

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

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DA ALGA
VERMELHA *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

KAREN LUISE LANG

Florianópolis

2006

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

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DA ALGA VERMELHA
Acanthophora spicifera (Vahl) Borgesen

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia por Karen Luise Lang como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmácia

ORIENTADORA: Prof. Dr. Miriam de Barcellos Falkenberg

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel

Florianópolis

2006

DEDICATÓRIA

Aos meus pais: Paulo e Marli

*“Melhor do que a criatura,
fez o criador a criação.
A criatura é limitada.
O tempo, o espaço,
normas e costumes.
Erros e acertos.
A criação é ilimitada.
Excede o tempo e o meio.
Projeta-se no Cosmos.”*
Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

Aos meus orientadores Profa Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg e Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel pela orientação, amizade, dedicação, e principalmente, pela contribuição em minha formação científica e humana desde a iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Jorge Palermo, do Departamento de Química Orgânica, da Universidade de Buenos Aires, na Argentina, pela realização dos espectros de massas e de Ressonância Magnética Nuclear apresentados neste trabalho, e, sobretudo, por todo carinho e boa vontade;

Ao Prof. Dr. Flávio H. Reginatto, pelo auxílio na realização dos testes de atividade antibacteriana, e principalmente pelo carinho e amizade sempre presentes.

À Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões e ao Prof. Mario Steindel, pela realização dos experimentos para determinação da atividade antiviral e antiparasitária, respectivamente, dos extratos de *A. spicifera*;

À Profa. Dra. Zenilda Bouzon pela identificação do material vegetal;

Às técnicas Solange e Claudinha, pela amizade, dedicação, coca-colas e boas risadas!!

Ao meu noivo Daniel, por todo carinho, apoio, dedicação e por toda paciência. Te amo!!;

À amiga Silvana, agradeço pela amizade e por toda ajuda! Muito do que sei hoje devo a ti!

Aos colegas de laboratório Maria Izabel, Cíntia, Clara, Flora, Leopoldo e Andressa pela amizade e disponibilidade em ajudar-me sempre que precisei;

Aos colegas de mestrado Ariane, Regina, Fábio, Tatiane e aos amigos Gislaine, Monika, Rafael e Bruno pelas conversas, brincadeiras e ajudas no dia a dia.

Obrigada a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. OBJETIVO GERAL.....	6
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
3.1. PRODUTOS NATURAIS MARINHOS.....	8
3.2. ALGAS MARINHAS.....	13
3.2.1. Classificação.....	14
3.2.2. Importância ecológica.....	14
3.2.3. Importância econômica.....	14
3.2.4. O filo Rhodophyta.....	20
3.2.5. <i>Acanthophora spicifera</i>	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1. PROCEDIMENTOS GERAIS.....	27
4.2. MATERIAL VEGETAL.....	28
4.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	28
4.3.1. Preparação do extrato etanólico.....	28
4.3.2. Preparação do extrato hidroetanólico.....	29
4.3.3. Preparação do extrato aquoso.....	29
4.4. FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS.....	29
4.4. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DAS FRAÇÕES.....	31

4.5. ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO	31
4.5.1. Fracionamento do extrato orgânico	31
4.5.1. Isolamento das substâncias S1A, S2A e S3A e S6A	31
4.5.2. Isolamento da substância S5A	34
4.5.3. Análise das substâncias isoladas.....	34
4.6. ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	37
4.6.1. Avaliação da atividade antibacteriana	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1. INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE <i>Acanthophora spicifera</i>	40
5.1.1. Rendimento dos extratos.....	40
5.1.2. Análise cromatográfica das frações.....	41
5.1.3. Análise estrutural da substância S1A	43
5.1.4. Análise estrutural da substância S2A	54
5.1.5. Análise estrutural da substância S5A	60
5.1.6. Substâncias S3A e S6A	64
5.2. ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	65
5.2.1. Ensaio antibacteriano.....	65
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
7. CONCLUSÕES	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
9. ANEXOS	82
9.1. ANEXOS S1A	83
9.2. ANEXOS S2A	100
9.3. ANEXOS S5A	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da briostatina.....	8
Figura 2: Estruturas químicas dos nucleosídeos ARA-A e ARA-C.....	10
Figura 3: <i>Porphyra</i> sp. (1) base do nori (2), utilizado para o preparo do sushi (3).....	15
Figura 4: <i>Acanthophora spicifera</i> (Vahl) Borgesen.	22
Figura 5: Estrutura do tilirosídeo.....	23
Figura 6: Estrutura da quercetina (A) e catequina (B).....	23
Figura 7: Estrutura da acanthophorina A (C) e acanthophorina B (D).....	24
Figura 8: Estrutura da 5 α -colestano-3,6-diona e da 11 α -hidroxi-5 α -colestano-3,6-diona	24
Figura 9: Estrutura do colest-4-en-3 α ,6 α -diol e da colest-4-en-3-ona.	25
Figura 10: Representação esquemática do fracionamento do extrato etanólico de <i>A. spicifera</i>	30
Figura 11: Representação esquemática do isolamento das substâncias S1A, S2A, S3A e S6A de <i>A. spicifera</i>	33
Figura 12: Representação esquemática do isolamento da substância S5A de <i>A. spicifera</i>	34
Figura 13: Substâncias isoladas de <i>A. spicifera</i>	40
Figura 14: Comparação cromatográfica da fração aquosa, metanólica e etanólica de <i>A. spicifera</i>	42
Figura 15: Fração orgânica de <i>A. spicifera</i>	43
Figura 16: Comparação entre as frações orgânica, CAF12 e a substância S1A.....	44
Figura 17: Núcleo esteroidal do tipo colestano.	45
Figura 18: Possibilidades de acoplamentos observados nos espectros de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C de correlação de ¹ H ¹ H-COSY, HSQC e HMBC.	47
Figura 19: Espectro de absorção UV da substância S1A, em CHCl ₃	48
Figura 20: Sistemas eno-diona em núcleos esteroidais.	49

Figura 21: Estrutura parcial de S1A, atribuições dos deslocamentos químicos de ^{13}C para os anéis A e B.	50
Figura 22: Estrutura parcial de S1A, atribuições dos deslocamentos químicos de ^{13}C para os anéis C e D.	51
Figura 23: Estrutura proposta para a substância S1A, colest-4-en-3,6-diona.	52
Figura 24: Comparação entre as frações orgânica, CAF12 e a substância S2A.....	54
Figura 25: Estrutura parcial da molécula S2A, atribuições dos deslocamentos químicos de RMN- ^{13}C para os anéis A e B.....	58
Figura 26: Estrutura parcial de S2A, atribuições dos deslocamentos químicos de ^{13}C para os anéis A e B.	59
Figura 27: Estrutura proposta para a substância S2A, 6 β -hidroxi-colest-4-en-3-ona.	59
Figura 28: Comparação entre a substância S5A e o padrão β -sitosterol.	60
Figura 29: Estrutura proposta para a substância S5A, 3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol (fitol).	63
Figura 30: Estrutura do geranilgeraniol.....	63
Figura 31: Estrutura da vitamina K ₁	64
Figura 32: Estrutura da clorofila a.	64
Figura 33: Comparação entre a fração orgânica, substâncias isoladas S3A e S6A e o padrão colesterol.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos de origem marinha.....	9
Tabela 2: Produtos naturais marinhos em fase de estudos clínicos em janeiro de 2004 ...	12
Tabela 3: Principais algas marinhas comestíveis.....	16
Tabela 4: Principais metabólitos bioativos obtidos de algas vermelhas.....	18
Tabela 5: Antibióticos de 1ª escolha para avaliação da atividade antibacteriana.....	38
Tabela 6: Rendimento do extrato etanólico de <i>A. spicifera</i>	41
Tabela 7: Rendimento das frações da partição do extrato etanólico de <i>A. spicifera</i>	41
Tabela 8: Correlações dos grupamentos metila observadas no espectro de HMBC em CDCl ₃ da substância S1A.....	49
Tabela 9: Valores de deslocamentos químicos em ppm observados no espectro de RMN 13C (125 MHz) do esteróide S1A, comparado com os dados da literatura.....	53
Tabela 10: Comparação dos valores dos deslocamentos químicos, em ppm, observados nos espectros de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C em CDCl ₃ , para os esteróides S1A e S2A.....	58
Tabela 11: Comparação entre os valores de deslocamentos químicos em ppm observados nos espectros de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C da substância S5A, e os dados da literatura (SDBS, 2006).....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

RMN-¹H: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN-¹³C: Ressonância magnética nuclear de carbono 13

DEPT: Distortionless enhancement by polarization transfer

¹H¹H-COSY: Correlated spectroscopy

HSQC: Heteronuclear single quantum coherence

HMBC: Heteronuclear multiple bond correlation

δ_H : Valor de deslocamento químico em ppm no espectro de ¹H-RMN

δ_C : Valor de deslocamento químico em ppm no espectro de ¹³C-RMN

IV: Infravermelho

UV: Ultravioleta

AcOEt: Acetato de etila

EtOH: Etanol

MeOH: Metanol

EP: Éter de petróleo

Cq: Carbono quaternário

HSV: Herpes simplex vírus

ATCC: American Type Collection Culture

RESUMO

O ambiente marinho apresenta-se como uma fonte promissora de novos compostos, que mostram grande variedade e complexidade estrutural. Devido à escassa produção científica a respeito da constituição química de macroalgas bênticas provenientes do litoral catarinense, e com o intuito de dar continuidade às pesquisas com produtos naturais marinhos iniciadas em 2003 neste Programa de Pós-graduação, este trabalho teve por objetivo a investigação química do extrato etanólico da alga vermelha *Acanthophora spicifera*, bem como a avaliação das atividades antimicrobiana, antiparasitária e antiviral do extrato e, eventualmente, de substâncias isoladas. O material foi coletado na Lagoa da Conceição (Florianópolis, SC) em janeiro de 2006 e foi inicialmente extraído em etanol 70%. A partir da fração acetato de etila, obtida da partição do extrato etanólico, foram isoladas cinco substâncias, identificadas mediante análises espectroscópicas e comparação com dados da literatura. Assim, S1A foi identificada como sendo o esteróide colest-4-en-3,6-diona, nunca antes descrito para algas marinhas, e S2A, como o esteróide 6 β -hidróxi-colest-4-en-3-ona, inédito para o gênero *Acanthophora*. Além desses, foram isolados o diterpeno fitol e o esteróide colesterol, substâncias comumente encontradas em produtos naturais, além da substância S3A (cromatograficamente semelhante a S2A), para a qual não foi possível obter os espectros necessários à elucidação estrutural. A atividade antibacteriana de extratos e frações de *A. spicifera* não foi expressiva. Quanto à atividade antiviral, somente a fração orgânica apresentou resultados significativos contra o herpes simples tipo 1 (HSV-1), cepa KOS, com índice de seletividade (IS) de 5,0; das substâncias isoladas, apenas S1A e S2A foram testadas, sendo que individualmente nenhuma delas apresentou atividade significativa, entretanto a combinação de ambas apresentou alguma atividade antiviral, o que sugere um efeito sinérgico. Nenhum dos extratos e frações avaliados quanto às atividades tripanocida e leishmanicida apresentou atividade. Dentre os compostos isolados, os três esteróides estão presentes no extrato em concentrações relativamente elevadas e, dada a ausência na literatura de estudos de atividade biológica de S1A e S2A, estas substâncias podem ser considerados promissoras para futuras investigações.

ABSTRACT

The marine environment is considered a promising source of new compounds, with impressive variety and structural complexity. Since there are few studies about the composition of benthic macroalgae from Santa Catarina's coast, this work aimed the chemical investigation of the ethanolic extract of red alga *Acanthophora spicifera*, as well as the evaluation of antimicrobial, antiparasitic and antiviral activities of the extract and isolated substances. The material was collected at Lagoa da Conceição (Florianópolis, Brazil) in January 2006 and was extracted with ethanol 70%. The extract was partitioned with different solvents and from the ethyl acetate fraction five substances were isolated and identified through spectroscopic analysis and comparison with literature data. The compound S1A was identified as the steroid cholest-4-en-3,6-dione, which has never been reported for algae, and S2A as the steroid 6 β -hydroxy-cholest-4-en-3-one, here reported for the first time to the genus *Acanthophora*. A diterpene (phytol) and a steroid (cholesterol) commonly found in natural products have been also identified; another substance (S3A) with similar R_f to steroid S2A was obtained in very low yield. The antibacterial activity of extracts and fractions of *A. spicifera* was not significant. Among the extracts and fractions tested to antiviral activity, only the organic fraction showed significant results against herpes simplex virus type 1 (HSV-1), strain KOS, (selectivity index 5.0); substances S1A and S2A presented no significant activity, however their combination presented some antiviral activity, suggesting a synergic effect. The tested extracts and fractions presented no trypanocidal or leishmanicidal activity. The three isolated steroids are present in relatively high concentrations in the extract, and since there were no reports on literature for investigations on the biological activity of S1A and S2A, these substances can be considered promising for future studies.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais, tanto de origem terrestre como marinha, constituem uma fonte inesgotável de compostos com atividades biológicas promissoras, não apenas pelo grande número de espécies encontradas nesses habitats, com propriedades medicinais inexploradas, mas principalmente pela variedade de metabólitos sintetizados (NIELSEN, 2002; NEWMAN; CRAGG; SANDER, 2003).

Em certos ecossistemas marinhos, como recifes de corais ou de regiões abissais, estudiosos estimam que a diversidade biológica seja muito maior que a de florestas tropicais. Diversos organismos marinhos possuem corpos moles e são sedentários, necessitando de meios químicos de defesa (HAEFNER, 2003). Dessa forma, substâncias químicas derivadas do metabolismo primário e secundário, são produzidas em resposta a estímulos externos que podem ter origem biótica ou abiótica (NIELSEN, 2002; STROHL, 2000).

Apesar de o Brasil possuir a segunda maior costa litorânea, com 8.000 Km (a Austrália é a primeira, com mais de 14.000 Km), o início da química de organismos marinhos brasileiros foi lento, uma vez que o maior foco dos químicos de produtos naturais brasileiros se voltava quase que em sua totalidade para o estudo de plantas medicinais e para a quimiotaxonomia de plantas (BERLINCK et al., 2004). Atualmente, em nível mundial, a pesquisa de produtos naturais marinhos representa uma grande parcela do número total de publicações na temática de produtos naturais em geral (PROKSCH; EDRADA; EBEL 2002; ALONSO et al., 2003). No entanto, a pesquisa nacional de produtos naturais ativos de origem marinha ainda necessita ser incrementada, pois sua realização é amplamente justificada pela razoável massa crítica de pesquisadores da área de química de produtos naturais e pelas características da costa brasileira, com ampla diversidade de organismos marinhos e, conseqüentemente, grande potencial na obtenção de novos compostos ativos (BERLINCK et al., 2004).

Até a década de 50, a utilização de organismos marinhos com propriedades medicinais, principalmente de algas, era restrita a medicina popular. Nesse período, o início da exploração desse novo ambiente revelou novas utilizações para esse grupo de organismos marinhos, sendo que, atualmente, a utilização de macroalgas pela indústria

mundial movimentada bilhões de dólares todos os anos (SMIT, 2004). Grande parte dessa movimentação está ligada ao cultivo de algas comestíveis e a produção de ficocolóides como ágar, carragenanos e alginatos.

A partir da década de 60, as indústrias farmacêuticas iniciaram uma busca por novos fármacos de origem natural e o mar se mostrou um habitat bastante promissor. Segundo Ireland (1993), entre 1977 e 1987 as algas marinhas foram responsáveis por 35% dos novos compostos descobertos, seguido por esponjas (29%) e cnidários (22%). A descoberta de novos compostos a partir de algas marinhas diminuiu depois de 1995, uma vez que as atenções se voltaram, em parte, para microorganismos marinhos.

Estima-se que existam mais de 150.000 espécies de macroalgas nos oceanos e mares, sendo que somente uma pequena parte já foi identificada e catalogada (HARVEY, 1988). Metabólitos primários e secundários obtidos a partir desses organismos mostram-se como potenciais compostos bioativos para a indústria farmacêutica, sendo que especial atenção é dedicada a compostos com atividade antiviral, antibacteriana e antifúngica (LIMA-FILHO et al. 2002).

No estado de Santa Catarina poucos trabalhos foram realizados na área de investigação química e biológica de macroalgas bênticas. Em 2003, deu-se início a investigação de produtos naturais marinhos pelo Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, tendo sido concluídas duas dissertações de mestrado até o presente (LHULLIER, 2005; SILVA, 2005). Há, no entanto, estudos de universidades em outros estados com espécies provenientes do litoral catarinense, como o estudo com *Sargassum stenophyllum* (DUARTE et al., 2001), além de outros iniciados recentemente com objetivo de isolar carragenanas e ágar ou de descrição da estrutura da comunidade algal, bem como de biomonitoramento de poluição das águas marinhas (BOUZON, 2005).

Devido à escassa produção científica a respeito de macroalgas bênticas provenientes do litoral catarinense e à diversidade estrutural encontrada em produtos naturais marinhos, com grande potencial terapêutico, esta dissertação de mestrado visa dar continuidade à

investigação química e biológica de algas bênticas do litoral do estado de Santa Catarina (SC), iniciada em 2003 neste Programa de Pós-graduação.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar estudos químicos e biológicos de extratos da macroalga vermelha *A. spicifera* (Vahl) Borgesen coletada na Lagoa da Conceição, Florianópolis.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar constituintes químicos do extrato etanólico da macroalga *A. spicifera*;
- Avaliar a atividade antibacteriana de extratos e frações de *A. spicifera*;
- Avaliar a atividade antiviral de extratos, frações e substâncias isoladas de *A. spicifera*;
- Avaliar a atividade antiparasitária de extratos e frações de *A. spicifera*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. PRODUTOS NATURAIS MARINHOS

Os oceanos possuem uma enorme biodiversidade, contendo 34 dos 36 filos de todo o globo terrestre, possuindo 200.000 espécies relatadas de plantas e animais, tais como esponjas, tunicados, briozoários, moluscos, bactérias, cianobactérias, peixes e algas (PINTO et al., 2002; BLUNT et al., 2004). Esses organismos se desenvolvem em condições adversas quando comparadas às espécies de vida terrestre, como a alta salinidade da água, a pouca ou nenhuma presença de luz e ainda grandes variações de temperatura. Essas condições climáticas, aliadas a pressões ecológicas, tais como competição por espaço, predação, simbiose e variação das marés, originaram ao longo de milhares de anos, a biossíntese de metabólitos secundários complexos e variados, por parte desses organismos, que permitiram sua adaptação a um ambiente competitivo e hostil (FAULKNER, 2000; KELECOM, 2002; LEI; ZHOU, 2002; PINTO et al., 2002; KIJJOA; SAWANGWONG, 2004). Alguns exemplos da complexidade dos esqueletos químicos encontrados no ambiente marinho podem ser observados na Tabela 1.

Acredita-se que a atividade de produtos naturais em ensaios farmacológicos (celulares ou enzimáticos) está relacionada às propriedades de defesa do organismo produtor (PINTO et al., 2002). Como exemplo, a briostatina (Figura 1), agente anticâncer em fase de testes clínicos, atua no briozoário *Bugula neritina*, do qual foi isolada, como inibidor da divisão celular de organismos estranhos, impedindo a sua proliferação (MUTTER; WILLS, 2000).

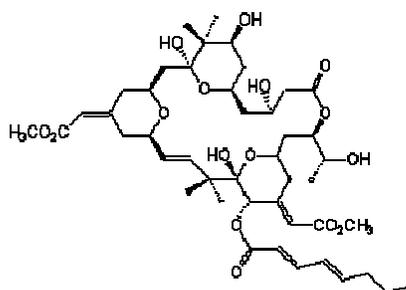
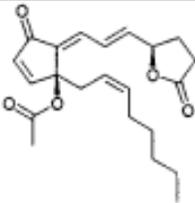
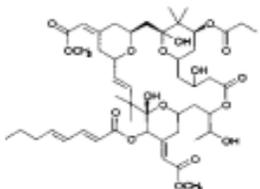
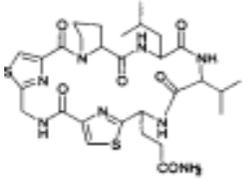
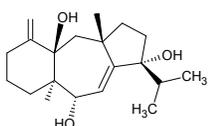
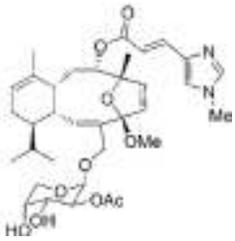
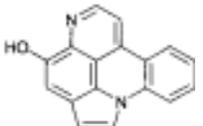


Figura 1: Estrutura da briostatina.

Tabela 1: Compostos de origem marinha

Composto	Estrutura química	Atividade	Origem
Clavulactona II		Anti-hipertensiva; estimulante uterino	Coral mole <i>Clavularia viridis</i>
Briostatina I		Agente antitumoral em fase II de testes clínicos	Briozoário <i>Bugula neritina</i>
Dolastatina 10		Agente antitumoral em fase II de testes clínicos Antifúngico	Lebre-do-mar <i>Dolabella auricularia</i>
Scitonemina		Antiinflamatória	Pigmento de cianofíceas
Dolatriol		Citotóxica	Alga parda <i>Dictyota divaricata</i>
Eleuterobina		Citotóxica	Coral <i>Eleutherobia</i> sp.
Arnoamina A		Agente antitumoral Inibidor topoisomerase	Ascídia <i>Cystodytes</i> de spp.

FONTE: LEI E ZHOU, 2002

Produtos naturais marinhos são estudados há mais de um século. Inicialmente, seu conhecimento provinha da culinária e da medicina tradicional oriental. No ocidente, os primeiros estudos das atividades biológicas de produtos marinhos iniciaram-se na década de 50 com o isolamento dos nucleosídeos esponouridina e espongotimidina por Bergmann e colaboradores. Isoladas da esponja marinha *Tethya crypta*, estas substâncias possuem atividade antiviral e o estudo de análogos sintéticos levou ao desenvolvimento de agentes antivirais e antileucêmicos, tais como ARA-A e ARA-C (Figura 2) (PETTIT et al., 2001; NEWMAN; CRAGG; SANDER, 2003).

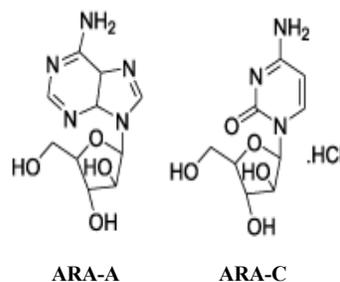


Figura 2: Estruturas químicas dos nucleosídeos ARA-A e ARA-C.

No Brasil, as pesquisas com produtos naturais marinhos tiveram início na década de 60 no Centro de Pesquisas de Produtos Naturais na Faculdade de Farmácia da UFRJ, com o isolamento do colesterol a partir do equinodermo *Echinometra lucunter*, em 1963 (TURSCH, 1963). Posteriormente, no Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal Fluminense, as pesquisas tiveram uma grande evolução, tendo sido estudados vários organismos marinhos. Esses estudos, realizados por uma equipe multidisciplinar, envolvendo químicos, biólogos e farmacêuticos, realizou durante cinco anos um *screening* de mais de 500 extratos de esponjas, anêmonas do mar, estrelas do mar e várias algas frente às mais diversas atividades biológicas (KELECOM, 1997).

Os trabalhos liderados por este grupo conduziram à formação de três grupos na área de química de produtos marinhos: um no Instituto de Química da UFF, outro no Instituto de Química da UFRJ e um terceiro grupo no Instituto de Química da Universidade de São Paulo/USP, Campus São Carlos. Atualmente, estão sendo desenvolvidas pesquisas nesta área, em várias instituições, tais como UFRJ, UFF, UFPR, UFC, USP, UNICAMP, UFBA, UFRGS, UFPB e, mais recentemente, a própria UFSC, tendo sido concluídas em 2005 duas dissertações de mestrado (uma relacionada a esponjas e outra, a algas) no Programa de Pós-graduação em Farmácia, estabelecendo-se, assim, um novo e promissor cenário na pesquisa de organismos e microorganismos marinhos no nosso país. Os trabalhos envolvem pesquisadores das áreas de taxonomia, ecologia, biogeografia, química e farmacologia, e a sua interação é fundamental para a descoberta de novos compostos marinhos bioativos, genuinamente brasileiros.

Por volta de 1960 houve grande investimento por parte de indústrias farmacêuticas na busca de substâncias bioativas a partir dos organismos marinhos. 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 dos cientistas nas pesquisas em produtos naturais marinhos (WEINHEIMER; SPRAGGINS, 1969; VALMSEN et al., 2001; SCHNEIDER et al., 2002).

Especialmente para doenças infecciosas, a exploração do ambiente marinho representa uma nova e promissora fronteira na busca de compostos ativos, pois devido ao aparecimento de resistência de diversos microorganismos aos tratamentos disponíveis, a necessidade de novos fármacos, especificamente no que diz respeito às ações antifúngica, antiparasitária, antibacteriana e antiviral é de extrema importância. Até o presente, a maioria das publicações traz metabólitos bioativos, provindos de invertebrados marinhos e microorganismos a eles associados, e são citados em várias revisões (FAULKNER, 2000; 2001; 2002; MAYER; HAMANN, 2002; 2004; 2005;

BLUNT et al., 2003; 2004; 2005; 2006; DONIA; HAMANN, 2003). Na Tabela 2 são apresentados alguns compostos de origem marinha em fase de estudos clínicos.

Tabela 2: Produtos naturais marinhos em fase de estudos clínicos em janeiro de 2004.

Composto	Origem	Desenvolvimento	Atividade biológica	Testes clínicos
APLIDINA	<i>Aplidium albicans</i> (tunicado)	Pharmamar (Espanha)	Citotóxica	Fase II
BRIOSTATINA	<i>Bugula neritina</i> (Briozoário)	GPC Biotech (Alemanha)	Antitumoral (moduladora da atividade da proteína kinase)	Fase II Câncer de esôfago e outros cânceres
CONOTOXINAS	<i>Conus spp.</i> (Molusco)	Prialt (Zicotina) Élan Pharmaceuticals (Irlanda) Amrad (Austrália)	Analgésica (atividade neurofarmacológica)	Prialt (Zicotina): Fase III AM336: Fase II (dor severa)
GTS-21, DMXBA	<i>Amphiporus lactifloreus</i> (nemertina)	Taiho Pharmaceuticals CO (Japão)	Antagonista de receptores nicotínicos	Fase I – II Doença de Alzheimer
IPL-576092	<i>Petrosia contignata</i> (Esponja)	Inflazyme Pharmaceuticals (Canadá) Aventis (Frac)	Antiinflamatória	Fase II Terapia oral para a asma
OAS-100	<i>Pseudoptero gorgia elizabethae</i>	Osteoarthritis sciences (USA)	Cicatrizante Antiinflamatório	Fase I- II
LY355703	<i>Nostoc sp.</i> (cianofíceas)	Eli Lilly Research Laboratories	Antitumoral	Fase I
NEOVASTAT™	Squalidae	Aeterna (Canadá)	Antitumoral (antiangiogênica)	Fase II (câncer de rim e próstata)

FONTE: <http://www.bioaqua.net/mnp/MNP/clinical.asp>

No Brasil, os estudos mais significativos são os relacionados a polissacarídeos sulfatados com atividades anticoagulante e antitrombótica, isolados de algas, ascídeas, pepinos e ouriços-do-mar. Como exemplo do resultado dessas pesquisas, o sulfato

fucosilado de condroitina, isolado do pepino-do-mar *Ludwigothurea grisea* apresenta-se como alternativa promissora para a heparina, por suas atividades anticoagulante e antitrombótica (GUNAY, 1999).

3.2. ALGAS MARINHAS

As algas compreendem um grupo muito diverso de organismos, fotossintetizadores, não vasculares, dotados de estruturas reprodutivas desprotegidas, produtoras de esporos e desprovidas de sementes e flores (SOUTH; WHITTICK, 1987).

São denominadas talófitas, ou plantas inferiores, por não apresentarem uma estrutura vegetal diferenciada em raiz, caule e folhas. Este grupo inclui desde organismos procarióticos a eucarióticos e unicelulares a pluricelulares, apresentando assim uma variação morfológica extremamente diversa (VAN DEN HOEK; MANN; JAHS, 1995).

Bioquímica e fisiologicamente as algas são similares em muitos aspectos às outras plantas, possuindo as mesmas vias bioquímicas básicas. Possuem clorofila *a* como principal pigmento fotossintético e carotenóides (beta-caroteno e fucoxantina), ficocianina e ficoeritrina como pigmentos acessórios. Ainda, seus polissacarídeos e proteínas biossintetizados são comparáveis àqueles das plantas superiores (SOUTH; WHITTICK, 1987).

As algas seriam os organismos mais antigos do planeta, havendo evidências de sua existência no período pré-cambriano (3,5 bilhões de anos, aproximadamente). Elas ocorrem em praticamente todas as condições ambientais na terra, porém se mostram mais abundantes nos ambientes aquáticos, onde representam os maiores produtores de compostos orgânicos e desempenham papel central na base da cadeia alimentar, além de liberarem oxigênio (LEE, 1999).

3.2.1. Classificação

As algas constituem um grupo polifilético de organismos que apresentam um histórico evolutivo muito diverso, englobando representantes de diferentes reinos como Eubacteria, Protista e Plantae.

As algas foram dispostas em onze divisões, hoje denominadas filos, segundo critérios químicos, citológicos e morfológicos, de acordo com os tipos e as combinações de pigmentos fotossintetizantes presentes, a natureza química das substâncias de reserva e das paredes celulares, a ausência ou a presença de flagelos, o padrão e o curso da mitose e da citocinese, a presença ou a ausência de membrana no retículo endoplasmático e o tipo e a complexidade de ciclo de vida (LEE, 1999; GRAHAM; WILCOX, 2000).

3.2.2. Importância ecológica

As algas, aliadas a um pequeno grupo de angiospermas marinhas, constituem os produtores primários que sustentam a vida nos mares e oceanos e, portanto, desempenham um papel ecológico fundamental na manutenção destes ecossistemas. Estima-se que o fitoplâncton marinho seja responsável por 40 a 50 % da produção primária global. Por outro lado, as algas calcárias são elementos importantes na formação e manutenção dos recifes de coral, ecossistemas com biodiversidade comparável à das florestas tropicais (OLIVEIRA, 2006) É possível ainda que as algas calcárias tenham um importante papel no ciclo global do carbono, tendo sua abundância e diversidade provável influência sobre o clima do planeta (OLIVEIRA, 1996).

3.2.3. Importância econômica

Cerca de 4 milhões de toneladas de algas são colhidas, anualmente, em todo o mundo, sendo os principais produtores os chineses e japoneses, seguidos pelos norte-americanos e noruegueses. As algas permitem obter produtos de baixo custo e em quantidades inesgotáveis e delas têm sido obtidos produtos imprescindíveis para a vida do homem moderno, com valores que ultrapassam alguns bilhões de dólares anuais (ARMISEN, 1995).

a) Emprego na alimentação

No oriente há registro da utilização de algas marinhas como alimento há mais de 10 mil anos. Na cozinha japonesa, as algas são comumente utilizadas no preparo de sushi, como tempero, condimento ou ainda como saladas constituindo entre 10% e 25% da comida ingerida pela maioria dos japoneses (YUAN; WALSH, 2006).



Figura 3: *Porphyra* sp. (1) base do nori (2), utilizado para o preparo do sushi (3).
FONTE: www.ucmp.berkeley.edu/protista/reds/porphyra.gif e www.yatego.com

Apesar de seus carboidratos não serem digeridos pelo homem, as algas representam excelentes fontes de vitaminas C (equivalente aos frutos cítricos), A, D, B1, B12 e E, e ainda fornecem aminoácidos livres, carotenóides e diversos elementos traços requeridos para a nutrição humana (SOUTH; WHITTICK, 1987; GRAHAM; WILCOX, 2000). Na Tabela 3 são apresentadas algumas das principais algas marinhas comestíveis.

Tabela 3: Principais algas marinhas comestíveis

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>Gracularia</i>
<i>Ulva</i>	<i>Eisenia</i>	<i>Gelidium</i>
	<i>Ecklonia</i>	<i>Euchema</i>

FONTE: HORTA, 2000

Diversas espécies de algas vermelhas, assim como de verdes e pardas são também utilizadas na alimentação do gado, ovelhas, cavalos, porcos e aves domésticas, em áreas onde são abundantes. Em regiões mais distantes da costa, as algas são secas e acrescidas como suplemento à dieta regular dos rebanhos. A comercialização de rações a base de algas movimenta atualmente mais de 15 milhões de dólares por ano (HORTA, 2000).

b) Emprego como Fertilizantes

O valor das algas como fertilizantes é demonstrado principalmente em fazendas próximas ao mar, onde 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 ácidos como corretivo de pH, uma vez que possuem teores de carbonatos superiores a 90%. Em países como Inglaterra, Escócia, Irlanda e Dinamarca, a comercialização de fertilizantes a base de algas movimenta 15 milhões de dólares por ano.

