria</i>	riboflavina-4'5'-fosfatada cíclica
	<i>Dictyopteris undulata</i>	ciclozonarona
	<i>Cystoseira amentácea</i>	citoesqueleto dimetoxi-cromano citoesqueleto quinona
	<i>Stypodium zonale</i>	(-)-stipoldiona
	<i>Dictyota acutiloba</i>	acutilol A e seu acetato, B
	<i>D. crenulata</i>	acetoxicrenulida
1997	<i>Ectocarpus siliculosus</i>	cis-ciclopropano trans-ectocarpano
	<i>Dictyopteris prolifera</i>	(3S, 4S)-3- <i>n</i> -butil-4-vinilciclopentano
	<i>Laminaria digitata</i>	lamiroxeno
	<i>Notheia anomala</i>	trieno, bis-epóxido e diidróxi-tetraidrofuranos
	<i>Sporochnus bolleanus</i>	(+)-sporochnol (S)-epiclorohidrina
	<i>Dictyota dichotoma</i>	5 novos diterpenos dolabelanos isopacidictiol A e dictiotatriol
	<i>Taonia australasica</i>	(+)-taonianona
	<i>Turbinaria ornata</i>	29-hidroperoxistigmasta-5,24 (28)-dien-3 $\beta$ -ol
	<i>Desmarestia menziesii</i>	cromenóis
	<i>Cystoseira amentácea</i>	2 meroditerpenos
	<i>Cystoseira sp.</i>	7 meroditerpenos
	<i>Sargassum spinuligerum</i>	Hexaacetato de florescorbinila pseudotrifuhalol A octacetato
	<i>Cystophora torulosa</i>	clorobisfucopentafloretol-A
	<i>Zonaria diesingiana</i>	17(R)-hidroxieicosatetraenoil-floroglucinol
1998	<i>Notheia anômala</i>	(6S,7S,9S,10S)-6,9-epoxinonadec-18-en-7,10-diol (6S,7S,9S,10R)-6,9-epoxinonadec-18-en-7,10-diol
	<i>Dictyoperis spp.</i>	dictioptereno C'
	<i>Sargassum autumnale</i>	meroditerpenos nahacols A, A <sub>1</sub> , B, C, D <sub>1</sub> e D <sub>2</sub> isonahocols D <sub>1</sub> e D <sub>2</sub>
	<i>Cystoseira abies marina</i>	Cistomexiconas A e B 4-(5-hidroxi-2-metóxi-3-metilfenil)-butan-2-ona
	<i>Cystophora brownii</i>	2 meroditerpenos diasteroisômeros (20S)-3 $\beta$ ,20-dihidroxi ergosta-5,24(28)-dien-16-ona 3 $\beta$ -hidroxi ergosta-5,24(28)-dien-16-ona
	<i>Dictyopteris zonaroides</i>	(+)-zonarol
	<i>Dictyota sp.</i>	14-hidroxiacetoxicrenulida 13-hidroxiacetoxicrenulida
	<i>Stypodium zonale</i>	stipodiol
	<i>Cystoseira balearica</i>	eleganolona, acetato de eleganolona, elegandiol, eleganonal e epoxieleganolona
	<i>Bifurcaria bifurcata</i>	sulfonoglicolípídeo
1999	<i>Dictyota ciliolata</i>	éter ciclopropílico
	<i>Carpophyllum angustifolium</i>	2,4,6-triacetoxiclórobenzeno 2[D']-iododifloretoleto pentaacetato 3[A]-clorobifuhalol hexaacetato 3[A <sub>4</sub> ]-clorodifucol hexaacetato
	<i>Cystophora retroflexa</i>	3 floretois, 10 fucofloretois e 10 floretois halogenados
	<i>Sargassum vachellianum</i>	12 membros heterocíclicos
	<i>Spatoglossum variabile</i>	spatazoato, spatosterol I, varinasterol

	<i>Stypodium zonale</i>	Ácido stipoquinônico
	<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	metoxi-bifurcarenona
	<i>Sporochnus bolleanus</i>	(-)-sporochnol
	<i>Bifurcaria bifurcata</i>	3 diterpenos e (-)-bifurcadiol
	<i>Stoechospermum marginatum</i>	5(R), 16(S)-diacetoxispata-13,17-dieno
	<i>Dilophus okamurai</i>	secospatacetais A-E
	<i>Turbinaria conoides</i>	6 derivados do fucoesterol

### e.3) Algas vermelhas

São o grupo de macroalgas que possui o maior número de substâncias isoladas, sendo ricas em compostos de reserva e ficobiliproteínas. O gênero mais estudado é *Laurencia*, pertencente à família Rhodomelaceae, e atualmente as pesquisas se concentram na síntese de seus metabólitos e em estudos pré-clínicos e clínicos. As pesquisas com esse grupo de algas tiveram um aumento de publicações, no ano de 1998, decaindo no ano seguinte (tabela 7).

**Tabela 7:** Algas marinhas do filo Rhodophytas e seus respectivos metabólitos conforme revisões publicadas entre 1998 a 2001 (FAULKNER).

Ano	Alga	Metabólito
1996	<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i>	1,5-anidro-D-frutose
	<i>Laurencia spectabilis</i>	laurenciona
	<i>Neodilsea yendoana</i>	ácido (5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 17Z)-eicosapentaenóico
	<i>Agardhiella subulata</i>	agardhilactona
	<i>Constantinea simplex</i>	constanolactona
	<i>Laurencia spp.</i>	(2E)-tridecilheptadec-2-enal
	<i>Laurencia pannosa</i>	pannosalleno
	<i>Laurencia nipponica</i>	neisoprelaurefucina
	<i>Pantoneura plocamioides</i>	pantofuranóides A-F
	<i>Plocamium cartilagineum</i>	(3Z, 7E)-5,8-dibromo-2,6-dicloro-2,6-dimetil-octa-3,7-dien-1-al (E)-2,8-dibromo-2,7-dicloro-2,6-dimetil-oct-5-eno
	<i>Laurencia karlae</i>	benkarlaol
	<i>Laurencia filiformis</i>	6 derivados do parguerana
	<i>Laurencia viridis</i>	viridióis A e B 10-epideidrotirsiferol e isodeidrotirsiferol
	<i>Galaxaura marginata</i>	peróxidos e epóxidos
	<i>Melanothamnus somalensis</i>	somalenona
	<i>Haraldiophyllum sp</i>	almazol D
	<i>Digenea simplex</i>	ácido (-)- $\alpha$ -kaínico
1997	<i>Neodilsea yendoana</i>	yendolipina
	<i>Laurencia majuscula</i>	iodolactona

	<i>Delisea fimbriata</i>	2-acetil-1,1-dibromo-heptano 3-acetil-1,1,2-tribromo-oct-1-eno
	<i>Gracilaria coronopifolia</i>	manuelídeos A, B e C apliatoxina e debromoapliatoxina
	<i>Laurencia obtusa</i>	obtusaleno IV scanlonenina
	<i>Laurencia claviformis</i>	acetogenina (3Z)-1,3-epinнатifidenina
	<i>Laurencia pinnata</i>	(+)-isolaurepinnacina
	<i>Laurencia nipponica</i>	trans-desacetilkumausina
	<i>Laurencia glandulifera</i>	(+)-laurencina
	<i>Portieria hornemanni</i>	monoterpenos
	<i>Plocamium hamatum</i>	monoterpeno cíclico
	<i>Laurencia majuscula</i>	majusina
	<i>Laurencia obtusa</i>	allolaurineterol
	<i>Aplysia dactylomela</i>	debromoisolaurinterol
	<i>Laurencia rígida</i>	3-acetoxi-E- $\gamma$ -bisaboleno (-)-10 $\alpha$ -bromo-9 $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -chamigreno rigidol (+)-(10S)-10-bromo- $\beta$ -chamigreno
	<i>Laurencia cartilaginea</i>	Norchamigrano, mailiona, allo-isoobtusol
	<i>Laurencia subopposita</i>	oppositol
	<i>Laurencia paniculata</i>	paniculatol
	<i>Laurencia microcladia</i>	rogiodiol A, rogiolal
	<i>Laurencia viridis</i>	tirsenóis A e B
	<i>Galaxaura marginata</i>	4 esteróides hidroperóxidos
	<i>Chondria armata</i>	ácidos isodomóicos G e H
	<i>Digenea simplex</i>	ácido (-)-kaínico
1998	<i>Schizymenia dubyi</i>	4 ácidos graxos metoxilados
	<i>Gigartina tenella</i>	sulfoquinovosildiácilglicerol KM043
	<i>Gracilaria coronopifolia</i>	malingamídeos M e N e acetato malingamido I anidrodebromoapliatoxina manauelídeo C
	<i>Constantinea simplex</i>	constanolactona
	<i>Polycavernosa tsudai</i>	policavernosídeo A
	<i>Laurencia nipponica</i>	trans-kumausina
	<i>Pantoneura plocamioides</i>	4 monoterpenos halogenados
	<i>Plocamium cartilagineum</i>	plocamapiranóide, 4-bromo-5-cloro-2-(E)-clorovinil- 1,5-dimetil-1,2-epoxi-ciclohexano
	<i>Portieria hornemanni</i>	halomono
	<i>Laurencia japonensis.</i>	anhidroapliadiol
	<i>Laurencia satoi</i>	3 diterpenos
	<i>Acantophora spicifera</i>	colest-4-en-3 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol
	<i>Chondria atropurpurea</i>	chondriamida C
	<i>Martensia fragilis</i>	martefragina
1999	<i>Laurencia japonensis</i>	acetogeninas A e B
	<i>Laurencia obtusa</i>	laurencienina B, (+)-obtusenina
	<i>Laurencia pinnatifida</i>	obtuseninas
	<i>Odonthalia corymbifera</i>	éter difenílico e éter dibenzílico bromados
	<i>Plocamium costatum</i>	monoterpeno halogenado
	<i>Portieria hornemanni</i>	apakaochtodenos A e B
	<i>Laurencia claviformis</i>	claviol
	<i>Laurencia nidifica</i>	14 derivados do chamigrano
	<i>Porphyra yezoensis</i>	diterpenos derivados do fitol
	<i>Laurencia sp.</i>	aplisina, debromoaplisina, aplisinol, debromoaplisinol, isoaplisina, isolaureneterol e debromoisolaurinterol

### **3.1.1.1. MACROALGAS BÊNATICAS NO BRASIL E NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Ainda há muitas divergências quanto à origem da flora de macroalgas no Brasil. De acordo com Joly (1964, 1965), a flora caribenha originou-se a partir da migração da flora brasileira transportada pela Corrente das Guianas, que se desloca do nordeste e norte do Brasil rumo às Antilhas, considerando o Brasil, como o centro de dispersão da flora de águas quentes do Atlântico.

Já trabalhos realizados por Oliveira Filho (1977) baseiam-se em Taylor (1955) no fato de que, geologicamente, o Caribe é mais antigo que o Atlântico Sul Americano e que o número de espécies caribenhas é muito maior que o encontrado na costa brasileira, aventando-se a hipótese de que o Caribe seja o grande centro de dispersão no Atlântico Tropical, levantando como argumento a grande riqueza específica e o alto grau de endemismo daquela região. Mas de acordo com Horta et al. (2001) a flora do Brasil e a do Caribe podem ter sua origem comum Indo-Pacífica, mas, em épocas e por rotas distintas, e não através de uma migração Caribe-Brasil ou vice versa.

De acordo com os resultados gerados a partir da compilação das espécies citadas por Oliveira Filho (1977), Horta et al. (2001) agruparam as macroalgas bênticas brasileiras em unidades de federação onde foram coletadas. Os estados brasileiros foram reunidos em três grupos, sendo denominados através da coincidência das áreas com as regiões Tropical, Temperada Quente e Manguezais, descritas a partir de uma escala de observação global (VAN DEN HOEK, 1984, JOOSTEN e VAN DEN HOEK, 1986).

O litoral do estado de Santa Catarina corresponde à região Temperada Quente e apresenta flora rica em número de espécies, havendo um predomínio de espécies de algas vermelhas. As algas colonizam os espaços dos costões rochosos do maciço cristalino, que mergulha no oceano. Esta zona mostra um empobrecimento da flora no sentido norte-sul e este pode estar relacionado à redução paulatina do substrato disponível (OLIVEIRA

FILHO, 1977) e às maiores variações sazonais de temperatura, dificultando a presença de espécies estenotérmicas.

Em relação ao estudo de substâncias produzidas por algas marinhas brasileiras, as algas pardas formam o grupo que contribui com a maior parte da produção bibliográfica. Ao longo da costa brasileira, estas algas são muito abundantes, sendo a ordem Laminariales a mais encontrada. A espécie *Laminaria brasiliensis*, da costa do Espírito Santo, é usada na produção de alginato (KELECOM, 1997).

Em comparação com esteróides de Coelenterados ou Porífera, algas pardas não são muito diversificadas (FLEURY et al., 1996). *Laminaria brasiliensis* possui colesterol (37,3%), brassicasterol (2,6%), dibassicasterol (27,2%) e fucoesterol (25,2%) juntamente com muitos traços de esteróides não-identificados (SARSA, 1997).

Recentemente 7 espécies de algas pardas foram examinadas, principalmente por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (FLEURY et al., 1994a). As espécies *Dictyota cerviconis*, *Dictyota dichotoma*, *Dictyota mertensii*, *Dictyopteris delicatula* e *Sargassum furcatum* foram coletadas em Búzios (RJ); as espécies *Dictyopteris plagiogramma* e *Sargassum filipendula* em Angra dos Reis (RJ) e uma segunda amostra de *Dictyota cerviconis* foi obtida de Mambucaba (RJ). Colesterol e fucoesterol foram os principais componentes encontrados. Os outros esteróides foram identificados como 22-deidrocolesterol, ergosta-5,24-dieno-3 $\beta$ -ol, campesterol, estigmasterol, 24 $\xi$ -etil colesterol, 24-propil-colesta-5,24-dien-3 $\beta$ -ol e colestanol. Interessante ressaltar que o fucoesterol, um esteróide típico de algas pardas, não foi encontrado em *Sargassum filipendula*, mas é dominante em *Sargassum furcatum*, sendo que a quantidade de esteróides de ordem Fucales (*Sargassum* spp.) é em média 10% mais que a ordem Dictyotales.

As algas pardas também são ricas em compostos terpênicos, contêm muitos diterpenos, alguns sesquiterpenos enquanto os triterpenos são praticamente inexistentes (TEIXEIRA et al., 1991). As espécies *Dictyota*



*dichotoma* e *Dictyota mertensii*, ambas coletadas em Búzios (RJ), têm o conhecido diterpeno guaiano prenilado, paquidictiol A (TEIXEIRA et al., 1990; KELECOM et al., 1991) e também produzem o dictiol guaiano prenilado H, que não é comumente encontrado (KELECOM et al., 1991). Para uma terceira espécie, *Dictyota cerviconis* da Baía de Ribeira (RJ) foram descritos 14 diterpenos, 10 com esqueleto dolastano e 4 com esqueleto secodolastano (FLEURY et al., 1994b). As estruturas destes diterpenos foram estabelecidas por análises espectrais e entre eles encontra-se o isolinerol secodolastano, acetato de iolinerol e cervicol. Todos os outros diterpenos têm sido encontrados nas Dictyotales da região Indo-Pacífica (KELECOM et al., 1987).

Poucos trabalhos químicos são realizados com outras macroalgas. Entre estes estudos, um menciona a identificação de 4 ácidos graxos: ácido láurico (12:0), palmítico (16:0), esteárico (18:0) e araquídico (20:0) na alga verde *Ulva fasciata*.

Das algas verdes *Codium decorticatum*, *Caulerpa racemosa* e *Cladophora vagabunda* de Boa Viagem (RJ) e Ibicuí (RJ) foram isolados os ácidos graxos saturados 12:0, 16:0, 18:0 e 22:0 juntamente com componentes insaturados (FLEURY et al., 1994a). Os ácidos láurico (12:0), mirístico (14:0) e araquidônico (20:4) foram encontrados nas algas vermelhas *Arthrocladia* sp., *Centroceras clavulatum* e *Gymnosgongrus griffithsiae* coletadas ao longo da costa do estado do Rio de Janeiro. Da alga verde *Codium bursa* de Cabo Frio (RJ) foram isolados dois 25-metilenesteróis, clerosterol (86,9%) e o codiesterol (6,7%) (SARSA, 1997).

Atualmente os estudos brasileiros continuam focalizando no filo de algas pardas com investigação estrutural de fucoïdanos em *Sargassum stenophyllum* (DUARTE et al., 2001), coletada em Bombinhas (SC). Também há pesquisas com caráter quimiotaxonômico utilizando diterpenos das algas *Dictyota menstrualis* (TEIXEIRA et al., 2001), e estudos de similaridades entre *Dictyota cerviconis* e *Dictyota pardalis* (DE-PAULA et al., 2001), além de estudos de elucidação estrutural de diterpenos dolabelanos de *Dictyota ptafii* (BARBOSA et al., 2003) e de variações na produção de diterpenos na alga *Styopodium zonale* (SOARES et al., 2003).

### 3.1.1.2. *PTEROCLADIELLA CAPILLACEA* (S.G. Gmelin) Santelices & Homnersand

*Pterocladia capillacea* é uma alga vermelha pertencente ao filo das Rhodophytas, classe Florideophyceae, ordem Gelidiales, família Gelidiaceae. As algas deste filo são seres eucariotos, com clorofila **a** e **d** e ficobilinas (*b*, *r* e *c*-ficoeritina, aloficocianina e *c* e *r*-ficocianina), além de xantofilas e amido como substância de reserva. A ocorrência é predominantemente na região equatorial e em águas salgadas, podendo estar presente em profundidades de até 260 metros em regiões de águas com elevado índice de transparência (HORTA, 2000).

Foi descrito que a ordem Gelidiales possui muitas espécies que possuem ágar de alta qualidade (SANTELICES et al., 1980; MCLAHLAN, 1985) e que através de estudos de manipulação genética para espécies economicamente viáveis pode-se chegar ao mapeamento do código genético destas algas (CHENEY, 1998). Estudos utilizando técnicas de citofotometria de variações inter e intra-específicas do ADN nuclear descobriram proteínas codificadoras de aminoácidos presentes na alga vermelha *Pterocladia capillacea* (FRESHWATER, 1992).

Além de estudos genéticos sobre esta alga vermelha, grupos de pesquisadores da Universidade de Buenos Aires realizaram experimentos para isolar polissacarídeos do extrato aquoso, como resíduos de 4-3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose e 2,6-di-O-metilgalactose (ERREA; MATULEWICZ, 1994, 1996 e 2003). Também encontraram atividade antiviral contra *Vibrio nerisis*, *V. pelagis* e *V. vulnificus* de lectinas presentes no extrato aquoso de várias algas marinhas, inclusive em *Pterocladia capillacea* (LIAO et al., 2003).



**Figura 1:** *Pterocladia capillacea* (Wood, 2001; Sohlstrom, 2000)

### **3.2. ENSAIO DE LETALIDADE PARA LARVAS DE ARTEMIA SALINA LEACH**

Compostos bioativos são quase sempre tóxicos em altas doses. Desta maneira, a avaliação da letalidade em um organismo animal menos complexo pode ser usado para um monitoramento simples e rápido durante o fracionamento de extratos. Além disso, geralmente os laboratórios de fitoquímica não estão preparados para a realização de ensaios biológicos elaborados (MACIEL et al., 2002). Assim, muitos grupos de pesquisa têm inserido este bioensaio em suas rotinas de isolamento, purificação e elucidação estrutural, pois os cistos de *Artemia salina* são de baixo custo e facilmente encontrados no comércio, além de permanecerem viáveis por anos no estado seco (MEYER et al., 1982).

*Artemia salina* Leach (Artemiidae) é um microcrustáceo cosmopolita, pertencente à subclasse Branchiopoda. Este organismo produz cistos, os quais permanecem em diapausa enquanto mantidos secos ou em anaerobiose. Após a hidratação, o embrião é ativado e a eclosão costuma ocorrer dentro de 48 horas, liberando-o ainda ligado à membrana. Assim que a membrana se rompe, a larva móvel (o náuplio) é liberada (USEPA, 2002).

Este ensaio foi proposto inicialmente por Michael e colaboradores (1956), e posteriormente desenvolvido por Vanhaecke et al. (1981) e Sleet;

Brendel (1983), baseando-se na possibilidade de imobilizar náuplios de *Artemia salina* em culturas laboratoriais (CARBALLO et al., 2002).

A metodologia admite variações. Solis e colaboradores (1993) propõem o mesmo ensaio em microplacas, sugerindo a partir dos resultados que este bioensaio possa ser utilizado também na busca de novos fármacos antiespasmódicos e até substituir os testes utilizados para triagem de atividade antimalárica, que são de alto custo.

Este ensaio é considerado útil também para detectar toxicidade preliminar (SOLIS et al., 1993), sendo utilizado ainda para detectar toxinas fúngicas (HARWIG et al., 1971) e avaliar a bioatividade de extratos de plantas (McLAUGHLIN et al., 1991), metais pesados (MARTINEZ et al., 1998), pesticidas (BARAHONA et al., 1999) e testes de citotoxicidade em materiais dentários (PELKA et al., 2000).

Carballo e colaboradores (2002) propuseram uma comparação entre dois ensaios de letalidade com larvas de *A. salina* para detectar *in vitro* a citotoxicidade de produtos naturais marinhos e concluíram que os seus resultados possuem a mesma correlação estabelecida para citotoxicidade de extratos de plantas, sugerindo que este bioensaio seja utilizado para testar produtos naturais marinhos com potencial atividade farmacológica.

Em outro estudo utilizando 22 extratos etanólicos de macroalgas bênticas (13 algas pardas, 6 algas verdes e 3 algas vermelhas) provenientes da costa de Karachi, obteve-se um resultado de seis extratos ativos para o ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina*, sendo a maioria proveniente das algas pardas. Concluiu-se que extratos etanólicos provenientes daquelas macroalgas apresentaram toxicidade e que os extratos provenientes das algas pardas são os mais tóxicos, quando comparada à concentração letal média (CL<sub>50</sub>) com os extratos de algas verdes e vermelhas (ARA et al., 1999).

Considerando os resultados obtidos nos estudos analisados anteriormente, propomos a realização de um *screening* inicial de macroalgas bênticas do estado de Santa Catarina com posterior investigação fitoquímica

de uma destas algas, biomonitorado por ensaio de letalidade utilizando larvas de *Artemia salina*.

### 3.3. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Atualmente, o número de investigações dos efeitos da luz, do oxigênio livre e de radicais livres ativos ( $O_2^-$ ,  $OH^-$  e radicais peróxido lipídicos) nos sistemas biológicos têm crescido (FOTI et al., 1994). Os resultados mostram que os radicais livres são prejudiciais à saúde, envolvendo-se em processos de envelhecimento como também em patogêneses de muitas doenças do ser humano, como a aterosclerose, artrite reumatóide, distrofia muscular, catarata, muitas desordens neurológicas e de câncer (BRECCIA et al., 1986; GIROTTI, 1990; STEINBERG et al., 1989; SUN, 1990). As membranas celulares, o ADN e as proteínas são as principais moléculas-alvo dos radicais livres e do oxigênio livre. As membranas são altamente afetadas pelos radicais peróxidos que atacam os fosfolipídeos poliinsaturados até que os metilenos bisalílicos sejam comprometidos (GIROTTI, 1990; BARCLAY, 1993).

As reações com radicais livres modificam as bases purínicas e pirimidínicas do ADN, e muitas proteínas são oxidadas até que os locais ligados ao aminoácido estejam ocupados por resíduos de metais, no caso de muitos aminoácidos, há a perda da amônia e a formação de derivados da carbonila (STADTMAN, 1992). A peroxidação lipídica é a principal causa da baixa da qualidade de alimentos ricos em ácidos graxos (RAMANATHAN; DAS, 1992).

Os fenóis são antioxidantes particularmente efetivos para ácidos graxos poliinsaturados, pois eles transferem facilmente um átomo de hidrogênio para os radicais de peróxido de lipídeos. A formação dos radicais ariloxílicos nesta reação é usada como um ativador lento na quebra da cadeia, então a reação em cadeia da peroxidação lipídica é interrompida (FISCH et al., 2003). Muitas investigações usando diferentes métodos para determinar propriedades antioxidantes de fontes naturais têm sido realizadas. Esses estudos mostram

que a maioria dos antioxidantes tem estrutura hidrofílica, enquanto as investigações com antioxidantes lipofílicos são raras (VINSON et al., 2001).

Dos muitos ensaios que existem para detectar a atividade antioxidante *in vitro* a reação com o radical  $\alpha, \alpha$ -difeníl- $\beta$ -picril-hidrazila (DPPH) serve como método para detecção direta da atividade de seqüestro de radical em soluções orgânicas e é utilizado em ensaios guiados de triagem para posterior fracionamento (FISCH et al., 2003). O ensaio com DPPH foi sumarizado e introduzido, no início dos anos 50, por Marsden Blois, da Universidade de Stanford (BLOIS, 1958).

Este ensaio tem como princípio o deslocamento do elétron sobressalente para a molécula de DPPH até que as moléculas não possam mais passar pelo processo de dimerização. Esse deslocamento leva à coloração violeta da solução, caracterizada por um pico de absorção em solução de etanol em 520 nm. Quando a solução de DPPH é colocada com uma substância que doa um átomo de hidrogênio, há o aparecimento da forma reduzida com perda da cor violeta e a formação de um resíduo amarelo (MOLYNEUX, 2004).

Os organismos marinhos são fontes ricas de metabólitos secundários com muitas atividades biológicas (CAPON, 2001) e há alguns estudos focalizados principalmente nos efeitos antioxidantes em extratos brutos (NAKAGAWA et al., 1998). As substâncias marinhas antioxidantes incluem pigmentos como clorofilas (WATANABE et al., 1993) e carotenos (CHOI et al., 2002), como derivados do tocoferol (vitamina E) e isoprenóides (KOBAYASHI, 1994).

As algas marinhas, como o *wakame* e *hizikia*, constituem uma das fontes mais comum de alimento no Japão. Já é sabido que estas possuem vitaminas e substâncias com atividade antioxidante, como os fenóis (FUJIMOTO; KANEDA, 1984). Um *screening* de extratos metanólicos e diclorometânicos de algas para investigação de atividade antioxidante revelou que o extrato diclorometânico da alga parda *Cystoseira crinita* apresentou atividade nos ensaios com ácido tiobarbitúrico (TBARS) e DPPH devido à produção de

derivados do tetrapreniltoluquinol que são considerados metabólitos secundários (FISH et al., 2003).

Em relação a algas coletadas em litoral brasileiro não foram encontrados relatos na literatura, o que nos motivou a incluir também a avaliação de atividade antioxidante em nossa triagem de algas da ilha de Santa Catarina.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Materiais utilizados**

#### **4.1.1. Material estudado**

O material foi coletado no litoral catarinense na faixa do médio e infra-litoral, no período de novembro a dezembro de 2002 e julho de 2003, sendo identificado pelo Prof. Dr. Paulo Horta e colaboradores, pesquisadores do Departamento de Botânica, CCB-UFSC.

#### **4.1.2. Equipamentos utilizados**

Para a concentração dos extratos etanólicos e das frações obtidas foi utilizado o evaporador rotatório a vácuo Quimis, sob temperatura entre de 40 a 60 °C.

No ensaio de atividade antioxidante utilizou-se para leitura de absorbância o espectrofotômetro Perkin Elmer - lambda 10.

Os espectros de massa e de ressonância magnética de carbono 13 e próton foram obtidos no Instituto de Química Orgânica da Universidade de Buenos Aires, em espectrômetro Bruker AM 500 (500 MHz para próton e 125 MHz para carbono 13), pelo Prof Dr. Jorge Palermo.

#### **4.1.3. Solventes e reagentes**

Os solventes utilizados foram de grau analítico de procedência Nuclear, Merck e Vetec.

As fases estacionárias utilizadas na cromatografia líquida em coluna (CLC) foram gel de sílica 60 em duas faixas de granulometria (70-270 e 230-400 mesh) da marca Vetec além de Sephadex LH-20 (Pharmacia).

Para as cromatografias em camada delgada (CCD) foram usadas placas de gel de sílica 60 F 254 sobre base de alumínio, de marcas Merck e



Macherey-Nagel, com 0,25 mm de espessura e partículas entre 5 a 40 µm de diâmetro.

Para detecção das substâncias nas placas cromatográficas foram utilizados como reveladores:

\* Anisaldeído-sulfúrico (WAGNER e BLADT, 1995)

\* NP/PEG (WAGNER et al., 1986)

\* Orcinol-sulfúrico (KOSCIELAR et al., 1978)

Os padrões de rutina, ácido clorogênico e β-sitosterol, da marca Sigma, foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Marení Rocha Farias, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC. Os padrões de digalactosil diglicerídeo e de quercetina, ambos da marca Sigma, foram cedidos respectivamente pelo Prof. Dr. Marcos Machado, do Departamento de Análises Clínicas da UFSC e pela Profa. Dra. Clarice Azevedo Machado, da Faculdade de Farmácia da PUC-RS.

O reagente difenilpicril-hidrazila (DPPH), marca Sigma, utilizado no ensaio de atividade antioxidante foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Tânia Pasa, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC.

## **4.2. Procedimentos gerais**

### **4.2.1. Screening de macroalgas bêmicas na ilha de Santa Catarina**

#### **4.2.1.1. Coleta do Material**

Amostras de macroalgas bêmicas (26 macroalgas, 10 espécies de Rhodophytas, 6 Phaeophytas e 5 Chlorophytas) foram coletadas nas praias de Canasvieiras e Jurerê (Ilha do Francês), na faixa de médio e infralitoral, no período de novembro a dezembro de 2002.

#### **4.2.1.2. Preparo dos extratos**

Após a coleta, o material foi armazenado em etanol (EtOH) 99% para transporte. Após, retiraram-se todas as epífitas, lavou-se com água destilada e secou-se à temperatura ambiente (25°C) dentro de estufa. Foram utilizados sete dias para secagem e, após este período, o material foi rasurado e macerado em EtOH 99% durante uma semana.

O extrato obtido foi filtrado sob papel filtro e concentrado em rotavapor até *secura total* dos extratos, para cálculo de rendimento.

#### **4.2.1.3. Análise Cromatográfica dos extratos**

Os extratos brutos das macroalgas bêmicas foram divididos em grupos (algas verdes, pardas e vermelhas) e submetidos à análise por CCD.

Após a migração cromatográfica, as placas foram avaliadas sob luz UV em 254 e 365 nm e borrifadas com reagentes específicos para cada padrão utilizado.

Para triagem de glicolípídeos, foi utilizado o padrão de digalactosil diglicerídeo juntamente com os extratos, no sistema de eluentes clorofórmio:metanol:água (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O) 65:25:4 e o revelador orcinol sulfúrico.

Na análise de esteróides foi utilizado o padrão de  $\beta$ -sitosterol juntamente com os extratos, no sistema de eluentes diclorometano:metanol ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH) (80:20). Foi utilizado o revelador anisaldeído sulfúrico.

Para análise dos compostos fenólicos foram utilizados os padrões de quercetina, rutina e ácido clorogênico juntamente com os extratos, no sistema de eluentes acetato de etila:ácido fórmico:água (AcOEt:HCOOH:H<sub>2</sub>O) 80:10:10 e o revelador NP/PEG.

#### **4.2.1.4. Bioensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina***

Foi utilizada a metodologia descrita por Meyer e colaboradores (1982), com algumas modificações.

Os cistos de *Artemia salina* foram colocados em um aquário sob aeração e controle da temperatura e após 48 h de incubação as larvas foram retiradas para o ensaio.

##### **4.2.1.4.1. Preparação das diluições seriadas dos extratos**

Foram realizadas diluições seriadas, de acordo com o cálculo do rendimento dos extratos obtidos de macroalgas bênticas, nas concentrações de 200  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$ , utilizando EtOH 99%. Estas soluções foram aquecidas em banho-maria (50 °C) até total evaporação do solvente. Foram preparados tubos-controle contendo somente solvente ao invés de extrato. Para cada diluição os testes foram realizados em triplicata.

##### **4.2.1.4.2. Incubação das larvas com o material**

A todos os tubos de ensaio foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido. Os tubos foram colocados em sonicador por 10 min e, com auxílio de uma pipeta graduada de 5,0 mL, foram transferidas 10 larvas para cada tubo de ensaio. O volume do tubo foi completado com água do mar para 5,0 mL.

#### **4.2.1.4.3. Contagem das larvas**

Após 24 h em contato com a suspensão dos extratos, realizou-se a contagem do número de larvas sobreviventes. Foram consideradas mortas aquelas larvas que permaneceram imóveis por mais de 10 segundos após agitação suave dos tubos.

#### **4.2.1.4.4. Análise estatística dos resultados**

O cálculo da  $CL_{50}$  dos extratos foi feito a partir das três concentrações estudadas utilizando o programa PROBIT.exe.

A análise estatística dos dados do ensaio de *A. salina* também foi feita pelo teste de Qui-quadrado, tabela de contingência 2X2, utilizando a correção de Yates, sendo considerados significativos ( $\alpha = 0,05$ ) os valores de  $\chi^2$  maiores ou iguais a 3,84 (CENTENO, 1990).

#### **4.2.1.5. Ensaio de Atividade Antioxidante**

Foi utilizada a metodologia descrita por Choi e colaboradores (2002), com algumas modificações.

##### **4.2.1.5.1. Ensaio fotométrico utilizando DPPH**

O reagente DPPH foi dissolvido em EtOH de forma a se obter uma solução padrão na concentração de 0,3 mM.

##### **4.2.1.5.1.1. Preparações das diluições seriadas dos extratos**

Foram realizadas diluições seriadas, de acordo com o cálculo do rendimento dos extratos obtidos de macroalgas bênticas, nas concentrações de 200  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$ , utilizando EtOH 99%. Utilizou-se um tubo para o controle negativo contendo 2,5 mL de EtOH, um tubo “branco” com 2,5 mL de extrato de alga marinha e 1,0 mL de EtOH, três tubos controle positivo contendo 2,5 mL de quercetina nas três concentrações estudadas.

#### 4.2.1.5.1.2. Incubação dos extratos com DPPH

Em tubos de ensaio de 5 mL foram adicionados 2,5 mL dos extratos diluídos e adicionou-se 1,0 mL da solução padrão de DPPH 0,3 mM a todos os tubos de ensaio, exceto ao tubo “branco”. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, os valores de absorbância foram lidos em espectrofotômetro, a 518 nm.

#### 4.2.1.5.1.3. Cálculo da percentagem de seqüestro

Para o cálculo de percentagem da capacidade de seqüestro dos radicais livres foi utilizada a seguinte equação de acordo com Mensor e colaboradores (2001).

$$\% = 100 - [(abs \text{ da amostra} - abs \text{ do branco}) \times 100 / abs \text{ do controle}]$$

### 4.2.2. Investigação fitoquímica da espécie selecionada

#### 4.2.2.1. Preparação do extrato para investigação fitoquímica

Após análise dos resultados do *screening*, foi escolhida a espécie *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmelin) Santelices & Hommersand, Gelidiaceae (Gelidiales, Florideophyceae) para fracionamento e isolamento de substâncias.

O material foi coletado na Reserva do Arvoredo (SC), meso-litoral em julho de 2003. O extrato bruto de *Pterocladia capillacea* foi preparado a partir de 1,5 Kg de alga coletada. Foram realizadas a limpeza, secagem e moagem, resultando em 216,3 g de material seco e moído. Este foi macerado em EtOH durante 7 dias, na proporção de 1 g de material vegetal para 10 mL de líquido extrator. Após, o macerado foi filtrado e concentrado sob baixa pressão em rotavapor, à temperatura de 60 °C.

#### 4.2.2.2. Procedimentos de isolamento

##### 4.2.2.2.1. Fracionamento do extrato (figura 2)

###### a) Partição com solventes e bioensaio com larvas de *Artemia salina*

Após evaporação do macerado em evaporador rotatório, foram obtidos 18,84 g de extrato mole, deste foram retirados 0,24 g que foram ressuspensos em 10,0 mL de MeOH aquoso 90% e submetidos à partição em funil de separação com éter de petróleo,  $\text{CHCl}_3$  e AcOEt (3 x 5,0 mL cada partição).

As frações obtidas foram evaporadas, analisadas por CCD e submetidas, juntamente com o extrato bruto, ao bioensaio com larvas de *Artemia salina*.

###### b) Fracionamento do extrato bruto

Na primeira coluna cromatográfica de gel de sílica (coluna 1), utilizou-se  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  para suspensão do adsorvente. A coluna possuía 6,5 cm de diâmetro e foi preenchida até 28,5 cm de altura, sendo utilizados 400 g de gel de sílica (70-270 mesh). Foram aplicados 10 g de extrato bruto dissolvido em 20 mL de etanol (tabela 8).

**Tabela 8** : Desenvolvimento da coluna 1.

<b>Extrato bruto</b>	<b>Sistemas de eluentes</b>	
10 g de extrato bruto <b>Coluna</b> 6,5 cm de diâmetro 28,5 cm de altura <b>Montagem</b> 400 g de gel de sílica (70- 230 mesh) suspensos em $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 100%	frações 1-14
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt (90:10)	frações 15-17
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt (80:20)	frações 18-20
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt (70:30)	frações 21-22
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt (60:40)	frações 23-24
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :AcOEt (1:1)	frações 25-31
	AcOEt 100%	frações 32-34
	AcOEt:MeOH (90:10)	frações 35-38
	AcOEt:MeOH (1:1)	frações 39-41
	MeOH 100%	frações 42-47
	MeOH: $\text{H}_2\text{O}$ (90:10)	frações 48-50

Ao todo foram coletadas 50 frações com volumes entre 200 e 300 mL que foram reunidas em 13 grupos de frações de acordo com perfil em CCD e codificadas em C1 e o número de cada grupo.

### c) Obtenção de C2F8

A fração C1F1 (125 mg), resuspendida em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , foi submetida a uma nova separação cromatográfica (coluna 2) em que se utilizou  $\text{CHCl}_3$ , ciclo-hexano (Chx) e MeOH para eluição (tabela 9).

**Tabela 9:** Montagem e desenvolvimento da coluna 2.

Coluna	Montagem	Sistemas de eluentes	
1 cm de diâmetro 35 cm de altura	15 g de gel de sílica (70-230 mesh) dissolvidos em Chx: $\text{CHCl}_3$ (80:20)	Chx: $\text{CHCl}_3$ (80:20)	frações I-IV e 1-5???
		Chx: $\text{CHCl}_3$ (60:40)	frações 6-18
		Chx: $\text{CHCl}_3$ (20:80)	frações 19-26
		Chx: $\text{CHCl}_3$ (1:1)	frações 27-36
		$\text{CHCl}_3$ :MeOH (1:1)	frações 37-41

Foram coletadas frações de 50 mL. As 45 frações coletadas foram reunidas em 9 grupos de frações e denominadas de C2 e o número de cada grupo.

A fração C2F8 (20 mg) foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa, no sistema de eluente clorofórmio:ciclohexano ( $\text{CHCl}_3$ :Chx) 80:20, obtendo-se o composto **C2F8** (10,0 mg).

### d) Obtenção de C3F3

A fração C1F2 (75 mg) foi submetida à coluna cromatográfica (coluna 3) de 1 cm de diâmetro e 42 cm de comprimento, utilizando 7 g de gel de sílica fina (230-400 mesh) e  $\text{CHCl}_3$  para sua montagem. Foram empregados como eluentes  $\text{CHCl}_3$  100% (frações 1-19) e  $\text{CHCl}_3$ :MeOH 1:1 (frações 20-24), sendo que foram reunidas em 5 grupos de frações de acordo com o perfil em CCD e codificadas em C3 e o número do grupo.

Desta coluna cromatográfica obteve-se no grupo de frações F2 o composto **C3F3** (6,0 mg).

#### e) Obtenção de C4F1 e C4F9

A fração C1F10 (125 mg) foi submetida a uma nova coluna cromatográfica (coluna 4) com 1,5 cm de diâmetro e 45 cm de altura e utilizou-se 14 g de gel de sílica fina (230-400 mesh) e AcOEt:MeOH (97:3) para sua montagem. Foram coletadas 59 frações de 10 mL, com os seguintes eluentes: AcOEt:MeOH 97:3 (frações 1-40) e MeOH 100% (frações 41-59).

As frações obtidas foram reunidas em 9 grupos de frações de acordo com o perfil em CCD e denominadas C4 e o número do grupo. Foi obtido o composto **C4F1** (4,0 mg).

A fração C4F9 (15 mg) foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa em sistema de eluentes: CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (60:35:5), obtendo-se o composto **C4F9** (2,0 mg).

#### 4.2.2.2.2. Colunas cromatográficas que não levaram ao isolamento de substâncias

Estas colunas cromatográficas realizadas durante o trabalho de mestrado originaram frações com rendimento muito pequeno e/ou nenhuma fração que tenha conduzido a substâncias isoladas.

#### a) Coluna 2F

A fração C1F5 (146 mg) foi submetida a cromatografia líquida em coluna (tabela 10).

**Tabela 10:** Montagem e desenvolvimento da coluna 2F

Coluna	Montagem	Sistemas de eluentes	
2 cm de diâmetro 34,5 cm de altura	14 g de gel de sílica (70-230 mesh) CHCl <sub>3</sub> :C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> :AcOEt (50:10:1)	CHCl <sub>3</sub> :C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> :AcOEt (50:10:1)	frações 1-15
		CHCl <sub>3</sub> :C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> :AcOEt (50:10:1,5)	frações 16-20
		CHCl <sub>3</sub> :C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> :AcOEt (50:10:2)	frações 21-24
		AcOEt 100%	frações 25-28
		MeOH 100%	frações 29-33



Foram coletadas 33 frações de 50 mL e reunidas em 9 grupos de frações de acordo com o perfil em CCD. As frações reunidas foram codificadas em C2Ff e número de cada grupo.

### b) Coluna 3F

A fração C2Ff2 (54 mg) foi submetida a uma nova cromatografia em coluna (tabela 11).

**Tabela 11:** Montagem e desenvolvimento da coluna 3F

Coluna	Montagem	Sistemas de eluentes	
		1 cm de diâmetro 42 cm de altura	5,4 g de gel de sílica (70-230 mesh) Chx:AcOEt (10:1)

Foram coletadas 36 frações de 50 mL. As frações foram reunidas em 7 grupos de frações de acordo com o perfil em CCD e denominadas em C3Ff e o número de cada grupo.

### c) Coluna 4F

A fração C1F11 (45 mg) foi submetida a uma nova CLC de 1 cm de diâmetro por 42 cm de altura. Utilizou-se de 5,0 g de gel de sílica fina (230-400 mesh) e sistema de eluição  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (92:8) para sua montagem.