No Brasil, o uso de algas como fertilizantes é esporádico e artesanal. No país existem extensos depósitos de algas calcárias entre o Espírito Santo e a região de Búzios, RJ. Sua exploração, entretanto, deve ser acompanhada de estudos planejados para

verificar os efeitos em outros recursos biológicos de importância econômica (HORTA, 2000; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

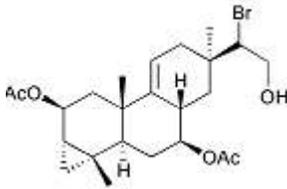
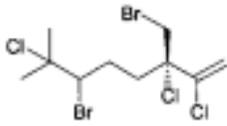
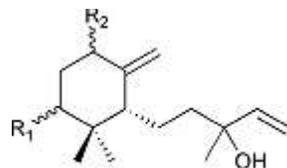
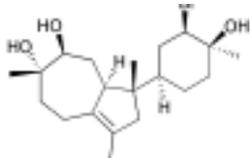
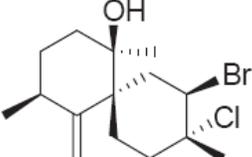
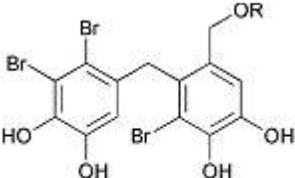
c) Emprego medicinal

Preparações a base de algas são utilizadas há séculos por populações devido às propriedades medicinais. Algumas algas, como *Chondria armata* e *Chondria crassicaulis*, comuns em mares asiáticos, são utilizadas como vermífugo. Preparações a base dessas algas, nas quais foram identificadas grandes quantidades de ácido domóico, são indicadas para crianças infectadas com vermes intestinais. Outras espécies como *Porphyra* sp. são utilizadas no combate ao escorbuto (TSENG, 2001). Atualmente, muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de isolamento de compostos que tenham ação farmacológica.

Em várias revisões realizadas por Faulkner (1996; 1997; 1998; 1999; 2000; 2001; 2002) e por Blunt e colaboradores (2003; 2004; 2005; 2006) foram compilados dados de artigos sobre produtos naturais marinhos de 1994 até 2004. Em relação às algas marinhas bentônicas houve um crescimento na descoberta de substâncias inicialmente encontradas em organismos evolutivamente mais recentes, 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.

As algas vermelhas são as macroalgas com maior número de substâncias isoladas. O gênero mais estudado é *Laurencia*, pertencente à família Rhodomelaceae, sendo que, atualmente, as pesquisas se concentram na síntese de seus metabólitos e em estudos pré-clínicos e clínicos. Na tabela 4 podem ser visualizados alguns metabólitos isolados de algas vermelhas nos últimos anos e atividade biológicas já constatadas.

Tabela 4: Principais metabólitos bioativos obtidos de algas vermelhas

Alga	Metabólito	Estrutura	Atividade biológica
<i>Jania rubens</i>	Peisonenina		Anti-helmíntica
<i>Portieria hornemannii</i>	Halomona		Antineoplásica, com citotoxicidade célula-específica
<i>Laurencia microcladia</i>	Sniderol		Antiparasitária (<i>Plasmodium falciparum</i>)
<i>Laurencia obtusa</i>	Prevenzol D		Citotoxicidade
<i>Laurencia pannosa</i>	Panosano		Antibacteriana
<i>Laurencia pannosa</i>	Panosanol		Antibacteriana
<i>Rhodomela confervoides</i>	Bromofenol		Antibacteriana

FONTE: BLUNT, 2005; 2006; MAYER; HAMANN, 2004; 2005.

d) Outros empregos

Ficocolóides: Entre outras utilizações industriais, destaca-se a produção de ficocolóides, substâncias mucilaginosas (polissacarídeos coloidais) extraídas da parede celular de algas marinhas, utilizadas em soluções aquosas, formadoras de géis. São classificados em alginatos, carragenanos e ágar, que, conforme suas propriedades físicas têm um emprego determinado.

Os alginatos são polímeros dos ácidos L-glucurônico e D-manurônico, sendo os ficocolóides característicos das algas pardas. São utilizados como agentes gelificantes, estabilizantes e emulsificantes. São de grande importância para a indústria de sorvetes, pois impedem a formação de cristais macroscópicos de gelo em soluções aquosas submetidas a baixas temperaturas. São também utilizados no tingimento de tecidos, nas fábricas de tintas e em cervejarias, onde auxiliam a formação de espuma nas cervejas.

Os carragenanos são polímeros de D-galactose que se caracterizam por apresentar grupos sulfatados em sua estrutura, estando presentes na parede celular de algas vermelhas como as dos gêneros *Hypnea* e *Euchema*. Esses ficocolóides têm numerosas aplicações nas indústrias farmacêuticas, cosmética e de tintas. Sua maior aplicação, no entanto, está na indústria alimentícia, onde, devido as suas propriedades gelificantes e estabilizantes e por não serem energéticos, não apresentarem cheiro, cor e sabor são utilizados na fabricação de queijos, cremes e gelatinas (DE RUITER; RUDOLPH, 1997; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004)

O termo ágar contempla uma família de polissacarídeos presentes em algas vermelhas que apresentam estruturas D- e L-galactose. A maioria dos ágares possui um baixo teor de sulfato, o que lhes confere uma alta força gel. Além de possuir as mesmas aplicações dos carragenanos, o ágar é muito utilizado na preparação de meios de cultura, sendo matéria prima básica para a biologia molecular. Os principais gêneros produtores desse polissacarídeo são *Gelidium*, *Gracilaria* e *Pterocladia* (HORTA, 2000; TSENG, 2001)

Ficobiliproteínas: As ficobiliproteínas ou ficobilinas são proteínas que contêm pigmentos fluorescentes. Esses pigmentos são encontrados principalmente em algas vermelhas, sendo que o 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).

3.2.4. O filo Rhodophyta

O filo Rhodophyta provavelmente representa um dos mais antigos grupos de algas eucarióticas, possui apenas uma única classe, a Rhodophyceae, que se divide em duas sub-classes: Bangiophyceae e Florideophyceae. Englobam cerca de 5500 espécies, distribuídas em aproximadamente 600 gêneros, destes, 20 compreendem representantes de água doce e 10 contêm organismos unicelulares. Os demais gêneros contêm unicamente organismos pluricelulares de ambiente marinho (LEE, 1999; VAN DEN HOEK; MANN; JAHS, 1995).

As algas vivem presas a rochas, substratos calcários, paredes oceânicas ou ainda sobre conchas de moluscos ou sobre outras algas (RAVEN; EVERT, EICHHORN, 2001; VAN DEN HOEK; MANN; JAHS, 1995). São mais abundantemente encontradas em regiões quentes próximas ao equador, porém podem ser encontradas também em regiões de águas frias. Poucas espécies de algas vermelhas são encontradas em regiões polares e sub-polares, onde as algas pardas e verdes são mais abundantes (VAN DEN HOEK; MANN; JAHS, 1995; LEE, 1999). Apesar de apresentarem com frequência coloração avermelhada, devido à presença do pigmento fotossintético acessório ficoeritrina no interior dos cloroplastos, também podem apresentar coloração violeta, marrom, preta ou azul, variações atribuídas a presença dos pigmentos ficocianina e aloficocianina (VAN DEN HOEK; MANN; JAHS, 1995; SOTH; WHITTICK, 1987).

As algas vermelhas têm importante papel econômico em alguns países, destacando-se Japão, China e Filipinas, onde muitas espécies são coletadas diretamente de fontes naturais ou de áreas de cultivo para uso na alimentação, humana ou animal, na indústria, além da extração de ficobiliproteínas e compostos com propriedade medicinais (RAVEN; EVERT, EICHHORN, 2001; VAN DEN HOEK; MANN; JAHS, 1995; GRAHAM; WILCOX, 2000, YUAN; WALSH, 2006).

3.2.5. *Acanthophora spicifera*

Acanthophora spicifera (Figura 4) é uma alga vermelha pertencente à classe Rhodophyceae, ordem Ceramiales, família Rhodomelaceae. As algas dessa divisão são eucariotas, com clorofila a e d e ficobilinas (b, r e c-ficoeritina, aloficocianina e c e r-ficocianina), além de xantofilas e amido, denominado “amido das florídeas”, como substância de reserva. A ocorrência é ampla nos mares tropicais e subtropicais, sendo frequentemente a alga com maior biomassa encontrada em mares quentes (KILAR e MCLACHLAN, 1986).

A. spicifera é uma das espécies de algas vermelhas mais abundantes em regiões recifais. A macroalga é facilmente encontrada em regiões de mar calmo, raso (geralmente de 1 a 8 m, mas também pode ser encontrada em profundidades de até 22 m em mares translúcidos) e em bancos rochosos. Geralmente é encontrada fixa a substratos duros, como rochas, bordas basálticas, ou ainda flutuando, devido a sua constituição frágil (JOIKEL e MORRISSEY, 1986).

A espécie é utilizada no preparo de saladas em países asiáticos como as Filipinas além de ser uma importante fonte de alimento para tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) nos mares do Haváii (ALGAEBASE, 2006)



Figura 4: *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen. FONTE: www.algaebase.org

As investigações de atividades biológicas de *A. spicifera* são escassas. Naqvi e colaboradores (1980) descrevem uma importante atividade antifertilidade do extrato metanólico da alga, ocorrendo 100% de inibição da implantação do ovo quando 200 mg/Kg de extrato foi administrado por via oral em ratas fêmeas. A dose letal (LD₅₀) do extrato foi de 1.000 mg/Kg, cinco vezes maior que a dose efetiva. Testes posteriores localizaram a atividade nas frações éter de petróleo e clorofórmio, obtidas pela partição do extrato metanólico de *A. spicifera*. Os mesmos autores descrevem também a atividade antiviral do extrato metanólico da alga contra o vírus SFV (*Semliki Forest Vírus*).

Burkholder, Burkholder e Almodovar (1960), reportam a atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Mycobacterium smegmatis*.

Duarte e colaboradores (2004) relatam uma importante atividade antiviral contra os vírus HSV-1 e HSV-2 para frações e polissacarídeos obtidos a partir do extrato aquoso de *A. spicifera*.

Com relação a identificação de metabólitos secundários de *A. spicifera*, são descritas algumas classes de substâncias:

Wang e colaboradores (1998) reportaram o isolamento do flavonóide tilirosídeo (canferol 3-O-(6''-O-p-cumaroil)- β -D-glicopiranosídeo) a partir do extrato etanólico de

A. spicifera, sendo esta classe de substâncias pela primeira vez relatada para a alga (Figura 5)

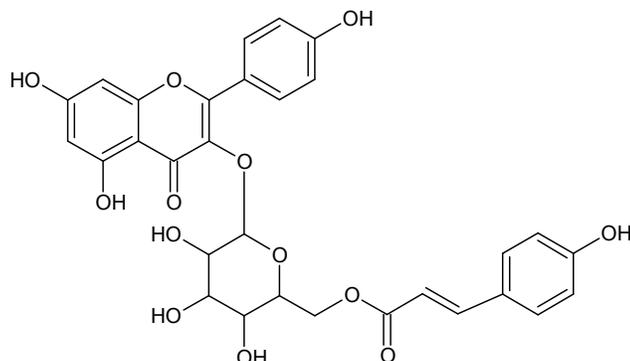


Figura 5: Estrutura do tilirosídeo.

Zeng e colaboradores (2001), além do flavonóide tilirosídeo, descreveram a presença dos flavonóides quercetina e catequina e dos glicosídeos acanthophorina A (canferol 3-O- α -L-fucopiranosídeo) e acanthophorina B (quercetina 3-O- α -L-fucopiranosídeo) no extrato etanólico de *A. spicifera* (Figuras 6 e 7).

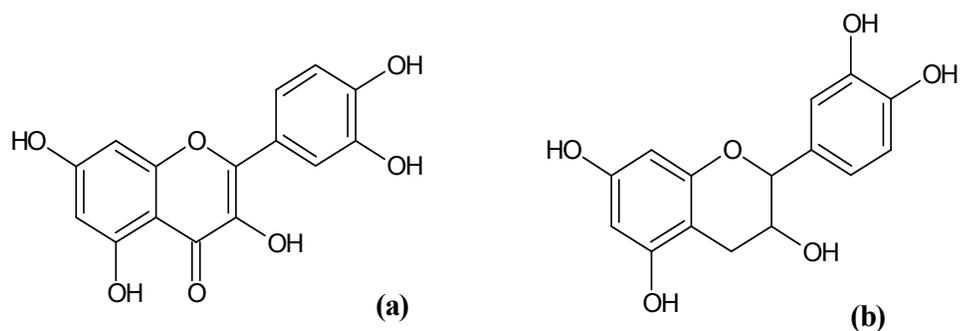


Figura 6: Estrutura da quercetina (a) e catequina (b).

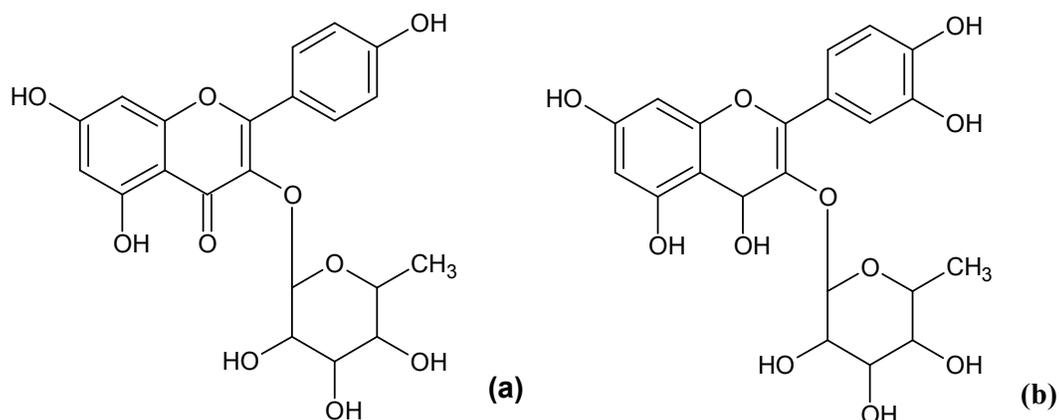


Figura 7: Estrutura da acanthophorina A (a) e acanthophorina B (b).

Wahidulla, D'Souza e Kamat (1986) relatam o isolamento de colesterol, de ácidos graxos como o ácido esteárico e o ácido palmítico e do éster graxo palmitato de metila. Em 1991, esses mesmos autores descrevem a presença do dipeptídeo acetato de aurantiamina no extrato etanólico de *A. spicifera*.

Wahidulla, D'Souza e Patel, (1987) relatam a presença do cetoesteróide 5α -colestano-3,6-diona (Figura 8a) para *A. spicifera*, sendo esta a primeira ocorrência natural deste esteróide. Dois anos depois, Prakash e colaboradores (1989) relatam a ocorrência do cetoesteróide 11α -hidroxi- 5α -colestano-3,6-diona (Figura 8b)

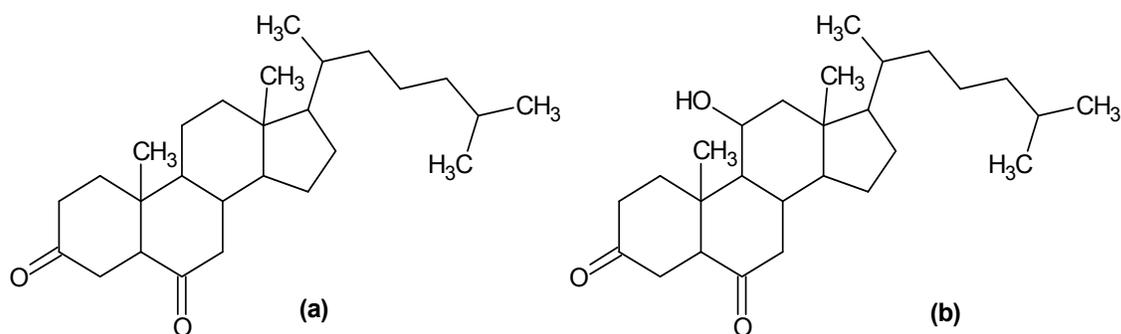


Figura 8: Estrutura da 5α -colestano-3,6-diona e da 11α -hidroxi- 5α -colestano-3,6-diona.

Wahidulla, D'Souza e Govenker (1998) descrevem mais dois esteróides para o extrato etanólico de *A. spicifera*, o colest-4-en-3 α ,6 α -diol (Figura 9a) e o cetosteróide colest-4-en-3-ona (Figura 9b).

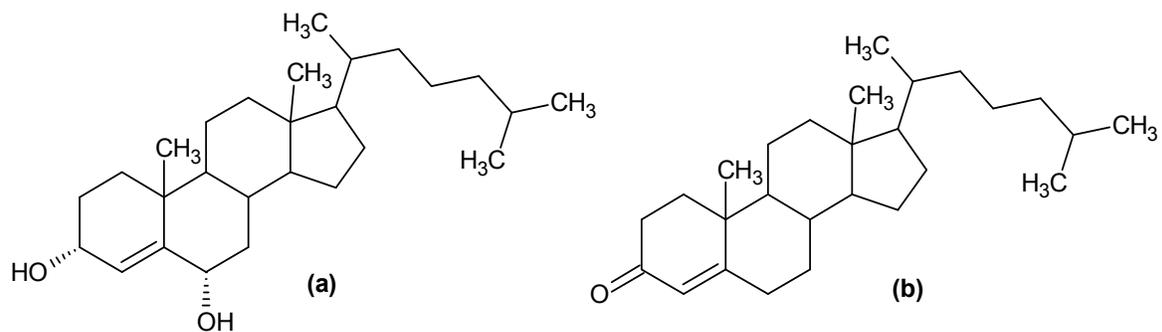


Figura 9: Estrutura do colest-4-en-3 α ,6 α -diol e da colest-4-en-3-ona.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. PROCEDIMENTOS GERAIS

Os solventes e reagentes utilizados para análise química foram de grau analítico de procedência Nuclear®, Merck® Vetec® e Reagen®. A água utilizada nos experimentos foi destilada no laboratório. O etanol empregado nas macerações foi o comercial.

Os extratos e frações obtidas foram concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida em temperatura inferior a 60 °C.

As cromatografias líquidas em coluna foram realizadas em gel de sílica 60 de procedência Merck®, com tamanhos de partículas 0,04–0,063 mm. As cromatografias em camada delgada foram realizadas em cromatofolhas de alumínio F₂₅₄ de procedência Merck® e 27 Macherey-Nagel®.

A detecção dos compostos foi realizada mediante observação sob lâmpada de luz ultravioleta com comprimentos de onda de 254 e 365 nm e visualização após reação com agente cromogênico anisaldeído-sulfúrico e/ou orcinol-sulfúrico.

Para elucidação estrutural das substâncias isoladas, foram obtidos espectros de ultravioleta (UV), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H), ressonância magnética nuclear de carbono (RMN de ¹³C) e espectrometria de massas, nos seguintes equipamentos:

- Varian Cary 50 Bio: Espectros de UV;
- Shimadzu IRPrestige-21: Espectros de IV;
- Bruker Avance 2: Espectros de RMN de ¹H (500 MHz) e RMN de ¹³C (125 MHz);
- Shimadzu QP-5000: Espectros de massas.

Os espectros de RMN e de massas foram obtidos pelo Prof. Dr. Jorge A. Palermo, do Departamento de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Exatas e Naturais da Universidade de Buenos Aires, Argentina.

4.2. MATERIAL VEGETAL

A macroalga utilizada no estudo químico e na avaliação das atividades biológicas foi coletada em janeiro de 2006 na Lagoa da Conceição, no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. O material vegetal foi identificado pela Profa. Dra. Zenilda Laurita Bouzon do Departamento de Botânica CCB/UFSC.

Tanto os extratos para avaliação das atividades biológicas, como para a investigação química foram obtidos a partir da alga fresca.

4.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Os três extratos - etanólico, hidroetanólico e aquoso - foram utilizados para a avaliação de atividades biológicas. Para a investigação química foi utilizado somente o extrato etanólico.

4.3.1. Preparação do extrato etanólico

Aproximadamente 4 kg de *A. spicifera* foram lavados com água destilada e rasurados manualmente. O extrato foi obtido a partir da alga fresca, por maceração em etanol comercial, durante 7 dias, na proporção 10 g (alga)/ 100 mL (líquido extrator). O extrato etanólico foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura inferior a 60 °C. O rendimento do extrato foi avaliado com base na quantidade de macroalga macerada.

4.3.2. Preparação do extrato hidroetanólico

O extrato hidroetanólico foi obtido por maceração da alga fresca, durante 7 dias, em mistura hidroetanólica 40:60 (água/álcool), na proporção de 10 g (alga)/ 100 mL (líquido extrator). O extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura inferior a 60 °C.

4.3.3. Preparação do extrato aquoso

O extrato aquoso foi preparado por infusão da alga fresca, na proporção 10 g (alga)/ 100 mL (líquido extrator), sendo que a alga foi deixada em contato com água quente durante 10 minutos e o extrato obtido foi, então, filtrado e liofilizado.

4.4. FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

O extrato etanólico de *A. spicifera* foi submetido a partição com acetato de etila, obtendo-se assim uma fração denominada orgânica e uma fração denominada aquosa ou polar, conforme mostra a figura 10. A fração aquosa foi liofilizada, ressuspensa em metanol e o resíduo insolúvel dissolvido em etanol:água (70:30).

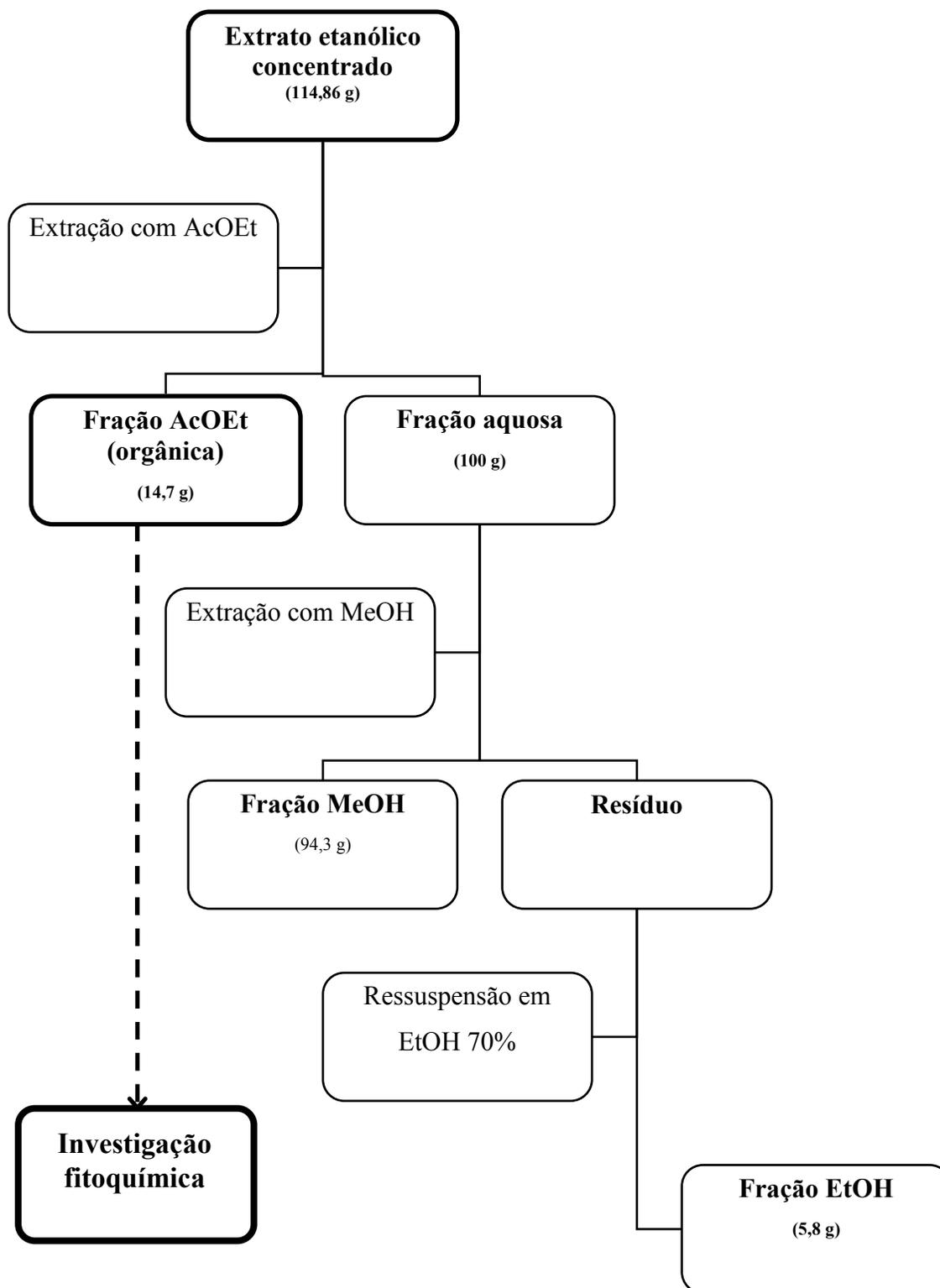


Figura 10: Representação esquemática do fracionamento do extrato etanólico de *A. spicifera*.

4.4. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DAS FRAÇÕES

As frações acetato de etila, aquosa, metanólica e etanólica obtidas através da partição do extrato etanólico de *A. spicifera* foram analisadas através de cromatografia em camada delgada. A fração acetato de etila foi analisada com sistemas de eluentes de ordem crescente de polaridade e a revelação foi realizada com o agente cromogênico anisaldeído-sulfúrico, após aquecimento. Para as frações polares foi empregada a fase móvel clorofórmio: etanol: água (8:5:1, V/V/V) e a revelação foi realizada com os agentes cromogênicos anisaldeído-sulfúrico e orcinol-sulfúrico, após aquecimento.

4.5. ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO

4.5.1. Fracionamento do extrato orgânico

Parte da fração acetato de etila (8 g) foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica. A coluna foi eluída com o sistema n-hexano:acetato de etila (95:5, V/V), com aumento gradual da polaridade, obtendo-se um total de 120 frações que foram agrupadas em função de sua semelhança cromatográfica em 14 frações, codificadas de CAF1 a CAF14, em ordem crescente de polaridade.

4.5.1. Isolamento das substâncias S1A, S2A e S3A e S6A

A fração CAF12 (2 g) foi submetida a uma nova separação por coluna cromatográfica (coluna B), onde foi utilizado o sistema n-hexano: acetato de etila (9:1, V/V) para eluição.

Foram coletadas 166 frações, reunidas pela semelhança cromatográfica em 12 frações, denominadas de CBF1 a CBF12.

A fração CBF6 (140 mg) foi submetida a cromatografia em coluna em gel de sílica (coluna C) utilizando como eluente diclorometano:n-hexano (80:20, V/V). A partir desta fração foram isoladas duas substâncias designadas S1A (23 mg) e S6A (18 mg).

A fração CBF11 (90 mg) foi submetida a purificação em coluna cromatográfica com gel de sílica (coluna D), eluída com o sistema de solventes clorofórmio:acetato de etila (80:20, V/V). A partir dessa fração foi obtida a substância S2A (20 mg).

A fração CBF12 (40 mg) foi submetida a purificação através de coluna cromatográfica em gel de sílica (coluna E), utilizando como eluente diclorometano:acetato de etila (80:20, V/V). A partir dessa fração foi isolada a substância S3A (2 mg).

A representação esquemática do fracionamento do extrato orgânico e do isolamento das substâncias S1A, S2A, S3A e S6A são apresentadas na Figura 11.

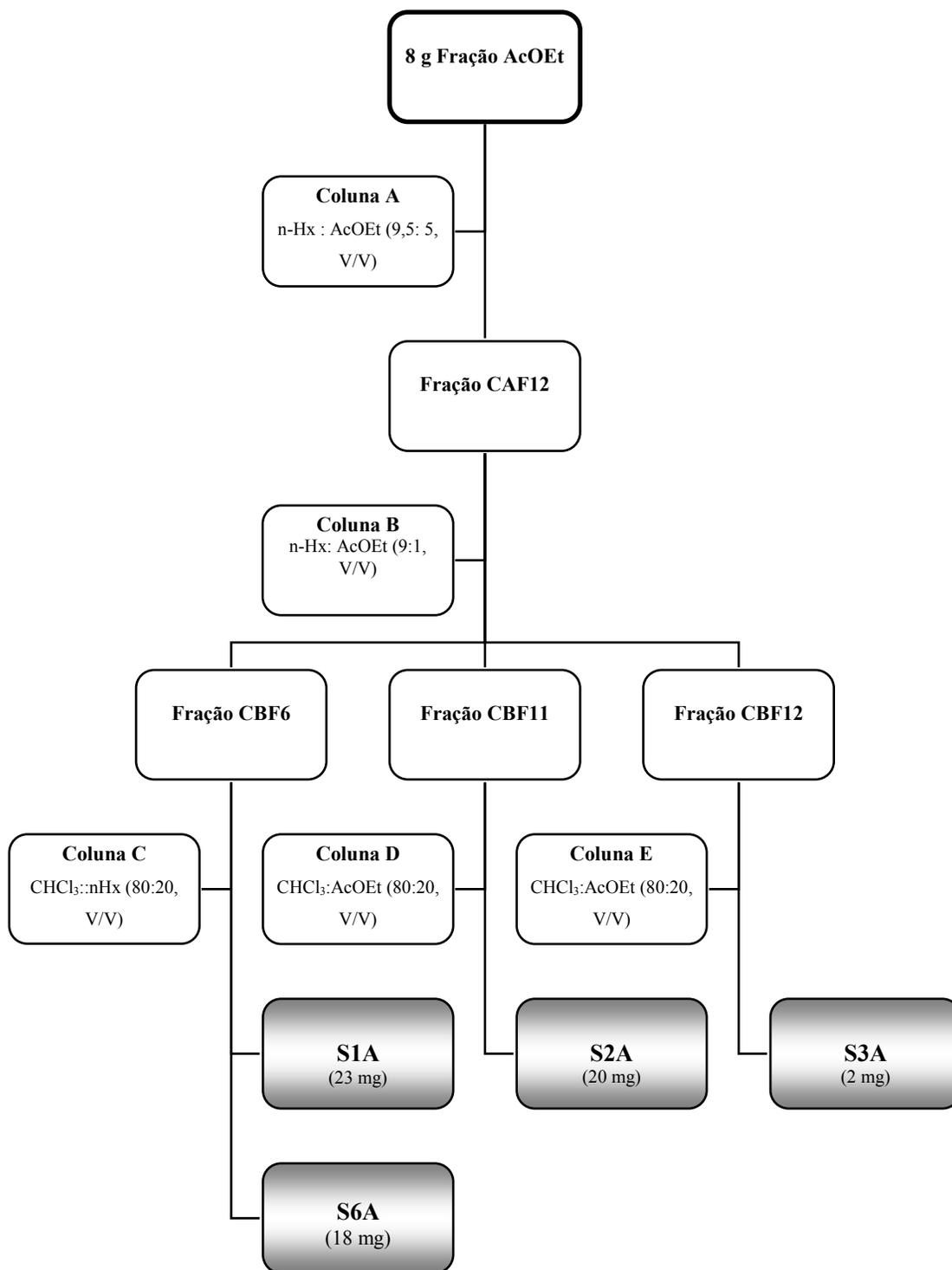


Figura 11: Representação esquemática do isolamento das substâncias S1A, S2A, S3A e S6A de *A. spicifera*.

4.5.2. Isolamento da substância S5A

A fração CAF10 (111,6 mg) foi submetida a separação por coluna cromatográfica em gel de sílica (coluna F) utilizando como eluente diclorometano. A partir dessa coluna foi obtida a substância pura S5A (15 mg). A representação esquemática do isolamento da substância S5A é mostrada na figura 12.