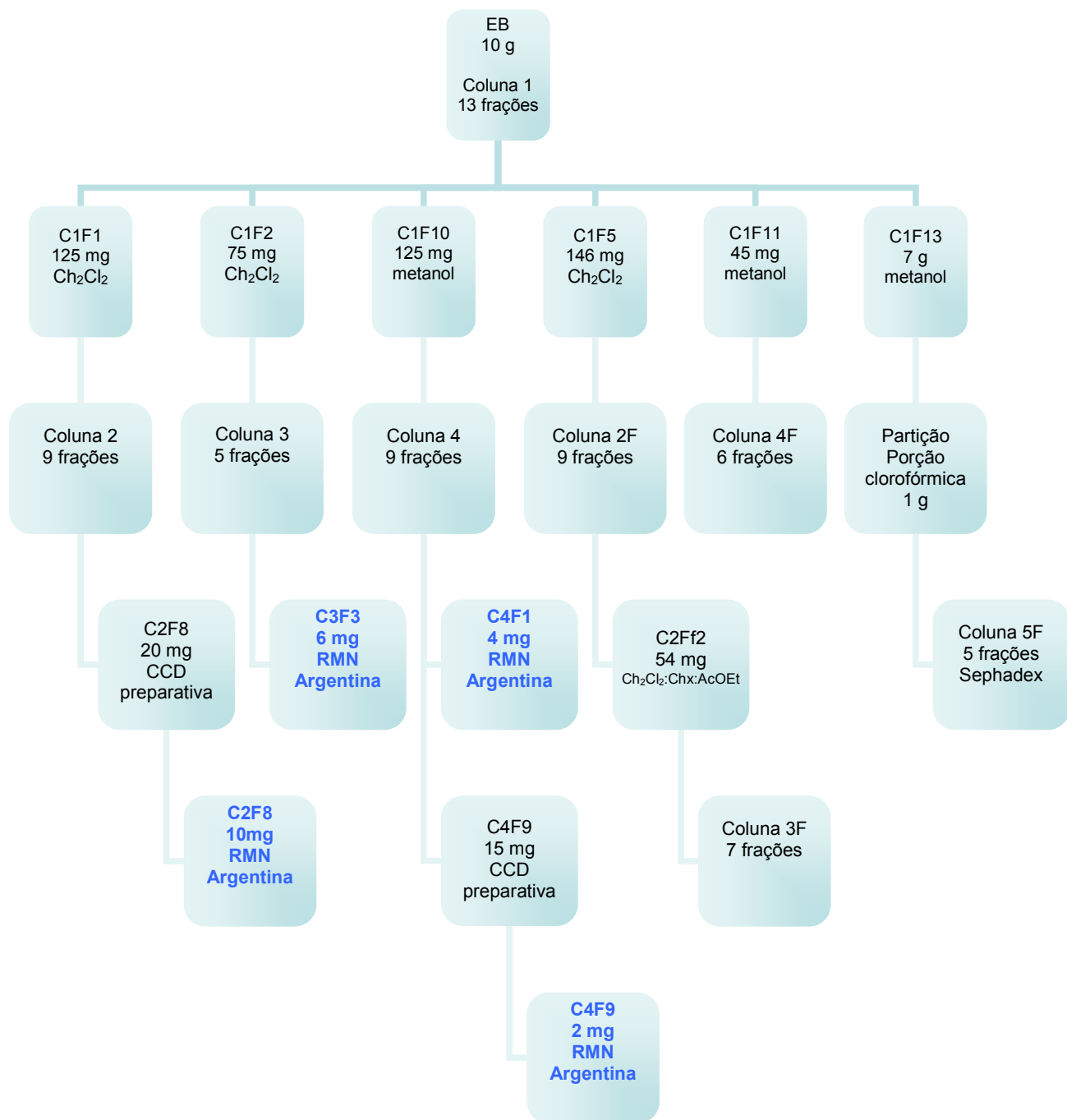
Coletaram-se 30 frações de 50 mL que foram reunidas em 6 grupos de frações de acordo com o perfil na CCD e codificadas em C4Ff e o número de cada grupo.

### d) Coluna 5F

A fração C1F13 (7,0 g) foi submetida à partição em funil de separação com éter de petróleo,  $\text{CHCl}_3$  e AcOEt (3 x 5,0 mL cada partição) e da sub-fração na porção clorofórmica (1,0 g) foi realizada uma CLC. A coluna possuía 33 cm de altura e 5 cm de diâmetro, utilizou-se 100 mL de

suspensão de Sephadex LH-20 (25 g) em MeOH para sua montagem e eluição.

Foram coletadas 25 frações de 200 mL e reunidas em 5 grupos de frações de acordo com o perfil em CCD e codificadas em C5Ff e o número de cada grupo.



**Figura 2:** Esquema do fracionamento do extrato etanólico bruto (EB) de *Pterocladia capillacea*.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. *Screening* das macroalgas bênticas

O *screening* de macroalgas bênticas abrangeu 26 amostras, de 19 espécies diferentes as quais foram assim classificadas: 6 Chlorophytas (algas verdes), 8 Phaeophytas (algas pardas) e 12 Rhodophytas (algas vermelhas).

Em relação às Rhodophytas e Phaeophytas todas pertencem a mesma classe Florideophyceae e Phaeophyceae, respectivamente. Entre as Chlorophytas, o gênero *Codium* pertence à classe das Bryospsidophyceae e as demais a Ulvaphyceae. Como a maioria das macroalgas coletadas pertence a famílias diferentes, a taxonomia não foi utilizada como critério para possíveis discussões de resultados.

Conforme tabelas 12 e 13, as espécies que obtiveram um maior rendimento foram *Sargassum stenophyllum* (17%) e *Padina gymnospora* (16%) ambas coletadas na Ilha do Francês. Este cálculo foi feito uma vez que o rendimento de extração é um dos aspectos importantes para o futuro fracionamento e isolamento de substâncias de interesse da espécie a ser estudada, pois quanto maior o seu rendimento, menor a quantidade de biomassa necessária para obter quantidades suficientes de substâncias puras para análise espectral.

**Tabela 12:** Algas marinhas coletadas na Ilha do Francês (Jurerê), mesolitoral em 22/11/02.

Filo	Espécie	Quantidade de material	Rendimento da extração (m/m)
Chlorophyta	<i>Codium isthmocladum</i> Vickers	1,2 g	4%
	<i>Ulva fasciata</i> Delile	0,9 g	8%
Phaeophyta	<i>Colpomenia sinuosa</i> Derbés & Solier	3,5 g	4%
	<i>Dictyota cervicomis</i> Kützting	2,6 g	3%
	<i>Padina gymnospora</i> (Kützting) Sonder	1,5 g	16%
	<i>Sargassum stenophyllum</i> Martius	2,6 g	17%
	<i>Sargassum vulgare</i> C. Agardh, nom. illeg	1,8 g	10%
Rhodophyta	<i>Acanthophora spicifera</i> (M. Vahl) Børgesen	0,7 g	5%
	<i>Galaxaura marginata</i> ( Ellis & Solander) J.V. Lamauroux	1,7 g	10%
	<i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) J.V. Lamauroux	6,2 g	6%
	<i>Laurencia</i> sp Lamauroux	2,6 g	4%
	<i>Pterocliadiella capillacea</i> (S.G. Gmelin) Santelices & Homnersand	1,2 g	7%

**Tabela 13:** Algas marinhas coletadas na praia de Canasvieiras, mesolitoral em 07/12/02.

Filo	Espécie	Quantidade de material	Rendimento da extração (m/m)
Chlorophyta	<i>Chaetomorpha antennina</i> (Bory de Saint-Vicent) Kützting	0,2 g	5%
	<i>Codium decorticatum</i> (Woodward) M.A. Howe	1,2 g	7%
	<i>Enteromorpha intestinalis</i> (Linnaeus) Link	0,9 g	2%
	<i>Ulva fasciata</i> Delile	0,6 g	6%
Phaeophyta	<i>Ectocarpus breviarticulatus</i> J. Agardh	0,5 g	2%
	<i>Padina gymnospora</i> (Kützting) Sonder	0,3 g	7%
	<i>Sargassum stenophyllum</i> Martius	1,6 g	4%
Rhodophyta	<i>Acanthophora spicifera</i> (M. Vahl) Børgesen	1,5 g	6%
	<i>Bostrychia</i> sp. Montagne	1,2 g	8%
	<i>Centroceras clavulatum</i> (C. Agardh) Montagne	0,5 g	2%
	<i>Chondracanthus acicularis</i> (Roth) Fredericq	0,4 g	5%
	<i>Gracilaria domingiensis</i> (Kützting) Sonder ex Dickie	0,5 g	12%
	<i>Grateloupia doryphora</i> (Montagne) M.A. Howe	0,1 g	10%
<i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) J.V. Lamauroux	1,1 g	5%	

### 5.1.1. Ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* Leach

Este bioensaio tem sido utilizado para uma variedade de substâncias, incluindo os testes *pré-screening* para substâncias antitumorais (MEYER et al., 1982; SOLIS et al., 1993; McLAUGHLIN, 1991).

### a) Análise estatística pelo método do qui-quadrado

Pelos dados apresentados na tabela 14, observa-se um predomínio de resultados significativos para o teste de letalidade para larvas de *A. salina* nas algas marinhas do filo Rhodophyta, onde encontramos as espécies *Acanthophora spicifera*, *Hypnea musciformis* e *Pterocladia capillacea* com resultados estatisticamente significativos nas três concentrações estudadas. Em relação aos outros filios, somente as alga verdes *Enteromorpha intestinalis* e *Chaetomorpha antennina* apresentaram resultados estatisticamente significativos nas 3 concentrações estudadas.

A ocorrência de resultados estatisticamente significativos para extratos de espécies do filo Rhodophyta pode ser devido a este possuir diferenças em relação às outras algas eucarióticas, como ausência de estágios flagelados, presença de ficobilinas e clorofila *d*, tilacóides não agregados nos cloroplastos e reprodução sexuada oogâmica envolvendo células femininas (carpogônio) e masculinas (espermácio) dando a este filo um maior estágio evolutivo, conseqüentemente uma maior produção de metabólitos secundários diversificados (VAN DEN HOEK et al., 1995).

Observamos diferenças entre as espécies de um mesmo gênero, como *Codium decorticatum* e *Codium isthmocladum*, sendo que para a primeira foram obtidos índices de letalidade estatisticamente significativos nas concentrações de 100 e 200 µg/mL, enquanto para *Codium isthmocladum* os resultados não foram estatisticamente significativos. Isto pode dever-se a diferenças propriamente ditas entre as espécies e/ou por terem sido coletadas em locais diferentes (fatores ambientais).

Podemos observar a relevância da influência do local de coleta na diferença dos valores entre a amostra *Hypnea musciformis* coletada na Ilha do Francês (dados estatisticamente significativos apenas na concentração 200 µg/mL) e a coletada na praia de Canasvieiras (dados estatisticamente significativos nas 3 concentrações estudadas), onde o hidrodinamismo, herbivoria, pH e salinidade podem influenciar na produção de metabólitos destas algas (HORTA et al., 2001).

**Tabela 14:** Valores de  $\chi^2$  calculados para os diferentes extratos no ensaio de letalidade para larvas de *A. salina* do screening de macroalgas bênticas. Resultados iguais ou superiores a 3,84 são considerados significativos ( $\alpha=0,05$ ). Os códigos especificam local de coleta, sendo F 11.02 = Ilha do Francês em 11/2002 e C 12.02 = Canasvieiras em 12/2002.

Alga marinha	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/ml
<i>Acanthophora spicifera</i> F11.02	6,95	10,11	18,03
<i>Acanthophora spicifera</i> C12.02	5,75	10,93	18,03
<i>Bostrychia</i> sp C12.02	0,96	8,37	18,03
<i>Centroceras clavulatum</i> C12.02	2,99	8,37	18,03
<i>Chaetomorpha antennina</i> C12.02	6,95	10,11	18,03
<i>Chondracanthus acicularis</i> C12.02	0,96	10,11	22,16
<i>Codium decorticatum</i> C12.02	2,99	10,11	18,03
<i>Codium isthmocladum</i> F11.02	0,04	0,05	0,96
<i>Colpomenia sinuosa</i> F11.02	0,23	2,06	10,11
<i>Dictyota cervicomis</i> F11.02	1,26	6,95	18,03
<i>Enteromorpha intestinalis</i> C12.02	8,37	10,93	22,16
<i>Ectocarpus breviarticulatus</i> C12.02	0,51	8,37	10,93
<i>Galaxaura marginata</i> F11.02	1,65	5,75	10,93
<i>Gracilaria domingiensis</i> C12.02	1,26	8,37	18,03
<i>Grateloupia doryphora</i> C12.02	0,96	3,18	8,37
<i>Hypnea musciformis</i> F11.02	0,08	0,71	10,93
<i>Hypnea musciformis</i> C12.02	5,75	10,93	18,03
<i>Laurencia</i> sp F11.02	0,04	3,18	22,16
<i>Padina gymnospora</i> F11.02	3,18	8,37	14,08
<i>Padina gymnospora</i> C12.02	1,65	6,95	14,80
<i>Pterocladia capillacea</i> F11.02	<b>4,72</b>	<b>10,11</b>	<b>18,03</b>
<i>Sargassum vulgare</i> F11.02	0,71	2,06	10,93
<i>Sargassum stenophyllum</i> F11.02	0,08	0,96	18,03
<i>Sargassum stenophyllum</i> C12.02	0,05	0,71	10,93
<i>Ulva fasciata</i> F11.02	0,96	2,06	10,11
<i>Ulva fasciata</i> C12.02	0,51	1,26	10,93

#### b) Cálculo da CL<sub>50</sub>

Em relação aos dados observados na tabela 15, percebe-se que há um predomínio de valores de CL<sub>50</sub> baixos, ou seja, com alta letalidade para larvas de *A. salina*, nas algas pertencentes ao filo Rhodophyta, como *Acanthophora spicifera* (Ilha do Francês e Canasvieiras), *Hypnea musciformis* (Canasvieiras) e *Pterocladia capillacea*. Isto poderia ser explicado ao menos parcialmente pela semelhança entre este filo e o filo das Cyanofitas (algas azuis ou cianobactérias) (HORTA, 2000), já que em estudo realizado por Falch e colaboradores (1995) observou-se que a cianobactéria *Fischerella ambigua* exibia também uma alta potência letal para *A. salina*.

Também foram observadas atividades citotóxicas altas em algas pardas, como *Ectocarpus breviarticulatus* ( $CL_{50} = 20,7 \mu\text{g/mL}$ ) e *Padina gymminospora* Canasvieiras ( $CL_{50} = 31,5 \mu\text{g/mL}$ ), corroborando os dados apresentados por Ara e colaboradores (1999). Para esse teste também podemos observar diferenças na atividade entre espécies diferentes, *Codium decorticatum* ( $CL_{50} = 39,0 \mu\text{g/mL}$ ) e *Codium isthmocladum* ( $CL_{50} = 229,2 \mu\text{g/mL}$ ).

Dentro da espécie *Hypnea musciformis* também foram observadas diferenças quanto ao local de coleta: Ilha do Francês ( $CL_{50} = 21,8 \mu\text{g/mL}$ ) e Canasvieiras ( $CL_{50} = 97,5 \mu\text{g/mL}$ ), confirmando a influência dos fatores ambientais na produção de metabólitos nas macroalgas bênticas.

**Tabela 15:** Valores calculados de  $CL_{50}$  em relação ao número de larvas de *A.salina* mortas (de um total de 30) para os diferentes extratos do *screening* de macroalgas bênticas. Os códigos especificam local de coleta, sendo F 11.02 = Ilha do Francês em 11/2002 e C 12.02 = Canasvieiras em 12/2002. Os valores entre parênteses são o intervalo de confiança.

Alga marinha	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	$CL_{50}$
<i>Acanthophora spicifera</i> F11.02	24	26	29	16,6 (0,000 - 40,528)
<i>Acanthophora spicifera</i> C12.02	23	27	29	21,8 (0,010 - 43,408)
<i>Bostrychia</i> sp C12.02	15	25	29	52,8 (31,144 - 68,561)
<i>Centroceras clavulatum</i> C12.02	19	25	29	39,6 ((11,460 – 57,901)
<i>Chaetomorpha antennina</i> C12.02	24	26	29	16,6 (0,000 – 40,528)
<i>Chondracanthus acicularis</i> C12.02	15	26	30	53,4 (96,847 – 65,756)
<i>Codium decorticatum</i> C12.02	19	26	29	39,0 (11,604 – 56,561)
<i>Codium isthmocladum</i> F11.02	5	8	15	229,2 (144,459 – 2459,067)
<i>Colpomenia sinuosa</i> F11.02	11	18	26	79,4 (50,150 – 106,721)
<i>Dictyota cervicomis</i> F11.02	16	24	29	51,0 (27,076 – 67,877)
<i>Enteromorpha intestinalis</i> C12.02	25	25	30	57,1 (31,073 – 76,497)
<i>Ectocarpus breviarticulatus</i> C12.02	13	27	27	20,7 (0,002 – 40,629)
<i>Galaxaura marginata</i> F11.02	17	23	27	44,8 (9,117 – 60,329)
<i>Gracilaria domingiensis</i> C12.02	16	25	28	48,0 (20,441 – 66,691)
<i>Grateloupia doryphora</i> C12.02	15	20	25	57,8 (12,217 – 88,531)
<i>Hypnea musciformis</i> F11.02	9	27	26	21,8 (0,010 – 43,408)
<i>Hypnea musciformis</i> C12.02	23	14	29	97,5 (68,524 – 128,814)
<i>Laurencia</i> sp F11.02	5	20	30	85,0 (65,647 – 100,342)
<i>Padina gymnospora</i> F11.02	20	24	28	45,5 (15,350 – 65,653)
<i>Padina gymnospora</i> C12.02	17	25	28	31,5 (1,231 – 54,149)
<i>Pterocliadiella capillacea</i> F11.02	<b>22</b>	<b>26</b>	<b>29</b>	<b>26,6 (0,491 – 47,613)</b>
<i>Sargassum vulgare</i> F11.02	14	18	27	67,4 (35,348 – 92,955)
<i>Sargassum stenophyllum</i> F11.02	9	15	29	88,5 (65,847 – 110,150)
<i>Sargassum stenophyllum</i> C12.02	8	14	27	98,1 (71,581 – 125,140)
<i>Ulva fasciata</i> F11.02	15	16	26	76,2 (45,432 – 103,535)
<i>Ulva fasciata</i> C12.02	13	18	27	63,2 (22,556 – 92,743)



### 5.1.2. Atividade Antioxidante - Ensaio fotométrico utilizando DPPH

O ensaio de atividade antioxidante utilizando DPPH foi realizado em uma etapa posterior à escolha da espécie para investigação fitoquímica, com o objetivo de enriquecer o *screening* de macroalgas bênticas na Ilha de Santa Catarina para futuros estudos. Esta metodologia foi introduzida há aproximadamente 50 anos atrás por Morsden Blois (1958), sendo um método simples para triagem de atividade antioxidante em extratos de plantas e outros organismos (MOLYNEUX, 2004).

#### 5.1.2.1. Percentagem de seqüestro

Em relação aos dados apresentados na tabela 16, observamos valores altos na concentração de 100 µg/mL para extratos de *Codium isthmocladum* (70%), possivelmente devido a presença da substância feofitina encontrada em algas verdes e que possui alta atividade antioxidante (NISHIBORI; NAMIKI, 1998), bem como de *Ectocarpus brevearticlaris* (62%), possivelmente pela presença na ordem Ectocarpales de taninos que têm alto poder antioxidante (YAMADA, 2000). Também observamos valores crescentes de percentagem de acordo com o aumento da concentração estudada nas macroalgas *Codium decortdatum*, *Padina gymnospora* (Canasvieiras), *Sargassum vulgare* e nas duas amostras de *Ulva fasciata*.

Em relação aos resultados observados no mesmo gênero, verificou-se que *Sargassum vulgare* teve um perfil de percentagem de seqüestro melhor em relação a *Sargassum stenophyllum* (Ilha do Francês). Já em relação aos efeitos ambientais observamos diferenças nas espécies para as quais foram feitas coletas em locais diferentes. Para *Hypnea musciformis* Canasvieiras foram observados valores menores para percentuais de seqüestro em relação à espécie coletada na Ilha do Francês, já para *Padina gymnospora* ocorreu o contrário e para o *Sargassum stenophyllum* as diferenças foram mínimas.

**Tabela 16:** Resultados em % de capacidade de seqüestro de radicais livres dos extratos do *screening* de macroalgas bênticas. Onde F = Ilha do Francês e C = Canasvieiras.