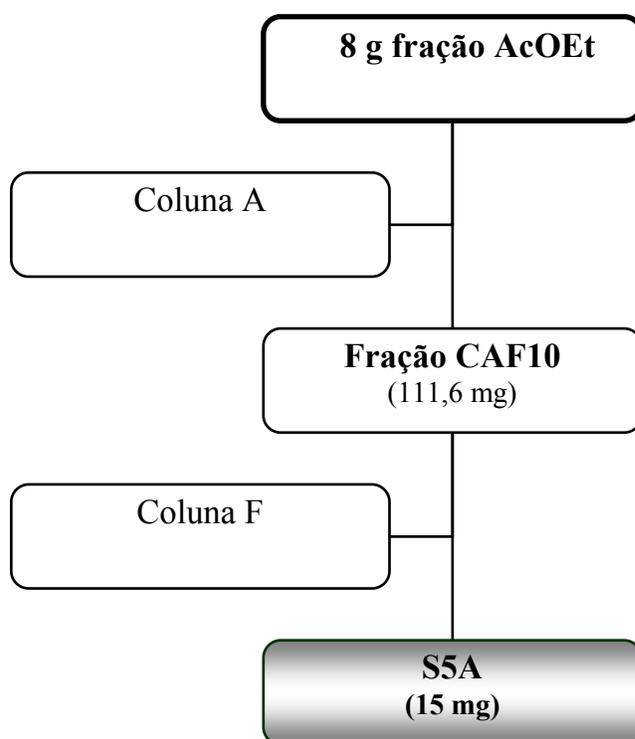


Figura 12: Representação esquemática do isolamento da substância S5A de *A. spicifera*.

4.5.3. Análise das substâncias isoladas

As substâncias S1A e S2A foram analisadas por meio de espectros de IV, UV, massas (MS) e RMN de ^1H e ^{13}C , bem como por espectros de correlação e DEPT 135°.

A substância S5A foi analisada por meio de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , e por espectros de correlação. A substância S6A foi analisada através de seu ponto de fusão e comparação com amostra autêntica. A substância S3A ainda não foi completamente identificada.

Substância S1A

Massa molar: $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_2$

Aspecto físico: pó branco

Ponto de fusão: 115-118 °C.

UV: 250 nm

IV: $\nu_{\text{máx}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1}): 2945, 2927, 2866, 1685, 1678, 1650, 1381

MS (m/z (%): 398 (36,6), 370, 285 (18,3), 243, 137, 109, 95, 79, 55, 43(100)

RMN- ^1H : δ 0,72 (s) (3H, H-18), 0,86 (d, 6,6) (3H, H-27), 0,87 (d, 6,6) (3H, H-26), 0,94(d, 6,6) (3H, H-21), 1,13 (2H, H-24), 1,13 e 1,33 (2H, H-23), 1,15 (1H, H-14), 1,16 (s) (3H, H-19), 1,17 (1H, H-17), 1,26 e 2,13 (2H, H-12), 1,31 (1H, H-25), 1,34 (2H, H-22), 1,37 (1H, H-9), 1,39 (1H, H-20), 1,51 e 1,62 (2H, H-11), 1,52 e 1,88 (2H, H-16), 1,61 (2H, H-15), 1,89 (1H, H-8), 1,91 e 2,15 (2H, H-1), 2,03 e 2,66 (2H, H-7), 2,46 e 2,52 (2H, H-2), 6,17 (1H, H-4)

RMN- ^{13}C : δ 11,9 (CH_3 , C-18), 17,5 (CH_3 , C-19), 18,6 (CH_3 , C-21), 20,8 (CH_2 , C-11), 22,5 (CH_3 , C-26), 22,8 (CH_3 , C-27), 23,8 (CH_2 , C-23), 27,9 (CH_2 , C-16), 28,0 (CH , C-25), 33,9 (CH_2 , C-2), 34,2 (CH , C-8), 35,5 (CH_2 , C-1) 35,6 (CH , C-20), 36,0 (CH_2 , C-22), 39,1 (CH_2 , C-12) 39,4 (CH_2 , C-24), 39,8 (Cq, C-10), 42,5 (Cq, C-13), 46,8 (CH_2 , C-7), 50,9 (CH , C-9), 55,9 (CH , C-14), 56,5 (CH , C-17), 125,4 (CH , C-4), 161,0 (Cq, C-5), 199,5 (Cq, C-3), 202,3 (Cq, C-6).

Substância S2A

Massa molar: C₂₇H₄₄O

Aspecto físico: pó branco

Ponto de fusão: 176 - 182 °C.

UV: 250 nm

IV: $\nu^{\text{KBr}}_{\text{máx}}$ (cm⁻¹): 3479, 3458, 2953, 2929, 2868, 1683, 1676, 1465.

MS (m/z (%): 400 (100), 385 (17,3), 287 (10,5), 227 (15,4), 152 (38,3), 109 (12,3), 95 (16,7), 79 (17,9), 55 (34,6), 43(86,4).

RMN-¹H: δ 0,74 (s) (3H, H-18), 0,86 (d, 6,6) (3H, H-27), 0,87 (d, 6,6) (3H, H-26), 0,91 (1H, H-9), 0,92 (d, 6,6) (3H, H-21), 1,02 (1H, H-14), 1,12 (1H, H-17), 1,14 (2H, H-24), 1,15 e 1,34 (2H, H-23), 1,15 e 2,05 (2H, H-12), 1,00 e 1,34 (2H, H-22), 1,38 (s) (1H, H-19), 1,38 (1H, H-20), 1,51 (2H, H-11), 1,52 (1H, H-25), 1,85 (2H, H-16), 1,60 (2H, H-15), 1,26 (1H, H-8), 1,72 e 2,04 (2H, H-1), 1,25 e 2,01 (2H, H-7), 2,38 e 2,51 (2H, H-2), 4,35 (1H, H-6), 6,81 (1H, H-4)

RMN-¹³C: δ 11,9 (CH₃, C-18), 18,6 (CH₃, C-21), 19,5 (CH₃, C-19), 20,9 (CH₂, C-11), 22,5 (CH₃, C-26), 22,8 (CH₃, C-27), 23,8 (CH₂, C-23), 27,9 (CH, C-25), 28,1 (CH₂, C-16), 29,7 (CH, C-8), 34,2 (CH₂, C-2), 35,7 (CH, C-20), 36,1 (CH₂, C-22), 37,1 (CH₂, C-1), 37,9 (Cq, C-10) 38,5 (CH₂, C-7), 39,5 (CH₂, C-24), 39,6 (CH₂, C-12), 42,5 (Cq, C-13), 53,6 (CH, C-9), 55,9 (CH, C-14), 56,1 (CH, C-17), 73,3 (1H, C-6), 126,3 (CH, C-4), 168,4 (Cq, C-5), 200,5 (Cq, C-3).

Substância S5A

Massa molar: C₂₀H₄₀O

Aspecto físico: pó branco

RMN-¹H: δ 0,85 (3H, H-18), 0,85 (3H, H-19), 0,87 (3H, H-17), 0,87 (3H, H-16), 1,06 (2H, H-8), 1,08 (2H, H-12), 1,14 (2H, H-14), 1,18 (2H, H-13), 1,26 (2H, H-10), 1,26 (2H, H-6), 1,28 (2H, H-9), 1,36 (1H, H-7), 1,37 (1H, H-11), 1,38 (2H, H-5), 1,52 (1H, H-15), 1,67 (3H, H-20), 1,99 (2H, H-4), 4,15 (2H, H-1), 5,41 (1H, H-2).

RMN-¹³C: δ 16,16 (CH₃, C-20), 19,69 (CH₃, C-18), 19,73 (CH₃, C-19), 22,61 (CH₃, C-17), 22,70 (CH₃, C-16), 24,45 (CH₂, C-13), 24,78 (CH₂, C-9), 25,11 (CH₂, C-5), 27,97 (CH, C-15), 32,68 (CH, C-7), 32,78 (CH, C-11), 36,65 (CH₂, C-12), 39,27 (CH₂, C-8), 37,35 (CH₂, C-10), 37,41 (CH₂, C-6), 39,35 (CH₂, C-14), 39,86 (CH₂, C-4), 59,42 (CH₂, C-1), 123,07 (CH, C-2), 140,31 (C_q, C-3).

4.6. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A avaliação das atividades antiviral e antiparasitária de extratos e frações de *A. spicifera* foi realizada por colaboradores, através de metodologias rotineiras nos respectivos laboratórios. Esses resultados são apresentados e discutidos no item 6 (Considerações finais).

A avaliação da atividade antimicrobiana constituiu parte efetiva desta dissertação de mestrado e foi realizada no laboratório de Farmacognosia, na Universidade de Passo Fundo, sob orientação do Prof. Dr. Flávio H. Reginatto.

4.6.1. Avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada com os extratos aquoso e hidroetanólico e com as frações orgânica, aquosa e metanólica do fracionamento do extrato etanólico de *A. spicifera*, segundo o método de difusão em disco. Os microorganismos utilizados nos testes foram *Escherichia coli* ATCC (*American Type Collection Culture*) 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* ATCC 10541.

Técnica: Discos de papel filtro (6 mm de diâmetro) impregnados com os extratos a serem testados foram depositados sobre placas com meio Mueller-Hinton (Merck[®], Darmstadt, Germany), previamente inoculadas com os organismos-teste de acordo com o protocolo padrão descrito pelo Comitê Nacional de Padronização de Laboratórios Clínicos (2004). Os discos de papel filtro foram impregnados com 25 µL de solução teste a fim de se obter uma concentração final de 50 mg/µL de extrato no disco. As placas foram incubadas a 35 °C (\pm 1 °C) e depois de 18 h os diâmetros das zonas de inibição foram medidos. Discos de papel filtro contendo água destilada foram utilizados como controle negativo. Discos de antibióticos foram selecionados de acordo com a sensibilidade da bactéria e utilizados como controle positivo (Tabela 5).

Tabela 5: Antibióticos de 1ª escolha para avaliação da atividade antibacteriana

Bactéria	Antibióticos	Halo padrão (mm)
<i>E. coli</i>	Cloranfenicol	21 – 27
<i>Pseudomonas sp.</i>	Ceftazidima	22 – 29
	Cefepima	24 – 30
<i>S. aureus</i>	Ampicilina	27 – 35
	Amicacina	20 – 26
<i>Enterococcus sp.</i>	Ampicilina	27 – 35
	Amicacina	20 – 26

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE *Acanthophora spicifera*

Para o estudo químico foi utilizada a fração orgânica do extrato etanólico de *A. spicifera*. A fração foi submetida a sucessivos procedimentos cromatográficos que resultaram no isolamento de 5 substâncias (Figura 13), codificadas como S1A (23 mg), S2A (20 mg), S3A (2 mg), S5A (15 mg) e S6A (18 mg). A elucidação estrutural desses compostos é descrita a partir do item 5.1.3. e os espectros são apresentados no item 9 (Anexos).

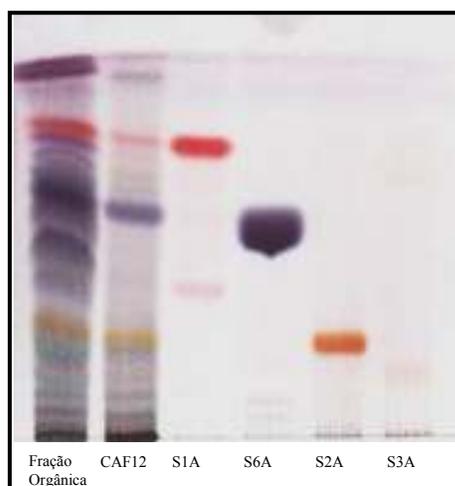


Figura 13: Substâncias isoladas de *A. spicifera*.
Eluente: éter de petróleo: acetato de etila (80:20, V/V).
Adsorvente: gel de sílica F₂₅₄
Detecção: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento.

5.1.1. Rendimento dos extratos

O rendimento da extração de *A. spicifera* com etanol, por maceração é apresentado na Tabela 6:

Tabela 6: Rendimento do extrato etanólico de *A. spicifera*.

Quantidade de alga	Extrato etanólico	Rendimento * (%)
4 Kg	114,9 g	3,8

* Rendimento em relação a 4 Kg de alga fresca macerada

O extrato etanólico seco foi ressuspenso em água e extraído com acetato de etila em funil de decantação. A fração acetato de etila foi concentrada em evaporador rotatório em temperatura inferior a 60°C, sob pressão reduzida, apresentando um rendimento de 14,7 g. O resíduo aquoso foi liofilizado, obtendo-se um rendimento de 100,4 g. Esse extrato foi solubilizado em metanol, restando ainda uma parte insolúvel que foi dissolvida em etanol: água (7:3). Os resultados dos rendimentos são apresentados de forma sucinta na Tabela 7.

Tabela 7: Rendimento das frações da partição do extrato etanólico de *A. spicifera*.

Fração	Quantidade (g)	Rendimento * (%)
Fração AcOEt	14,7 g	12,8
Fração MeOH	94,3 g	82,1
Fração EtOH	5,8 g	5,1

* Valor calculado em relação a 114,9 g de extrato etanólico

5.1.2. Análise cromatográfica das frações

As frações aquosa, metanólica e etanólica foram analisadas cromatograficamente utilizando-se o sistema de eluentes clorofórmio: etanol: água (8:5:1) e os agentes cromogênicos anisaldeído-sulfúrico e orcinol-sulfúrico como reveladores (Figura 14).

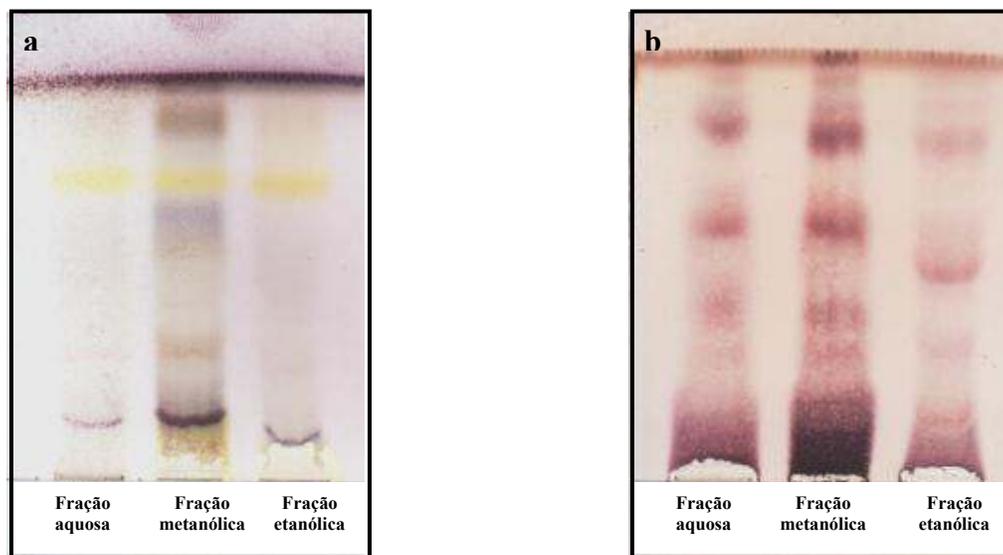


Figura 14: Comparação cromatográfica da fração aquosa, metanólica e etanólica de *A. spicifera*

Eluente: clorofórmio: etanol: água (8:5:1, V/V/V)

Adsorvente: gel de sílica F₂₅₄

Deteção: (a) anisaldeído-sulfúrico e aquecimento; (b) orcinol-sulfúrico e aquecimento.

Em ambos cromatogramas pode-se observar a semelhança entre os três extratos, principalmente no que diz respeito às manchas mais intensas. A reação com orcinol-sulfúrico (2), agente cromogênico específico para açúcares, mostrou diversas manchas de interesse, provavelmente devido a glicolipídeos, substâncias comuns em frações polares de algas marinhas (BERGÉ e BARNATHAN, 2005).

Na Figura 15 pode-se observar os cromatogramas referentes à fração orgânica de *A. spicifera*, analisados com sistemas de eluentes com diferentes polaridades.

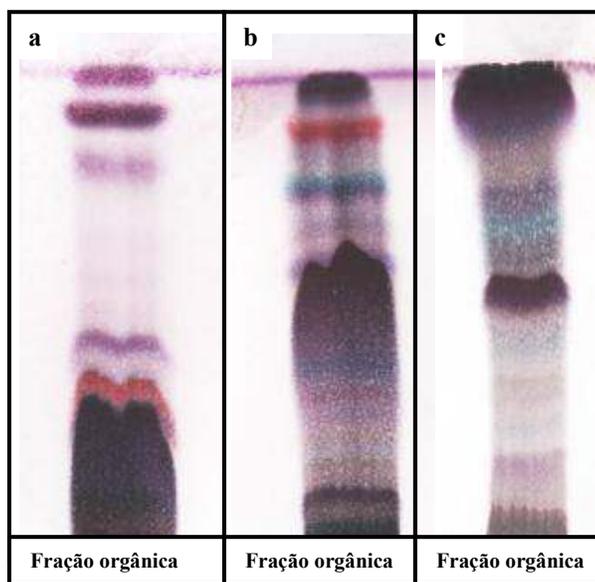


Figura 15: CCD da fração orgânica de *A. spicifera*.

Eluentes: (a) clorofórmio

(b) clorofórmio: metanol (95: 5, V/V)

(c) clorofórmio: metanol (90: 10, V/V)

Adsorvente: gel de sílica F₂₅₄

Deteção: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento

Através dos cromatogramas (Figura 15), observa-se em comparação às demais frações, um maior número de metabólitos na fração orgânica, sendo ela, por esse motivo, a escolhida para a investigação química.

5.1.3. Análise estrutural da substância S1A

Foram obtidos 23 mg da substância S1A na forma de um pó branco, apresentando valor de R_f 0,32 no sistema diclorometano: n-hexano (80:20, v/v), ausência de fluorescência em 366 nm e presença de extinção de fluorescência sob luz ultravioleta em 254 nm. Após revelação com anisaldeído-sulfúrico, a mancha apresentou coloração vermelha (Figura 16).

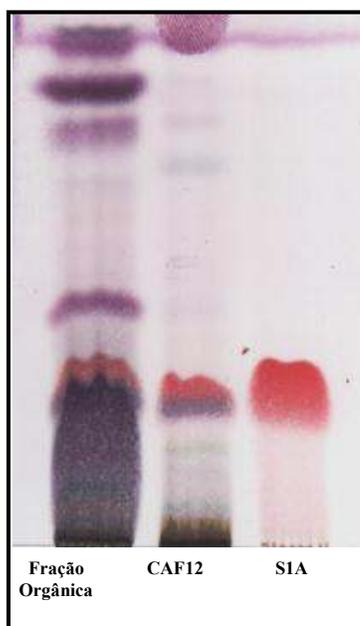


Figura 16: Comparação entre as frações orgânica, CAF12 e a substância S1A.
Eluente: diclorometano: n-hexano (80:20, v/v)
Adsorvente: gel de sílica F₂₅₄
Detecção: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento

O espectro de IV da substância S1A apresenta, na região de maior número de ondas, uma banda de absorção de forte intensidade, característica de um estiramento C-H (2945 cm^{-1}). Em 1685 cm^{-1} ocorre outra banda de absorção de intensidade forte, com inflexão em 1678 cm^{-1} , sugerindo a presença de carbonilas α,β -insaturadas. Cetonas alifáticas normalmente apresentam faixa de absorção no IV na região de 1715 cm^{-1} . A conjugação com uma ligação C=C aumenta a deslocalização de elétrons π de ambos os grupos insaturados. No grupamento C=O, a deslocalização dos elétrons π reduz o caráter de ligação dupla e leva à absorção em menor número de ondas. A presença de carbonilas α,β -insaturadas é reforçada por uma banda na região de 1650 cm^{-1} , quase sobreposta pela banda carbonílica, que sinaliza a presença de uma dupla ligação na molécula. Pode-se observar ainda a presença de uma banda de média intensidade em 1381 cm^{-1} , sugerindo a presença de grupamento metila na estrutura de S1A. Adicionalmente, pode-se deduzir a

ausência de anéis aromáticos na estrutura, devido à ausência de estiramentos C-H aromáticos na região de $\sim 3030\text{ cm}^{-1}$ (SMITH, 1999; CREWS; RODRÍGUEZ; JASPARS, 1998). Dessa forma, considerando a ausência de aromaticidade na estrutura, a análise cromatográfica e a coloração desenvolvida pela substância após a revelação com o agente cromogênico anisaldeído-sulfúrico sugerem a possibilidade de se tratar de um terpenóide.

Para diferenciação entre núcleos terpênicos e esteroidais foi realizada com S1A a reação de Liebermann-Burchard, em que o desenvolvimento de coloração azul sugeriu tratar-se de um esteróide.

Através dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ^1H), de carbono 13 (RMN- ^{13}C), de DEPT 135, HSQC, $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY e HMBC foi possível caracterizar os átomos de carbono e hidrogênio que compõem a estrutura da substância S1A. O espectro RMN- ^1H indicou a presença de cinco grupamentos metila: dois singletos em δ_{H} 0,72 e δ_{H} 1,16 e dubletos em δ_{H} 0,92, δ_{H} 0,86 e δ_{H} 0,87. Esse conjunto de dados, segundo Migliuolo, Piccialli e Sica (1990), sugere um esqueleto do tipo colestano para a estrutura (Figura 17). O espectro mostra ainda um sinal referente à presença de uma ligação dupla em δ_{H} 6,17.

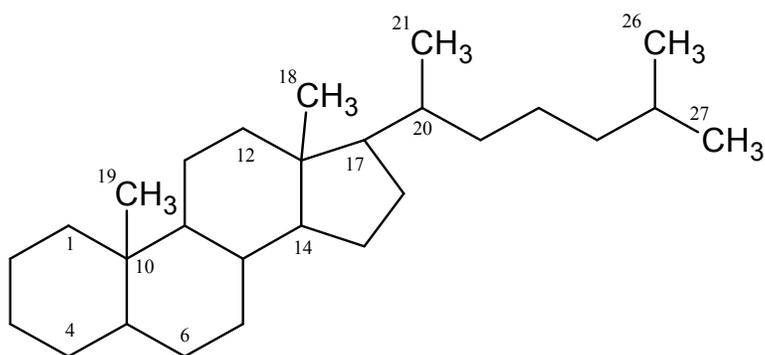


Figura 17: Núcleo esteroidal do tipo colestano.

No espectro de RMN-¹³C podem ser observados 27 átomos de carbono, confirmando a presença de uma estrutura esteroidal. Destes 27 carbonos, pelos valores de deslocamento químico, dois foram identificados como carbonilas e outros dois como carbonos oleofínicos, sendo os demais atribuídos a átomos de carbono com hibridização sp³. A caracterização de cada carbono da molécula foi auxiliada pela análise do espectro de DEPT 135.

O espectro DEPT 135 sinaliza a presença de metilas (-CH₃), grupos metinos (-CH<) e metilenos (>CH₂). No espectro, os sinais correspondentes aos metilenos (>CH₂) aparecem em região de blindagem e voltados para cima. Os sinais correspondentes às metilas (-CH₃) aparecem em região de blindagem e voltados para baixo. Os sinais de carbonos terciários (-CH<) também aparecem voltados para cima, porém em região de desblindagem. Sinais referentes a carbonos quaternários (Cq) não aparecem, sendo identificados por comparação com o espectro RMN-¹³C. Analisando o espectro de DEPT e comparando com o espectro de RMN-¹³C pode-se caracterizar os 27 átomos de carbono da estrutura de S1A como:

Carbono	CH₃	CH₂	CH	Cq
Σ = 27	5	10	7	5

A partir da espectrometria de massas do composto S1A, foi possível verificar o pico molecular m/z 398 [M]⁺, com 36,6% de intensidade, e o pico base m/z 43. Observa-se também o pico m/z 285, com 18,3% de intensidade, correspondente a M-113, que indica a eliminação de C₈H₁₇, cadeia lateral comum em esteróides com esqueleto colestano (ZARETSKII et al., 1967; DJERASSI, 1978).

Através dos espectros de correlação foram observadas as conectividades entre carbonos e seus respectivos hidrogênios (HSQC), entre hidrogênios vizinhos (¹H¹H-COSY) e entre hidrogênios e carbonos vizinhos a longa distância (HMBC), conforme a Figura 18.

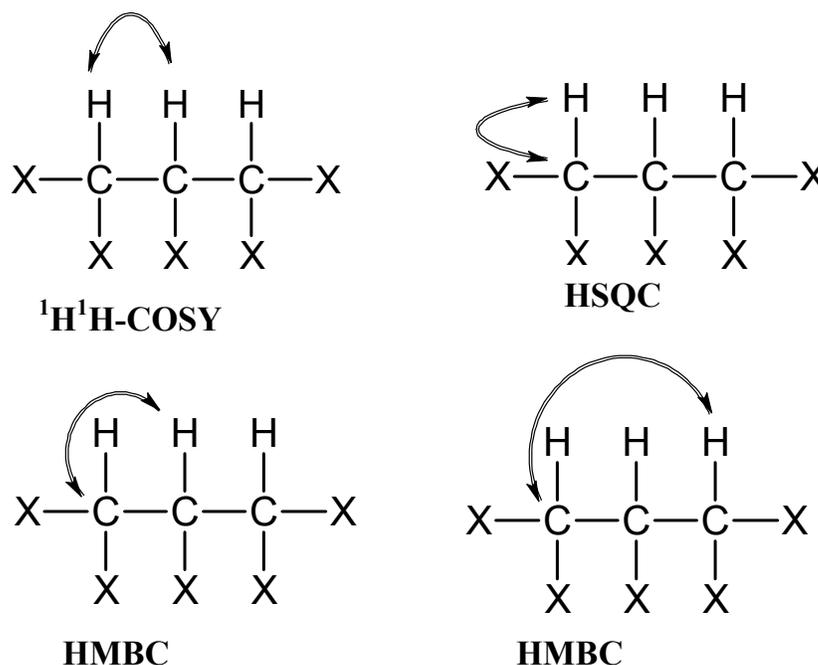
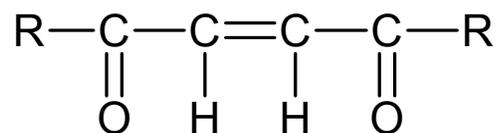


Figura 18: Possibilidades de acoplamentos observados nos espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C de correlação de ¹H¹H-COSY, HSQC e HMBC.

A partir dos espectros de correlação HSQC, foi possível identificar os hidrogênios ligados aos carbonos da molécula do esteróide, o número de átomos de hidrogênio ligados a cada átomo de carbono e caracterizar os sinais referentes a cada hidrogênio, verificando possíveis sobreposições de sinais no espectro de RMN-¹H. Dessa forma, as ressonâncias em δ_H 0,72 (s), δ_H 1,16 (s), δ_H 0,92 (d), δ_H 0,86 (d) e δ_H 0,87 (d), referentes as cinco metilas da estrutura S1A, podem ser relacionadas aos carbonos δ_C 11,9, δ_C 17,5, δ_C 18,6, δ_C 22,5 e δ_C 22,8, respectivamente.

Além da existência de 27 carbonos, o espectro RMN-¹³C mostra a presença de uma dupla ligação (δ_C 161,0 e δ_C 125,4) e indica a presença de duas carbonilas conjugadas (δ_C 202,3 e δ_C 199,5). Esses dados, juntamente com os de IV, que indicam a presença de carbonila α,β -insaturada na estrutura, remetem ao seguinte sistema:



Tal sistema pode ser confirmado através do espectro de ultravioleta (Figura 19), em que segundo Migliuolo, Piccialli e Sica (1990), a presença de uma eno-diona, pode ser caracterizada pela absorção máxima em 250 nm.

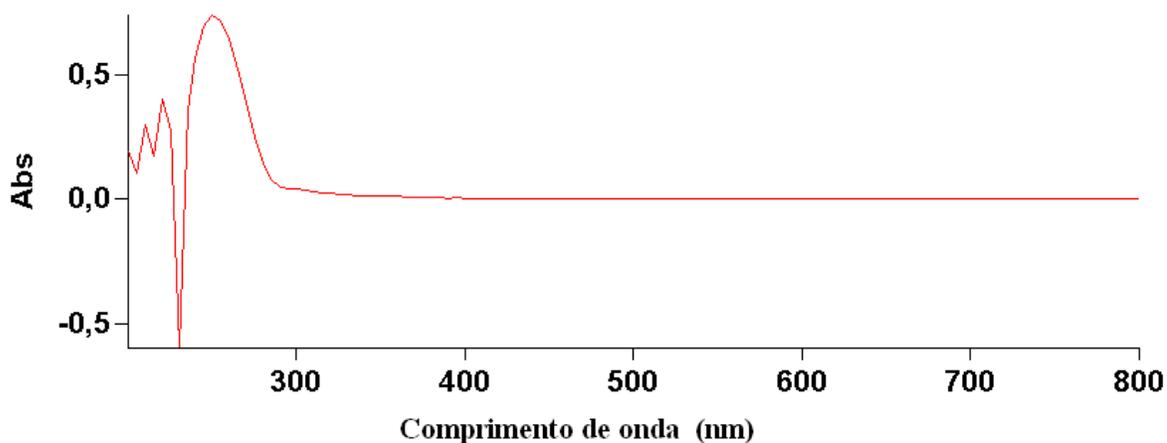


Figura 19: Espectro de absorção UV da substância S1A, em CHCl_3 .

Segundo Aiello e colaboradores (1991), um sistema eno-diona usualmente apresenta-se de duas maneiras na estrutura de um núcleo esteroidal, como representado na Figura 20:

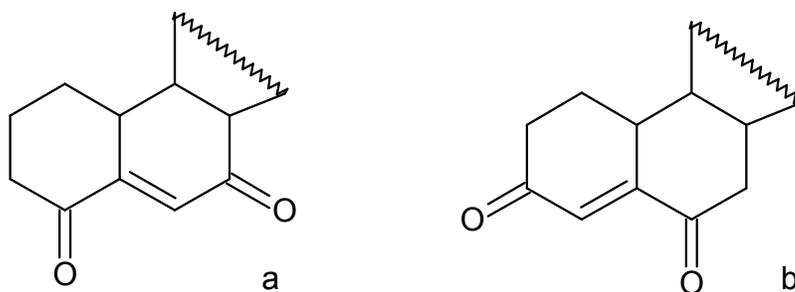


Figura 20: Sistemas eno-diona em núcleos esteroidais.

Os espectros de correlação $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY e HMBC forneceram informações importantes sobre a conectividade entre hidrogênios vizinhos e entre hidrogênios e carbonos vizinhos a longa distância, permitindo a definição da estrutura (b) para o sistema eno-diona na molécula de S1A. Através dos espectros de HMBC foi possível estabelecer todas as correlações dos hidrogênios dos cinco grupos $-\text{CH}_3$ da estrutura de S1A com seus respectivos carbonos vizinhos (Tabela 8).

Nessa estrutura, a metila em δ_{H} 1,16 pode ser atribuída ao C-19 tendo em vista a correlação à longa distância com o Cq portador da ligação dupla em δ_{C} 161,0 (C – 5), e a correlação com os carbonos δ_{C} 35,5 (C – 1), δ_{C} 50,9 (C – 9) e δ_{C} 39,8 (C – 10).

Tabela 8: Correlações dos grupamentos metila observadas no espectro de HMBC em CDCl_3 da substância S1A

δ_{H} (metila)	δ_{C}
0,72 (s) (C-18)	39,1 / 42,5 e 56,5
0,86 (d, 6,6) (C-25)	28,0 e 39,4
0,87 (d, 6,6) (C-26)	28,0 e 39,4
0,94 (d, 6,6) (C- 21)	35,6 e 56,5
1,16 (s) (C- 19)	161,0 / 35,5 / 50,9 e 39,8

No espectro $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY, os hidrogênios com sinais δ_{H} 1,91 e δ_{H} 2,15, associados ao C – 1, apresentam correlação com os hidrogênios em δ_{H} 2,46 e δ_{H} 2,52, conectados ao carbono δ_{C} 33,9 (C – 2). Nesse mesmo espectro, o hidrogênio δ_{H} 2,52, atribuído ao C – 2, apresenta correlação com o hidrogênio oleofínico δ_{H} 6,17. A presença da estrutura (b) é confirmada pela correlação do hidrogênio δ_{H} 1,89 (C – 8) no espectro $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY com os hidrogênios δ_{H} 2,03 e δ_{H} 2,66, associados ao carbono δ_{C} 46,8 (C – 7). Esses hidrogênios ressonam como duplo-dubletos, indicando a presença de apenas um hidrogênio vizinho (H – 8). O espectro HMBC mostra correlação do hidrogênio δ_{H} 2,66 com os carbonos δ_{C} 202,3 (C – 6), δ_{C} 161,0 (C – 5), δ_{C} 50,9 (C – 9) e δ_{C} 34,2 (C – 8).