<b>Alga marinha</b>	<b>50 µg/mL</b>	<b>100 µg/mL</b>	<b>200 µg/mL</b>
<i>Acanthophora spicifera F11.02</i>	12	24	47
<i>Acanthophora spicifera C12.02</i>	31	25	22
<i>Bostrychia sp C12.02</i>	30	30	27
<i>Centroceras clavulatum C12.02</i>	39	35	47
<i>Chaetomorpha antennina C12.02</i>	34	41	36
<i>Chondracanthus acicularis C12.02</i>	33	37	49
<i>Codium decortcatum C12.02</i>	35	42	49
<i>Codium isthmocladum F11.02</i>	42	70	65
<i>Colpomenia sinuosa F11.02</i>	33	33	29
<i>Dictyota cervicomis F11.02</i>	25	22	20
<i>Enteromorpha intestinalis C12.02</i>	37	31	34
<i>Ectocarpus breviararticulatus C12.02</i>	24	62	46
<i>Galaxaura marginata F11.02</i>	26	38	37
<i>Gracilaria domingiensis C12.02</i>	35	32	31
<i>Grateloupia doryphora C12.02</i>	39	34	38
<i>Hypnea musciformis F11.02</i>	33	31	38
<i>Hypnea musciformis C12.02</i>	28	22	15
<i>Laurencia sp F11.02</i>	33	33	29
<i>Padina gymnospora F11.02</i>	34	33	26
<i>Padina gymnospora C12.02</i>	35	44	49
<i>Pterocladia capillacea F11.02</i>	34	36	36
<i>Sargassum vulgare F11.02</i>	35	42	49
<i>Sargassum stenophyllum F11.02</i>	30	30	26
<i>Sargassum stenophyllum C12.02</i>	31	29	27
<i>Ulva fasciata F11.02</i>	34	37	38
<i>Ulva fasciata C12.02</i>	30	39	54

### 5.1.3. Análise Cromatográfica dos extratos

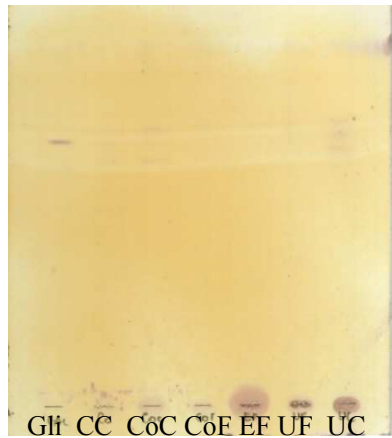
Esta análise em diferentes sistemas cromatográficos e com diferentes padrões de substâncias usualmente encontradas em extratos de plantas medicinais teve como objetivo enriquecer o *screening* e traçar perfis das possíveis algas marinhas a serem investigadas futuramente em estudos de fitoquímica.

#### a) Com padrão de glicolipídeo

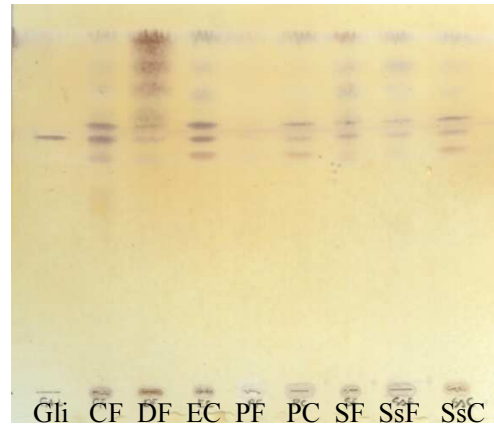
Analisando os cromatogramas (figuras 3, 4 e 5) podemos observar que naqueles correspondentes ao filo de algas verdes não foram visualizadas substâncias passíveis de caracterização como glicolipídeos (reação com orcinol-sulfúrico). Já no grupo de algas pardas, com exceção da *Padina gymnospora* (Ilha do Francês), todas apresentaram o padrão de digalactosil

diglicerídeo, sendo que o extrato de *Dictyota cerviconis* apresentou manchas com valores de Rf entre 0,62 e 0,72, destacando-se em relação às outras.

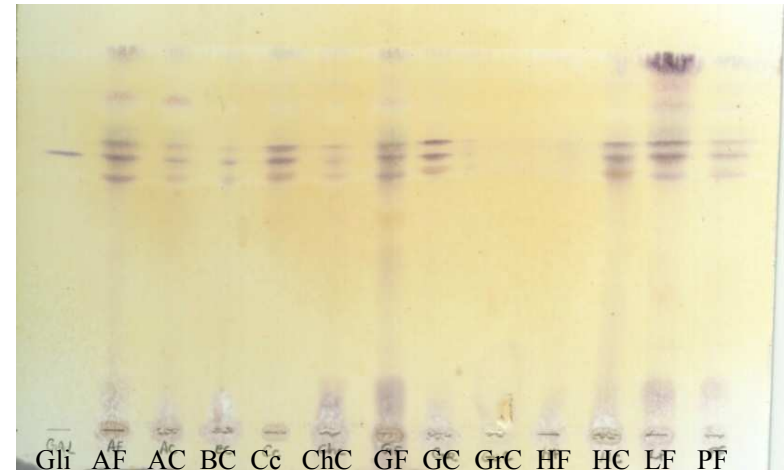
Em relação às algas vermelhas, com exceção da *Grateloupia doryphora* e *Hypnea musciformis* (Ilha do Francês), todas apresentaram manchas correspondentes ao padrão digalactosil diglicerídeo e perfis cromatográficos semelhantes. Destaca-se a presença de manchas em Rf = 0,62-0,68 no cromatograma de *Laurencia* sp, diferenciando-se das outras.



**Figura 3:** CCD algas verdes



**Figura 4:** CCD algas pardas



**Figura 5:** CCD algas vermelhas

Sistema eluente:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O (65:25:5). Revelador: orcinol-sulfúrico

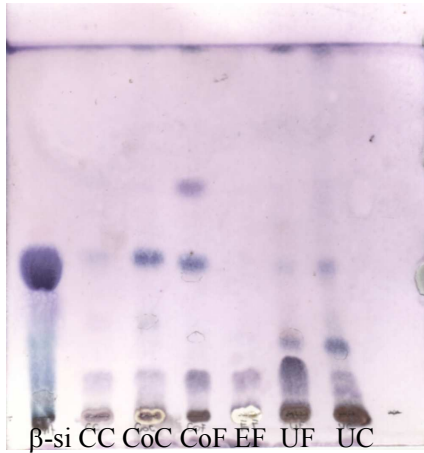
Legenda: **Algas verdes:** CC = *Chaetomorpha antennina* C, CoC = *Codium decorticatum* C, CoF = *Codium isthmocladium* IF, EF = *Enteromorpha intestinalis* IF, UF = *Ulva fasciata* IF e UC = *Ulva fasciata* C./ **Algas pardas:** CF = *Colpomenia sinuosa* IF, DF = *Dictyota cervicomis* IF, EC = *Ectocarpus breviarticulatus* C, PF = *Padina gymnospora* IF, PC = *Padina gymnospora* C, SF = *Sargassum vulgare* IF, SsF = *Sargassum stenophyllum* IF e SsC = *Sargassum stenophyllum* C./ **Algas vermelhas:** AF = *Acanthophora spicifera* IF, AC = *Acanthophora spicifera* C, BC = *Bostrychia* sp. C, Cc = *Centroceras clavulatum* C, ChC = *Chondracanthus acicularis* C, GF = *Galaxaura marginata* IF, GC = *Gracilaria domingiensis* C, GrC = *Grateloupia doryphora* C, HF = *Hypnea musciformis* IF, HC = *Hypnea musciformis* C, LF = *Laurencia* sp. IF e PF = *Pterocladia capillacea* IF. IF = Ilha do Francês e C = Cansvieiras.

### b) Com padrão de esteróides

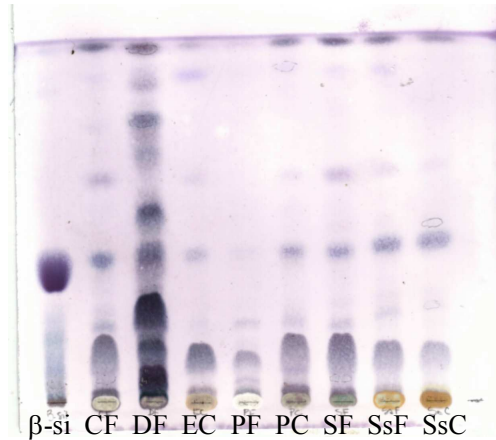
Analisando os cromatogramas obtidos com o eluente  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (90:10) e revelador anisaldeído-sulfúrico, (figuras 6, 7 e 8) observamos que no grupo das algas verdes com exceção da *Enteromorpha intestinalis*, todas apresentaram manchas com Rf equivalentes à do padrão  $\beta$ -sitosterol. Em relação às diferentes espécies, o gênero *Codium* apresentou perfil cromatográfico semelhante, destacando a presença de uma mancha em Rf= 0,4 no cromatograma de *Codium isthmocladum*. Já para os dois extratos de *Ulva fasciata* os perfis foram iguais.

No grupo de algas pardas todas apresentaram em seu cromatograma uma mancha semelhante à do padrão utilizado,  $\beta$ -sitosterol. Em relação às espécies com locais diferentes de coleta, observamos que *Padina gymnospora* (Canasvieiras) apresentou maior quantidade de manchas no cromatograma. Já o gênero *Sargassum* apresentou perfil cromatográfico semelhante nas duas coletas, destacando a presença de mancha em Rf = 0,4 para *Sargassum vulgare*, possivelmente pela diferença entre as espécies (*Sargassum stenophyllum* e *Sargassum vulgare*).

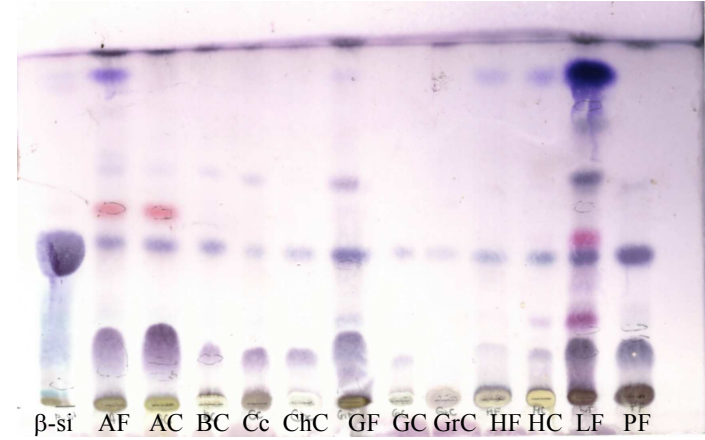
Todos os extratos analisados de algas vermelhas apresentaram manchas semelhantes à do  $\beta$ -sitosterol. Comparando os extratos de *Acanthophora spicifera* observamos a presença de uma mancha em Rf = 0,7 no extrato da amostra coletada na Ilha do Francês. Também foi observada uma mancha em Rf = 0,1 cm em todas algas pertencentes aos três filós estudados.



**Figura 6:** CCD algas verdes



**Figura 7:** CCD algas pardas



**Figura 8:** CCD algas vermelhas

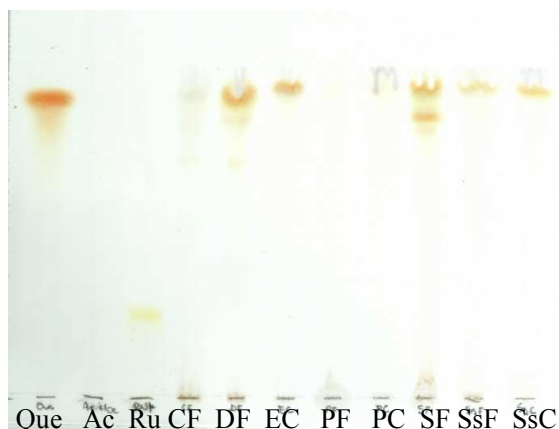
Sistema eluente:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (90:10). Revelador: anisaldeído-sulfúrico

Legenda: **Algas verdes:** CC = *Chaetomorpha antennina* C, CoC = *Codium decorticatum* C, CoF = *Codium isthmocladium* IF, EF = *Enteromorpha intestinalis* IF, UF = *Ulva fasciata* IF e UC = *Ulva fasciata* C./ **Algas pardas:** CF = *Colpomenia sinuosa* IF, DF = *Dictyota cervicomis* IF, EC = *Ectocarpus breviarticulatus* C, PF = *Padina gymnospora* IF, PC = *Padina gymnospora* C, SF = *Sargassum vulgare* IF, SsF = *Sargassum stenophyllum* IF e SsC = *Sargassum stenophyllum* C./ **Algas vermelhas:** AF = *Acanthophora spicifera* IF, AC = *Acanthophora spicifera* C, BC = *Bostrychia* sp. C, Cc = *Centroceras clavulatum* C, ChC = *Chondracanthus acicularis* C, GF = *Galaxaura marginata* IF, GC = *Gracilaria domingiensis* C, GrC = *Grateloupia doryphora* C, HF = *Hypnea musciformis* IF, HC = *Hypnea musciformis* C, LF = *Laurencia* sp. IF e PF = *Pterocliadiella capillacea* IF. IF = Ilha do Francês e C = Cansvieiras

### c) Com padrões de compostos fenólicos

Analisando os perfis cromatográficos utilizando os padrões de compostos fenólicos (quercetina, ácido clorogênico e rutina) observou-se que as algas pardas apresentaram alguns pigmentos em Rf's próximos ao da quercetina (figura 9).

Já os cromatogramas de algas verdes e algas vermelhas não apresentaram nenhuma mancha semelhante às dos padrões utilizados. Flavonóides não são metabólitos de ocorrência comum em algas e o uso destas substâncias de referência teve a finalidade apenas de auxiliar na descrição do comportamento cromatográfico.



**Figura 9:** CCD algas pardas. Sistema eluente: AcOEt:HCOOH:H<sub>2</sub>O (80:10:10). Revelador: NP/PEG. Legenda: **Algas pardas:** CF = *Colpomenia sinuosa* IF, DF = *Dictyota cervicomis* IF, EC = *Ectocarpus breviarticulatus* C, PF = *Padina gymnospora* IF, PC = *Padina gymnospora* C, SF = *Sargassum vulgare* IF, SsF = *Sargassum stenophyllum* IF e SsC = *Sargassum stenophyllum* C. IF = Ilha do Francês e C = Canasvieiras.

## 5.2. Escolha da espécie para investigação fitoquímica

A escolha da espécie de macroalga bêntica para investigação fitoquímica fez-se com base nos dados obtidos no bioensaio de letalidade para larvas de *A. salina*, na análise cromatográfica dos extratos e na quantidade de biomassa disponível no litoral da Ilha de Santa Catarina.

Em relação aos valores calculados do qui-quadrado para o bioensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* foram escolhidas as macroalgas que apresentaram valores estatisticamente significativos nas 3 concentrações estudadas (*Acanthophora spicifera* Ilha do Francês e Canasvieiras, *Enteromorpha intestinalis*, *Hypnea musciformis* e *Pterocladia capillacea*). Destas, as que apresentaram valores mais baixos de CL<sub>50</sub> foram *Acanthophora spicifera* (Ilha do Francês e Canasvieiras) e *Pterocladia capillacea*.

Em relação à análise por CCD, os extratos destas quatro macroalgas não diferiram significativamente entre si, sendo que todos apresentaram beta-sitosterol e perfil semelhante para glicolipídeos.

Das 3 espécies com melhores resultados no ensaio de *A. salina*, *Pterocladia capillacea* foi a única espécie considerada viável de se obter em quantidade suficiente para investigação fitoquímica (Prof. Dr. Paulo Horta, comunicação pessoal), sendo então este o fator determinante na escolha.

### **5.3. Fracionamento do extrato bruto de *Pterocladia capillacea***

Após o fracionamento do extrato bruto por partição em solventes (experimento piloto), as diferentes frações obtidas foram testadas quanto à letalidade para *A. salina* (tabela 17). Diante dos resultados optou-se por utilizar o extrato bruto para investigação fitoquímica uma vez que este apresentou os valores mais altos no teste do qui-quadrado, isto é, o extrato bruto apresentou índice de letalidade para *A. salina* superior ao das outras frações.

A diminuição na atividade após o fracionamento sugeriu que a toxicidade verificada para o extrato bruto poderia ser devida ao efeito sinérgico de constituintes de diferentes polaridades. Este fenômeno não chega a ser incomum, mas já sugere, de uma certa forma, possíveis dificuldades no isolamento monitorado por este ensaio.



**Tabela 17:** Valores de  $\chi^2$  no ensaio de letalidade para larvas de *A. salina* obtidos antes e após fracionamento do extrato bruto de *Pterocladia capillacea* (experimento piloto).

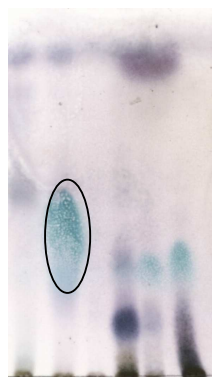
Tipo de extrato	$\chi^2$ 200 $\mu\text{g/mL}$	$\chi^2$ 50 $\mu\text{g/mL}$
Extrato bruto	20,9	15,5
Fração clorofórmica	12,5	8,9
Fração éter de petróleo	8,9	7,6
Fração acetato de etila	8,9	7,6

#### 5.4. Isolamento de substâncias a partir do extrato bruto de *Pterocladia capillacea*

Após a realização da primeira coluna cromatográfica, todos os 13 grupos de frações foram avaliados pelo ensaio de letalidade com larvas de *A. salina*, mas nenhum deles apresentou valores  $\chi^2$  superior a 3,84. Com isso, optou-se por dar continuidade ao isolamento de substâncias com as frações consideradas mais promissoras, em função do perfil cromatográfico e do rendimento.

##### 5.4.1. Obtenção da substância C2F8

O grupo de frações C1F1 (125 mg) foi submetido a uma nova coluna cromatográfica que resultou em 9 grupos de frações, deste o grupo 8 (20 mg) foi submetido a CCD preparativa para isolamento da substância C2F8 (10,0 mg).

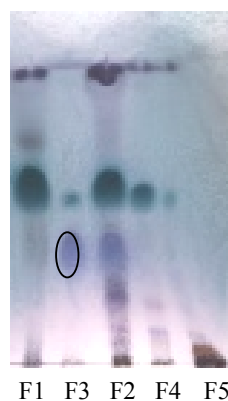


C1F1 F8 F9 F1 F2 F3

**Figura 10:** CCD de grupo de frações da coluna 2. Sistema eluente:  $\text{CHCl}_3$ :Chx (80:20), revelador: anisaldeído-sulfúrico.

#### 5.4.2. Obtenção da substância C3F3

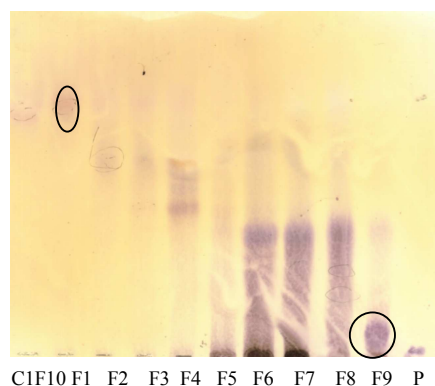
O grupo de frações 2 (75 mg) da coluna 1 foi submetido a um novo fracionamento (coluna 3), resultando em 5 grupos de frações, e a partir do grupo de frações 3 obteve-se a substância C3F3 (6,0 mg), visualizada na figura 11.



**Figura 11:** CCD de grupo de frações da coluna 3. Sistema eluente:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (90:10), revelador: anisaldeído-sulfúrico.

#### 5.4.3. Obtenções das substâncias C4F1 e C4F9

O grupo de frações 10 da coluna 1 (125 mg) foi submetido a uma nova coluna cromatográfica, resultando em 9 grupos de frações. A partir do grupo 1 obteve-se a substância C4F1 (6,0 mg) e o grupo 9 foi submetido a cromatografia em camada delgada preparativa através da qual isolou-se a substância C4F9 (2,0 mg) (figura 12).



**Figura 12:** CCD de grupo de frações da coluna 4. Sistema eluente:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O (65:35:5), revelador: orcinol-sulfúrico. Legenda: P = padrão digalactosildiglicerídeo.

## 5.5. Elucidação estrutural das substâncias isoladas

### 5.5.1. Substância C2F8

A substância C2F8 foi obtida da *Pterocliadiella capillacea* através da coluna 2, como um líquido incolor e inodoro. Na análise cromatográfica, este composto não apresentou fluorescência própria em 366 nm, mas apresentou extinção da fluorescência em 254 nm. Após revelação com anisaldeído-sulfúrico, a mancha de C2F8 apresentou intensa coloração azul-brilhante, que sugeriu a possibilidade de tratar-se de um ftalato.

Para esta substância foram obtidos espectros de RMN de próton e  $^{13}\text{C}$  (figuras 15 a 22). O espectro de ressonância magnética de próton (figura 19) confirma a presença de H ligados a um anel aromático (Ar-H), pelos sinais em 7,70 e 7,52 ppm, já que sinais de prótons olefínicos ocorrem entre 4,6 e 7,3 ppm enquanto prótons aromáticos apresentam deslocamentos químicos em campo mais baixo (7,0 - 9,0 ppm). Os sinais em 4,23 ppm (figura 18) correspondem aos prótons de grupos metilenos ligados ao oxigênio ( $\text{H}_2\text{C-O}$ ). Na região entre 1,7 e 0,9 ppm (figura 17) identificam-se os sinais referentes aos prótons alifáticos (RÜCKER et al., 2001).

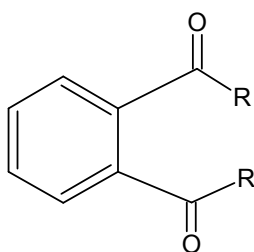
Os sinais em 5,37, 2,85, 2,3 e 2,0 ppm (figuras 17 e 18), por possuírem área sob a curva muito pequena em relação aos demais, foram considerados de muito baixa intensidade e como referentes a impurezas da amostra.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de C2F8 foi identificado em campo baixo um sinal em 167,7 ppm atribuído ao grupo carbonila de éster aromático (165-170 ppm conforme RÜCKER et al., 2001), além de sinais atribuíveis a carbonos aromáticos em 132,4, 130,8 e 128,7 ppm, sendo o primeiro deles de intensidade menor (figura 22).

O número de sinais referentes aos carbonos aromáticos sugere uma estrutura simétrica dissubstituída, com dois carbonos quaternários e 4 grupos metino, os quais aparecem no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN como dubletos de dubletos em 7,70 e 7,52 ppm (figura 19).

Esses dados permitem a proposição da estrutura parcial de um anel aromático com duas substituições de grupos carbonila (figura 13).

Na indisponibilidade de experimentos do tipo DEPT ou de espectros de correlação Hx e C x H, a atribuição dos sinais torna-se mais difícil. Entretanto considerando que os carbonos quaternários aos quais se ligam as cadeias laterais estariam sujeitas ao efeito de desblindagem, poder-se-ia esperar que os mesmos tivessem deslocamentos químicos em campo mais alto. Como o sinal em 132,4 ppm também aparece com intensidade menor, como seria esperado para carbonos quaternários, isto também reforçou a idéia de que este sinal corresponde aos carbonos quaternários da estrutura proposta.



**Figura 13:** Estrutura parcial de C<sub>2</sub>F<sub>8</sub>.

No espectro de <sup>13</sup>C-RMN, com base em tabelas da literatura (RÜCKER et al., 2001) identificaram-se ainda dois sinais com deslocamento químico característico de grupo metila em 13,9 e 10,9 ppm (figura 21), além de um sinal em 68,1 ppm característico de -O-CH<sub>2</sub> (cujos prótons aparecem como multipletos em 4,23 ppm) e de cinco outros sinais de carbonos alifáticos (CH/CH<sub>2</sub>) em 38,7, 30,3, 28,9, 23,7 e 22,9 ppm (figura 21). A existência de dois tipos de grupos metila sugere que as cadeias do éster ftálico sejam distintas ou ramificadas.

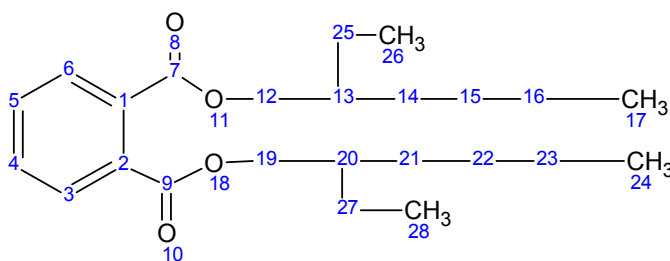
A partir dos espectros de ressonância magnética de próton e carbono 13 da substância C<sub>2</sub>F<sub>8</sub> e das comparações feitas com os dados apresentados por Rao et al. (2000) (tabelas 18 e 19) e Moeller et al. (2001) concluiu-se que C<sub>2</sub>F<sub>8</sub> corresponde ao ftalato de di(2-etil)-hexila (FDEH) (figura 14), uma vez que estes dados espectrais são equivalentes aos obtidos para C<sub>2</sub>F<sub>8</sub>.

**Tabela 18:** Comparação dos dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  de C2F8 em relação ao ftalato de di(2-etil)-hexila (RAO et al., 2000).

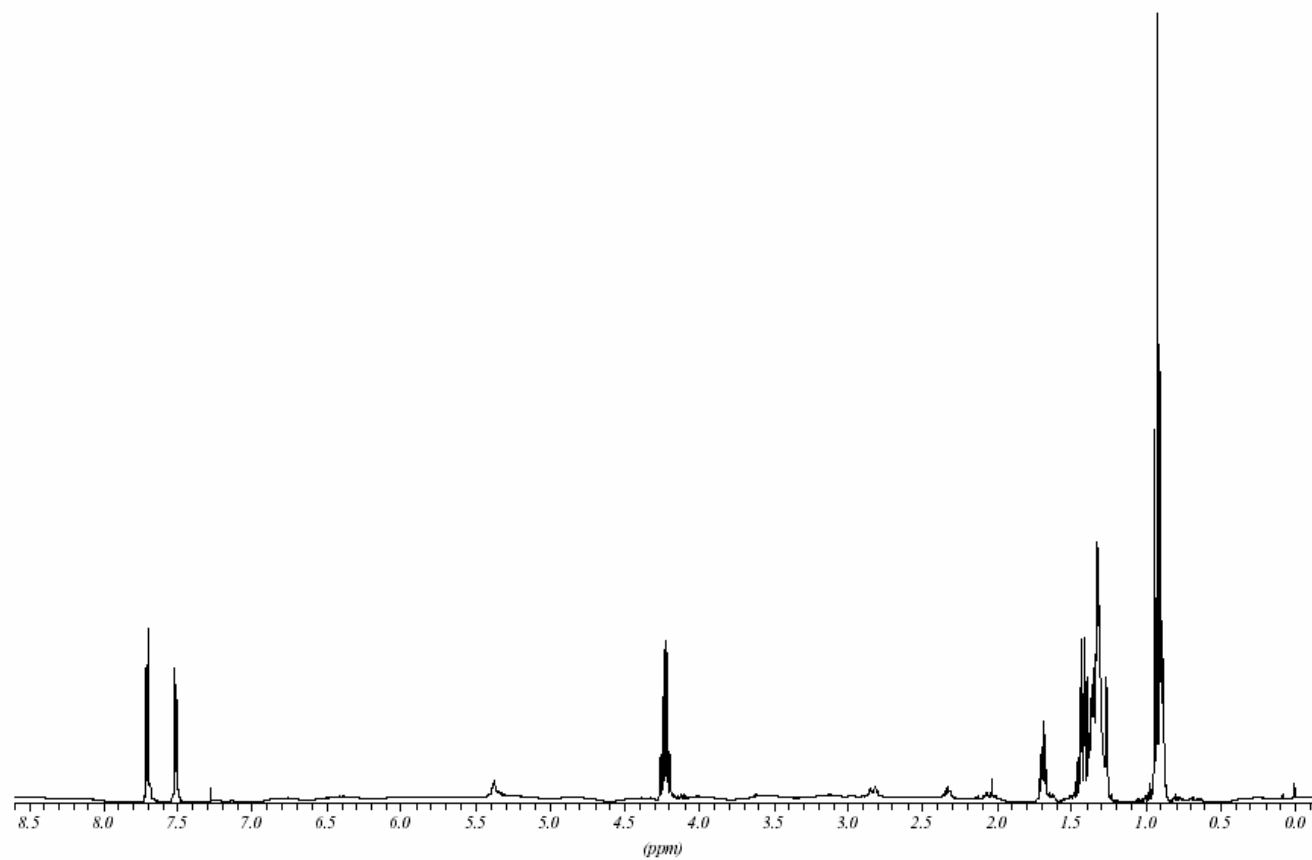
C2F8 500 MHz, $\text{CDCl}_3$		ftalato de di(2-etil)-hexila 90 MHz, $\text{CDCl}_3$	
Valores de deslocamento químico (ppm)	Tipo de H (RÜCKER et al., 2001)	Valores de deslocamento químico (ppm)	Multiplicidade (RAO et al., 2000)
7,70	H-Ar	7,75	<i>dd</i>
7,52	H-Ar	7,55	<i>dd</i>
4,23	$\text{CH}_2\text{-O}$	4,25	<i>d</i>
1,69	$\text{O-C-CH}_2\text{-C}$	1,65	<i>m</i>
1,30	$\text{C-CH}_2\text{-C}$	1,30	<i>m</i>
0,90	$\text{CH}_3$	0,90	<i>t</i>

**Tabela 19:** Comparação dos deslocamentos químicos no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de C2F8 em relação ao ftalato de di(2-etil)-hexila (RAO et al., 2000).

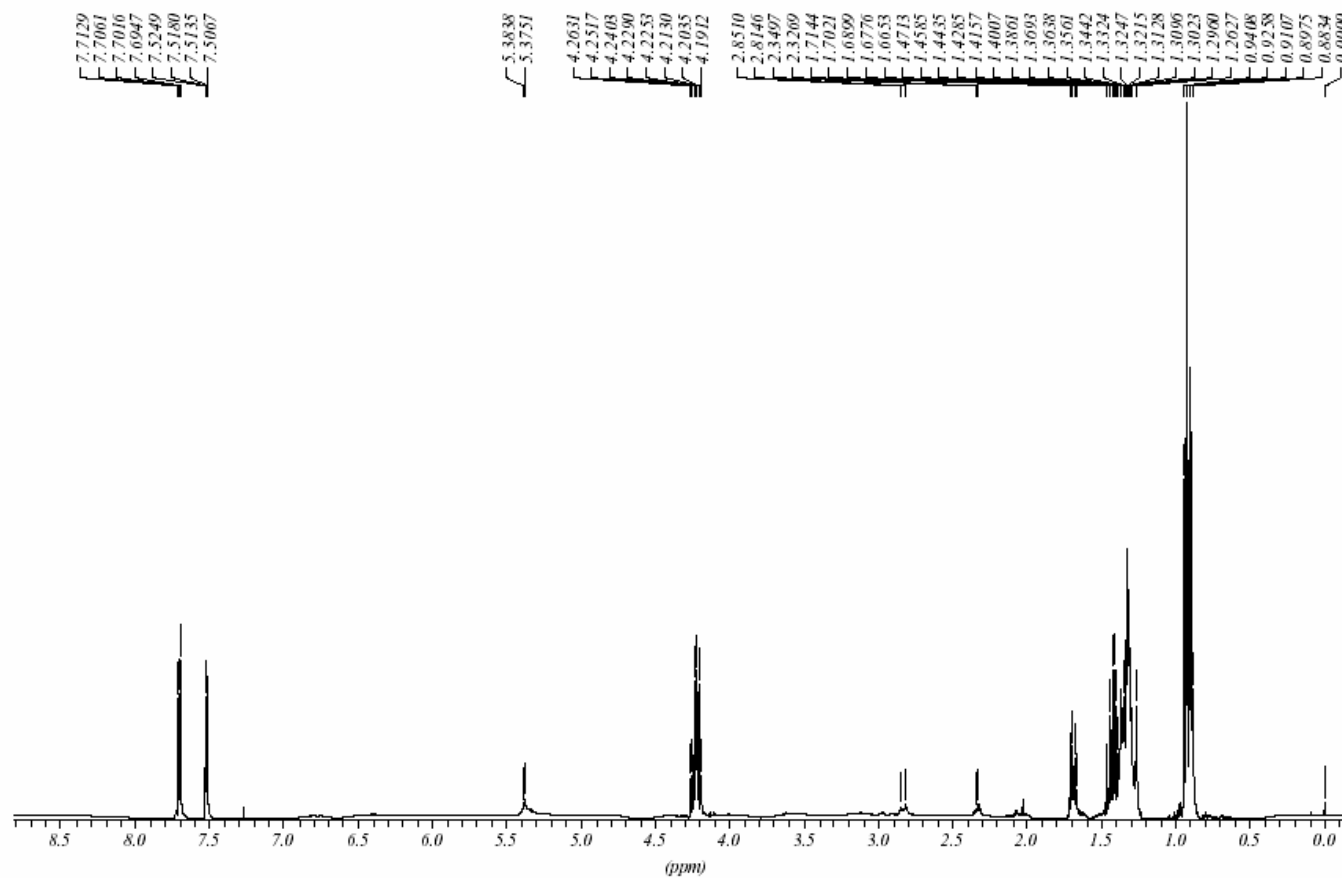
C2F8 500 MHz, $\text{CDCl}_3$		ftalato de di(2-etil)-hexila 90 MHz, $\text{CDCl}_3$	
Valores de deslocamento químico (ppm)	Tipo de C (RÜCKER et al., 2001)	Valores de deslocamento químico (ppm)	Carbonos da molécula (RAO et al., 2000)
167,7	$\text{-COO-}$	167,7	$\text{-COO-}$
132,4	$\text{Ar-C-COO}$	132,4	$\text{C}_1$ e $\text{C}_2$
130,8	C aromático	130,8	$\text{C}_3$ e $\text{C}_6$
128,7	C aromático	128,7	$\text{C}_4$ e $\text{C}_5$
68,1	$\text{COO-CH}_2\text{-C}$	68,1	$\text{C}_{12}$ e $\text{C}_{19}$
38,7	$\text{C-CH}_2\text{-C}$	38,7	$\text{C}_{14}$ e $\text{C}_{21}$
30,3	$\text{C-CH-C}$	30,3	$\text{C}_{13}$ e $\text{C}_{20}$
28,9	$\text{C-CH}_2\text{-C}$	28,9	$\text{C}_{15}$ e $\text{C}_{22}$
23,7	$\text{C-CH}_2\text{-C}$	23,7	$\text{C}_{25}$ e $\text{C}_{27}$
22,9	$\text{C-CH}_2\text{-C}$	22,9	$\text{C}_{16}$ e $\text{C}_{23}$
13,9	$\text{CH}_3$	13,9	$\text{C}_{17}$ e $\text{C}_{24}$
10,9	$\text{CH}_3$	10,9	$\text{C}_{26}$ e $\text{C}_{28}$



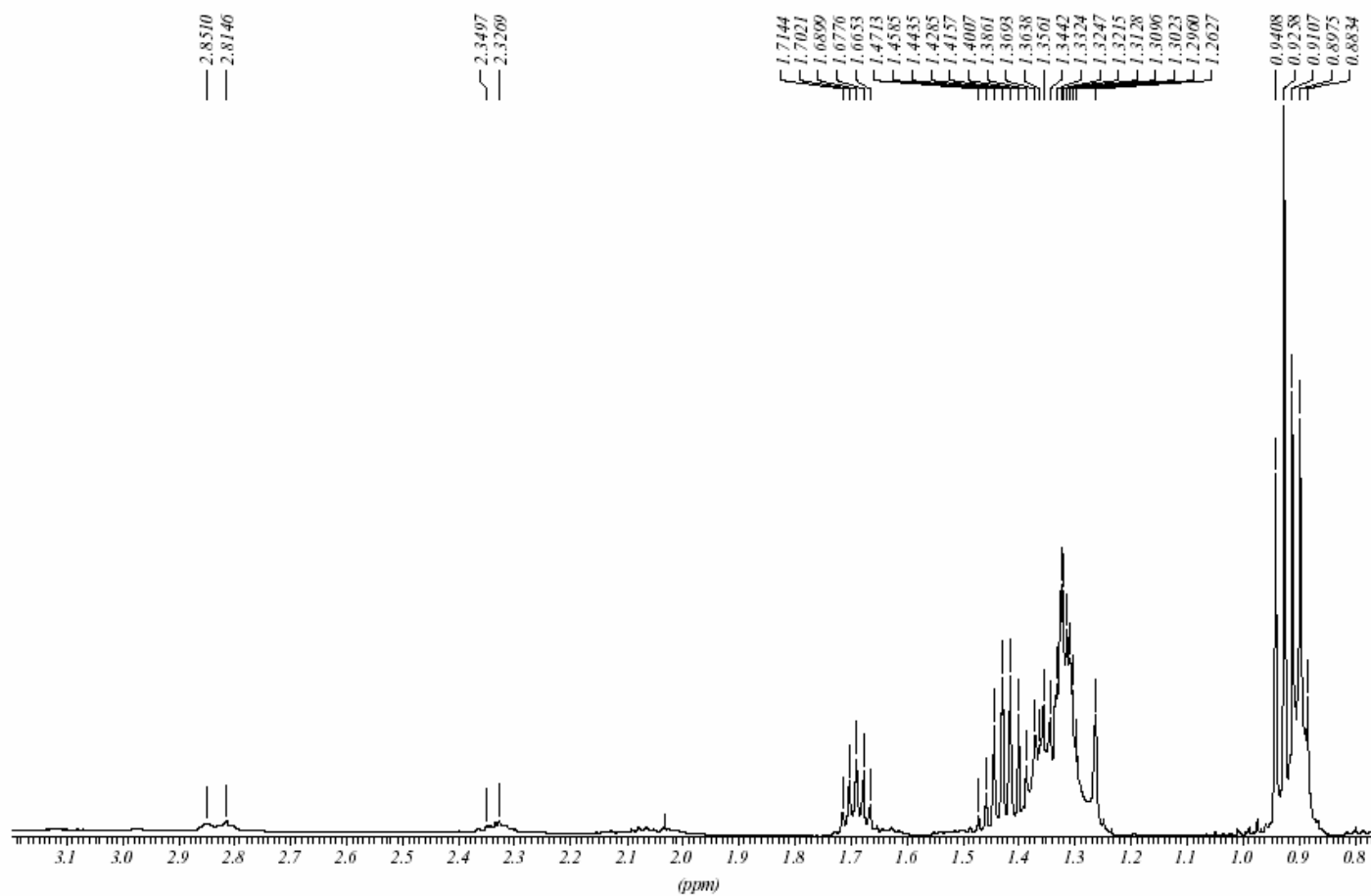
**Figura 14:** Estrutura química do ftalato de di(2-etil)-hexila (RAO et al., 2000).