Esses dados, juntamente com as correlações no espectro HMBC do hidrogênio oleofínico δ_{H} 6,17 com os carbonos δ_{C} 33,9 (C – 2), δ_{C} 161,0 (C – 5), δ_{C} 202,3 (C – 6) e δ_{C} 39,8 (C – 10), remetem à estrutura parcial (Figura 21) para a molécula da substância S1A:

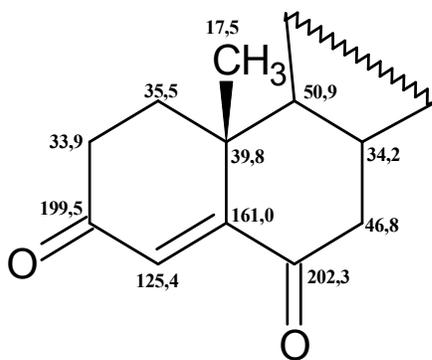


Figura 21: Estrutura parcial de S1A: atribuições dos deslocamentos químicos de ^{13}C para os carbonos dos anéis A e B.

Para atribuição dos sinais correspondentes aos carbonos dos anéis C e D foi importante a identificação do sinal da metila C – 18, observada no espectro RMN- ^1H

como singleto em δ_H 0,72. Essa metila apresenta correlação, no espectro HMBC, com os carbonos δ_C 39,1 (C – 12), δ_C 42,5 (C – 13) e δ_C 56,5 (C – 17).

No espectro $^1H^1H$ -COSY, os sinais em δ_H 1,26 e δ_H 2,13, conectados ao carbono δ_C 39,1 (C – 12), aparecem correlacionados com os hidrogênios δ_H 1,51 e δ_H 1,62, associados ao carbono δ_C 20,84 (C – 11). Neste mesmo espectro, o hidrogênio δ_H 1,89, ligado ao carbono δ_C 34,2 (C – 8), aparece correlacionado ao hidrogênio δ_H 1,15, associado ao carbono δ_C 55,9 (C – 14). Ainda, pode-se observar a correlação entre os hidrogênios δ_H 1,15 (C-14) e δ_H 1,61 (C – 15) e entre os hidrogênios δ_H 1,61 (C – 15) e δ_H 1,52 (C – 16), permitindo a atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos dos anéis C e D da molécula do esteróide S1A (Figura 22).

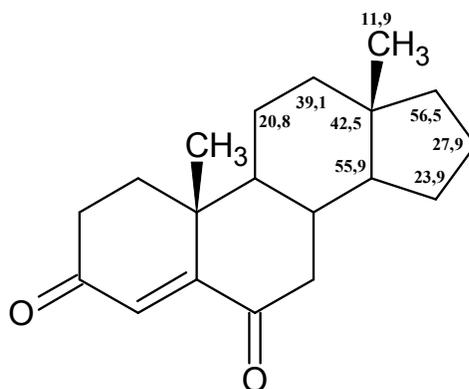


Figura 22: Estrutura parcial de S1A: atribuições dos deslocamentos químicos de ^{13}C para os anéis C e D.

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos da cadeia lateral do esteróide S1A foram determinados, principalmente, por comparação com dados da literatura. Apesar das sobreposições, alguns sinais importantes puderam ser visualizados, como os hidrogênios δ_H 0,94, associados à metila C-21, que ressonam como dubleto no espectro de RMN- 1H , sugerindo a ligação a um carbono terciário. Esse mesmo sinal (δ_H 0,94) no espectro HMBC apresenta correlação com os carbonos δ_C 35,64 (C – 20) e δ_C

56,52 (C – 17). Da mesma forma que o hidrogênio do C – 21, os hidrogênios δ_H 0,86 (C – 26) e δ_H 0,87 (C – 27), aparecem no espectro de RMN- 1H como dubletos, já que estão ligados a um carbono terciário. Ambas metilas aparecem no espectro HMBC correlacionadas aos carbonos δ_C 28,00 (C – 25) e δ_C 39,42 (C – 24), confirmando os dados apresentados na comparação com a literatura da tabela 9.

A comparação do conjunto de dados espectroscópicos com dados da literatura permitiu concluir que o esteróide S1A trata-se da colest-4-en-3,6-diona (Figura 23), previamente descrita para as esponjas marinhas *Geodia cydonium* (MIGLIUOLO; PICCIALLI; SICA, 1990) e *Cinachyra tarentina* (AIELLO et al., 1991), nunca tendo sido descrita para algas marinhas.

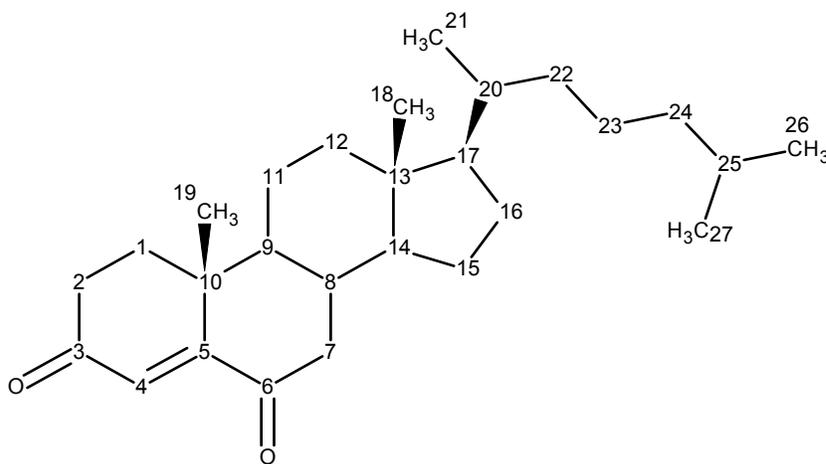


Figura 23: Estrutura proposta para a substância S1A, colest-4-en-3,6-diona.

Tabela 9: Valores de deslocamentos químicos em ppm observados no espectro de RMN ^{13}C em CDCl_3 (125 MHz) do esteróide S1A, comparado com dados da literatura.

C	CH _n	δ_{C}	δ_{C}
	DEPT	S1A	colest-4-en-3,6-diona ¹
1	CH ₂	35,5	35,5
2	CH ₂	33,9	33,8
3	Cq	199,5	199,1
4	CH	125,4	125,2
5	Cq	161,0	160,8
6	Cq	202,3	201,9
7	CH ₂	46,8	46,6
8	CH	34,2	34,0
9	CH	50,9	50,8
10	Cq	39,8	39,0
11	CH ₂	20,8	20,7
12	CH ₂	39,1	39,3
13	Cq	42,5	42,3
14	CH	55,9	55,8
15	CH ₂	23,9	23,6
16	CH ₂	27,9	27,8
17	CH	56,5	56,4
18	CH ₃	11,9	11,7
19	CH ₃	17,5	17,3
20	CH	35,6	35,3
21	CH ₃	18,6	18,5
22	CH ₂	36,0	35,9
23	CH ₂	23,8	23,8
24	CH ₂	39,4	39,6
25	CH ₂	28,0	27,8
26	CH ₃	22,5	22,4
27	CH ₃	22,8	22,7

¹ MIGLIUOLO; PICCIALI; SICA, 1990, em CDCl_3 , 101,1 MHz

5.1.4. Análise estrutural da substância S2A

Foram obtidos 20 mg da substância S2A, na forma de um pó branco, apresentando valor de Rf 0,43 no sistema diclorometano: acetato de etila (80:20, V/V), ausência de fluorescência sob luz ultravioleta em 366 nm e presença de extinção de fluorescência sob luz ultravioleta em 254 nm. Após revelação com anisaldeído-sulfúrico, a mancha apresentou coloração amarela (Figura 24).

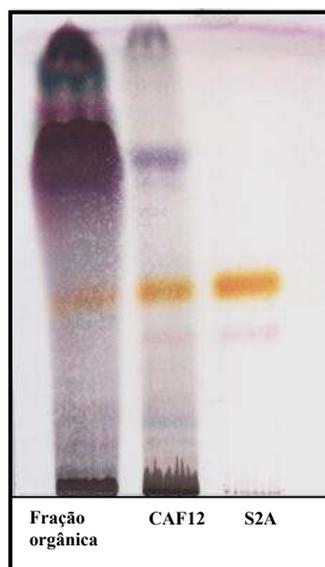


Figura 24: Comparação entre as frações orgânica, CAF12 e a substância S2A.

Eluente: diclorometano: acetato de etila (80:20, V/V)

Adsorvente: gel de sílica F₂₅₄

Deteção: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento

De acordo como o espectro de IV da substância S2A pode-se constatar a presença de uma banda de absorção de média intensidade entre 3600 e 3200 cm⁻¹, sugerindo a presença de hidroxila na molécula. Pode-se também observar uma banda de absorção de forte intensidade na região de estiramentos C-H (2980 cm⁻¹), sugerindo a presença de

unicamente carbonos com hibridização sp^3 na estrutura. Ainda, uma banda de absorção de intensidade forte, em 1690 cm^{-1} , sugere a presença de uma carbonila α,β -insaturada na estrutura de S2A.

Os dados de IV, juntamente com a análise cromatográfica e a coloração desenvolvida pela substância após a revelação com o agente cromogênico anisaldeído-sulfúrico, remetem à possibilidade de se tratar de um terpenóide ou de um esteróide.

Da mesma forma que para S1A, foi realizada a reação de Liebermann-Burchard para diferenciação entre núcleos terpênicos e esteroidais. A reação desenvolveu coloração azul, sugerindo que S2A também se trate de um esteróide.

Através dos espectros de RMN- ^1H e ^{13}C , $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY, HMQC e HMBC foi possível caracterizar todos os átomos de carbono e hidrogênio que compõem a estrutura da substância S2A e atribuir os deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos.

O espectro de RMN- ^{13}C da substância S2A evidencia a presença de 27 átomos de carbono, confirmando a presença de uma estrutura esteroidal, semelhante a S1A. Destes 27 carbonos, pelos valores de deslocamento químico, um foi identificado como carbonila, um como carbono ligado a grupamento hidroxila e outros dois como carbonos oleofínicos, sendo os demais atribuídos a átomos de carbono com hibridização sp^3 .

O espectro RMN- ^1H indicou a presença de cinco grupamentos metila: dois singletos em $\delta_{\text{H}} 0,74$ e $\delta_{\text{H}} 1,38$ e dubletos em $\delta_{\text{H}} 0,92$, $\delta_{\text{H}} 0,86$ e $\delta_{\text{H}} 0,87$. Os dados são semelhantes aos da substância S1A, sugerindo um esqueleto do tipo colestano também para S2A. O espectro mostra ainda um tripleto AB em $\delta_{\text{H}} 4,35$, referente a um hidrogênio geminal a um grupamento hidroxila e um singlete referente a um hidrogênio oleofínico em $\delta_{\text{H}} 5,81$.

A partir da espectrometria de massas do composto S2A, foi possível verificar o pico molecular $m/z 400\text{ [M]}^+$, que corresponde também ao pico base do espectro. Observa-se também a presença do pico $m/z 287$, com 4,3% de intensidade, que, da mesma forma que para S2A, indica a eliminação da cadeia lateral C_8H_{17} da molécula.

A comparação dos dados de RMN-¹³C de S1A e S2A (Tabela 10) permitiu observar a semelhança entre as duas substâncias, sendo que as diferenças foram detectadas nos deslocamentos químicos atribuídos aos hidrogênios e carbonos dos anéis A e B (posições 1 a 10), uma vez que os deslocamentos dos carbonos 11 a 27 são idênticos, exceto pela metila em δ_C 19,5 atribuída ao C-19, que em S1A está em campo mais alto (δ_C 17,5, C - 19).

A atribuição do singlete em δ_H 1,38 à metila C – 19 (δ_C 19,5) foi estabelecida devido às correlações no espectro HMBC com o carbono quaternário δ_C 168,4, portador da ligação dupla, e com os carbonos δ_C 37,9, δ_C 53,6 e δ_C 20,9.

Tabela 10: Comparação dos valores dos deslocamentos químicos, em ppm, observados nos espectros de RMN-¹H (multiplicidade, *J* em Hz) e RMN-¹³C em CDCl₃, para os esteróides S1A e S2A.

C	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
	S1A	S1A	S2A	S2A
1	35,5	2,15 - 1,91	37,1	2,04 - 1,72
2	33,9	2,52 - 2,46	34,2	2,51 - 2,38
3	199,5	-	200,5	-
4	125,4	6,17	126,3	5,81
5	161,0	-	168,4	-
6	202,3	-	73,3	4,35
7	46,8	2,66 - 2,03	38,5	2,01 - 1,25
8	34,2	1,89	29,7	1,94
9	50,9	1,37	53,6	0,91
10	39,8	-	37,9	-
11	20,8	1,62 - 1,51	20,9	1,51
12	39,1	2,13 - 1,26	39,6	2,05 - 1,15
13	42,5	-	42,5	-
14	55,9	1,15	55,9	1,02
15	23,9	1,61	24,1	1,63
16	27,9	1,88 - 1,52	28,1	1,85
17	56,5	1,17	56,1	1,12
18	11,9	0,72 (s)	11,9	0,74 (s)
19	17,5	1,16 (s)	19,5	1,38 (s)
20	35,6	1,39	35,7	1,38
21	18,6	0,94 (d, 6,6)	18,6	0,92 (d, 6,6)
22	36,0	1,34	36,1	1,34 - 1,00
23	23,8	1,33 - 1,13	23,8	1,34 - 1,15
24	39,4	1,13	39,5	1,14
25	28,0	1,31	27,9	1,52
26	22,5	0,87 (d, 6,6)	22,5	0,87 (d, 6,6)
27	22,8	0,86 (d, 6,6)	22,8	0,86 (d, 6,6)

O hidrogênio olefínico aparece no espectro HMBC correlacionado aos carbonos δ_C 34,2, δ_C 73,3 e δ_C 37,9. Através do espectro HSQC, pode-se observar que o sinal δ_C 34,2 está conectado aos prótons δ_H 2,38 e δ_H 2,51, e que estes hidrogênios possuem

correlação $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY com os hidrogênios δ_{H} 1,72 e δ_{H} 2,04 e correlação a longa distância como a carbonila, permitindo a determinação do anel A de S2A (Figura 25).

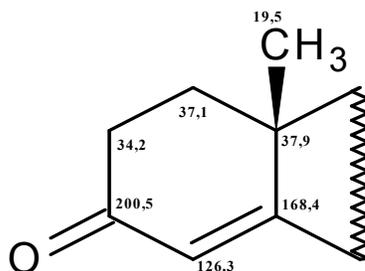


Figura 25: Estrutura parcial da molécula S2A, atribuições dos deslocamentos químicos de RMN- ^{13}C para o anel A.

O hidrogênio δ_{H} 4,35, geminal ao grupamento hidroxila, aparece correlacionado no espectro $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY com os hidrogênios δ_{H} 1,25 e δ_{H} 2,01, justificando o duplo dubleto observado no espectro de RMN- ^1H . Esse mesmo sinal em δ_{H} 4,35 tem correlação no espectro HMBC com o carbono δ_{C} 29,7, associado ao hidrogênio δ_{H} 1,94 que aparece correlacionado no espectro $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY ao hidrogênio δ_{H} 1,25, confirmando a vizinhança. O carbono hidroxilado aparece no espectro de RMN- ^{13}C deslocado para campo mais baixo, evidenciando a proximidade da ligação dupla.

Através das constantes de acoplamento observadas no espectro RMN- ^1H pode-se definir a estereoquímica da hidroxila na molécula de S2A. Como a constante de acoplamento observada no espectro é pequena (3 Hz), o hidrogênio ligado ao carbono hidroxilado está em posição α ou equatorial, ficando, assim, a hidroxila em posição β (HORNBACK, 2005).

Os dados de RMN, juntamente com os de IV, que indicam a presença de uma carbonila α,β -insaturada na estrutura de S2A, levam à estrutura parcial apresentada na Figura 26.

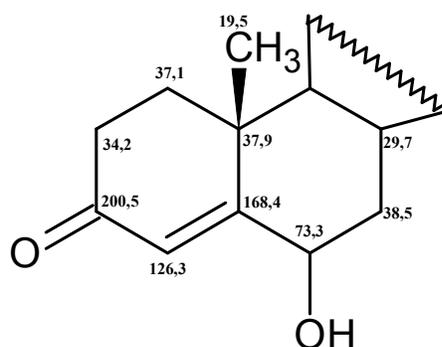


Figura 26: Estrutura parcial de S2A: atribuições dos deslocamentos químicos de ^{13}C para os anéis A e B.

Através da comparação com os dados de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C do esteróide S1A (Tabela 10) e com dados da literatura, foi possível definir a estrutura do esteróide S2A como 6 β -hidroxi-colest-4-en-3-ona (Figura 27), previamente isolado da alga marinha *Hypnea musciformis* (BULTEL-PONCÉ; ETAHIRI; GUYOT, 2002), mas descrito equivocadamente como 6 α -hidroxi-colest-4-en-3-ona.

De qualquer forma, trata-se de uma substância inédita para o gênero *Acanthophora* e para a ordem Ceramiales.

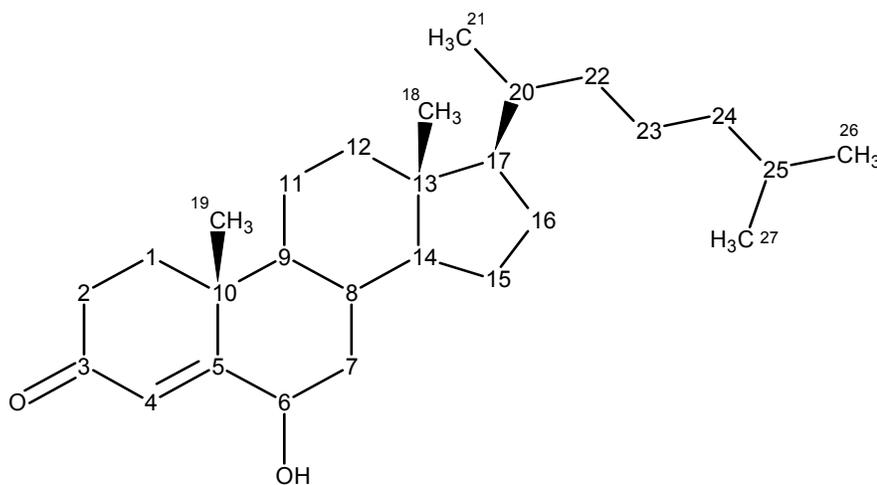


Figura 27: Estrutura proposta para a substância S2A, 6 β -hidroxi-colest-4-en-3-ona.

5.1.5. Análise estrutural da substância S5A

Foram obtidos 15 mg da substância S5A na forma de um pó branco, apresentando valor de Rf 0,40 no eluente diclorometano, ausência de fluorescência em 366 nm e ausência de extinção de fluorescência sob luz ultravioleta em 254 nm. Após revelação com anisaldeído-sulfúrico, a mancha apresentou coloração rosa (Figura 28).



Figura 28: Comparação entre a substância S5A e o padrão β -sitosterol.

Eluente: CH_2Cl_2

Adsorvente: gel de sílica F_{254}

Deteção: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento

Através dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ^1H), de carbono 13 (RMN- ^{13}C) e de DEPT 135 foi possível caracterizar os átomos de carbono e hidrogênio que compõem a estrutura da substância S5A.

A análise do espectro RMN- ^1H mostrou um tripleto em δ_{H} 5,41, deslocamento químico característico de um hidrogênio olefínico, que, devido a multiplicidade,

demonstra estar acoplado a um metileno. Em δ_H 4,17 aparece um dubleto, atribuído ao hidrogênio geminal a um grupamento hidroxila. Ambos os sinais possuem constante de acoplamento (J_{HH}) de 7,0 Hz, indicando que são gerados por hidrogênios acoplados entre si.

No espectro pode-se observar ainda a presença de um singlete em δ_H 1,67, atribuído a um grupo metila, provavelmente próximo à dupla ligação e também sinais de hidrogênios dos grupos CH_3 e CH_2 na região entre δ_H 0,83 e 2,00.

Nos espectros de RMN- ^{13}C pode-se evidenciar a presença de 20 átomos de carbono. Desses 20 carbonos, pelos valores de deslocamento químico, dois foram identificados como carbonos oleofínicos (δ_C 140,3 e 123, 1) e um como carbono metilênico ligado à hidroxila (δ_C 59,4), sendo que os demais, estando localizados na faixa entre δ_C 16,16 e 39,86, foram atribuídos a carbonos sp^3 de metilas, metilenos e metinos. O grande número de carbonos ressonando em campo alto sugere a presença de uma cadeia alifática linear para S5A.

Analisando o espectro de DEPT e comparando com o espectro de RMN- ^{13}C podem-se caracterizar os 20 átomos de carbono da estrutura de S5A como:

Carbono	CH₃	CH₂	CH	Cq
$\Sigma = 20$	5	10	4	1

A presença de 20 carbonos, associada à análise cromatográfica e à coloração desenvolvida pela substância após revelação, sugerem um estrutura terpênica para S5A.

A indicação de um álcool com 20 carbonos com cadeia alifática e linear sugere a possibilidade de tratar-se do fitol, um diterpeno bastante comum em produtos naturais. A comparação com dados da literatura (SDBS, 2006) confirma a esta para a estrutura de S5A (Tabela 11).

Tabela 11: Comparação entre os valores de deslocamentos químicos em ppm observados nos espectros de RMN-¹³C e RMN-¹H da substância S5A (125 e 500 MHz, CDCl₃), e dados da literatura (100 e 400 MHz, CDCl₃), (SDBS, 2006).

C	S5A		Fitol (SDBS, 2006)	
	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H
1	59,42	4,15	59,35	4,14
2	123,07	5,41	123,25	5,41
3	140,31	-	140,05	-
4	39,86	1,99	39,91	1,98
5	25,11	1,38	25,19	1,44 a 1,35
6	37,41	1,26	36,72	1,30 a 1,03
7	32,68	1,36	32,82	1,44 a 1,35
8	37,27	1,06	37,41	1,30 a 1,03
9	24,78	1,28	24,50	1,30 a 1,03
10	37,35	1,26	37,46	1,30 a 1,03
11	32,78	1,37	32,73	1,44 a 1,35
12	36,65	1,08	37,34	1,30 a 1,03
13	24,45	1,18	24,82	1,30 a 1,03
14	39,35	1,14	39,41	1,14
15	27,97	1,52	28,00	1,52
16	22,70	0,87	22,73	0,87
17	22,61	0,87	22,64	0,86
18	19,69	0,85	19,75	0,85
19	19,73	0,85	19,75	0,85
20	16,16	1,67	16,16	1,66

Através da análise da tabela 11 foi possível concluir que a estrutura química atribuída à substância S5A é realmente a do álcool vinílico 3,7,11,15-tetrametilhexadec-

2-en-1-ol, comumente chamado de fitol (Figura 29). Tal substância, apesar de bastante comum em produtos naturais, é descrita pela primeira vez para a espécie *Acanthophora spicifera*.

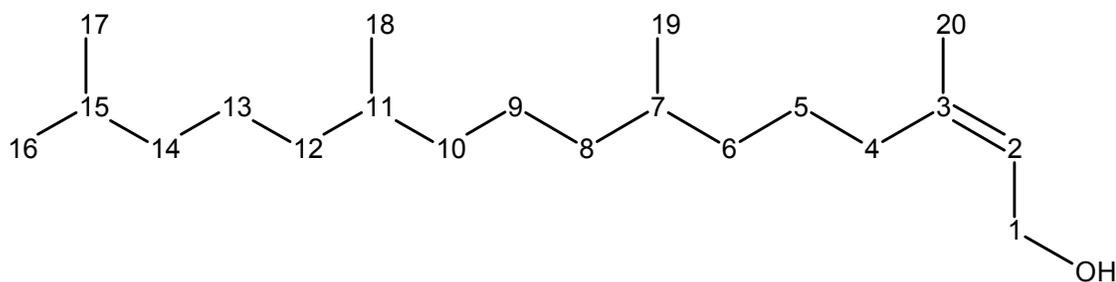


Figura 29: Estrutura proposta para a substância S5A, 3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol (fitol).

O fitol, que é a forma reduzida do geranylgeraniol (Figura 30), é um dos diterpenos mais simples e importantes da natureza, uma vez que forma a cadeia lateral lipofílica da vitamina K₁ (Figura 31) e das clorofilas (Figura 32) (DEWICK, 2002).

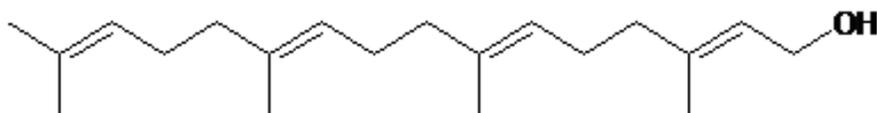


Figura 30: Estrutura do geranylgeraniol.

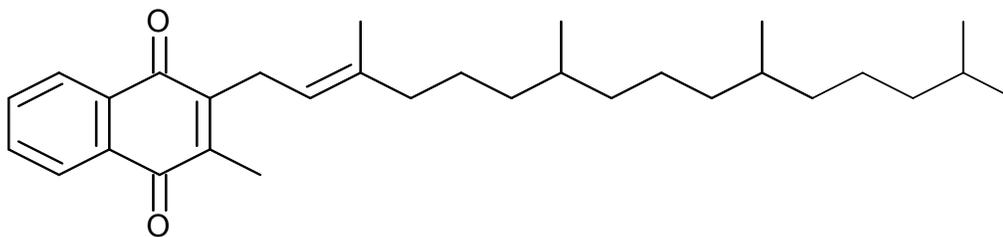


Figura 31: Estrutura da vitamina K₁.

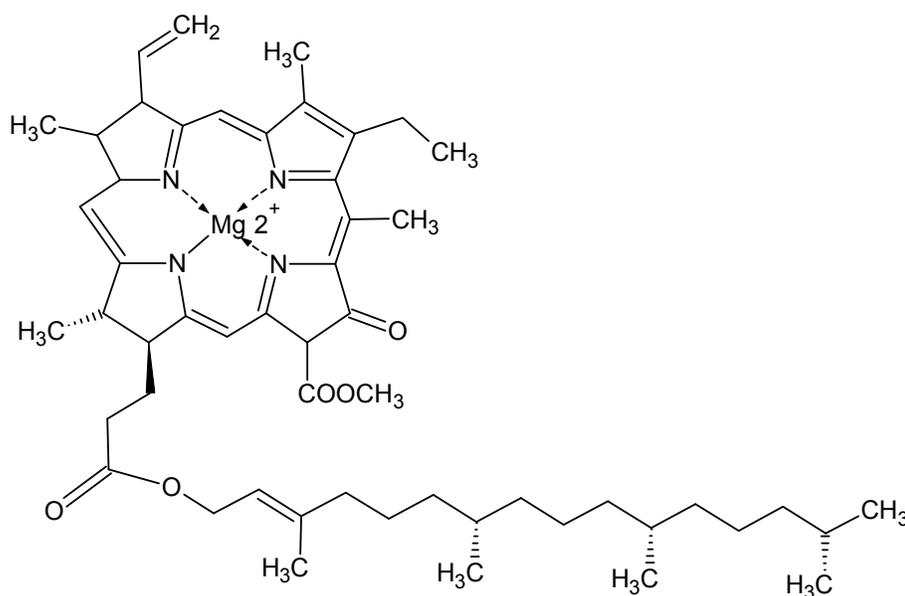


Figura 32: Estrutura da clorofila a.

5.1.6. Substâncias S3A e S6A

Foram obtidos 2 mg da substância S3A na forma de um pó branco, apresentando valor de R_f 0,30 no sistema clorofórmio: acetato de etila (90: 10, V/V), ausência de fluorescência sob luz ultravioleta em 366 nm e presença de extinção de fluorescência sob luz ultravioleta em 254 nm. Após revelação com anisaldeído-sulfúrico, a mancha apresentou coloração amarela. A substância foi enviada para análise de RMN e seus espectros ainda não foram recebidos.

A substância S6A foi obtida na forma de um pó branco, apresentando valor de Rf 0,49 no sistema clorofórmio: acetato de etila (90: 10, V/V), ausência de fluorescência e de extinção de fluorescência sob luz ultravioleta em 366 nm e 254 nm, respectivamente. Após revelação com anisaldeído-sulfúrico, a mancha apresentou coloração roxa. Através do ponto de fusão e da comparação cromatográfica com o padrão foi possível identificar a substância S6A como o colesterol (Figura 33).

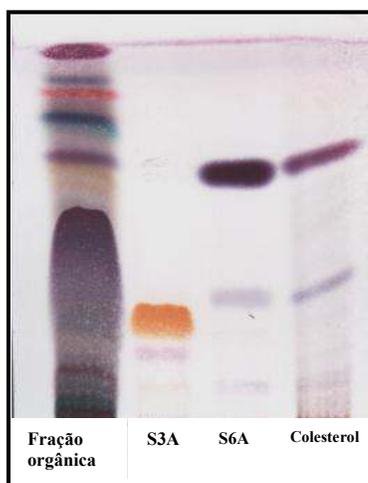


Figura 33: Comparação entre a fração orgânica, substâncias isoladas S3A e S6A e o padrão colesterol.

Eluente: clorofórmio: acetato de etila (90: 10, V/V)

Adsorvente: gel de sílica F₂₅₄

Deteção: anisaldeído-sulfúrico e aquecimento

5.2. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.2.1. Ensaio antibacteriano

Dois extratos (aquoso e hidroetanólico) e três frações (orgânica, aquosa e metanólica) de *A. spicifera* foram submetidos aos testes frente às bactérias *Escherichia*

coli ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* ATCC 10541.

Nenhum dos extratos ou frações testadas apresentou halos de inibição significativos, tanto para bactérias gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) quanto para bactérias gram-positivas (*S. aureus*, *E. faecalis* e *E. faecium*).

Burkholder, Burkholder e Almodovar (1960), relatam a atividade antibacteriana de *A. spicifera* para *S. aureus*, mas os dados aqui apresentados não confirmaram tal atividade para o material coletado na Lagoa da Conceição no verão de 2006.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi analisada a fração orgânica da macroalga *A. spicifera*, sendo isolados cinco componentes. Três compostos foram identificados como esteróides, sendo que dois deles nunca haviam sido relatados para a espécie. Além destes, foram obtidos o diterpeno fitol e um composto ainda não identificado.

A avaliação da atividade antiparasitária foi realizada com os extratos aquoso e hidroetanólico e com as frações orgânica, aquosa e metanólica de *A. spicifera*. Os ensaios foram realizados no laboratório de Protozoologia, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, da Universidade Federal de Santa Catarina pelas alunas de iniciação científica Anita Maurício Camillo Duarte, Rebeca Körting Nunes e Letícia Kramer Pacheco, sob orientação do Prof. Dr. Mário Steindel. A metodologia utilizada está descrita em Lunardi et al. (2003).

Os ensaios foram realizados incubando uma suspensão de parasitas, nas formas epimastigota de cultura da cepa Y de *T. cruzi* e promastigota de cultura de *Leishmania amazonensis* com diferentes concentrações dos extratos ou frações testados. A avaliação foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer. Nenhum dos extratos e frações testados apresentou atividade para as formas epimastigota de cultura da cepa Y de *T. cruzi* nem para as formas promastigota de cultura de *Leishmania amazonensis*. Até o presente, não foram encontrados registros na literatura de avaliações da atividade antiparasitária de *A. spicifera*.

A determinação da atividade antiviral foi realizada no Laboratório de Virologia Aplicada, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, da Universidade Federal de Santa Catarina pela doutoranda Luciane Savi, sob orientação da Profa. Dra. Cláudia M. O. Simões. Foram realizados estudos para avaliar a potencial atividade antiviral das frações orgânica, aquosa, metanólica e etanólica e das substâncias isoladas S1A e S2A de *A. spicifera*. O vírus utilizado nos experimentos foi o Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1), cepa KOS (Universidade de Rennes, França) e células VERO (ATCC, CC1 81).

A citotoxicidade foi observada através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT), segundo metodologia proposta por Takeuchi, Baba e Shigeta (1991). Esta técnica permitiu calcular a concentração que causa citotoxicidade a 50% das células CC_{50} , quando comparadas aos controles celulares.

A atividade antiviral *in vitro* foi realizada pelo mesmo ensaio colorimétrico do MTT citado acima. Este teste permite calcular valores de CE_{50} (concentração que diminui em 50% o efeito citopático viral), quando comparados com os controles celulares e virais. Com os resultados de CC_{50} e CE_{50} , calculam-se os índices de seletividade ($IS = CC_{50}/CE_{50}$), que expressam a relação entre a citotoxicidade e a atividade antiviral de determinado material-teste. Quanto maior o valor de IS, mais promissora é a atividade antiviral, indicando a viabilidade da realização de estudos posteriores mais detalhados tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Tanto os valores de CC_{50} quanto de CE_{50} representam a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão da média, e foram obtidos através de análise de regressão linear.

A fração etanólica e os esteróides S1A e S2A (isolados da fração orgânica) não apresentaram atividade contra a cepa KOS do HSV-1. Quando testados conjuntamente, os esteróides S1A e S2A apresentaram alguma atividade, com $IS=1,56$, considerado bastante baixo, mas que mostra um certo sinergismo entre os dois compostos, já que isoladamente eles foram inativos. As frações aquosa e metanólica apresentaram, respectivamente, $IS= 1,3$ e $2,4$, que são considerados muito baixos. Os melhores resultados foram observados com a fração orgânica, que apresentou $IS=5,0$, merecendo atenção para estudos posteriores visando a caracterização de substâncias potencialmente ativas.

Em termos gerais, para continuidade dessa linha de investigação com a espécie *A. spicifera*, os seguintes objetivos poderiam ser considerados:

- Caracterizar as frações ou compostos da fração orgânica responsáveis pela atividade antiviral.

- Caracterizar os constituintes das frações polares de *A. spicifera*, uma vez que na literatura não foram encontrados nenhum estudo a respeito dos mesmos e também por ter sido a fração com maior rendimento na extração.
- Avaliar os extratos, frações e compostos isolados também em relação à atividade antifertilidade, uma vez que para o extrato metanólico de *A. spicifera*, coletada na Índia, tal atividade foi detectada e está possivelmente relacionada à presença de esteróides (NAQVI, 1980).

7. CONCLUSÕES

-
- Da fração orgânica de *A. spicifera* foram isolados e identificados cinco compostos:
 - o cetoesteróide colest-4-en-3,6-diona, descrito pela primeira vez em algas marinhas;
 - o cetoesteróide 6 β -hidroxi-colest-4-en-3-ona, inédito para o gênero *Acanthophora*;
 - o álcool vinílico 3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol, comumente chamado de fitol, inédito para o gênero *Acanthophora*;
 - colesterol;
 - uma substância ainda não identificada, mas com características cromatográficas semelhantes às do esteróide 6 β -hidroxi-colest-4-en-3-ona.
 - Os extratos aquoso e hidroetanólico e as frações orgânica, aquosa e metanólica não apresentaram atividade antibacteriana frente às bactérias testadas.
 - A avaliação da atividade antiparasitária, realizada com os extratos aquoso e hidroetanólico e com as frações orgânica, aquosa e metanólica, não apresentou resultados significativos frente às formas epimastigota de cultura da cepa Y de *T. cruzi* e promastigota de cultura de *Leishmania amazonensis*.
 - A fração etanólica e os esteróides S1A e S2A, avaliados frente o HSV-1, não apresentaram atividade antiviral. As frações aquosa e metanólica, bem como os esteróides em mistura, apresentaram um IS baixo, não sendo significativo. A fração acetato de etila foi a que apresentou maior IS (IS=5), sendo considerada promissora.
 - Os trabalhos realizados em cooperação com grupos que atuam, principalmente, na avaliação da atividade antiviral, abrem a perspectiva da busca de frações e substâncias ativas, a partir dessa espécie, que possui um biomassa abundante, item de bastante relevância dentro da busca de metabólitos secundários em produtos naturais marinhos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIELLO, A.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; MENNA, M. Steroids of the marine sponge *Cinachyra tarentina*: isolation of cholest-4-ene-3,6-dione and (24R)-24-wthylcholest-4-ene-3,6-dione. *Journal of Natural Products*, v. 54, n. 1, p. 281-285, 1991.

ALGAE BASE. Disponível em: < www.algaebase.com >. Acesso em: 25/10/2006.

ALONSO, D.; KHALIL, Z.; SATKUNANTHAN, N.; LIVETT, B.G. Drugs from the sea: conotoxins as drug leads for neuropathic pain and other neurological conditions. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 3, p. 785-787, 2003.

ARMISEN, R. World-wide use and importance of *Gracilaria*. *Journal of Applied Phycology*, v. 7, n. 3, p. 231-243, 1995.

BERGÉ, J.P.; BARNATHAN, M.G. Fatty Acids from Lipids of Marine Organisms: Molecular Biodiversity, Roles as Biomarkers, Biologically Active Compounds, and Economical Aspects. *Advance Biochemical Engineer and Biotechnology*, v. 96, p. 49-125, 2005.

BERLINCK, R.G.; HAJDU, E.; ROCHA, R.M.; OLIVEIRA, J.H. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 510-522, 2004.

BIOAQUA. *Marine Natural Products*. Disponível em <http://www.bioaqua.net/mnp/MNP/clinical.asp>, acesso em 20/10/2006.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. *Natural Products Reports*, v. 20, p. 1-48, 2003.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. *Natural Products Reports*, v. 21, p. 1-49, 2004.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. *Natural Products Reports*, v. 22, p. 15-61, 2005.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. *Natural Products Reports*, v. 23, p. 23-68, 2006.

BOUZON, J.L. *Composição e estrutura espacial da comunidade macrofitobêntica de fundos consolidados das baías da Ilha de Santa Catarina (SC)*. Florianópolis, 2005. 68

p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

BULTEL-PONCÉ, V.; ETAHIRI, S.; GUYOT, M. New Ketosteroids from the Red Alga *Hypnea musciformis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.12, p. 1715–1718, 2002.

BURKHOLDER, P.R.; BURKHOLDER, M.L.; ALMODOVAR, L.R. *Botanica Marina*, v. 2, p. 149, 1960. Apud: WAHIDULLA, S.; D'SOUZA, L.; GOVENKER, M. Lipid constituents of the red alga *Acanthophora spicifera*. *Phytochemistry*, v. 48, n. 7, p. 1203-1206, 1998.

CREWS, P.; RODRÍGUEZ, J.; JASPARS, M. *Organic Structure Analysis*. United States of America: Oxford University Press, 1998. 552p.

DE RUITER, G.A.; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. *Trends in Food Science & Technology*, v. 8, p. 389-395, 1997.

DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 2. ed. New York: Wiley & Sons, 2002.

DJERASSI, C. Recent Advances in the Mass Spectrometry of Steroids. *Pure and Applied Chemistry*, v. 50, p. 171-184, 1978.

DONIA, M.; HAMANN M. T. Marine natural products and their potential applications as antiinfective agents. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 3, p. 338-348, 2003.

DUARTE, M.E.R.; CAUDURO, J.P.; NOSEDA, D.G.; NOSEDA, M.D.; GONÇALVES, A.G.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; CERESO, A.S. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. *Carbohydrate Research*, v. 339, p. 335–347, 2004.

DUARTE, M.E.R.; CARDOSO, M.A.; NOSEDA, M.D. Strutral studies on fucoidans from the Brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydrate Research*, v.333, p.281-293, 2001.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. *Natural Products Reports*, v. 13, p. 75-125, 1996.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. *Natural Products Reports*, v. 14, p. 259-302, 1997.

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.

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

FAULKNER, D. J. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v.19, p. 1-48, 2002.

GUNAY, N.S. Heparinoids: structure, biological activities and therapeutic applications. *Planta Medica*, v. 65, p. 301-306, 1999.

GRAHAM, L.E.; WILCOX, L.W. *Algae*. 1. ed. Prentice-Hall: Inc. Upper Saddle River, 2000, 640p.

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

HARVEY, W. *Biotechnology*, v. 6, p. 488-492, 1988.

HORNBACK, J.M. *Organic Chemistry*. 2. ed., Brooks Cole, 2005. 1328p

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

IRELAND, C.M.; COPP, B.R.; FOSTER, M.P.; MCDONALD, L.A.; RADISKY, D.C.; SWERSEY, J.C. Biomedical potential of marine natural products, 1993. Apud: SMIT, A.J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology*, v. 16, p. 245-262, 2004.

JOKIEL, P.L.; MORRISSEY, J.I. Influence of size on primary production in the reef coral *Pocillopora damicornis* and the macroalga *Acanthophora spicifera*. *Marine Biology*, v. 91, p. 15-26, 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 (5/6), p.321-330, 1997.

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

KIJJOA, A.; SAWANGWONG, P. Drugs and Cosmetics from the Sea. *Marine Drugs*, v. 2, p. 73-82, 2004.

KILAR, J.A.; MCLACHLAN, J. Ecological Studies of the Alga, *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borg. (Ceramiales: Rhodophyta): Vegetative Fragmentation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 104, p. 1-21, 1986.

LEE, R.E. *Phycology*, Cambridge University Press, Cambridge, 1999, 614p.

LEI, J.; ZHOU, J. A marine natural products database. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v. 42, p. 742-748, 2002.

LHULLIER, C. *Triagem de macroalgas bênticas do litoral de santa catarina biomonitorada pelo ensaio de letalidade para larvas de Artemia salina e investigação fitoquímica de Pterocladia capillacea*, 2005, 89p. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

LIMA-FILHO, J.V.M.; CARVALHO, A.F.F.U.; FREITAS, S.M.; MELO, V.M.M. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern brazilian coast. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.33 n.4, p. 311-314, 2002.

LUNARDI, F.; GUZELA, M.; RODRIGUES, A.T.; CORRÊA, R.; EGER-MANGRICH, I.; STEINDEL, M; GRISARD, E.C.; ASSREUY, J.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S. Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47 (4), p. 1449–1451, 2003.

MAYER, A.M.S.; HAMANN, M. Marine pharmacology in 1999: Compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, endocrine, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 132, n. 3, p. 315-339, 2002.

MAYER, A.M.S.; HAMANN, M. Marine pharmacology in 2000: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial,

antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Biotechnology*, v. 6, p. 37-52, 2004.

MAYER, A.M.S.; HAMANN, M. Marine pharmacology in 2001–2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 140, n. 3-4, p. 265-286, 2005.

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

MIGLIUOLO, A.; PICCIALI, V.; SICA, D. Steroidal ketones from the sponge *Geodia Cydonium*. *Journal of Natural Products*, v. 53, n. 5, p. 1262-1266, 1990.

MUTTER, R.; WILLS, M. Chemistry and clinical biology of the bryostatins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 8, p. 1841-1860, 2000.

NAQVI, S.W.A.; WAHIDULLA, S.; KAMAT, S.Y.; FERNANDES, L.; REDDY, C.V.G.; BHAKUNI, D.S.; DHAWAN, B.N. *Botanica Marina*, v. 24, p. 51, 1980. Apud: WAHIDULLA, S.; D'SOUZA, L.; GOVENKER, M. Lipid constituents of the red alga *Acanthophora spicifera*. *Phytochemistry*, v. 48, n. 7, p. 1203-1206, 1998.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. SANDER M.K. Natural products as sources over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 6, p. 297-305, 2002.

OLIVEIRA, E.C. Is there a relation among the global warming the missing carbon and the calcareous algae? *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 68, n. 1, p. 17-21, 1996.

OLIVEIRA, E.C.; HORTA, P. A.; AMANCIO, C. E.; SANT' ANNA, C. L. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha: algas e angiospermas marinhas bênticas do litoral brasileiro. Disponível em: (www.bdt.org.br/workshop/costa/algas+algas+utilizadas&hl=pt-R&gl=br&ct=clnk&cd). Acesso em 10/10/2006.

PETTIT, G.R.; LIPPERT, J.W.; TAYLOR, S.R.; TAN, R. WILLIAMS, M.D. Synthesis of Phakellistatin 11: A Micronesia (Chuuk) Marine Sponge Cyclooctapeptide, *Journal of Natural Products*, v. 64, p. 883-891, 2001.

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

PRAKASH, O.; ROY, R.; BHAKUNI, D.S.; WAHIDULLA, S.; KAMAT, S.Y. D-NMR studies of a novel steroid from the red alga *Acanthophora spicifera*. *Journal of Natural Products*. v. 52, n. 4, p. 686-692, 1989.

PROKSCH, P.; EDRADA, R.A.; EBEL, R. Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 59, p. 125-134, 2002.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal*, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001 906p.

SDBS. Spectral Database for Organic Compounds. Disponível em <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/sdbs/owa/sdbs_sea.cre_frame_sea>. Acesso em 20 out. 2006.

SCHNEIDER, C.; BOEGLIN, W.E.; PRUSAKIEWICZ, J.J.; ROWLINSON, S.W.; MARNETT, L.J.; SAMEL, N.; BRASH, A.R. Control of Prostaglandin Stereochemistry at the 15-Carbon by Cyclooxygenases-1 and -2. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 478- 485, 2002.

SILVA, A.C. *Triagem da potencial atividade antiviral de produtos marinhos esponjas coletadas na costa brasileira e compostos de organismos marinhos*. Florianópolis, 2005. 107 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

SMIT, A.J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology*, v. 16, p. 245-262, 2004.

SMITH, B. C. *Infrared spectral interpretation: a systematic approach*. United States of America: CRC Press LLC, 1999. 265p.

SOUTH, G.R.; WHITTICK, A. *Introduction to Phycology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987, 341p.

STROHL, W.R. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drugs Discovery Today*, v.5, p. 39-41, 2000.

TAKEUCHI, H.; BABA M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. *Journal of Virological Methods*, v. 33, p. 61-71, 1991.

TSENG, C.K. Algal biotechnology industries and research activities in China *Journal of Applied Phycology*, v. 13, p. 375–380, 2001.

TURSCH, B.; BARRETO, H.; SHARAPIN, N. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, v. 72, p. 807-808, 1963. Apud: BERLINCK, R.G.; HAJDU, E.; ROCHA, R.M.; OLIVEIRA, J.H. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 510-522, 2004.

VALMSEN, K.; JÄRVING, I.; BOEGLIN, W.E.; VARVAS, K.; KOLJAK, R.; PEHK, T.; BRASH, A.R.; SAMEL, N. The origin of 15R-prostaglandins in the Caribbean coral *Plexaura homomalla*: Molecular cloning and expression of a novel cyclooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 98, p. 7700-7705, 2001.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.G.; JAHNS, H.M. *Algae, An introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, 1995, 627p.

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

WAHIDULLA, S.; D'SOUZA, L.; KAMAT, S.Y.; Chemical constituents of the red alga *Acanthophora spicifera*. *Botanica Marina*, v. 29, n. 1, p. 49-50, 1986.

WAHIDULLA, S.; D'SOUZA, L.; PATEL, J. 5 α -Cholestane-3,6-dione from the red alga *Acanthophora spicifera*. *Phytochemistry*, v. 26, n. 10, p. 2864-2865, 1987.

WAHIDULLA, S.; D'SOUZA, L.; KAMAT, S.Y. Dipeptides from the red alga *Acanthophora spicifera*. *Phytochemistry*, v. 30, n. 10, p. 3323-3325, 1991.

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

WANG, C.; WANG, M.; SU, J.; LI, D.; ZENG, L. Research on the chemical constituents of *Acanthophora spicifera* in the South China Sea. (I). *Bopuxue Zazhi*, v. 15, n. 3, p. 237-242, 1998.

WEINHEIMER, A.J.; SPRAGGINS, R.L. The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA₂ and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla*. *Tetrahedron Letters*, v. 2, p. 5185-5188, 1969.

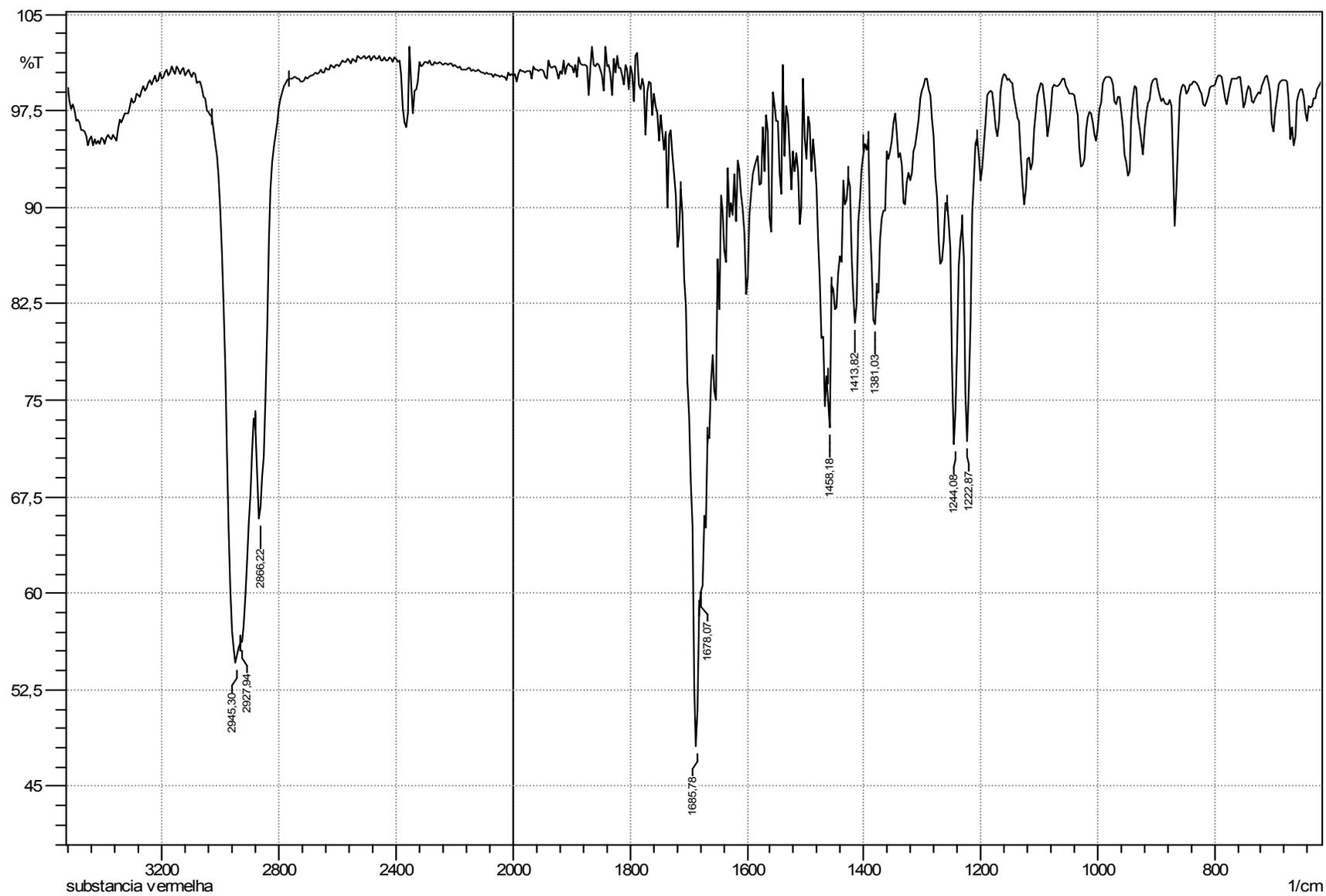
YUAN, Y.V.; WALSH, N.A. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and Chemical Toxicology*. v. 44, n. 7, p. 1144-1150, 2006.

ZARETSKII, V.I.; VUL'FSON, N.S.; ZAIKIN, V.G.; PAPERNAJA, I.B. Mass spectrometry of steroid systems. *Khimiya Prirodnyn Soerinenii*, v. 3, n. 6, p. 383-391, 1967.

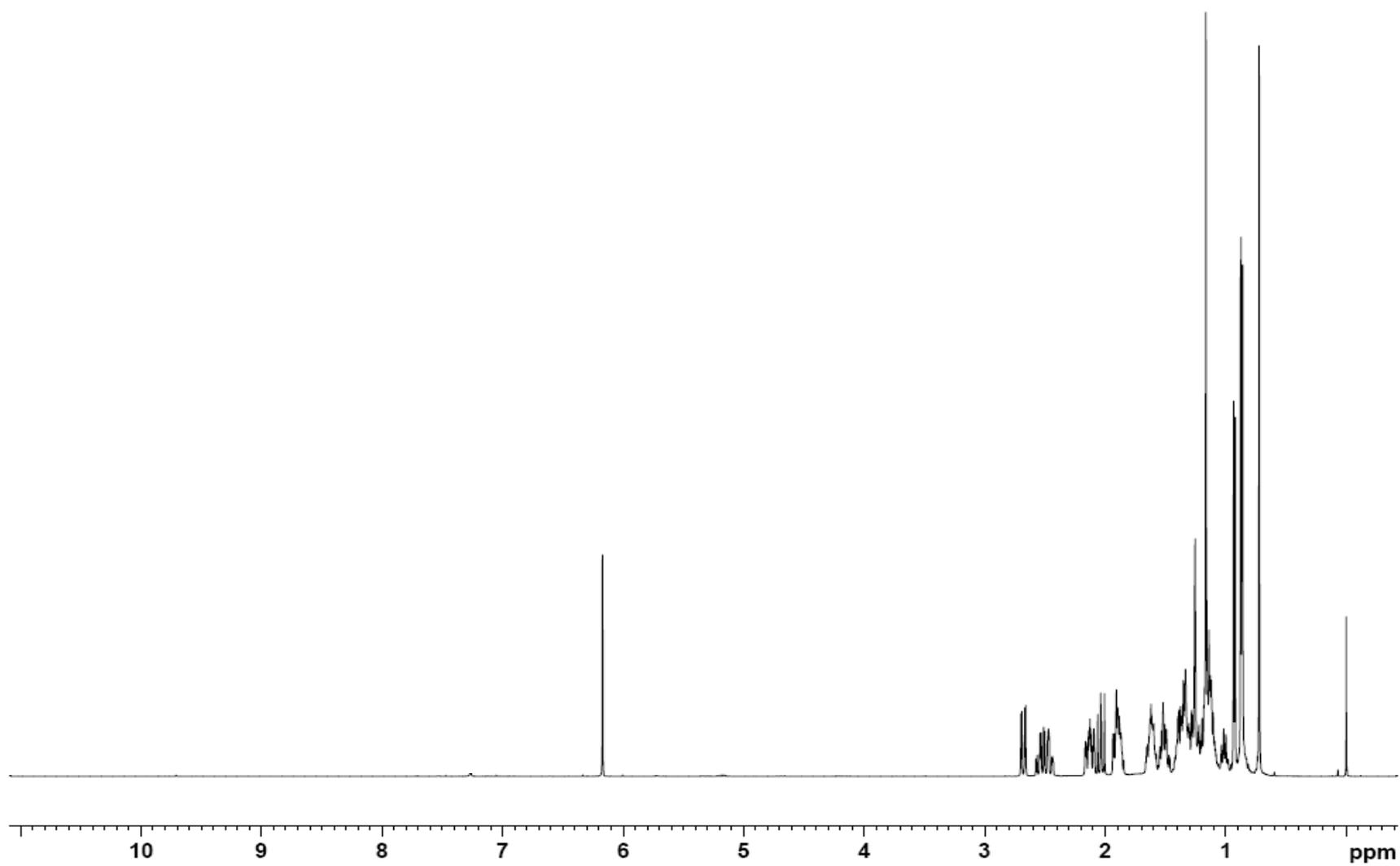
ZENG, L.M.; WANG, C., SU, J.Y.; LI, D.; OWEN, N.L.; LU, Y.; LU, N.; ZHENG, Q.T. Flavonoids from the red alga *Acanthophora spicifera*. *Chinese Journal of Chemistry*, v. 19, n. 11, p. 1097-1100, 2001.

9. ANEXOS

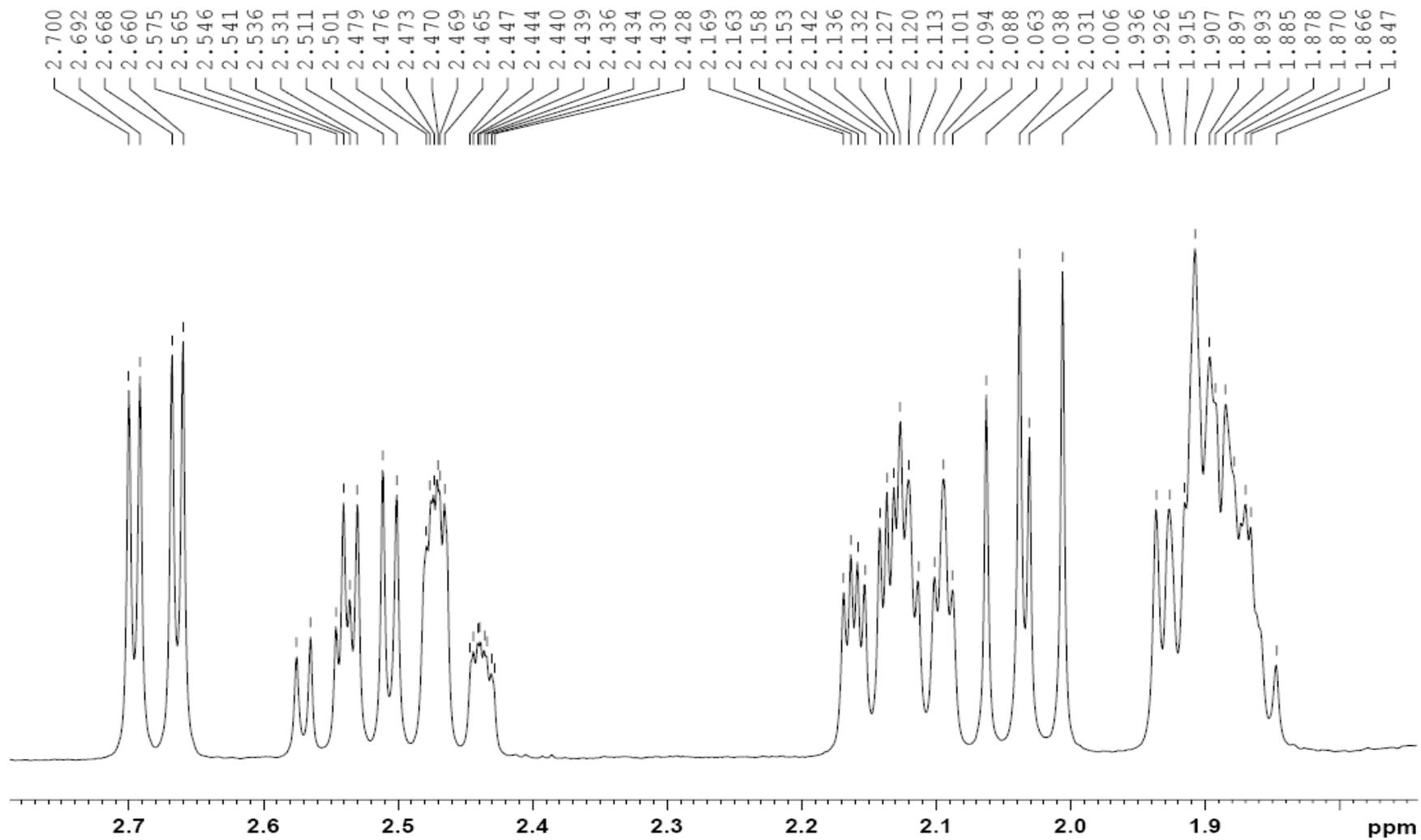
9.1. ANEXOS S1A



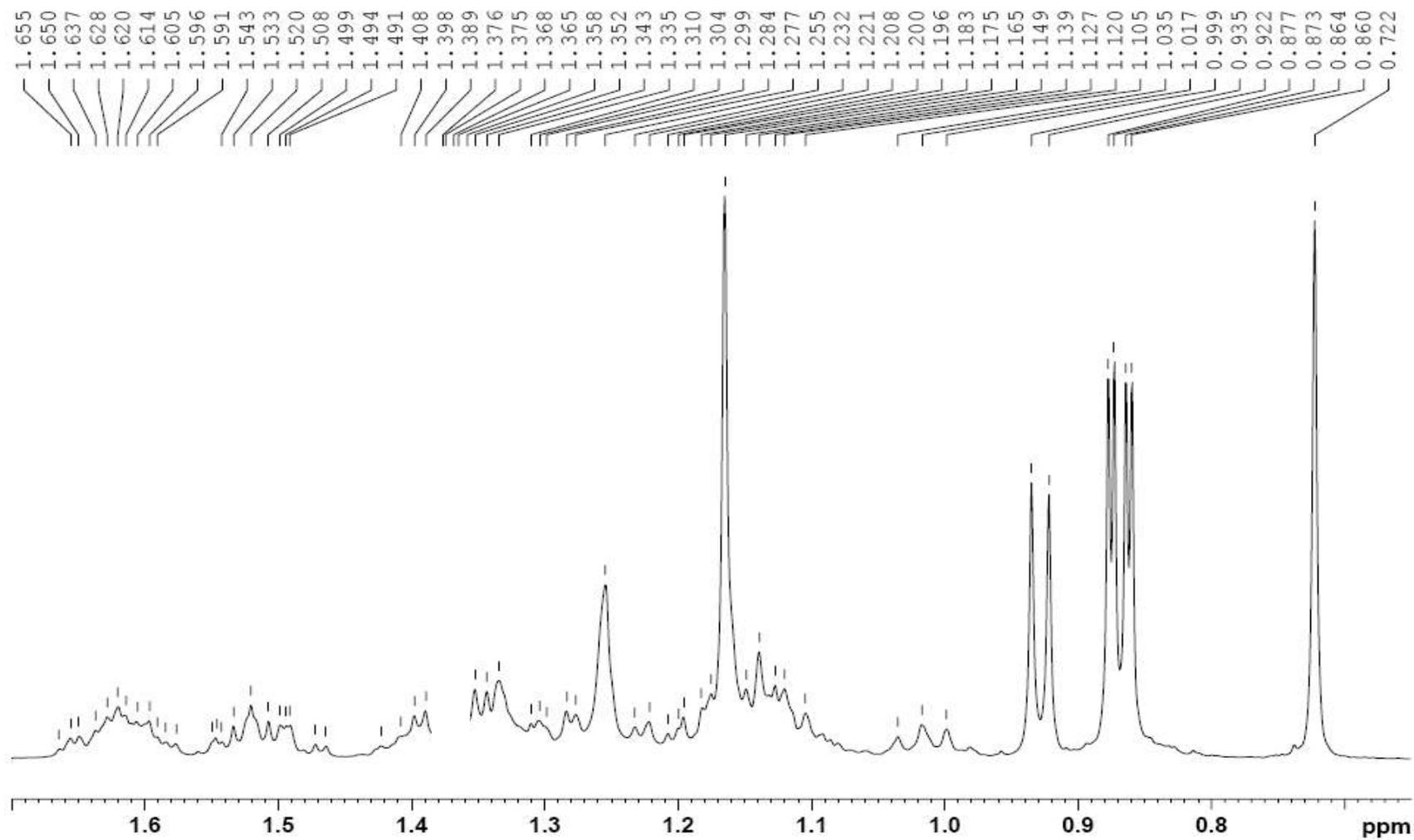
Espectro de IR da substância S1A, em pastilhas de KBr.