**Figura 15:** Espectro de RMN de próton de C<sub>2</sub>F<sub>8</sub>, em CDCl<sub>3</sub> (500 MHz)

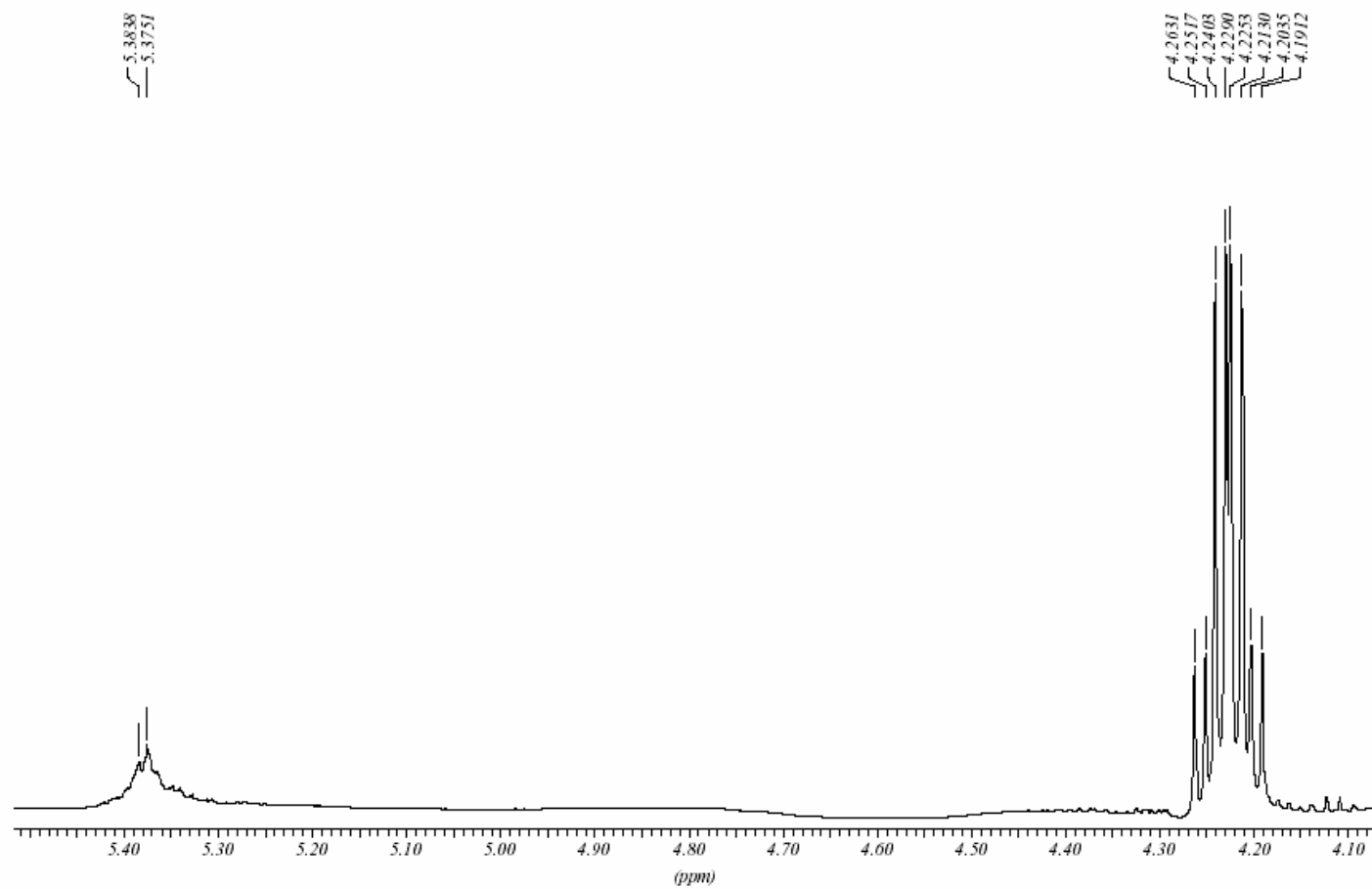


**Figura 16:** Espectro de RMN de próton de C2F8, em CDCl<sub>3</sub> (500 MHz) com deslocamentos químicos.

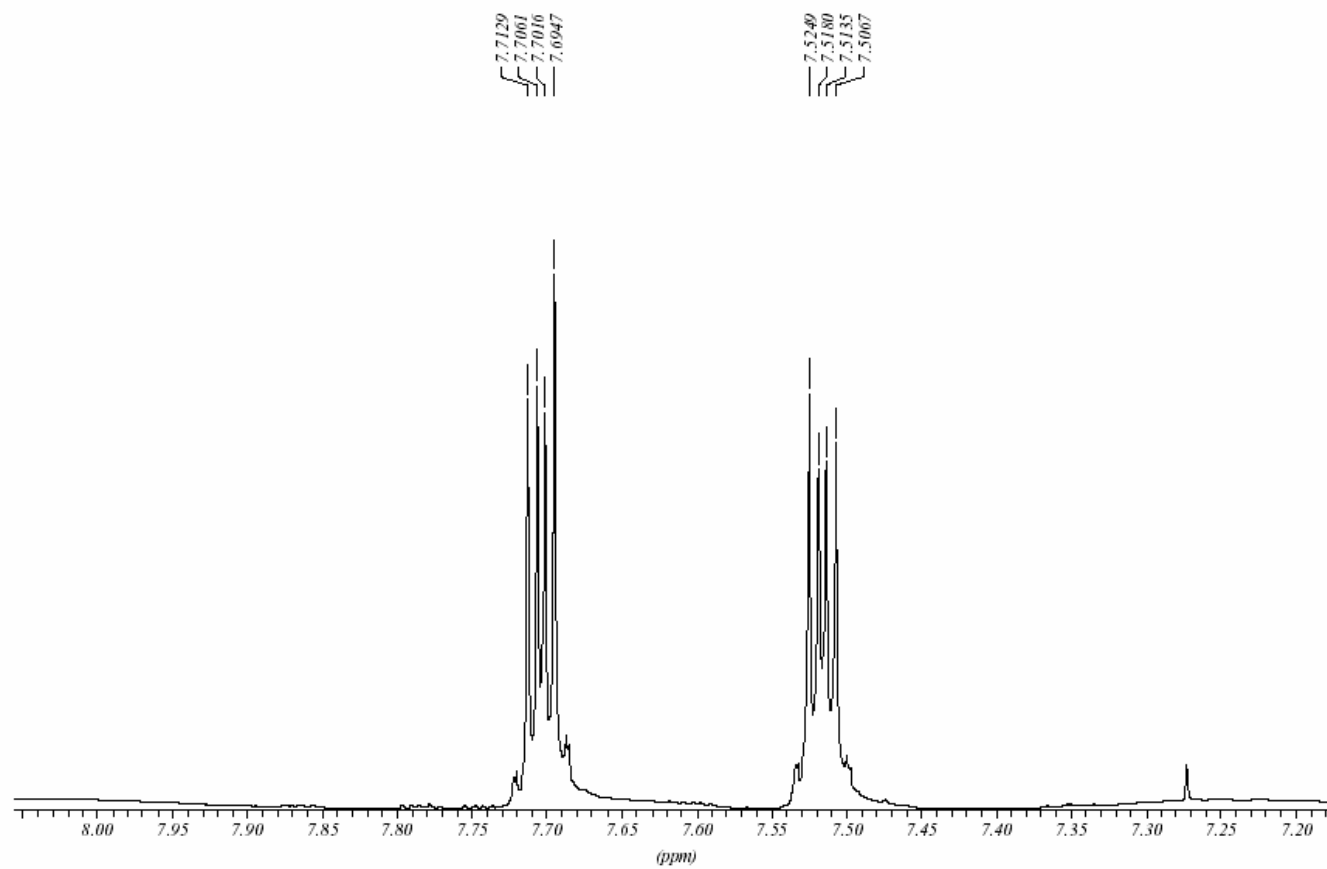


**Figura 17:** Expansão do espectro de RMN de próton de C<sub>2</sub>F<sub>8</sub>, região entre 3,1 e 0,8 ppm, em CDCl<sub>3</sub> (500 MHz).

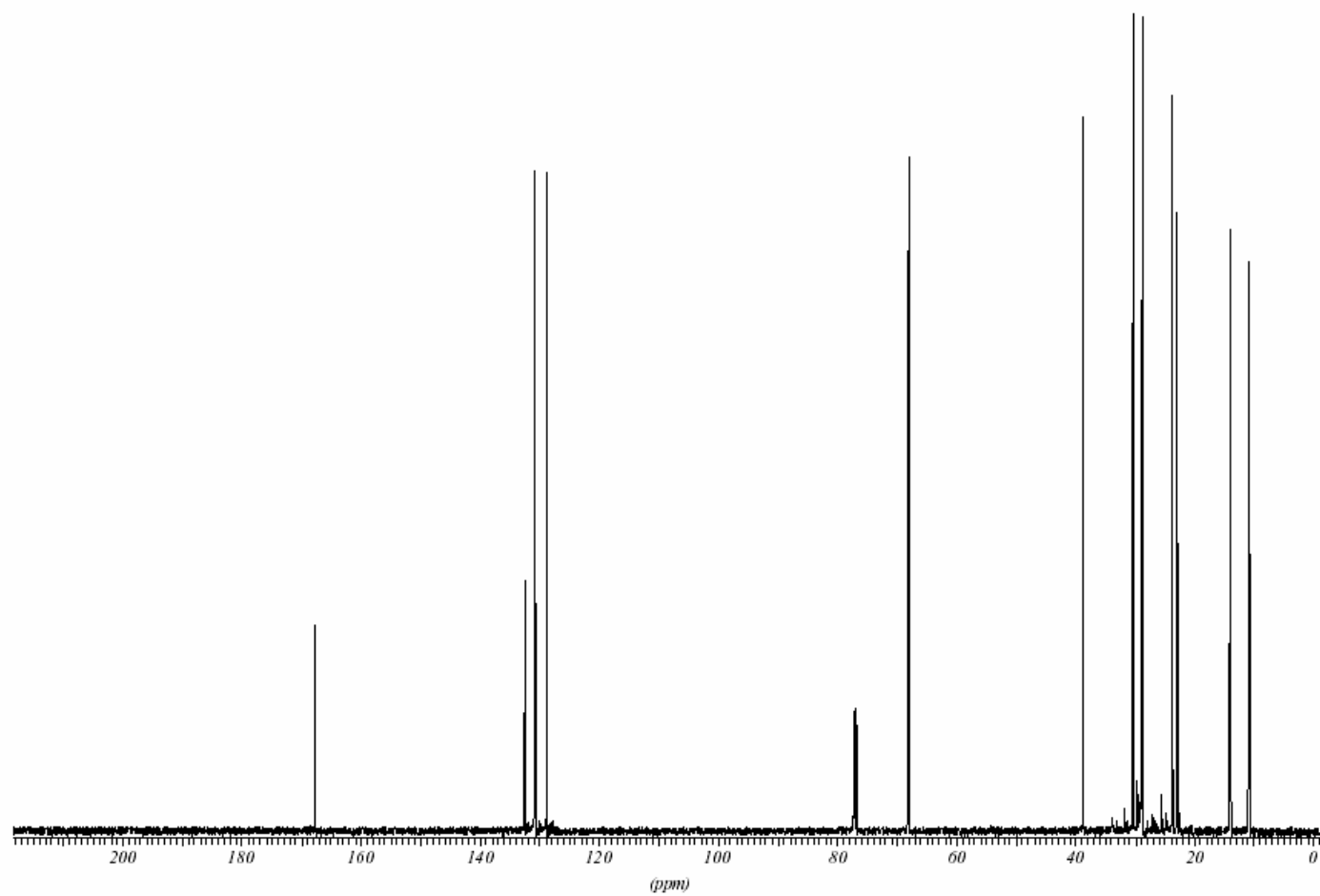




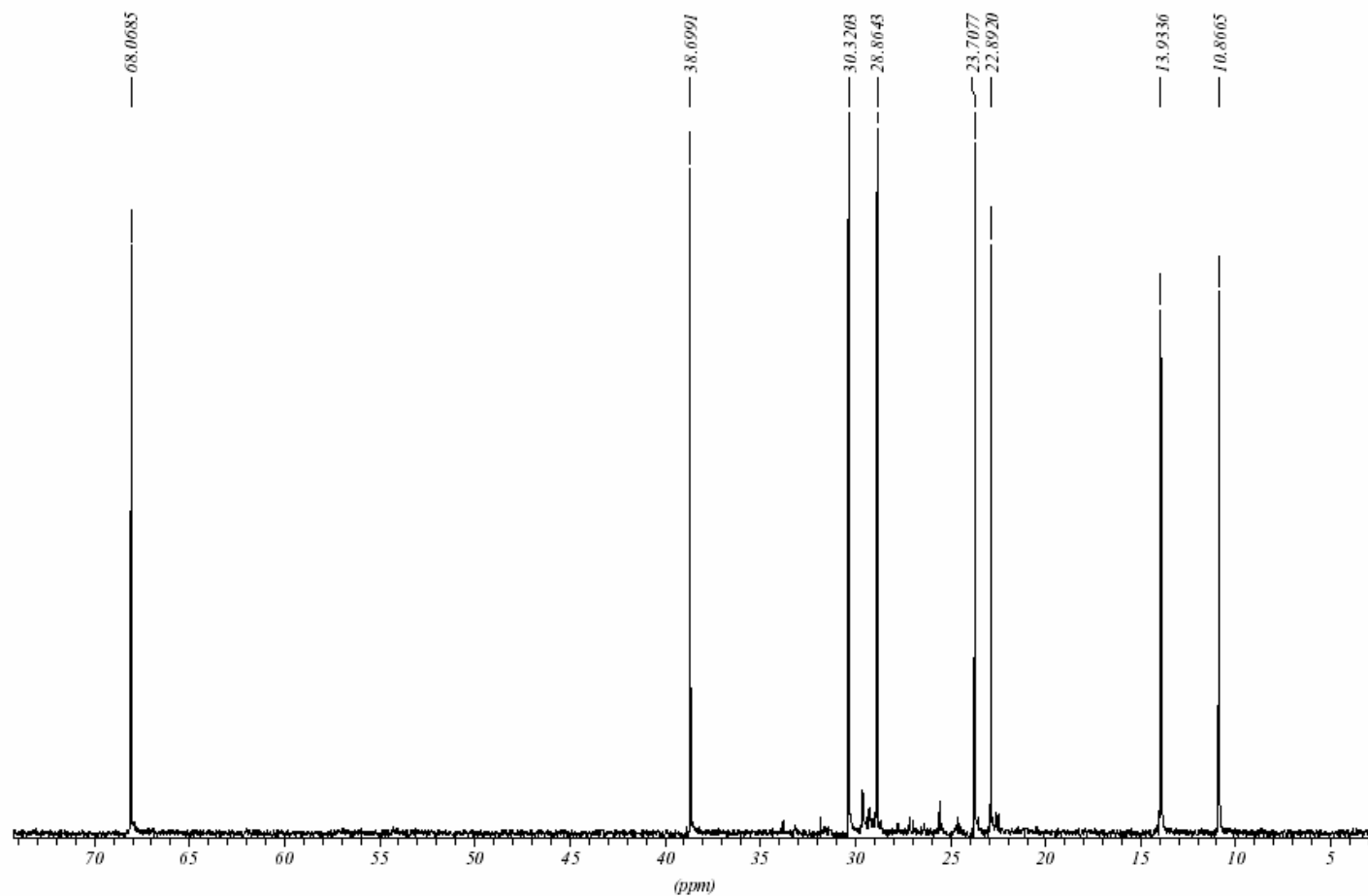
**Figura 18:** Expansão do espectro de RMN de próton de  $\text{C}_2\text{F}_8$ , região entre 5,4 e 4,1 ppm, em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz).



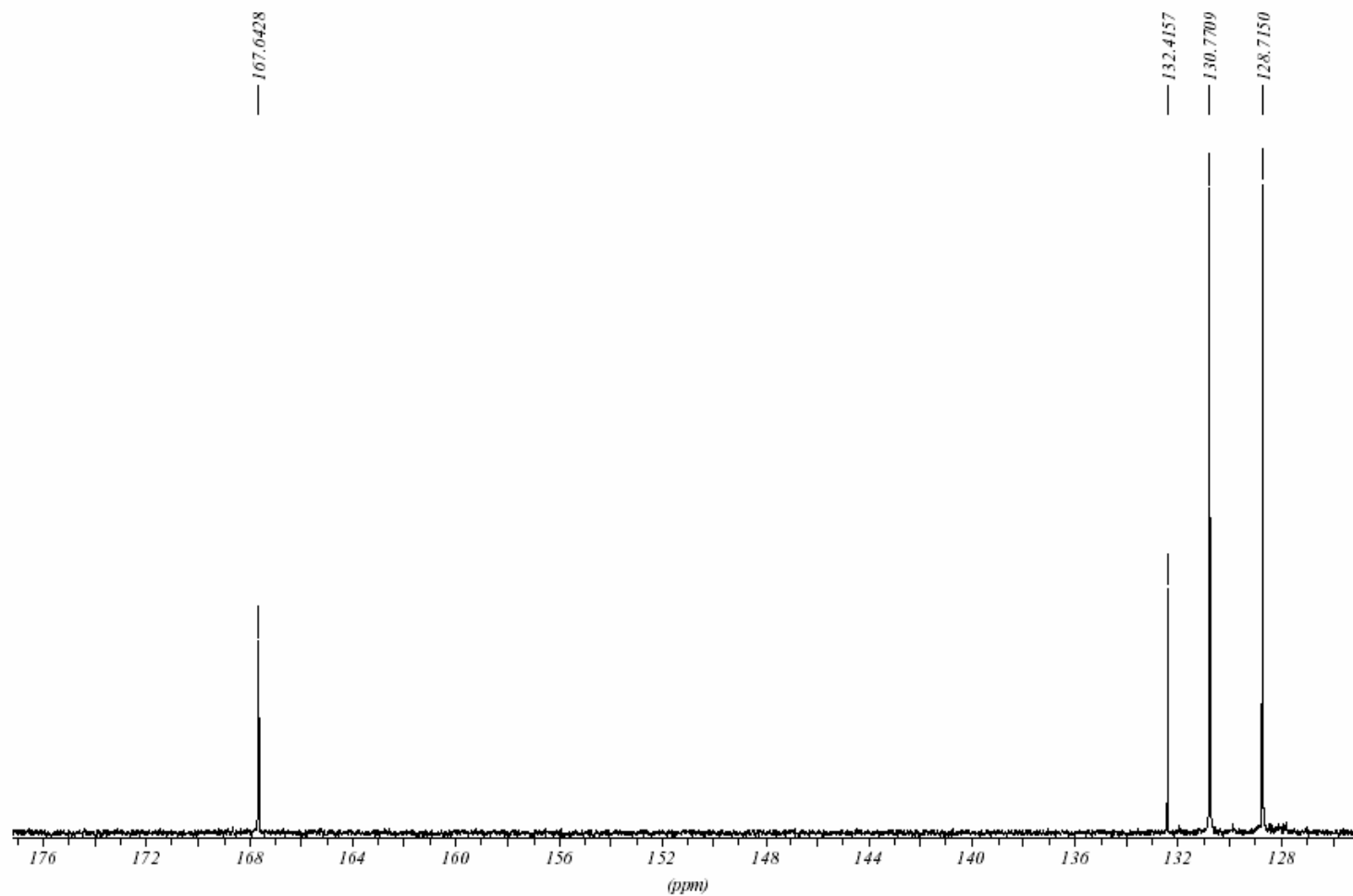
**Figura 19:** Expansão do espectro de RMN de próton de C<sub>2</sub>F<sub>8</sub>, região entre 8,0 e 7,2 ppm, em CDCl<sub>3</sub> (500 MHz).



**Figura 20:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de  $\text{C}_2\text{F}_8$ , em  $\text{CDCl}_3$  (125 MHz).



**Figura 21:** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de  $\text{C}_2\text{F}_8$ , região entre 70 e 5 ppm, em  $\text{CDCl}_3$  (125 MHz).



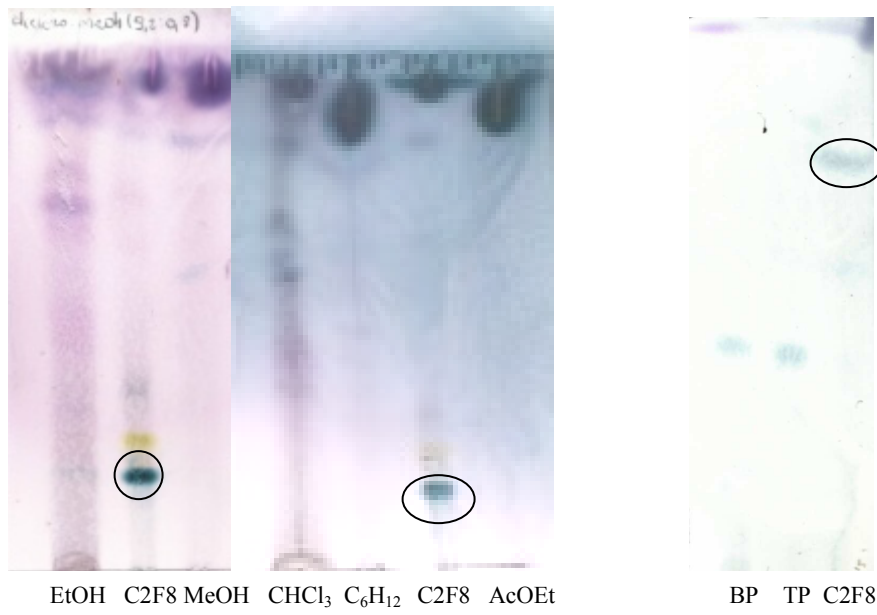
**Figura 22:** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de  $\text{C}_2\text{F}_8$ , região entre 176 e 128 ppm, em  $\text{CDCl}_3$  (125 MHz).

Os ésteres do tipo ftalato são usados em plastificantes e solventes químicos industriais (FISHBEIN; ALBRO, 1972; THOMAS et al., 1978). Entre eles, o ftalato de di(2-etil)-hexila (FDEH) e o ftalato de di-*n*-butila (FDB) são os mais comuns (GIAM et al., 1978). Eles são encontrados na natureza como poluentes provenientes de garrafas plásticas jogadas ao ambiente e também estão presentes nas bolsas para estocagem de sangue (JAEGER; RUBIN, 1970; DANIEL, 1978). Estes ftalatos são encontrados como sedimentos, na água, solos, plantas e organismos aquáticos (HUNNEMAN, 1968; STAPLES, 1997).

Wahidula et al. (1998) isolaram um destes ésteres, o ftalato de bis(2-etil)-nonila da alga vermelha *Acantophora spicifera*, sugerindo que este componente pode ser proveniente da poluição das águas ou de tecidos de organismos marinhos (PRESTON; AL OMRAN, 1986; WALDOCK, 1983). Também foi reportada a presença de outros ftalatos nas algas *Stoechospermum marginatum* (WAHIDULLA; D'SOUZA, 1995), *Phyllophora nervosa*, *Acantophora delilei* e *Hypnea musciformis* (KASIM et al., 1990).

Conforme Sastry e Rao (1994) a contaminação por ftalatos deve-se a muitas fontes. Materias plásticos presentes em bolsas plásticas, tampas e galões de estocagem possuem FDEH e também solventes orgânicos, como clorofórmio e hexano. Também já foi observada a presença de ftalato em amostras de águas de diversos rios europeus (HASHIZUME et al, 2002) e de estuários do Reino Unido (PRESTON, 1989).

Em nosso trabalho, após a confirmação de que C2F8 era um ftalato, investigamos a hipótese de uma possível contaminação. Foram realizadas análises cromatográfias dos extratos etanólicos dos materiais plásticos utilizados no laboratório (tampa plástica dos frascos utilizados para armazenar as frações e bolsa plástica para coleta das algas), dos resíduos de solventes concentrados em rotavapor e da substância C2F8 (figura 23 e 24).



**Figura 23:** Teste com solventes químicos .

**Figura 24:** Teste com material do laboratório.

Sistema de eluente: CHCl<sub>3</sub>:MeOH (92:0,8). Revelador: anisaldeído-sulfúrico.

Legenda: BP – bolsa plástica. TP- tampa plástica.

De acordo com os cromatogramas, observamos a presença de ftalatos tanto nos solventes químicos como nos materiais plásticos utilizados no laboratório, mas estes contaminantes diferem do ftalato isolado da alga *Pterocladia capillacea*, o que indica que C2F8 provavelmente não é originário do material utilizado em laboratório. O isolamento de FDEH desta espécie poderia, talvez, ser explicado pela contaminação da água do mar com ftalatos, como demonstrado por Chen (2004), que isolou dois tipos de ftalato, FDEH e FDB, da alga vermelha *Bangia atropurpurea*, sugerindo que por algas marinhas possuírem paredes celulares altamente ricas em lipídeos e serem organismos que tendem a depositar substâncias como metais pesados, estes ftalatos estariam estocados na membrana celular e manteriam a flexibilidade das células das algas.

Outra proposta levantada pelo mesmo autor sobre a possível origem desta contaminação seria de que as algas marinhas poderiam sintetizar ftalatos, mas

para isto deveria haver mais investigações a respeito dos processos fisiológicos envolvidos nesta síntese.

Na literatura pesquisada não foram encontrados relatos de isolamento de ftalatos no gênero *Pterocladia*, nem na ordem Gelidiales.

### **5.5.2. Substância C3F3**

A substância C3F3 foi obtida da *Pterocladia capillacea* através da coluna 3, na forma de líquido incolor e inodoro. A análise cromatográfica deste composto não apresentou fluorescência em 366 nm, nem extinção da fluorescência em 254 nm. Após revelação com anisaldeído-sulfúrico, apresentou coloração roxa. Devido às suas características de solubilidade (muito solúvel em clorofórmio), seu comportamento cromatográfico, e reação com anisaldeído-sulfúrico, levantou-se a hipótese de tratar-se de terpeno ou esteróide. A análise comparativa com padrões de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol mostrou tratar-se de uma substância diferente daquelas.