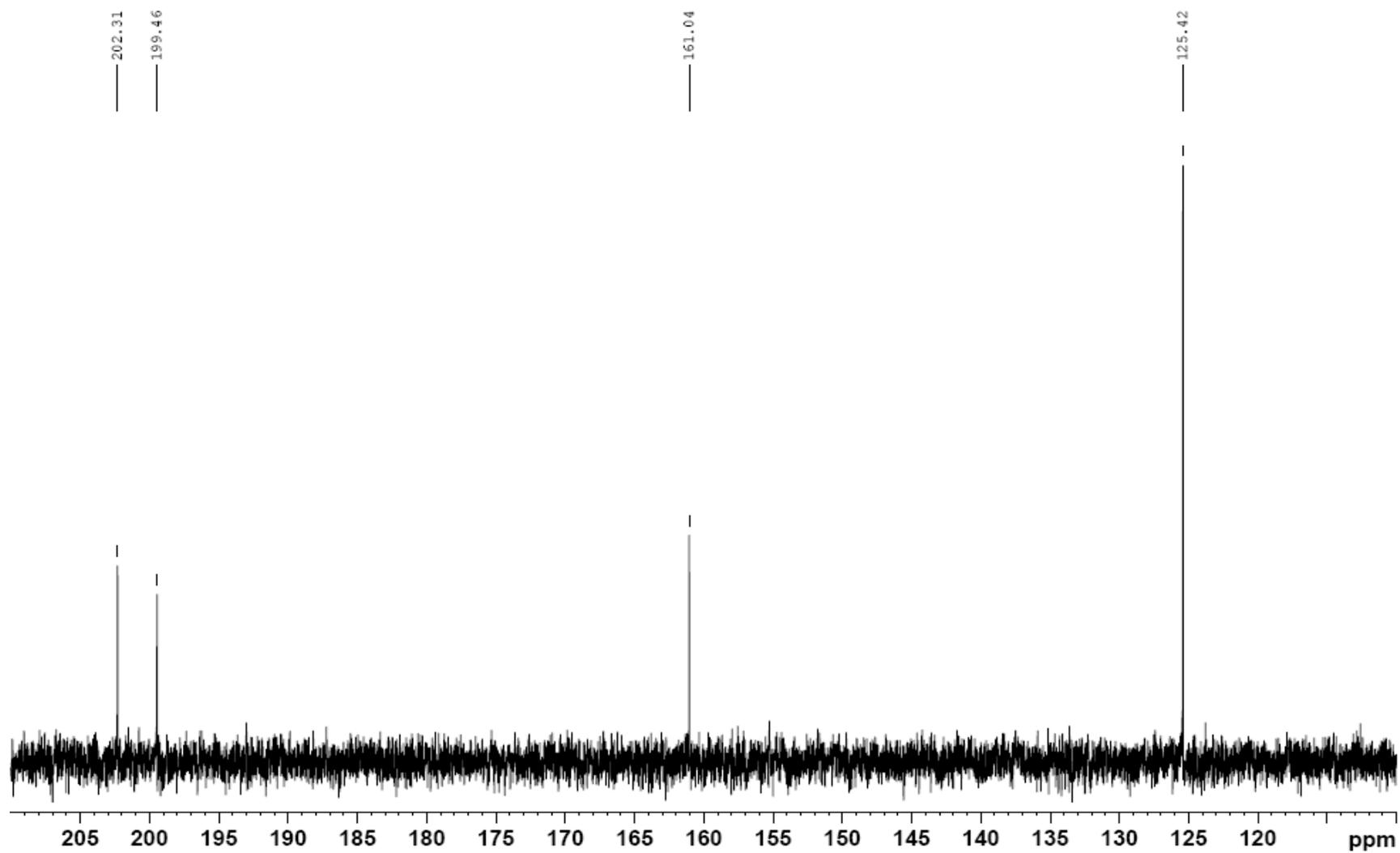
Espectro RMN ^1H da substância S1A em CDCl_3



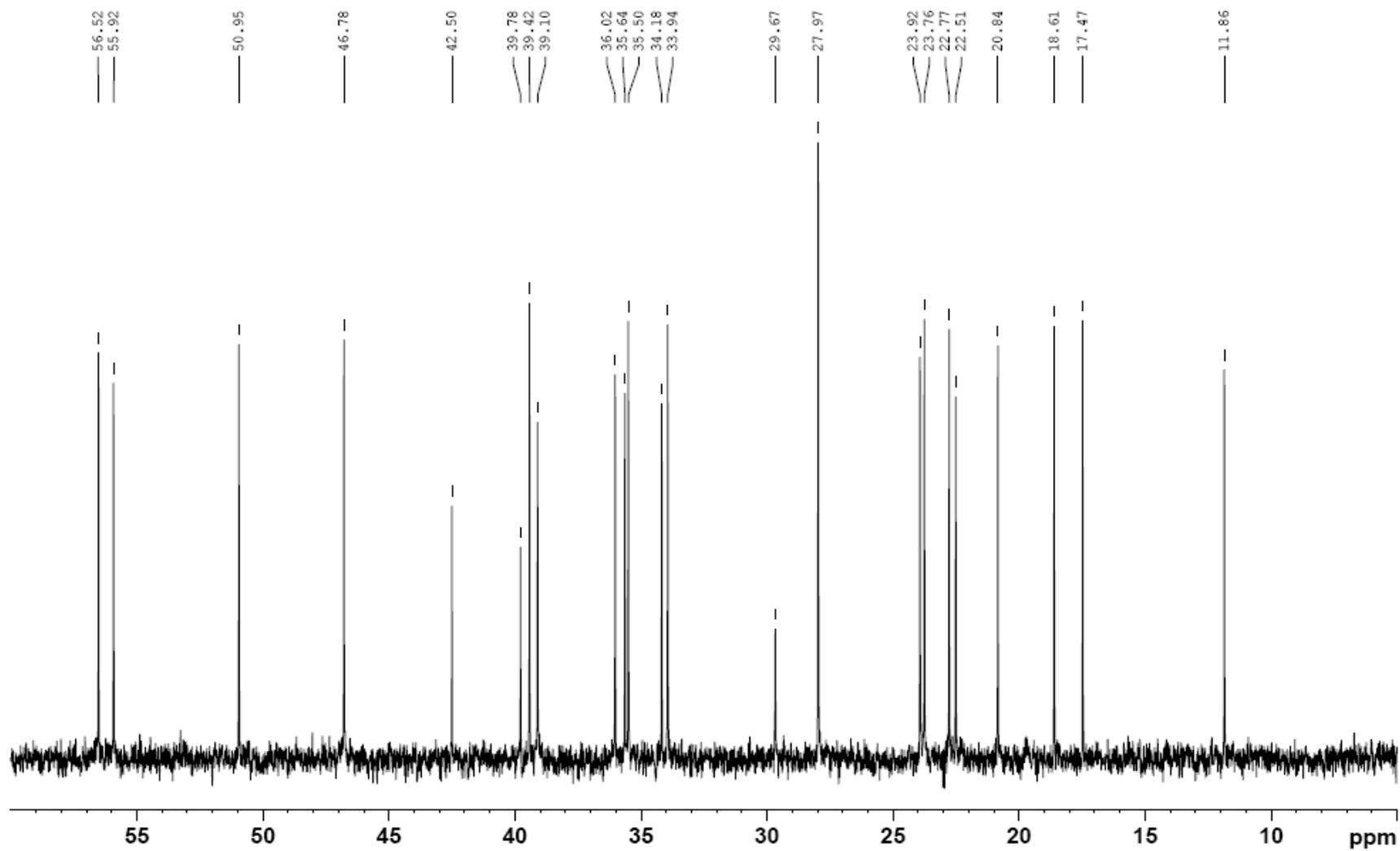
Espectro expandido de RMN ^1H da substância S1A em CDCl_3 , região entre 2,8 e 1,8 ppm.



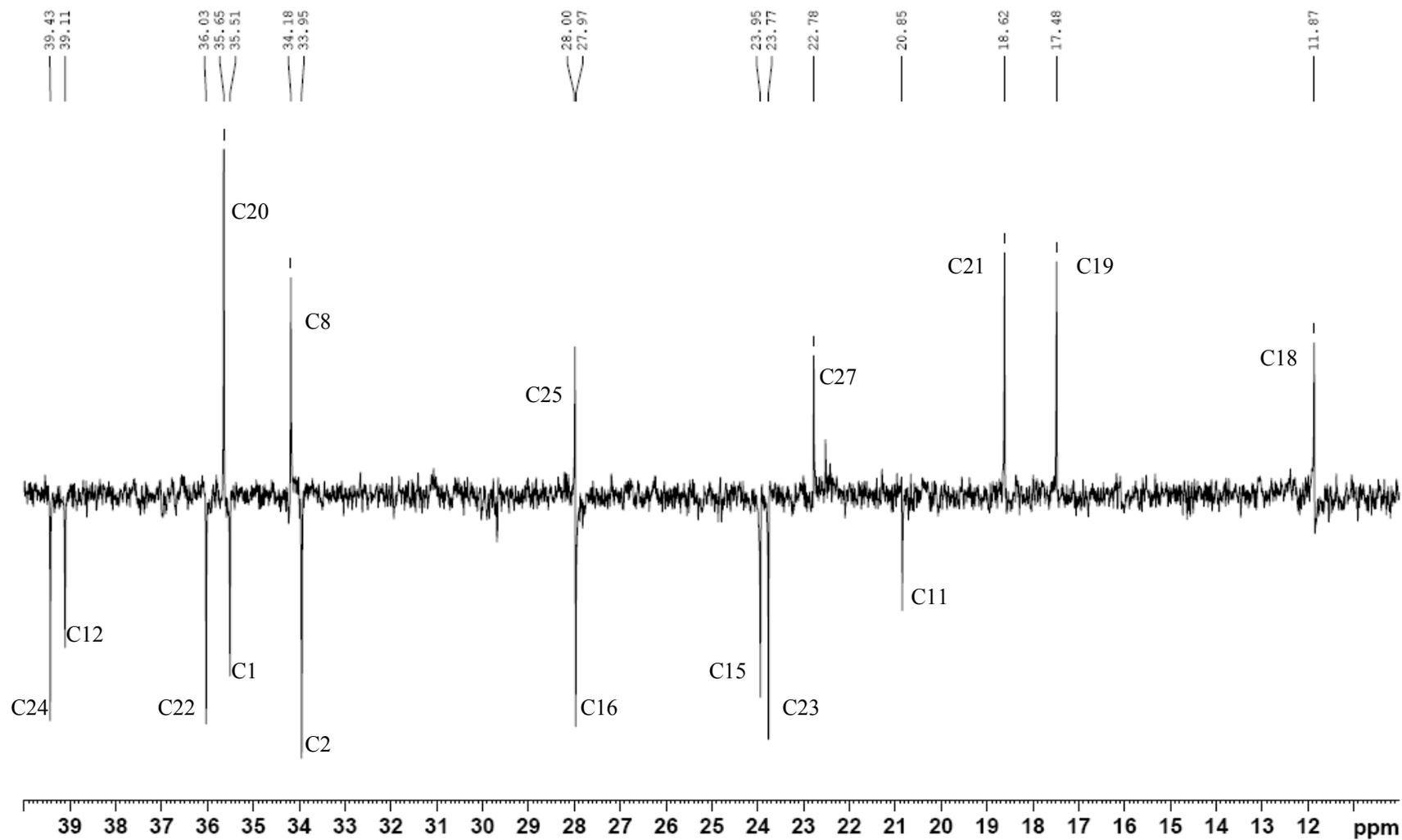
Espectro expandido de RMN ^1H da substância S1A em CDCl_3 , região entre 1,7 e 0,7 ppm.



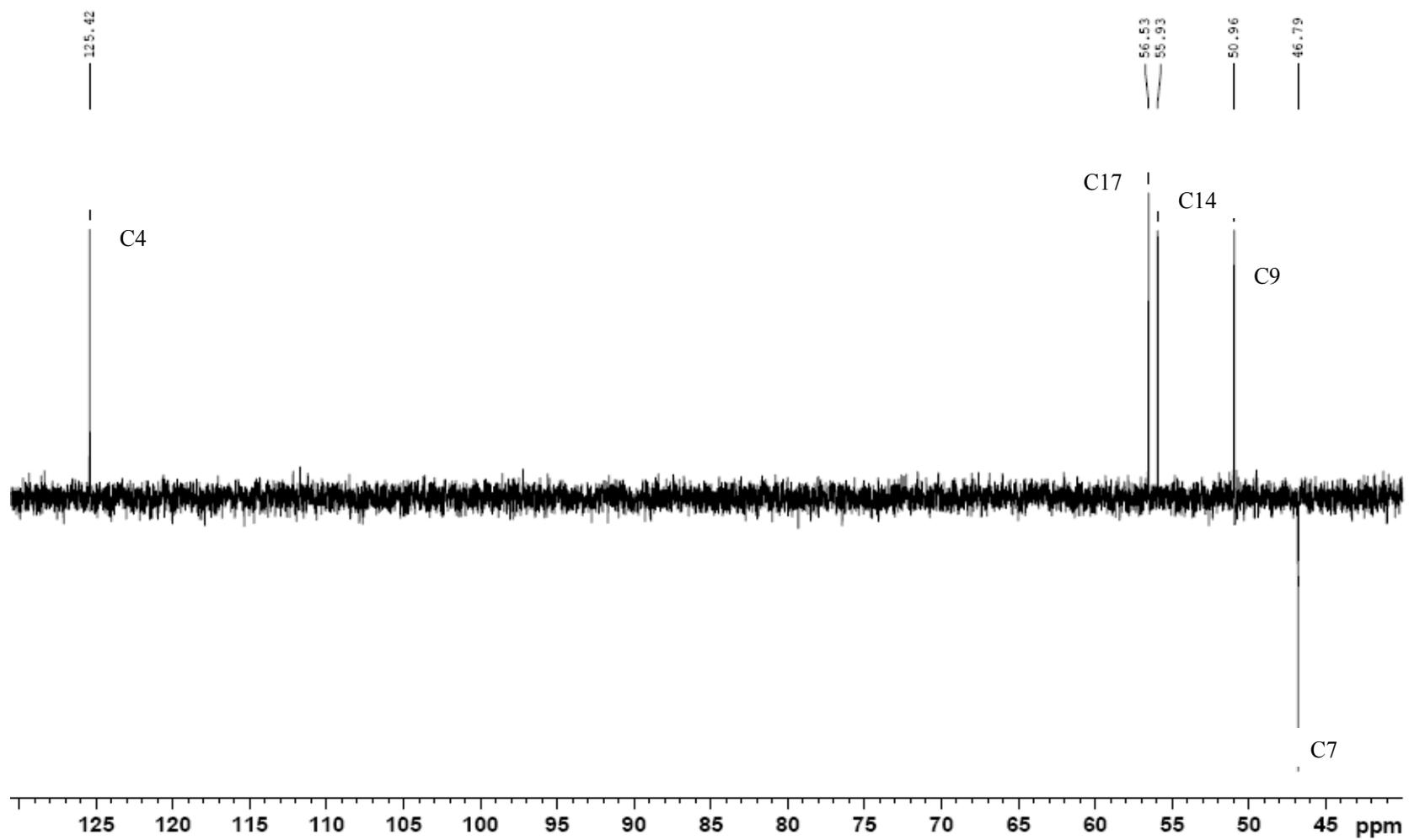
Espectro expandido de RMN ^{13}C da substância S1A em CDCl_3 , região entre 210 e 105 ppm.



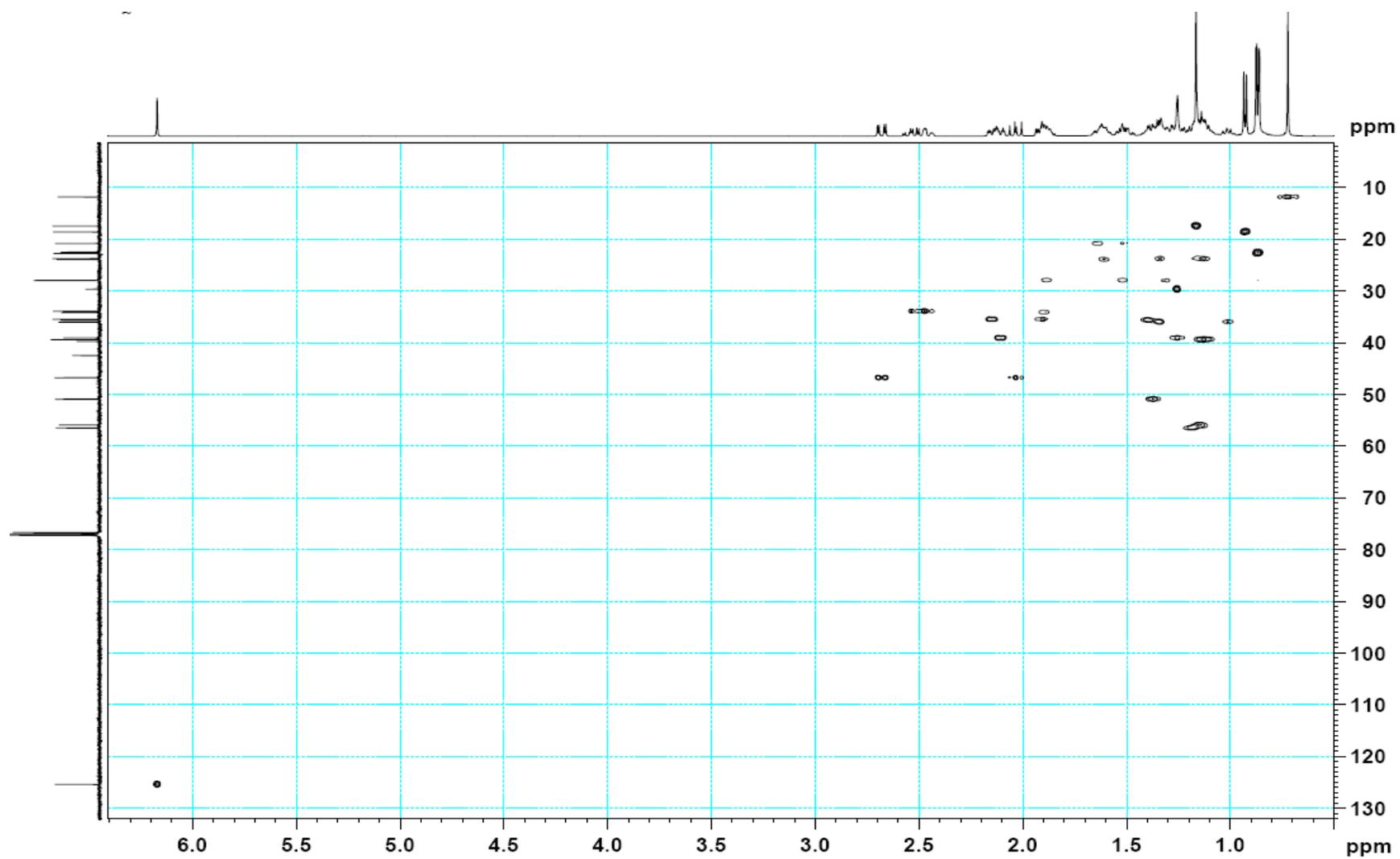
Espectro expandido de RMN ^{13}C da substância S1A em CDCl_3 , região entre 60 e 5 ppm.



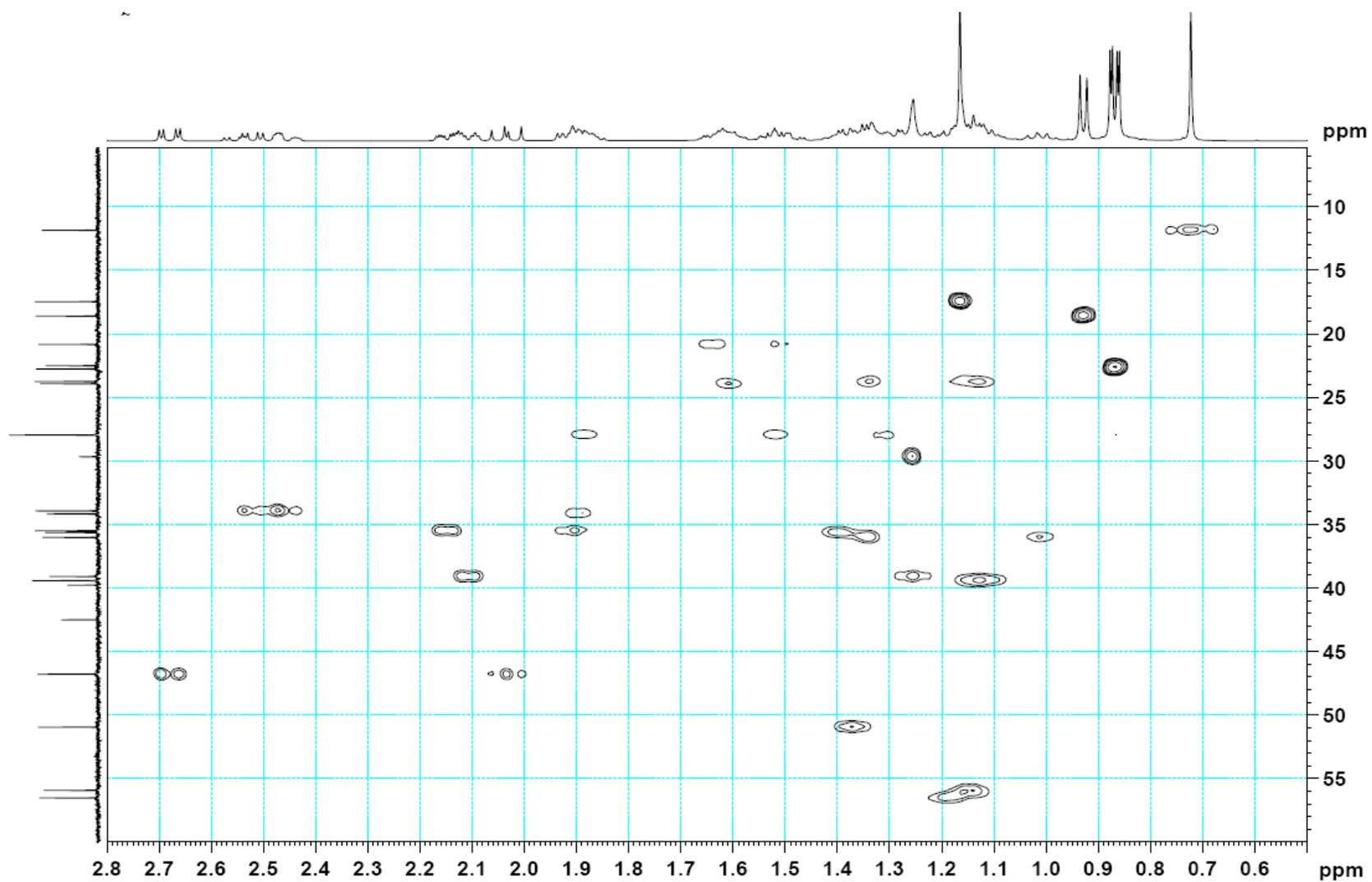
Espectro expandido DEPT 135° da substância S1A em CDCl₃, região entre 10 e 40 ppm.



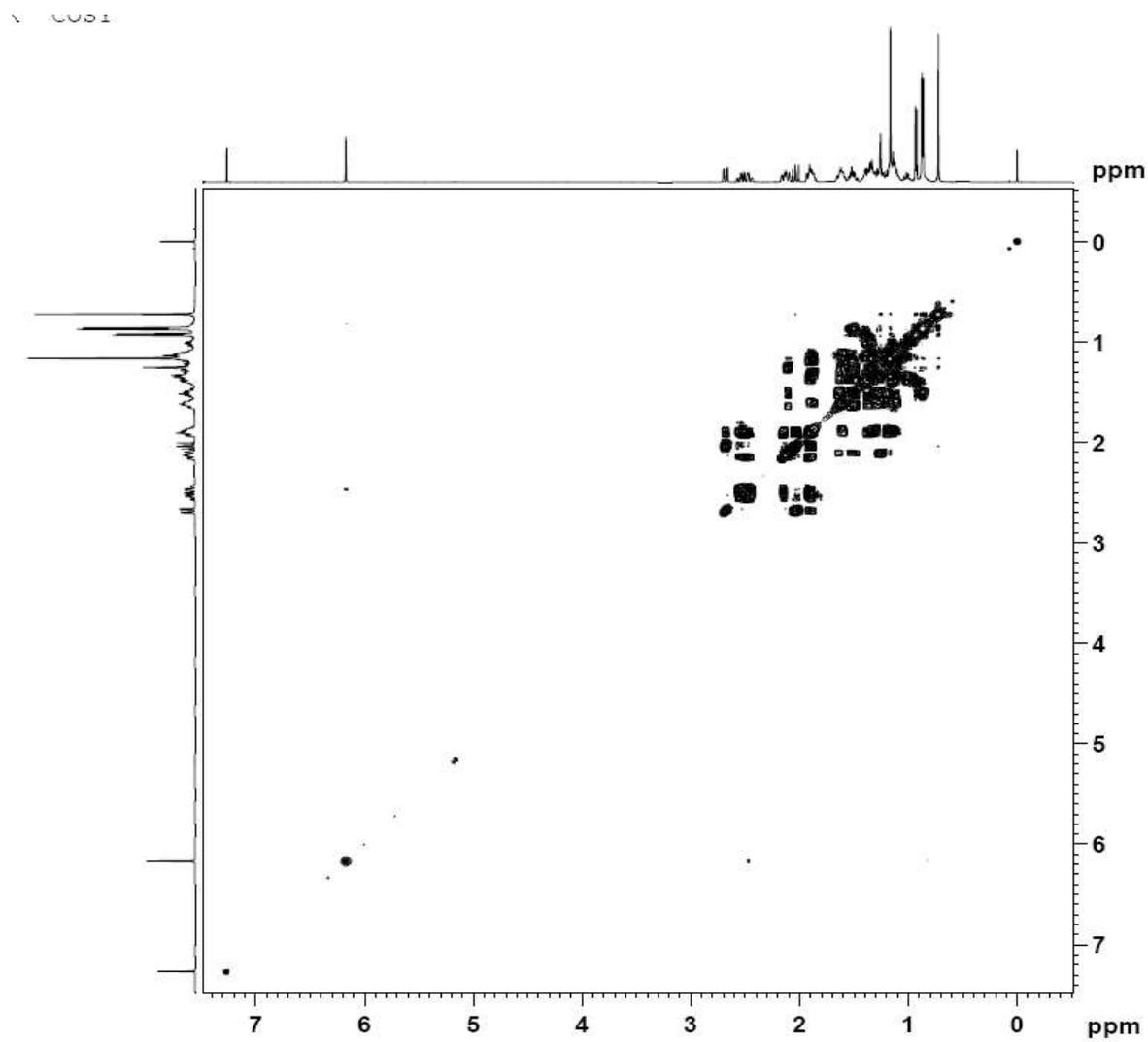
Espectro expandido DEPT 135° da substância S1A em CDCl_3 , região entre 130 e 40 ppm.



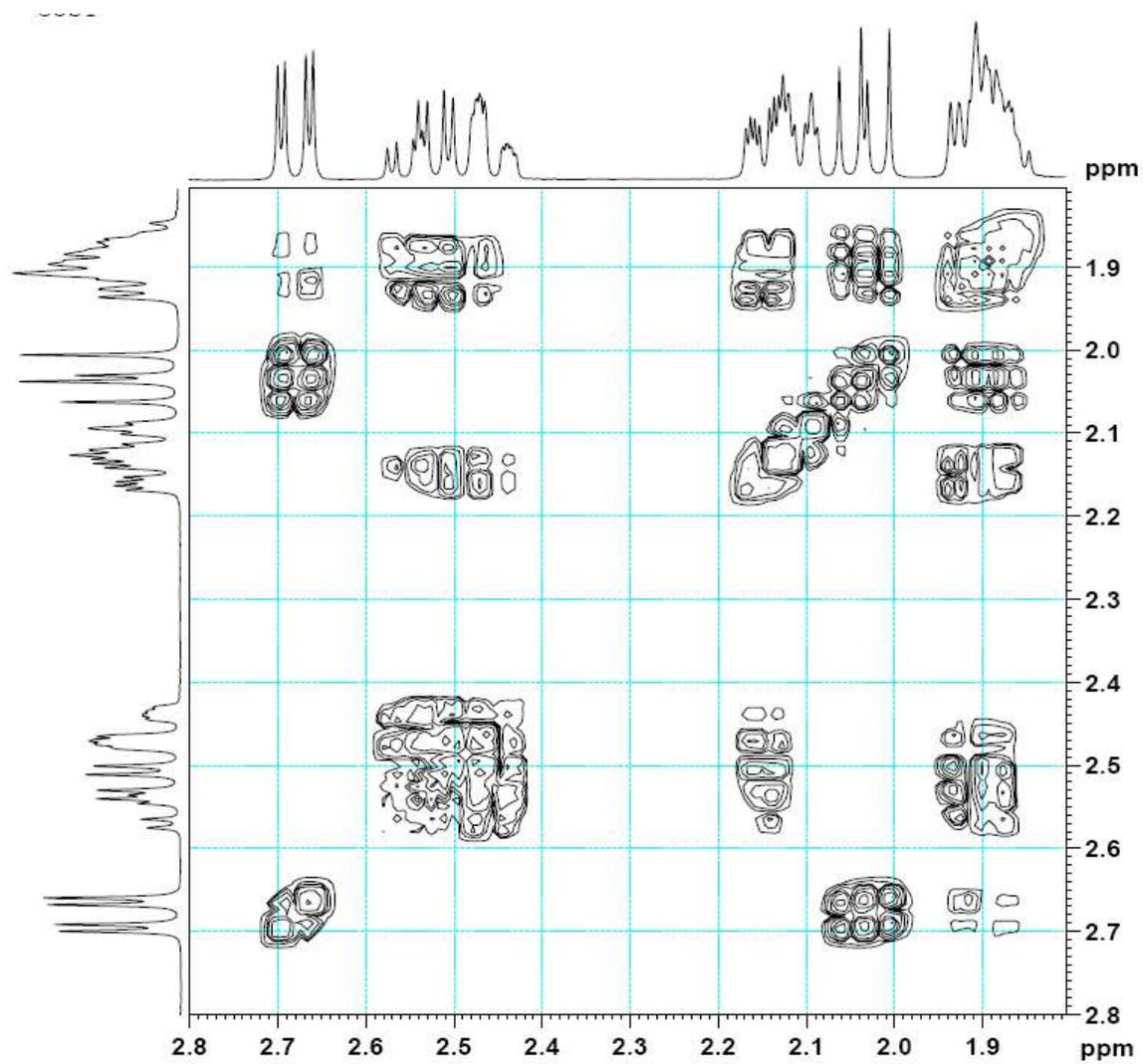
Espectro HSQC da substância S1A em CDCl₃



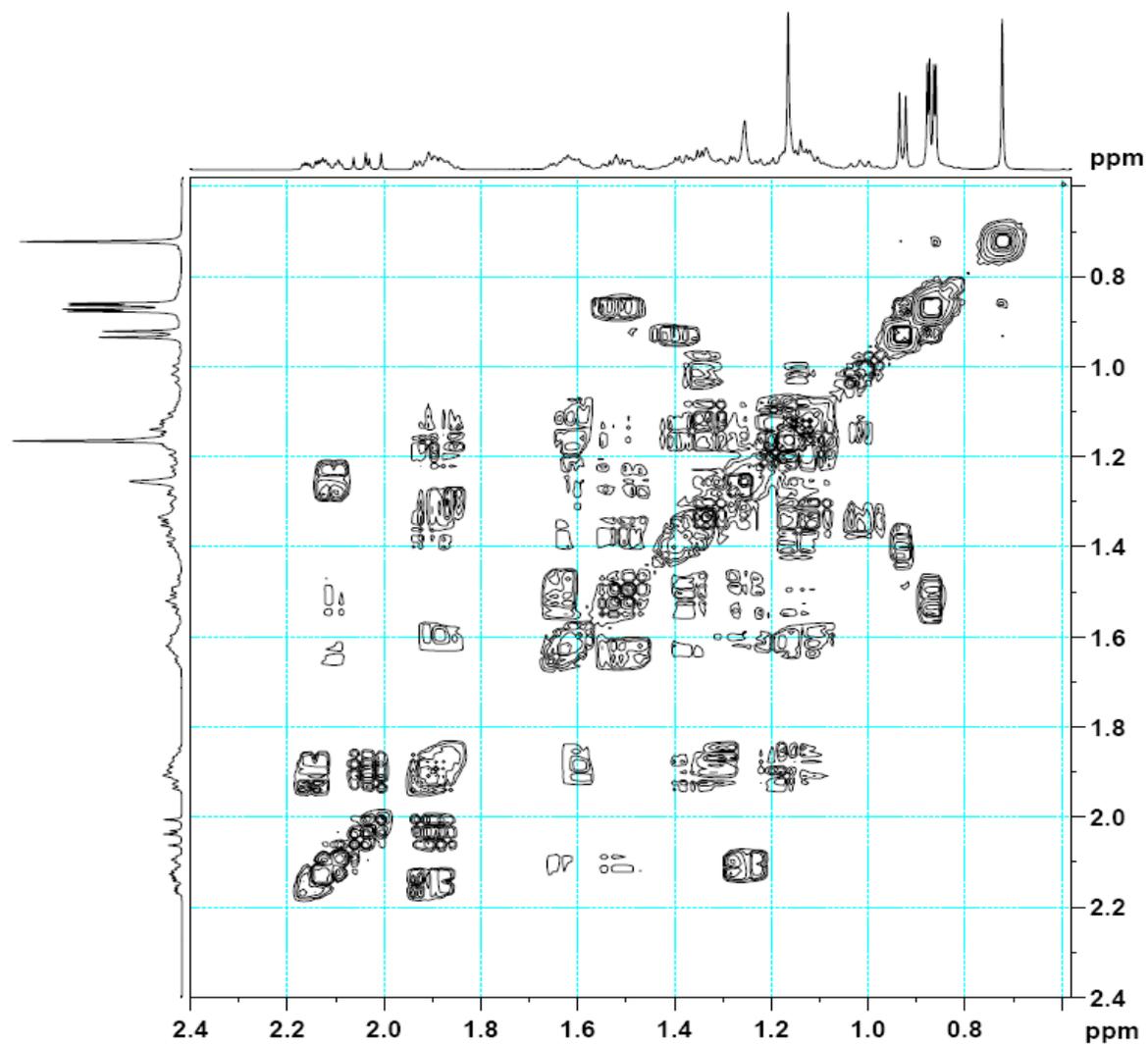
Espectro expandido HSQC da substância S1A em CDCl₃, região entre 2,8 e 0,5 ppm.



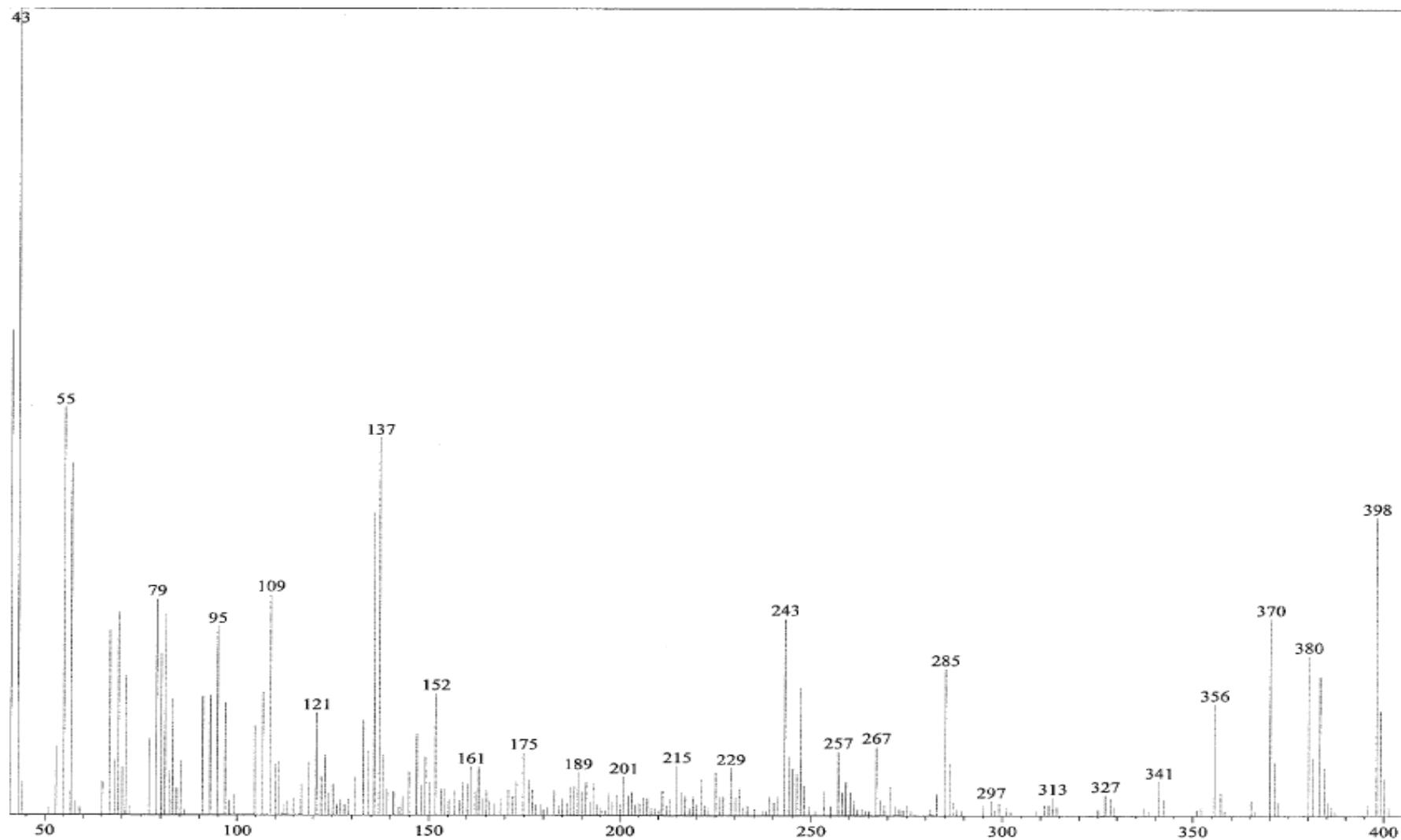
Espectro $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY da substância S1A em CDCl_3



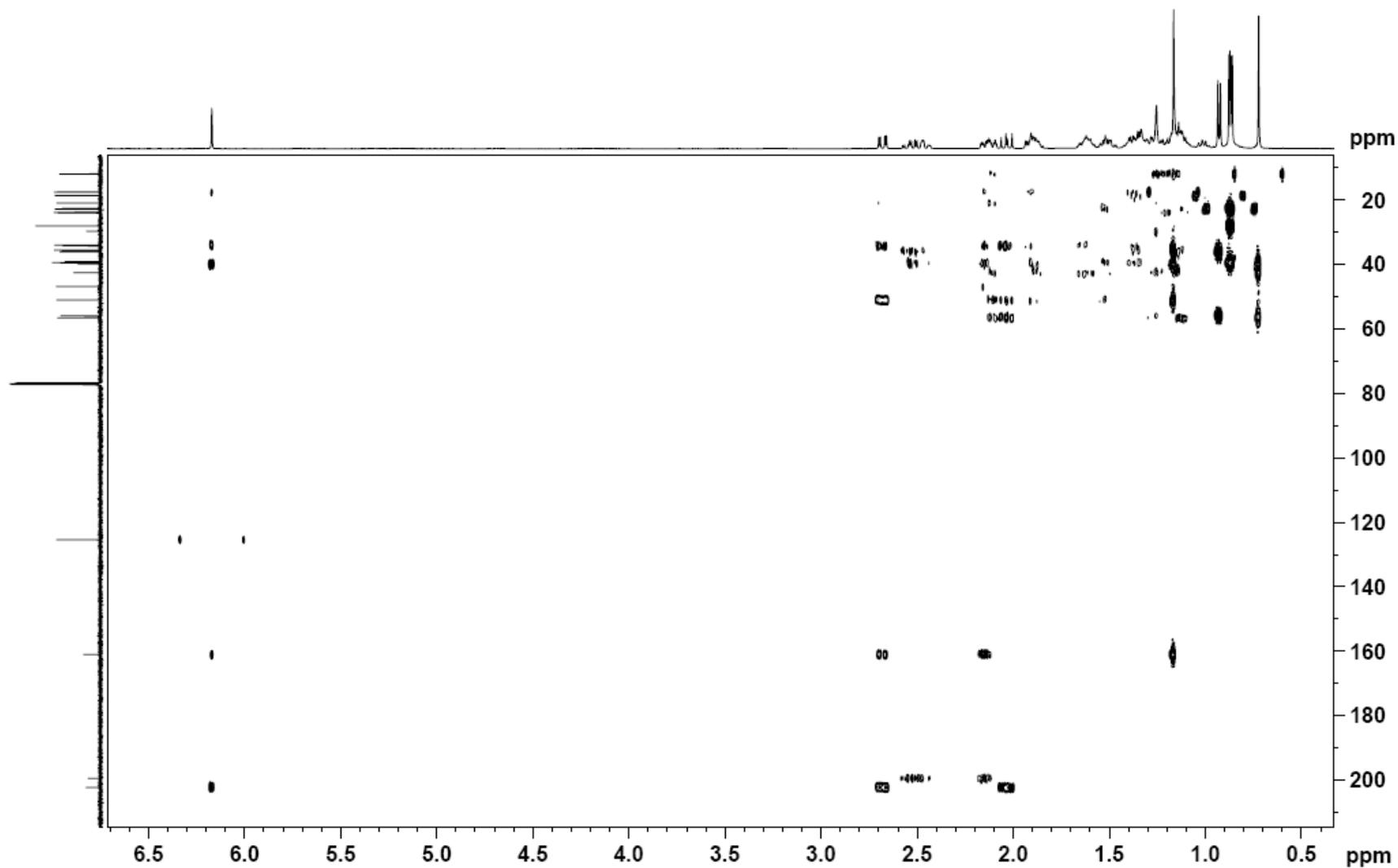
Espectro expandido ^1H - ^1H -COSY da substância S1A em CDCl_3 , região entre 2,8 e 1,8 ppm.



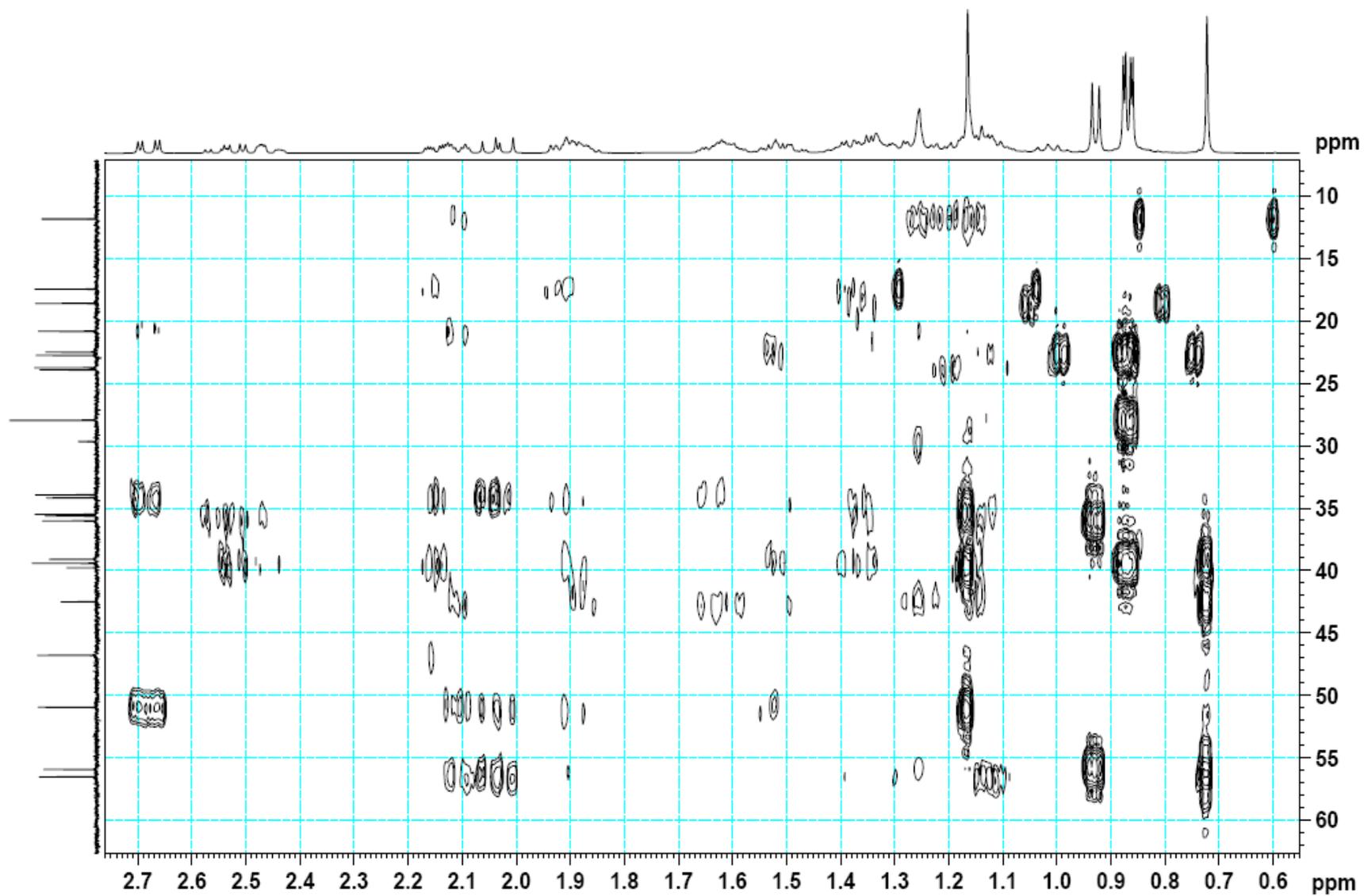
Espectro expandido ^1H - ^1H -COSY da substância S1A em CDCl_3 , região entre 2,4 e 0,6 ppm.



Espectro de massas da substância S1A

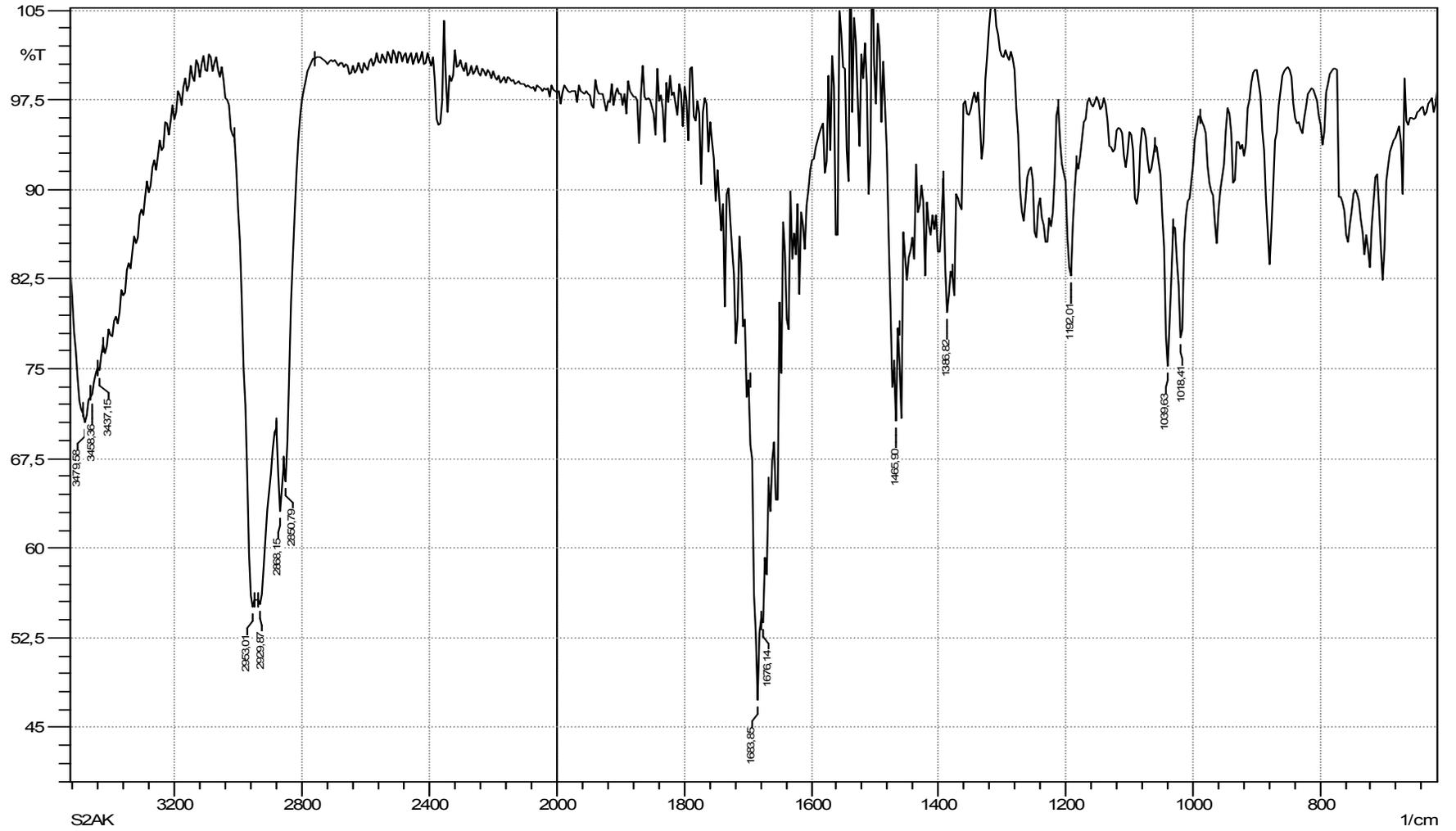


Espectro HMBC da substância S1A em CDCl₃

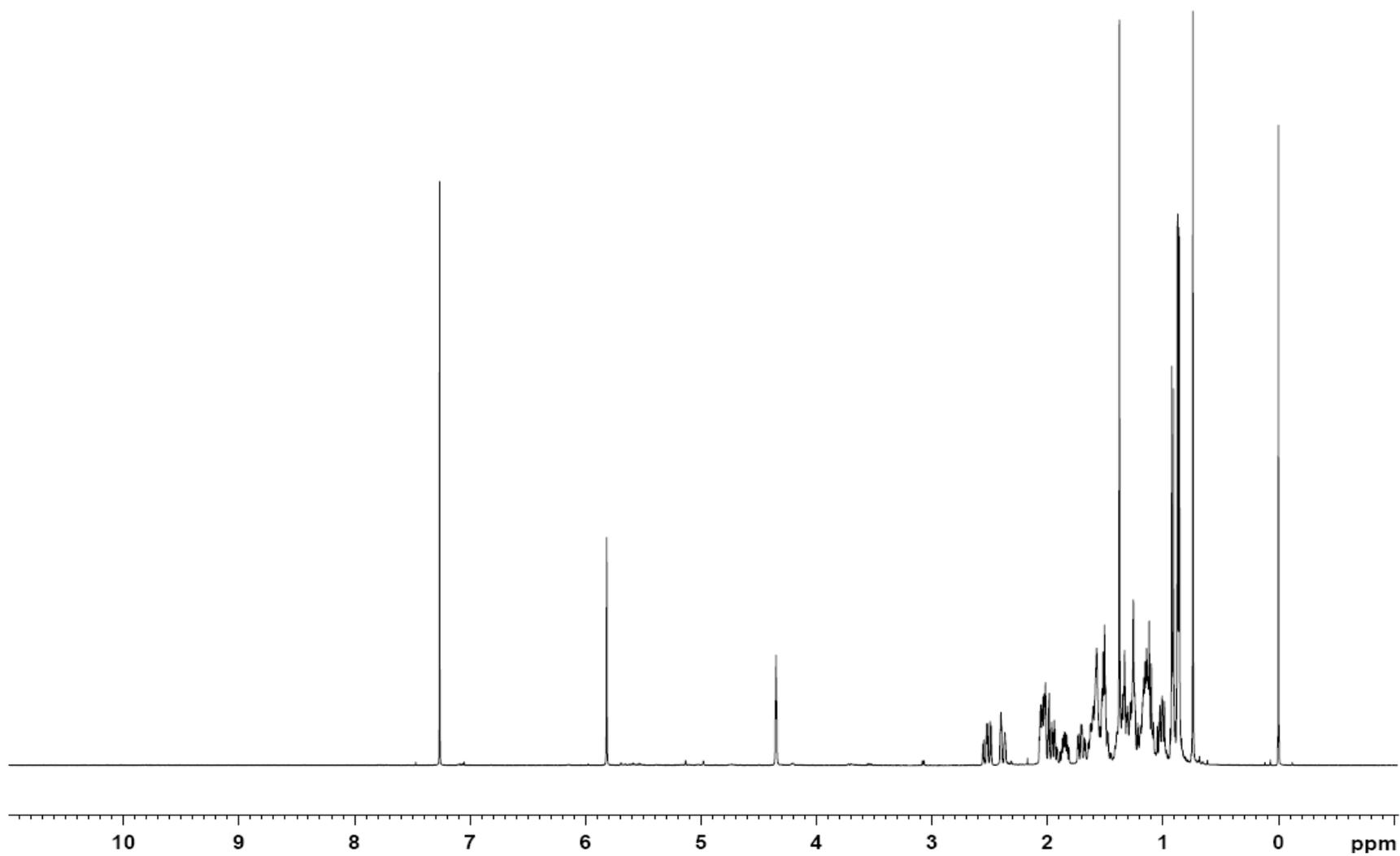


Espectro expandido HMBC da substância S1A em CDCl_3 , região entre 2,8 e 0,5 ppm.

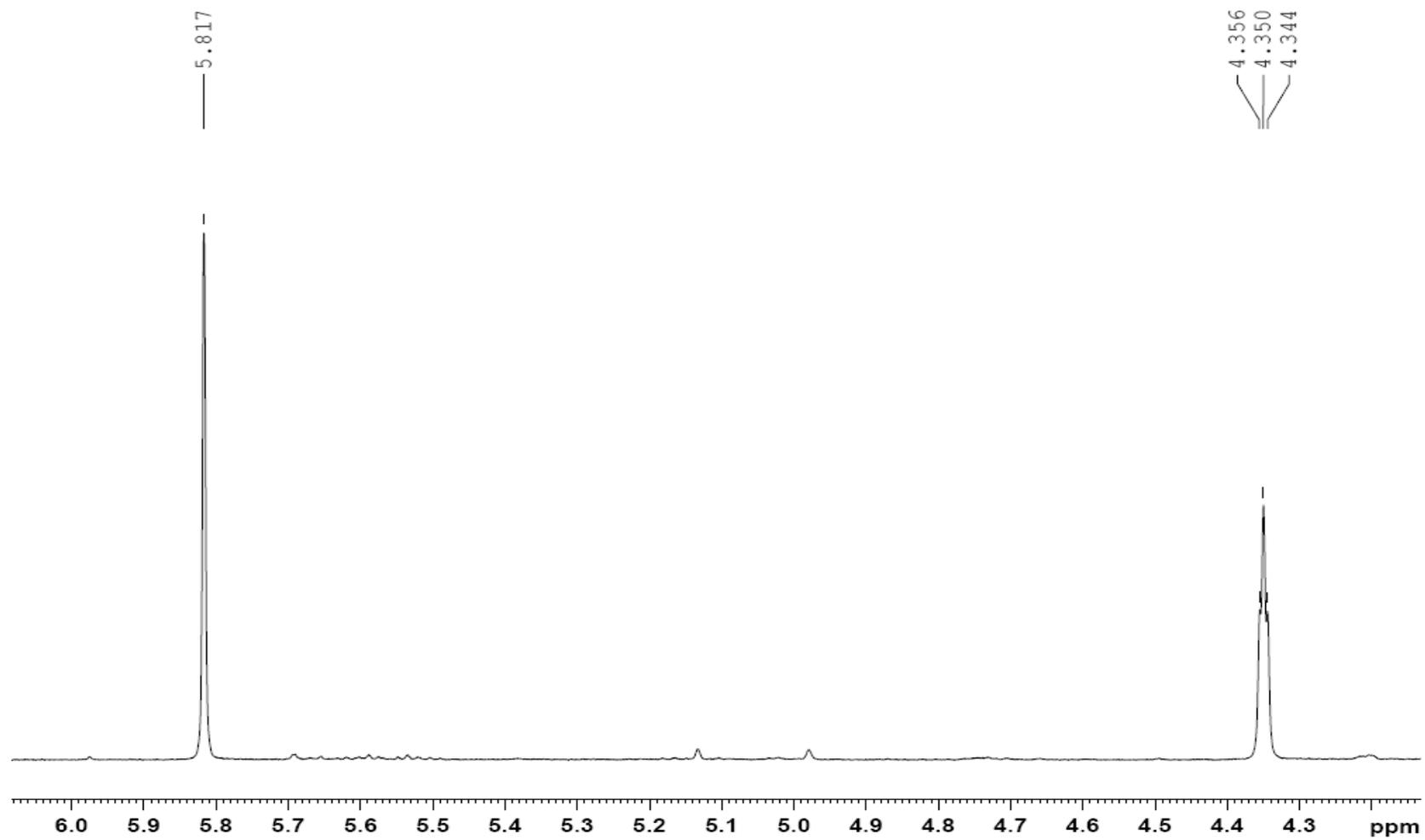
9.2. ANEXOS S2A



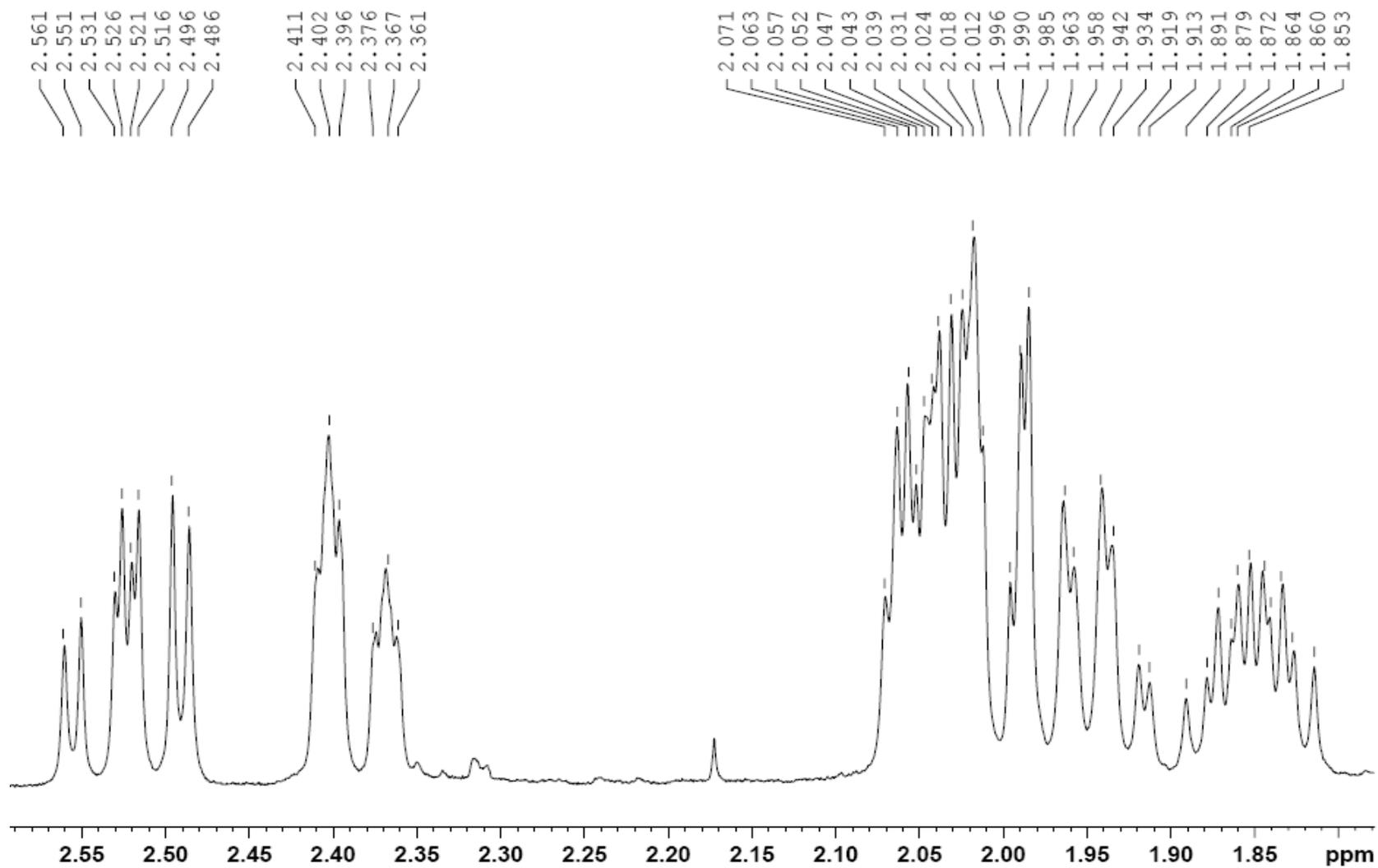
Espectro de IR da substância S2A, em pastilhas de KBr.



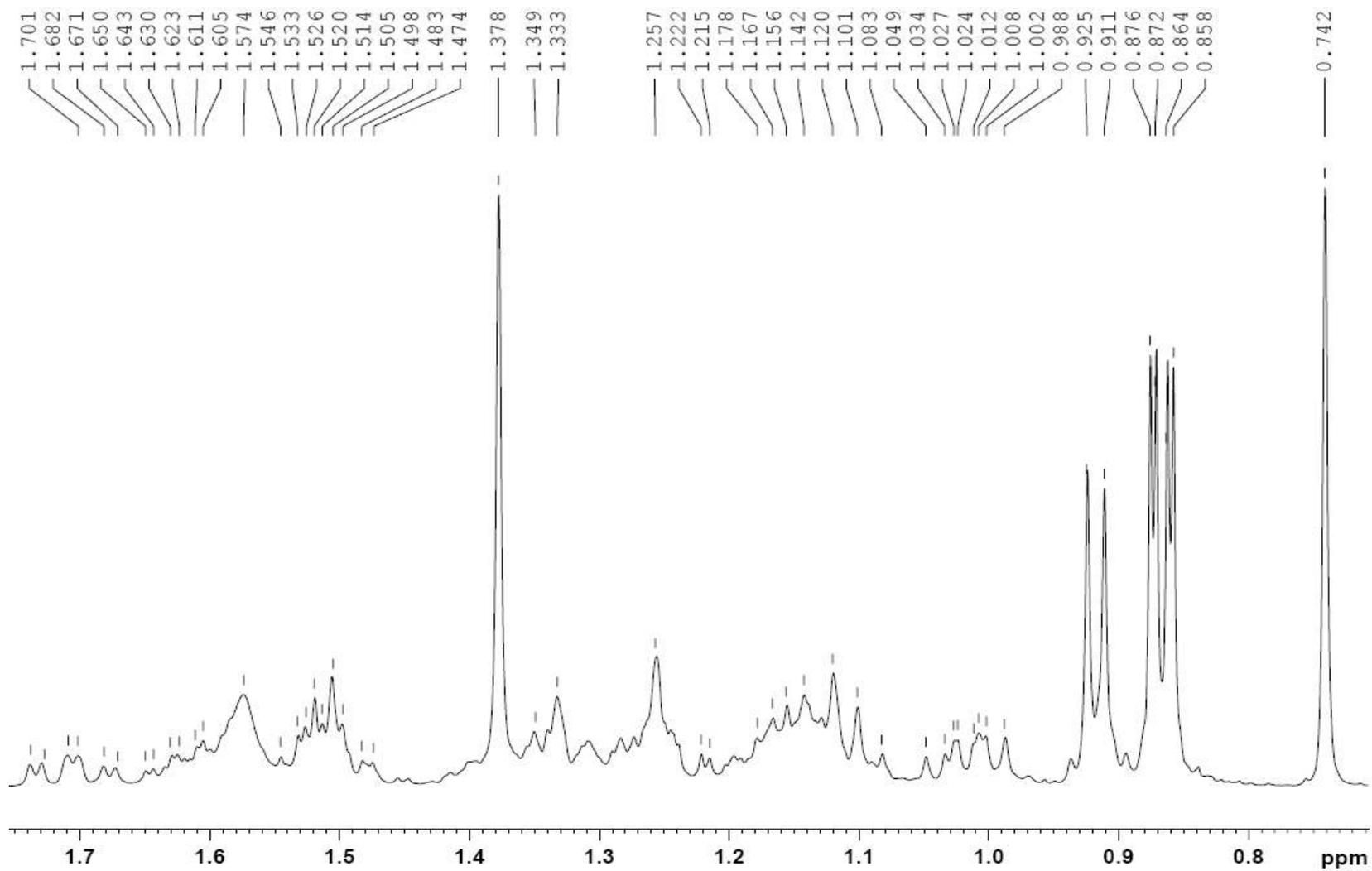
Espectro RMN ^1H da substância S2A em CDCl_3 .



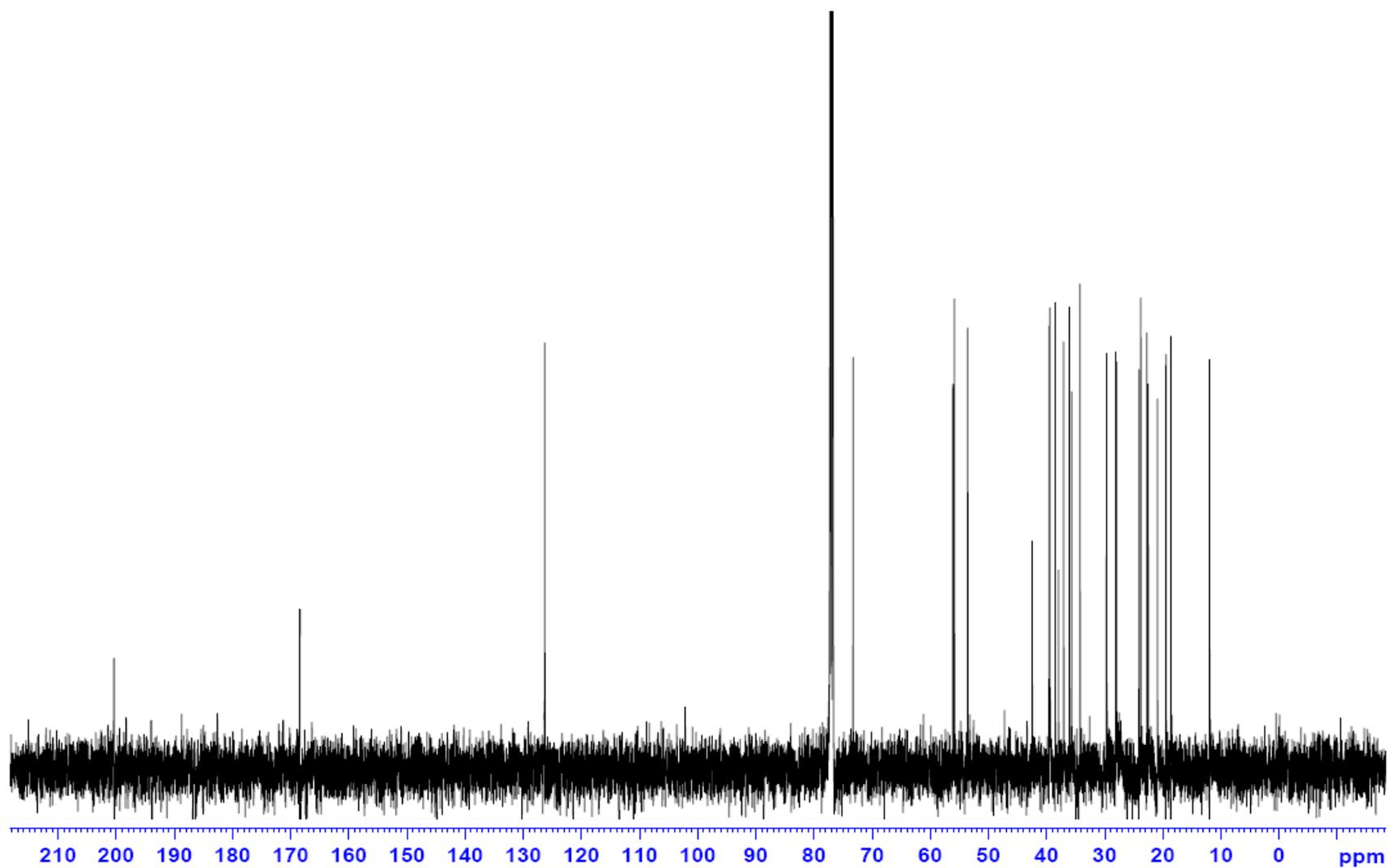
Espectro expandido de RMN ^1H da substância S2A em CDCl_3 , região entre 6,1 e 4,1 ppm.