Para C3F3 só foi obtido espectro de  $^1\text{H-RMN}$  (figura 25), o qual apontou a presença de alguns sinais com deslocamentos químicos característicos de esteróides mais comuns encontrados em algas marinhas, como colesterol (TSUDA et al., 1957 e 1958), desmosterol oxigenado (SHEU et al., 1997), fucosterol (SHEU et al., 1999) e decortinol (AHMAD et al., 1993) (tabela 20), como o sinal em 3,5 ppm atribuído ao próton ligado ao grupo carbinol: H-C-OH (RÜCKER et al., 2001).

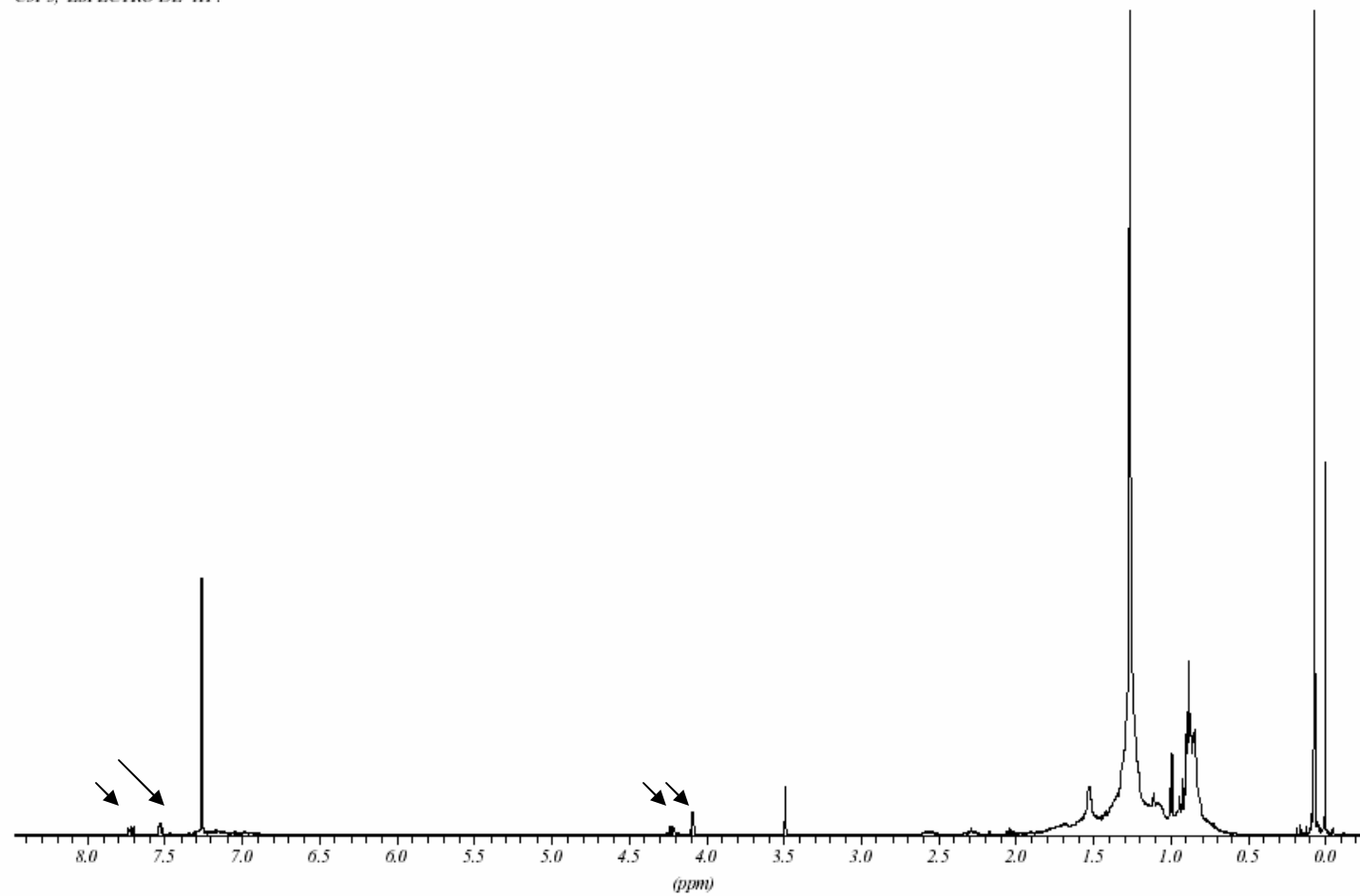


**Tabela 20:** Valores de deslocamentos químicos (ppm) do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de C3F3 comparados com dados da literatura. Convenção:  $\circ$  são sinais não detectados no espectro de C3F3 e  $\bigcirc$  sinais visualizados no espectro de C3F3.

<b>C3F3</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)	<b>Decortinol</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) (AHMAD et al., 1993)	<b>Fucoesterol</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) (SHEU et al., 1999)	<b>Colesterol</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) (TSUDA et al., 1957 e 1958)	<b>Desmosterol</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) (SHEU et al., 1997)
0,6	0,66/s	0,72/s	0,68	0,74/s
0,9	0,86/t	0,98/d	0,86	0,92/d
1,0	0,90/d	0,98/d	0,92	1,38/s
1,3	0,98/s	0,99/d	1,00	1,73/s
1,5	1,55/s	1,18/s	2,28	4,26/t
3,5	3,57/t	1,58/d	3,5	4,35/s
7,3	3,59/dd	2,22/m	5,3	5,01-5,02/s
	3,83/m	5,19/q		5,82/s
	4,63/s	5,72/s		7,72-7,73/s
	4,71/s			

Por C3F3 não apresentar alguns sinais característicos do colesterol (2,28 e 5,3 ppm), desmosterol oxigenado (1,73; 4,35; 5,01-5,02 e 5,82 ppm), fucoesterol (2,22; 5,19 e 5,72 ppm) e decortinol (3,83 e 4,71 ppm) pode-se sugerir que esta substância corresponde a outro esteróide com estrutura diferenciada. Entretanto, pela pouca quantidade de amostra isolada e pelo fato desta apresentar sinais de impurezas (inclusive ftalato, como verificado em CCD e sugerido no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN em 7,5 e 8,0 ppm), não foram obtidos espectros complementares, não se pode chegar a uma estrutura definida. A partir dos dados obtidos, sugere-se apenas que C3F3 corresponde a um álcool esteroidal saturado.

*C3F3, ESPECTRO DE 1H.*



**Figura 25:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de  $\text{C}_3\text{F}_3$ , em  $\text{CDCl}_3$  (500 MHz). As setas correspondem aos contaminantes.

### 5.5.3. Substâncias C4F1 e C4F9

As substâncias C4F1 e C4F9 foram obtidas da *Pterocladia capillacea* através da coluna 4, ambas na forma de líquido incolor e inodoro. Na análise cromatográfica, estes compostos não apresentaram fluorescência em 366 nm, nem extinção da fluorescência em 254 nm. Após revelação com orcinol-sulfúrico, apresentaram coloração roxa. Devido às suas características de solubilidade (muito solúvel em acetato de etila), seu comportamento cromatográfico e reação com orcinol-sulfúrico, levantou-se a hipótese de tratarem-se de glicolípideos. A análise comparativa com padrão digalactosil diglicero mostrou tratarem-se de substâncias diferentes daquela.

Devido à pouca quantidade de amostra de C4F9 não foi possível realizar experimentos de ressonância magnética nuclear. Também não foi viável a realização de hidrólise, tanto para C4F9 quanto para C4F1, que permitiria a caracterização por CCD dos açúcares.

Para C4F1 só foi obtido espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (figura 26), o qual demonstra sinais característicos de uma molécula com uma porção lipídica e outra de açúcar. O sinal observado em 2,2 ppm caracteriza grupo metileno ligado à carbonila e o desdobramento esperado para este sinal seria de tripleto, pelo acoplamento com o grupo  $\text{CH}_2$  em posição  $\beta$  (MACHADO et al., 1997). O sinal em 3,5 ppm indica o hidrogênio ligado a um grupamento álcool ( $\text{H-C-OH}$ ) (RÜCKER, 2001) e o sinal em 5,3 ppm poderia corresponder ao H-2 da porção glicerol conforme Janwitayanuchit et al. (2003).

De acordo com dados da literatura e por não possuir expansão do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN podemos atribuir regiões de sinais característicos de glicolípideos conforme demonstrado na tabela 21. Os sinais na região de 7,0-7,4 ppm indicam grupamento NH, de acordo com Machado et al. (1997). Também podemos provavelmente descartar estruturas parciais de galactose (ausência de sinais em 3,38; 3,39 e 3,44 ppm) e de esfingosina (apresentar um sinal fraco em 3,62 ppm,

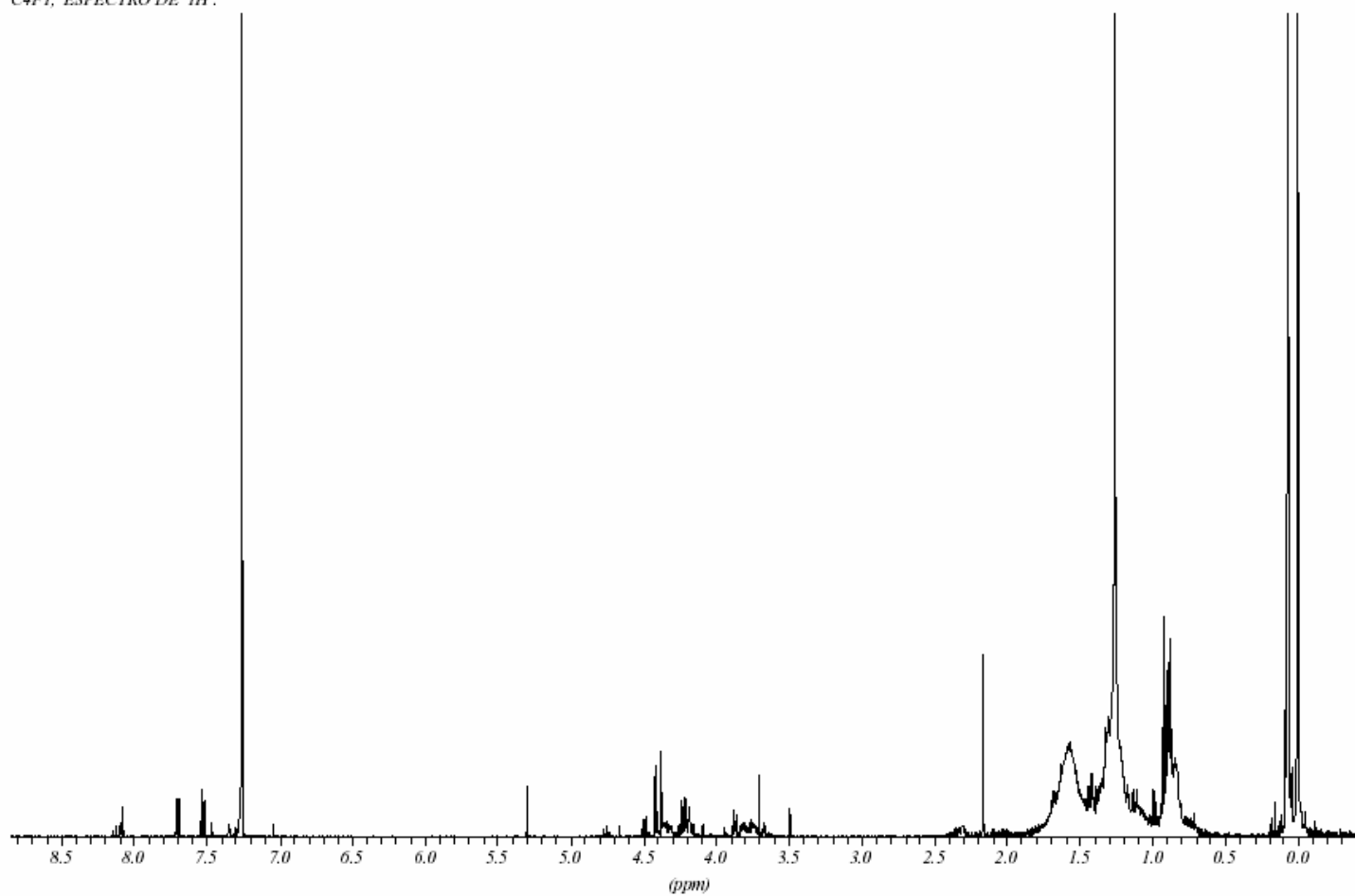
que se caracteriza como um dubleto de dubleto e não possuir um sinal em 5,60 ppm), comuns em alguns glicolipídeos (ALBRECHT et al., 1995).

**Tabela 21:** Comparação de dados do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de C4F1 com dados da literatura (sl = sinal largo).

<b>C4F1</b> 500 MHz, $\text{CDCl}_3$	<b>Janwitayanuchit et al. (2003)</b> 500 MHz, $\text{CDCl}_3$
0,8-0,9 ppm	grupos metílenos da porção acil graxa (sl)
1,1-1,3 ppm	grupos butil-metílenos da porção acil graxa (sl)
2,2-2,3 ppm	grupos $\alpha$ -metílenos da porção acil graxa (sl)
3,5-3,9 ppm	H 1, 2, 3,4,5,6 da porção açúcar (d,m)
4,1- 4,2 ppm	1-Ha da porção glicerol (dd)
4,3-4,4 ppm	1-Hb da porção glicerol (sl d)
5,2-5,3 ppm	2-Hb da porção glicerol (sl)

Não se dispendo de expansões do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, a estrutura fina dos sinais não pôde ser visualizada, dificultando a atribuição dos sinais a estruturas parciais mais específicas. De acordo com dados da literatura, os glicolipídeos mais comumente encontrados em algas marinhas são monogalactosil-diacilglicerol, digalactosildiácilglicerol, sulfoquinovosildiácilglicerol e trimetil- $\beta$ -alanina-diacilglicerol, de *Fucus vesiculosus* (RUPÉREZ et al., 2002) e *Ascophyllum nodosum* e o sulfonoquinovosildipalmitoilglicerídeo, da alga *Dictyocillaris fragrans* (JONES; HARWOOD, 1992).

C4F1, ESPECTRO DE 1H.



**Figura 26:** Espectro de RMN de próton de C4F1, em CDCl<sub>3</sub> (500 MHz).

## 6. CONCLUSÕES

- Num total de 26 amostras avaliadas quanto a letalidade para larvas de *A. salina*, 6 apresentaram resultados estatisticamente significativos nas 3 concentrações estudadas com destaque para o filo Rhodophyta (71,4%), cujos representantes apresentaram os valores mais baixos para CL<sub>50</sub> (*Hypnea musciformis*, *Acanthophora spicifera*, *Pterocladia capillacea*). Neste ensaio foram observadas diferenças entre espécies do mesmo gênero e para uma mesma espécie em diferentes locais de coleta.
- Na análise cromatográfica dos extratos para avaliação de glicolipídeos, todos os extratos de algas pardas e vermelhas testados apresentaram manchas com reação positiva para orcinol-sulfúrico, sendo que a maioria das espécies apresentou mancha em Rf semelhante ao padrão digalactosil diglicerídeo. Em nenhum cromatograma das algas verdes testadas foram visualizadas manchas com reação positiva para orcinol-sulfúrico.
- Na análise cromatográfica de esteróides, os extratos dos três filos de algas apresentaram um perfil semelhante, com manchas mais polares semelhantes ao do padrão  $\beta$ -sitosterol, além de outras em Rf inferior a este. A clorofita *Enteromorpha intestinalis* foi a única espécie testada em cujo cromatograma não se visualizou mancha equivalente ao padrão utilizado.
- Na análise cromatográfica para os padrões fenólicos (rutina, quercetina e ácido clorigênico) somente as algas pardas apresentaram pigmentos com Rfs próximos ao da quercetina.
- No ensaio para atividade antioxidante utilizando DPPH, os extratos testados na concentração de 100  $\mu$ g/mL apresentaram percentuais de seqüestro de radicais livres entre 22 e 70%, o que indica uma boa atividade antioxidante, com destaque para *Codium isthmocladum* e *Ectocarpus breviararticulatus*. Para 3

das 5 espécies com coletas em mais de um local, foram observadas diferenças nos percentuais de seqüestro nas concentrações testadas.

- As diferenças observadas em relação às análises cromatográficas com os vários reveladores, bem como os resultados dos testes de *Artemia salina* e atividade antioxidante evidenciam a influência de fatores ambientais na produção de metabólitos secundários.
- Na seleção de uma espécie de macroalga bêntica para investigação fitoquímica, entre as espécies com baixos valores de  $CL_{50}$  para larvas de *A. salina*, as diferenças de perfil cromatográfico não foram significativas, de modo que a quantidade de biomassa disponível foi o fator decisivo para escolha da alga vermelha *Pterocladia capillacea*.
- Após a segunda etapa de fracionamento do extrato bruto, as frações obtidas não mais apresentavam toxicidades significativas para as larvas de *A. salina*, de modo que se deu preferência às frações consideradas mais promissoras, em função do perfil cromatográfico e do rendimento.
- A partir do extrato etanólico de *Pterocladia capillacea* foram isoladas 4 substâncias:
- As substâncias C4F1 e C4F9, de acordo com os dados de  $^1H$ -RMN para C4F1, CCD e referências de literatura, parecem tratar-se de substâncias com grupamento açúcar e grupamento lipídico, possivelmente pertencentes à classe dos glicolipídeos.
- A substância C3F3, com base nos espectros de  $^1H$ -RMN, o comportamento cromatográfico e os dados da literatura, parece tratar-se de um álcool esteroideal saturado.
- A substância C2F8, de acordo com dados de  $^1H$ -RMN e  $^{13}C$ -RMN, foi identificada como o ftalato de di(2-etil)-hexila, sendo possivelmente um contaminante ambiental.

## 7. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, B.; PÜTZ, U.; SCHWARZMANN, G. Synthesis of fluorescent and radioactive analogues of two lactosylceramides and glucosylceramide containing  $\beta$ -thioglycosidic bonds that are resistant to enzymatic degradation. **Carbohydrate Research**, v. 276, p. 289-308, 1995.

ALGAE BASE. [www.algaebase.org](http://www.algaebase.org).

AHMAD, Y.U. et al. Sterols from marine green alga *Codium decorticans*. **Phytochemistry**, v. 33, p. 1189-1192, 1993.

ARA, J. et al. Cytotoxic activity of marine macro-algae on *Artemia salina* (brine shrimp). **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 4, p. 304-307, 1999.

BAKER, A.; ERSPAMER, V. The isolation and amino acid sequence of eledoisin, the active endecapeptide of the posterior salivary gland of *Eledone*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 101, p. 56-65, 1963.

BARAHONA, M.V.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. **Environmental Pollution**, v. 104, p. 469-476, 1999.

BARBOSA, J.P. et al. A dolabellane diterpene from the Brazilian brown alga *Dictyota paffi*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 1451-1453, 2003.

BARCLAY, L.R.C. Model biomembranes: quantitative studies of peroxidation, antioxidant action, partitioning, and oxidative stress (1992 Syntex Award Lecture). **Canadian Journal of Chemistry**, v. 71, p. 1-16, 1993.

BERGMAN, W.; FEENEY, R.J. Nucleosides of sponges. **Journal of Organic Chemistry**, v. 16, p. 981-987, 1951.

BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.



BRECCIA, A.; RODGERS, M.J.A.; SEMERARO, G. Oxygen and Sulfur Radical in Chemistry and Medicine. In: **Oxygen Radicals in Chemistry and Biology**. Bologna: Edizioni Scientifiche Lo Scarabeo, 1986. 20-52 p.

BURNELL, D.J.; APSIMON, J. W. Echinoderm Saponins. In: Scheuer, P.J. (ed.) **Marine natural products, chemical and biological perspectives**. New York: Academic Press, 1983. 287-389 p.

CAPON, R. J. Marine Bioprospecting - Trawling for Treasure and Pleasure. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2001, n. 4, p. 633-645, 2001.

CARBALLO, J.L. et al. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, v. 2, n. 17, p. 1-5, 2002.

CARDINELLA II, J.H.; MARNER, F.J.; MOORE, R.E. Seaweed dermatitis: structure of lyngbyatoxin-A. **Science**, v. 204, p. 193-195, 1979.

CENTENO, A.J. **Curso de estatística aplicada à biologia**. Goiânia: Cegraf-UFG, 1990.

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.

CHENEY, D. B. et al. Genetic manipulation and strain improvement in commercially valuable red seaweeds. In: **New developments in marine biotechnology**, New York: Y. Le Gal and H. Halvorson, Plenum Press, 1998. 101-104 p.

CHOI, C.W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p. 1161-1168, 2002.

COHEN, S.S. Sponges, cancer chemotherapy and cellular aging. **Perspective in Biology Medicine**, v. 6, p. 215-227, 1963.

DANIEL, J.W. Toxicity and metabolism of phthalate ester. **Clinical Toxicology**, v. 13, p. 257-268, 1978.

DE SILVA, E.D.; SCHEUER, P.J. Manoalide, an antibiotic sesterterpenoid from the marine sponge *Luffariella variabilis* (Polejaeff). **Tetrahedron Letters**, v. 21, p. 1611-1614, 1980.

DE-PAULA, J.C. et al. Chemical similarity between the brown algae *Dictyota cerviconis* and *D. pardalis* (Dictyotales, Phaeophyta). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 425-427, 2001.

DUARTE, M.E.R. et al. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Carbohydrate Research**, v. 333, p. 281-293, 2001.

ENDO, M. et al. Pharmacologically active substances from Southern Pacific marine invertebrates. **Pure and Applied Chemistry**, v. 58, p. 387-394, 1986.

ERREA, M.I. MATULEWICZ, M.C. Cold water-soluble polysaccharides from tetrasporic *Pterocladia capillacea*. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1075-1078, 1994.

ERREA, M.I.; MATULEWICZ, M.C. Hot water-soluble polysaccharides from tetrasporic *Pterocladia capillacea*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1071-1073, 1996.

ERREA, M.I.; MATULEWICZ, M.C. Unusual structures in the polysaccharides from the red seaweed *Pterocladia capillacea* (Gelidiaceae, Gelidiales). **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 943-953, 2003

FALCH, B.S. et al. Biological activities of cyanobacteria: evaluation of extracts and pure compounds. **Planta Medica**, v. 61, p. 321-8, 1995.

FAULKNER, D. J. Highlights of marine natural products chemistry (1972–1999). **Natural Products Reports**, v. 17, p. 1-6, 2000.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v 18, p. 1-49, 2001.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 15, p. 113-157, 1998.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v 16, p. 155-198, 1999.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v 17, p. 7-55, 2000.

FENICAL, W. Marine soft-coral of the genus *Pseudopterogorgia*: a resource for novel anti-inflammatory diterpenoids. **Journal of Natural Products**, v. 50, p. 1001-1008, 1987.

FISCH, K.M. et al. Antioxidative Meroterpenoids from the Brown Alga *Cystoseira crinita*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 968-975, 2003.

FISHBEIN, L.; ALBRO, P.W. Chromatographic and biological aspects of the phthalate esters. **Journal of Chromatography**, v. 70, p. 365-412, 1972.

FLEURY, B.G. et al. Análise de ácidos graxos em algas verdes (Chlorophyta). V Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química-Rio, Rio de Janeiro, p. 14-15, 1994a.

FLEURY, B.G. et al. Comparative study of monohydroxylated sterols from seven species of marine brown algae from the Dictyotales and Fucales. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1647-1649, 1994b.

FLEURY, B.G. et al. Os esteróis das algas pardas marinhas (filo: Phaeophyceae). **Química Nova**, v. 19, p. 37-42, 1996.

FOTI, M. et al. Antioxidant activity of phenolic meroditerpenoid from marine algae. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 26, p 159-164, 1994.

FRESHWATER, D.W. Cytophotometric estimation of inter- and intraspecific variation in nuclear DNA content in ten taxa of Gelidiales (Rhodophyta). **Journal of Experimental Marine Biology Ecology**, v. 166, p. 231-239, 1993.

FUJIMOTO, K.; KANEDA, T. Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. **Hydrobiologia**, v. 116/117, p. 111-113, 1984.

GIAM, C.S. et al. Phthalate ester plasticizers: a new class of marine pollutant. **Science**, v. 199, p. 419-421, 1978.

GIROTTI, A.W. Photodynamic peroxidation in biological systems. **Photochemistry and Photobiology**, v. 51, p. 497-509, 1990.

GOLIK, J. et al. Isolation and structure determination of sulfonoquinovosyl dipalmitoyl glyceride, a p-selectin receptor inhibitor from the alga *Dictyochloris fragrans*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p.387-389, 1997.

GROWEISS, A. et al. Subergorgic acid, a novel tricyclopentanoid cardiotoxin from the Pacific gorgonian coral *Subergorgia suberosa*. **Tetrahedron Letters**, v. 26, p. 2379-2382, 1985.

HALSTEAD, B.W. Poisonous and venomous marine animals of the world. **Government Printing Office**, Washington, 1965. v. 1, 4-5 p.

HARVEY, W.H. Algae. In: **Flora Hybernica**, part 3, Dublin: Mackay, J.T. Editors., 1836. 157-254 p.

HARWIG, J.; SCOTT, P. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 21, p. 1011-1016, 1971.

HASHIMOTO, Y. **Marine Toxins and other Bioactive Marine Metabolites**. Tokyo: Japan Scientific Society Press, 1979. 369p.

HASHIZUME, K. et al. Phthalate esters detected in various water samples and biodegradation of the phthalate by microbes isolated from river water. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 2, p. 2002.

HAY, M.E. Marine chemical ecology: What is known and what is next? **Journal of Experimental Marine Biology Ecology**, v. 2006, p. 103, 1996.

HAY, M.E.; FENICAL, W. Chemical ecology and marine biodiversity: insights and products from the sea. **Oceanography**, v. 9, p. 10-20, 1997.

HOCKIN, J. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid in toxic mussels from Eastern P.I.E. **Cancer Journal of Chemistry**, v. 67, p. 481-490, 1989.

HORTA, P.A. et al. Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas brasileiras. **Hoehnea**, v. 28, n. 3, p. 243-265, 2001.

HORTA, P.A. **Aspectos taxonômicos e ecologia de macroalgas bêmicas**. UFSC, 2000.

HUNNEMAN, D.H. A cautionary note on phthalate esters of *Criptotaenia canadensis*. **Tetrahedron Letters**, v.14, p. 1743, 1968.

IGUCHI, K. et al. Bromovulome I and Iodovulone I, unprecedented brominated and iodinated marine prostanoids with antitumor activity isolated from the Japanese stolonifer *Clavularia viridis* Quoy and Gaimard. **Journal Chemistry Society, Chemistry Community**, v. 2, p. 981-982, 1986.

JACOBS, R.S. et al. Some pharmacological observations on marine natural products. **Tetrahedron**, v. 41, p. 981-984, 1985.

JAEGER, R.J.; RUBIN, R.J. Plasticizers from plastic devices: extraction, metabolism, and accumulation by biological systems. **Science**, v. 170, p. 460-462, 1970.

JANWITAYANUCHIT, W. et al. Synthesis and anti-herpes simplex viral activity of monoglycosyl diglycerides. **Phytochemistry**, v.64, p. 1253-1254, 2003.

JOLY, A.B. Marine flora of the tropical and subtropical Western South Atlantic. **Anais da Academia brasileira de Ciências**, v. 37, p. 279-282, 1965.

JOLY, A.B. Extensão da flora marinha tropical no sul do Brasil. **Boletim do Instituto de Biologia marinha de Mar del Plata**, v. 7, p. 11-15, 1964.

JONES, L.A.; HARWOOD, L.J. Lipid composition of the brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 3397-3403, 1992.

JOOSTEN, A.M.T.; VAN DEN HOEK, C. World-wide relationships between red seaweed floras: a multivariate Approach. **Botanica Marinha**, v. 29, p. 195-214, 1986.

KASHMAN, Y. et al. Latrunculins: NMR study, two new toxins and a synthetic approach. **Tetrahedron**, v. 41, p. 1905-1914, 1985.

KASIM, C.G. et al. **Phytochemistry**, v. 29, p.3115, 1990.

KAUL, P.N. Biomedical potencial of the sea. **Pure and Applied Chemistry**, v. 54, p. 1963-1972, 1982.

KAUL, P.N. Compounds from the sea with actions on the cardiovascular and central nervous systems. **Federal Proceedment**, v. 40, p. 10-14, 1981.

KAUL, P.N.; DAFTARI, P. Marine pharmacology: bioactive molecules from the sea. **Annals Review Pharmacology Toxicology**, v. 26, p. 117-142, 1986.

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

KELECOM, A. Marine organisms: an alternative source of potentially valuable natural products. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 99-106, 1991.

KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 74, n. 1, p. 151-170, 2002.

KELECOM, A.; TEIXEIRA, V.L. On the absolute configuration of dolastane and secodolastane diterpenes. **Ciência e Cultura**, v. 39, p. 506, 1987.

KELECOM, A.; TEIXEIRA, V.L.; PITOMBO, L.F. Quimiotaxonomia de Dictyotales (Phaeophyta). 6. Da sinonímia entre as algas pardas *Dictyota dentata* e *Dictyota mertensii*. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 40, p. 67-70, 1991.

KOBAYASHI, M. Marine sterols. 27. 25-Hydroxy derivative of sarcosterol, a novel marine sterol with a 23-methyl and a 17(20)E-double bond, from the soft coral *Sinularia mayi*. **Journal of Chemistry Research**, p. 494-495, 1994.

KOSCIELAR, J.; MILLER-PODRAZA, H.; ZDEBSKA, E. Isolation of poly (glycosyl) ceramides with A, B, H and I blood group activities method. **Enzymology**, v. 3, p. 211-216, 1978.

KOSUGE, T. et al. First evidence of toxin production by bacteria in a marine organism. **Chemistry Pharmaceutical Bull.**, v. 33, p. 3059-3061, 1985.

KOSUGE, T.; TSUJI, K.; HIRAI, K. Isolation of neosurugatoxin from the Japanese ivory shell, *Babylonia japonica*. **Chemistry Pharmaceutical Bull.**, v. 30, p. 3255-3259, 1982.

LEE, R.E. **Phycology**. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge, University Press, 1989. 645 p.

LHULLIER, C.; FALKENBERG, M. Produtos naturais marinhos: Uma revisão de 5 anos. XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Cuiabá, 2002.

LIAO, W.R. et al. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 30, p. 433-439, 2003.

LOOK, S.A. et al. The pseudo-pterostins: a new class of anti-inflammatory and analgesic diterpene pentosides from the marine sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* (Octocorallia). **Journal Organization Chemistry**, v. 51, p. 5140-5145, 1986.

MACHADO, M.J. et al. A galactosphingolipid from the lichen, *Ramalina celastri*. **Phytochemistry**, v.45, p. 651-653, 1997.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA Jr., V.F. Plantas Mediciniais: a necessidade de estudos interdisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARTINEZ, M. et al. Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia partenogenetica*. **Aquaculture**, v. 172, p. 315-325, 1998.

MAYER, A.M.S.; LEHMANN, V.K.B. Marine Pharmacology in 1999: Antitumor and Cytotoxic Compounds. **Anticancer Research**, v. 21, p. 2489-2500, 2001.

McHUGH, D.J. **Production and utilization of products from commercial seaweeds**. New York. FAO Fisheries Technical Paper, 1987. 189 p.

McLACHLAN, J. Macroalgae (seaweeds): Industrial resources and their utilization. **Plant and Soil**, v. 89, p. 137-157, 1985.

McLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. Bench top bioassay for the discovery of bioactive natural products: an update. In: **Studies in Natural Products Chemistry**, New York. Elsevier Science, 1991. 383-409 p.

MENSOR, L.L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v. 15, p. 330-338, 2001.

MERCK, E. **Anfärbereagenzien für dünnschicht und papierchromatographie**. Nr.21. Darmstadt: Merck, 1984.



MEYER, B.N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MICHAEL, A.S.; THOMPSON, C.G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. **Science**, v. 123, p. 464, 1956.

MILLAR, J.G.; HAYNES, K.F. Methods in chemical ecology. In: **Biological method**, London: Kluwer Academic Publishers, 1998.

MINALE, L.; RICCIO, R.; SODANO, G. Avarol, a novel sesquiterpenoid hydroquinone with a rearranged drimane skeleton from the sponge *Dysidea avara*. **Tetrahedron Letters**, v. 4, p. 3401-3404, 1974.

MOELLER, P.D.R. et al. Current progress in isolation and characterization of toxins isolated from *Pfiesteria piscicida*. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 739-743, 2001.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarinn Journal Science Technology**. v. 26, n. 2, p 211-219, 2004.

MOORE, R.E.; SCHEUER, P.J. Palytoxin, a new marine toxin from a coelenterate. **Science**, v. 172, p. 495-498, 1971.

MUNRO, M.H. et al. Biological activity in New-Zealand marine organisms. **Pure and Application Chemistry**, v. 61, p. 529-534, 1989.

MURAKAMI, S. et al. Studies of the effective principles of *Digenea simplex* Ag. VIII. Structure of Kainic acid (1) and (2). **Yakugaku Zasshi**, v. 75, p. 866-873, 1953.

NAKAGAWA, H. et al. Screening of epiphytic dinoflagellates for radical scavenging and cytotoxic activities. **Phycological Research**, v. 42, p. 9-12, 1998.

NAKAMURA, H. et al. Xestoquinone, a novel cardiogenic marine natural product isolated from the Okinawan sea sponge *Xestospongia sapra*. **Chemical Letters**, v. 3, p. 713-716, 1985.

NISHIBORI, S.; NAMIKI, K. Antioxidative substance in the green fraction of the lipid of Aonori (*Enteromorpha* sp.). **Journal of Home Economics of Japan**, v. 39, p. 1173-1178, 1988.

OKAICHI, T.; HASHIMOTO, Y. The structure of nereistoxin. **Agriculture Biological Chemistry**. v. 26, p. 224-227, 1962.

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

PAUL, V.J. **Ecological role of marine natural products**, United Kingdom: Comstock Publishing Associates, 1992.

PAWLIK, J.R. Marine invertebrate chemical defenses. **Chemical Review**, v. 15, p. 1911, 1993.

PELKA, M. et al. A new screening test toxicity testing of dental materials. **Journal Dental**, v. 28, p. 341-345, 2000.

PERRY, N.B. et al. Mycalamide A, an antiviral compound from a New Zealand sponge of the genus *Mycale*. **Journal of American Chemistry Society**, v. 110, p. 4850-4851, 1988.

PETTIT, G.R. et al. Isolation and structure of bryostatin 1. **Journal of American Chemistry Society**, v. 104, p. 6846-6848, 1982.

PINTO, C.A. et al. Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PRESTON, M.R. Phthalate ester speciation in estuarine water, suspended particulates and sediments. **Environmental Pollution**, v. 62, p. 183-193, 1989.

PRESTON, M.R.; AL OMRAN, L.A. Dissolved and particulate phthalate ester in the River Mersey Estuary. **Marine Pollution Bulletin**, v. 17, p. 548, 1986.

QUINN, R.J. et al. Isolation and synthesis of 1-methysioguanosine, a potent pharmacologically active constituent from the marine sponge *Tedania digiata*. **Tetrahedron Letters**, v. 21, p. 567-568, 1980.

RAMANATHAN, L.; DAS, D.N.P. Studies on the control of lipid oxidation in ground fish by some polyphenolic products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 17-21, 1992.

RAO, N.G. et al. Constituents of *Cassia auriculata*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 82-83, 2000.

RINEHART, K.L. et al. Didemnins: antiviral and antitumor depsipeptides from a Caribbean tunicate. **Science**, v. 212, p. 933-935, 1981.

RINEHART, K.L. Biologically active marine natural products. **Pure and Applied Chemistry**, v. 61, p. 525-528, 1989.

RÜCKER, G.; NEUGEBAUER, M.; WILLEMS, C.G. **Instrumentelle pharmazeutische Analytik**. 3 ed. Stuttgart: Wissenschaftliche, 2001.

RUPÉREZ, P.; AHRAZEM, O.; LEAL, A.J. Potencial antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 840-845, 2002.

SANTELICES, B. et al. Comparative ecology of *Lessonia nigrescens* and *Durvillaea antarctica* (Phaeophyta) in Central Chile. **Marine Biology**, v. 59, p. 119-132, 1980.

SARSA group, unpublished results.

SASTRY, V.M.S.; RAO, G.R.K. Antibacterial substancea from marine algae: successive extratction using benzene, chloroform and methanol. **Botanica Marina**, v. 37, p. 357-360, 1994.

SCHEUER, P.J. Marine natural products and biomedicine. **Medical Journal Review**, v. 9, p. 535-545, 1989.

SCHNEIDER, C. et al. Control of Prostaglandin Stereochemistry at the 15-Carbon by Cyclooxygenases-1 and -2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 103. p. 478, 2002.

SCHUETT, W.; RAPAPORT, H. Saxitoxin, the paralytic shellfish poison. Degradation to a pyrrolopyrimidine. **Journal of American Chemistry Society**, v. 84, p. 2266-2267, 1962.

SHEU, J. et al. New cytotoxic oxygenated fucosterols from the brown alga *Turbinaria conoides*. **Journal of Natural Products**, v.62, p.224-227, 1999.

SHEU, J. et al. Study on cytotoxic oxygenated desmosterols isolated from the red alga *Galaxaura marginata*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 900-903, 1997.

SHIMIZU, Y. Dinoflagellates Toxins, In: **Marine Natural Products, Chemical and Biological Perspectives**, vol. II, chap.1, New York: Academic Press, 1978. 1-42 p.

SLEET, R.B.; BRENDEL, K. Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Artemia nauplii* for use in developmental toxicology. **Ecotoxicological Environmental Safety**, v. 7, p. 435-446, 1983.

SOARES, A.R. et al. Variation on diterpene production by the Brazilian alga *Styopodium zonale* (Dictyotales, Phaeophyta). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 1347-1350, 2003.

SOHLSTROM. Figura internet *Pterocliadiella capillacea*, 2000  
<http://www.piscoweb.org/cgi-bin/qml/> .

SOLIS, P.N. et al. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. **Planta Medica**, v. 59, p. 250-252, 1993.

STADTMAN, E.R. Protein oxidation and aging. **Science**, v. 257, p. 1220-1224, 1992.

STAPLES, C.A. et al. The environmental fate of phthalate esters: a literature review. **Chemosphere**, v. 35, p. 667-749, 1997.

STEINBERG, D. et al. Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. **New England Journal of Medicine**, v. 320, p. 915-924, 1989.

SUGANUMA, M. et al. Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 85, p. 1768-1771, 1988.

SUN, Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, p. 583-599, 1990.

TAKEMOTO et al. Studies on the constituents of *Chondria armata* VIII. On the structure of domoic acid. **Yakugaku Zasshi**, v. 86, p. 874-877, 1966.

TASHIBANA, K.; SAKAITANI, M.; NAKANISHI, K. Pavoninins: shark-repelling ichthyotoxins from the defense secretion of the Pacific sole. **Science**, v. 226, p. 703-705, 1984.

TAYLOR, W.R. Marine algal flora of the Caribbean and its extension into neighboring seas. In **Essays in the Natural Sciences in honour of Captain Allan Hancock**, Los Angeles, 1955. 259-270 p.

TEIXEIRA, V.L.; CAVALCANTI, D.N.; PEREIRA, R.C. Chemotaxonomic study of the diterpenes from the brown alga *Dictyota menstrualis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 313-316, 2001.

TEIXEIRA, V.L.; KELECOM, A.; ALMEIDA, S.S.A. Chemosystematic and biogeographic studies of the diterpenes from the marine brown alga *Dictyota dichotoma*. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 18, p. 87-92, 1990.

TEIXEIRA, V.L.; KELECOM, A.; GOTTLIEB, O.R. Produtos naturais de algas marinhas. **Química Nova**, v. 14, p. 83-90, 1991.

THOMAS, J.A. et al. A review of the biological effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate. **Toxicology and Applied**, v. 45, p. 1-27, 1978.

TSUDA, T. et al. Discovery of cholesterol in some red algae. **Science**, v. 126, p. 927-928, 1957.

TSUDA, T. et al. Steroid studies: VIII. Cholesterol in some red algae. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. V. 6, p. 101-104, 1958.

USEPA. **Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms**. 5<sup>th</sup> ed. Washington. Environmental Protection Agency, 2002. 178-184 p.

VALMSEN, K. et al. The origin of 15*R*-prostaglandins in the Caribbean coral *Plexaura homomalla*: Molecular cloning and expression of a novel cyclooxygenase. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 5, p. 7700-7705, 2001.

VAN DEN HOEK, C. World-wide latitudinal and longitudinal seaweed distribution patterns and their possible causes, as illustrated by the distribution of Rhodophytan genera. **Helgoländer Meeresuntersuchungen**, v. 38, p. 227-257, 1984.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.G.; JAHNS, H.M. **Algae – an introduction to phycology**, Cambridge. Academic Press, 1995. 623 p.

VANHAECKE, P. et al. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 5, p. 382-387, 1981.

VINSON, J.A.; PROCH, J.; BOSE, P. Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in foods and beverages. **Methods in Enzymology**, v. 335, p.103-115, 2001.

WAALAND, J. R. Commercial utilization. In: **The Biology of Seaweeds**, Oxford: Lobban C.S. and Wynne M.J. eds. Blackwell Scientific Publications, 1981. 736-741 p.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**. 2 ed. New York: Springer, 1995.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSK, E.M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, 1986.

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

WALDOCK, M.J. Determination of phthalate esters in samples from the marine environment using gas chromatography mass spectrometry. **Chemistry in Ecology**, v. 1, p. 261-277, 1983.

WATANABE, N. et al. New Chlorophyll-A-Related Compounds Isolated as Antioxidants from Marine Bivalves. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 305-317, 1993.

WEINHEIMER, A.J.; SPRAGGINS, R.L. The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA<sub>2</sub> and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla*. **Tetrahedron Letters**, v. 2, p. 5185-5188, 1969.

WOOD. Figura internet *Pterocliadiella capillacea*, 2001. <http://www.piscoweb.org/cgi-bin/qml/>

YAMADA, N. **Science of the utilization of sea algae**. Japan: Seizando-Shoten, 2000. 195-199 p.

YASUMOTO, T. et al. Interspecies distribution and biogenetic origin of tetrodotoxin and its derivatives. **Pure and Applied Chemistry**, v. 61, p. 505-508, 1989.

YOKOO, A. Chemical studies on tetrodotoxin. Rep. No 3, Isolation of spheroidine. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 71, p. 590-592, 1950.