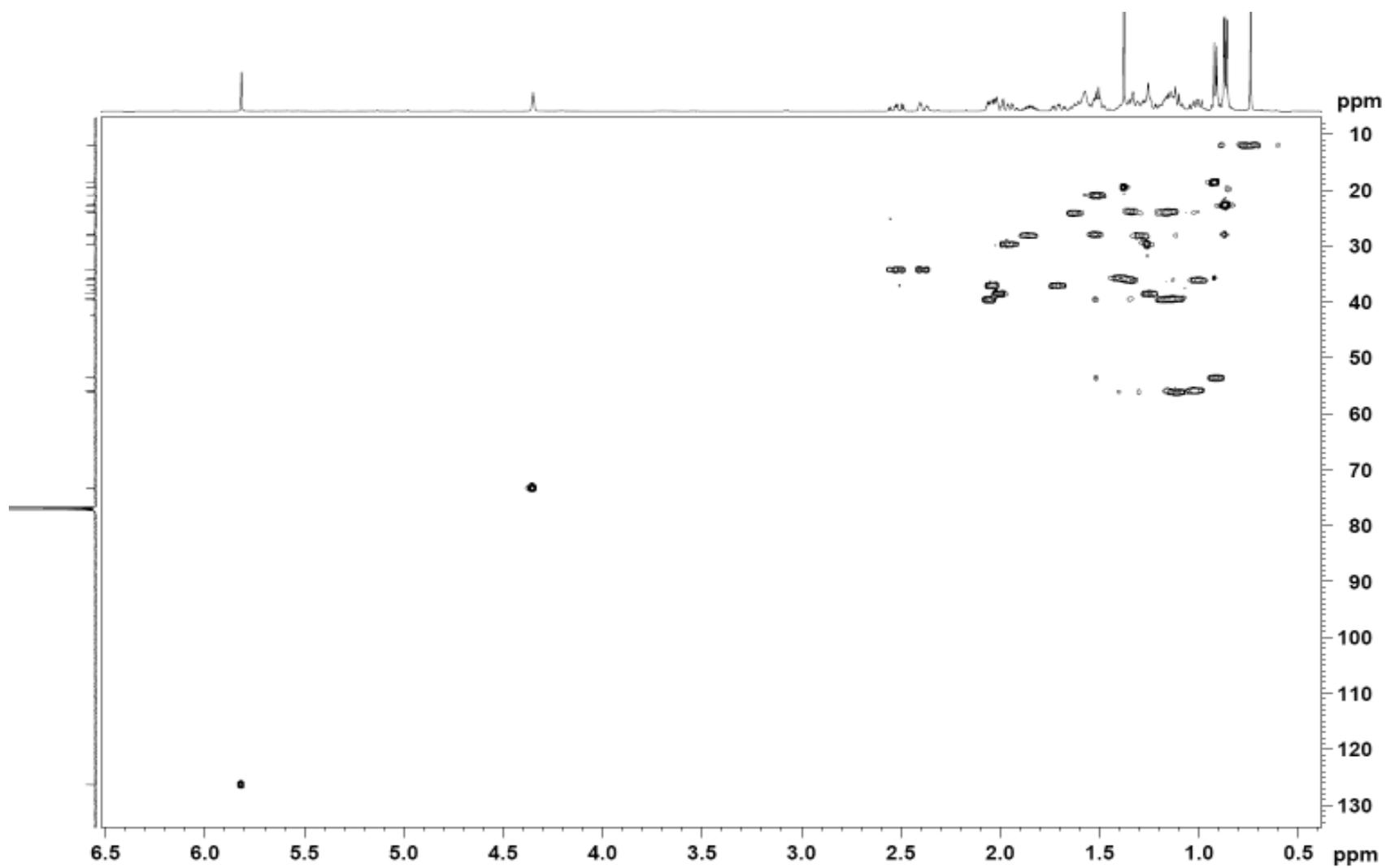
Espectro expandido de RMN ^1H da substância S2A em CDCl_3 , região entre 2,6 e 1,8 ppm.



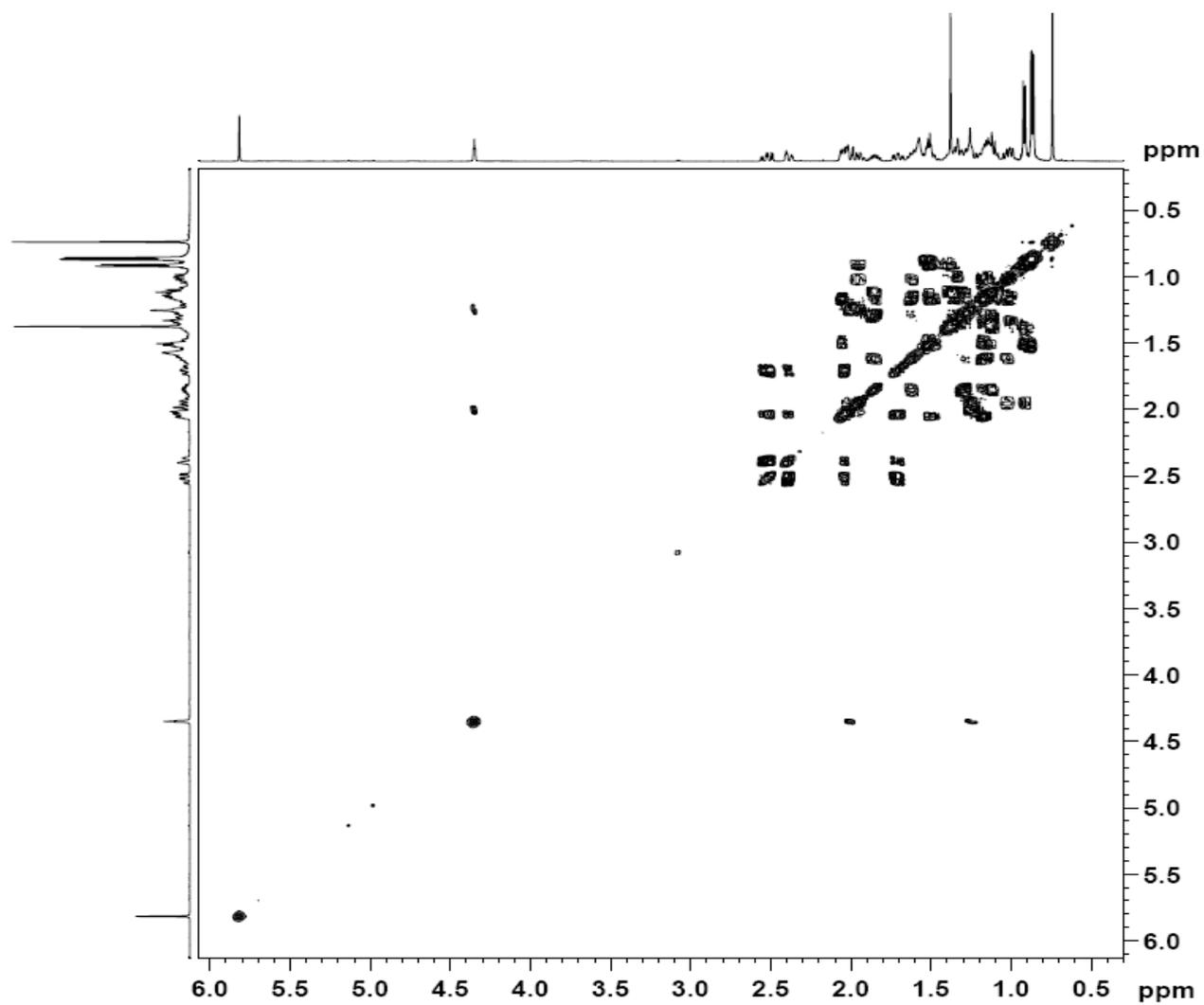
Espectro expandido de RMN ^1H da substância S2A em CDCl_3 , região entre 1,7 e 0,7 ppm.



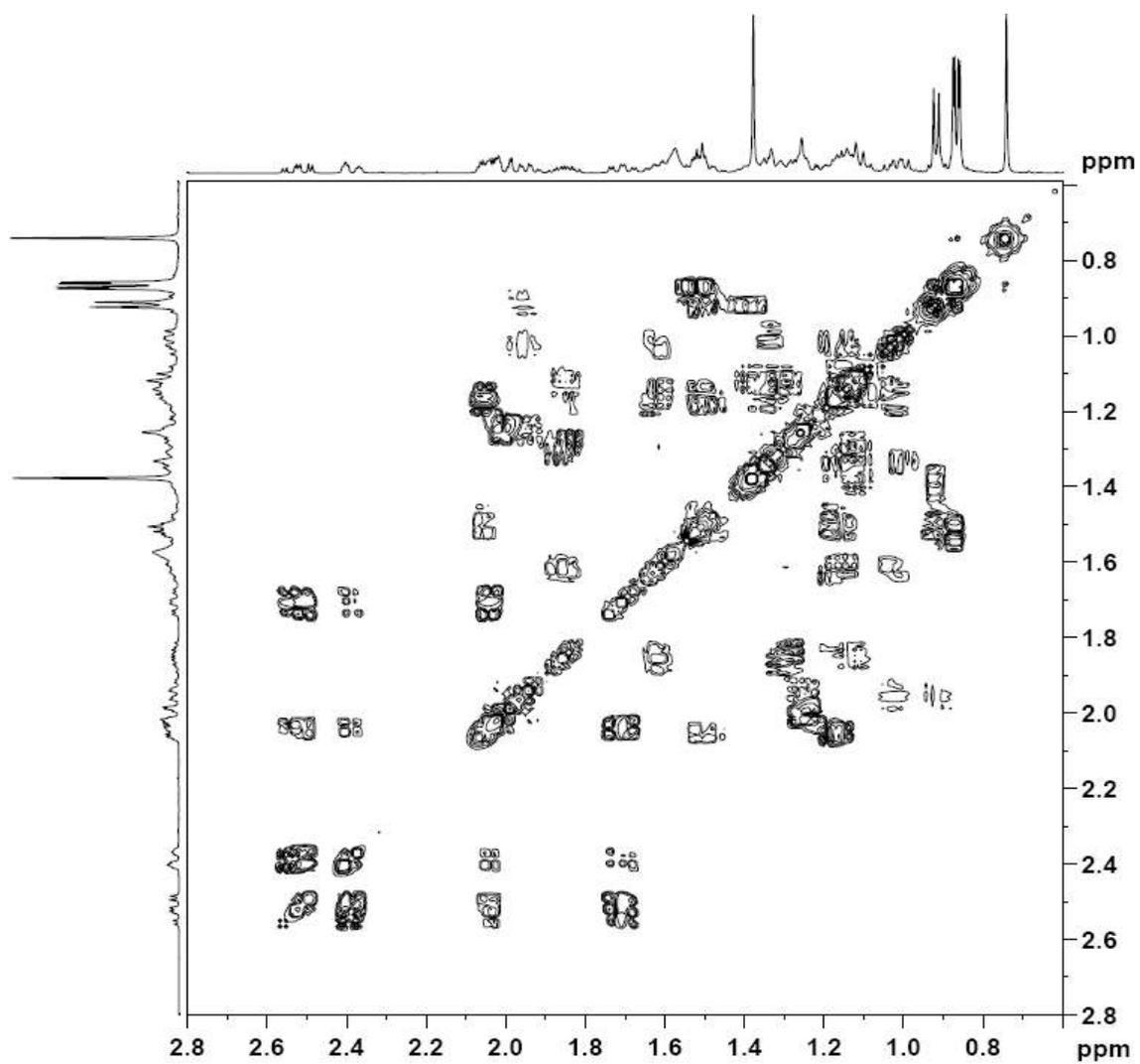
Espectro de RMN ^{13}C da substância S2A em CDCl_3 .



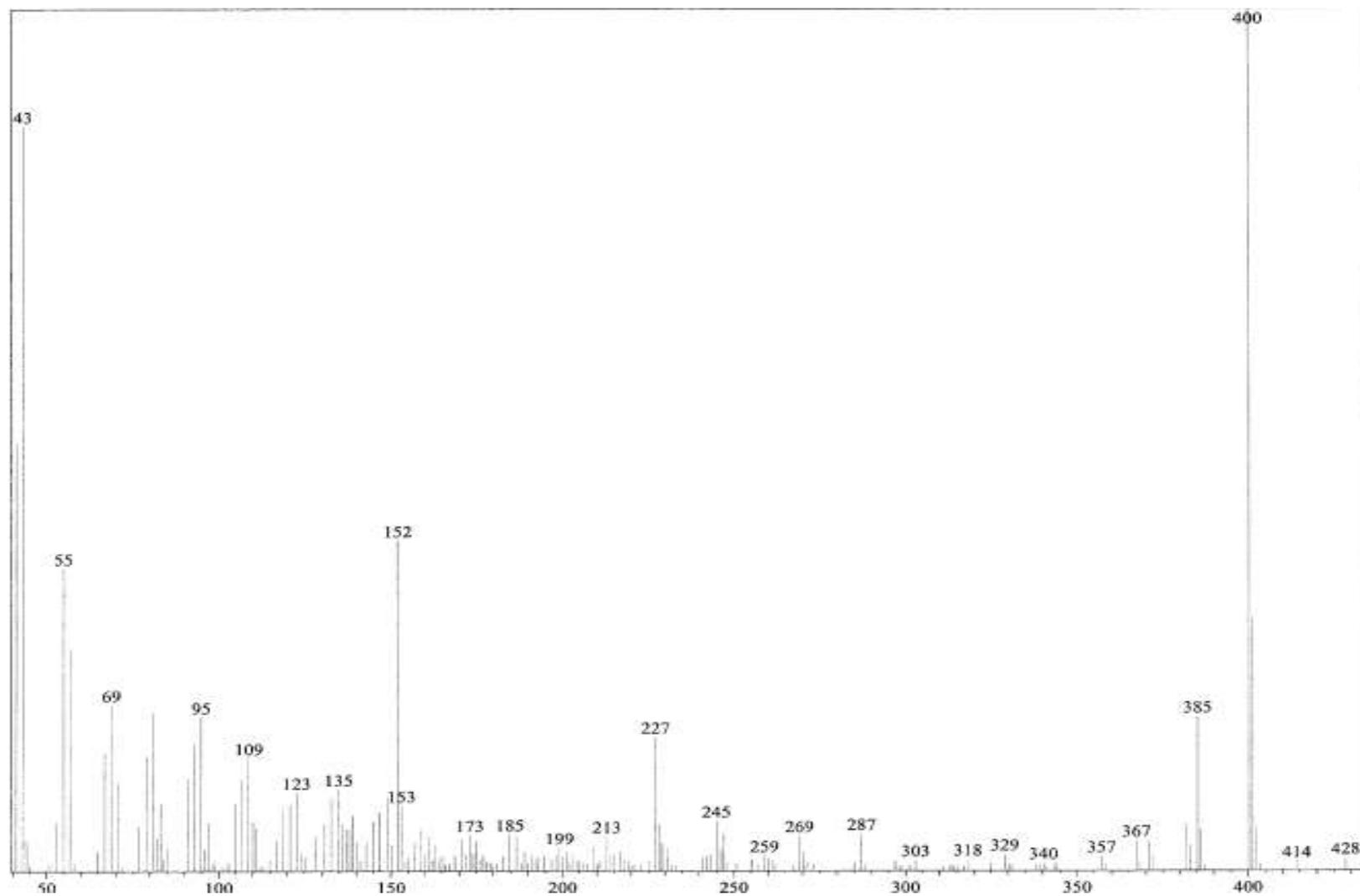
Espectro HSQC da substância S2A em CDCl₃



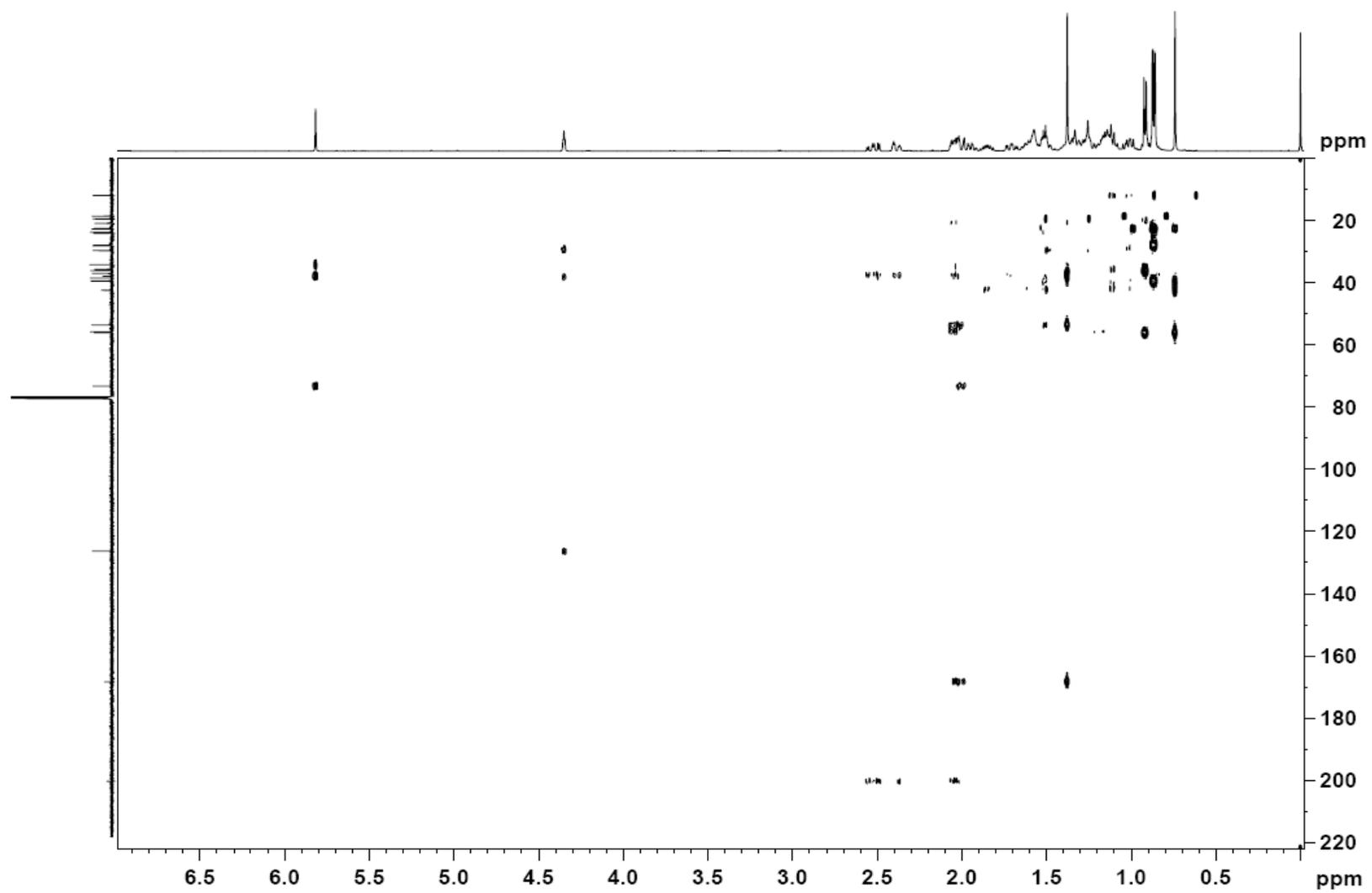
Espectro ^1H ^1H -COSY da substância S2A em CDCl_3

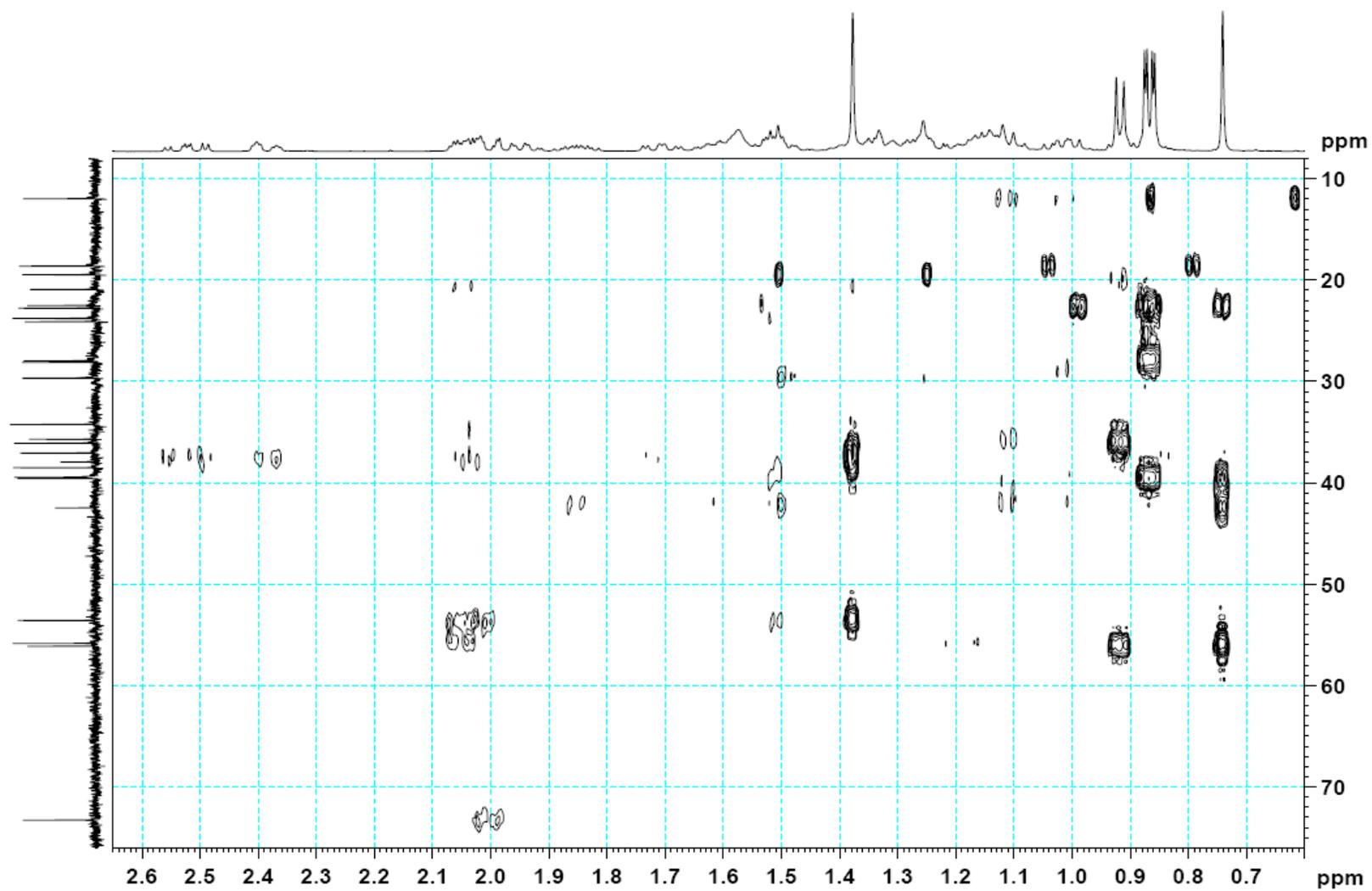


Espectro expandido $^1\text{H}^1\text{H}$ -COSY da substância S2A em CDCl_3 , região entre 2,8 e



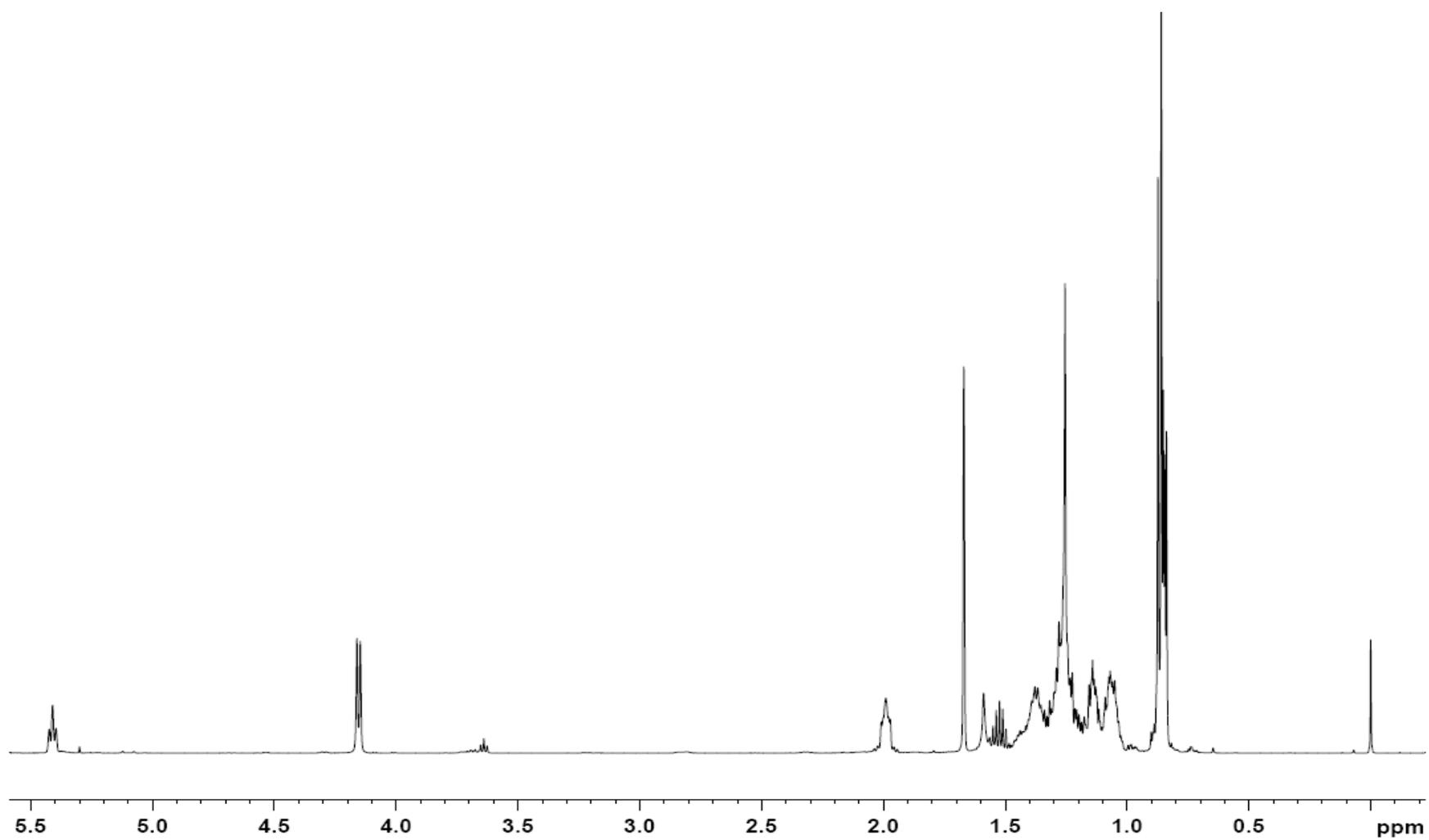
Espectro de massas da substância S2A

Espectro HMBC da substância S2A em CDCl₃

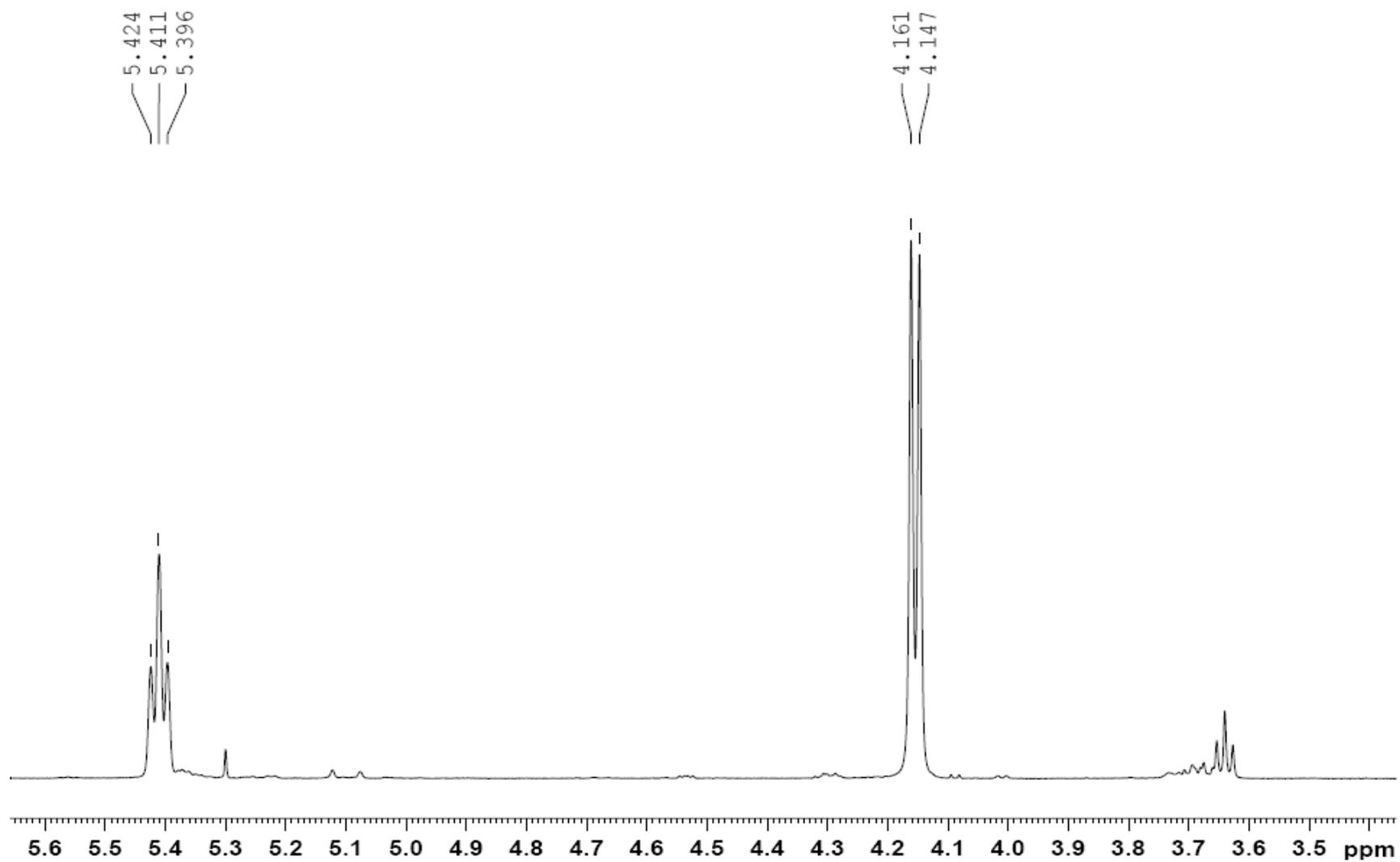


Espectro expandido HMBC da substância S2A em CDCl_3 , região entre 2,7 e 0,6 ppm.

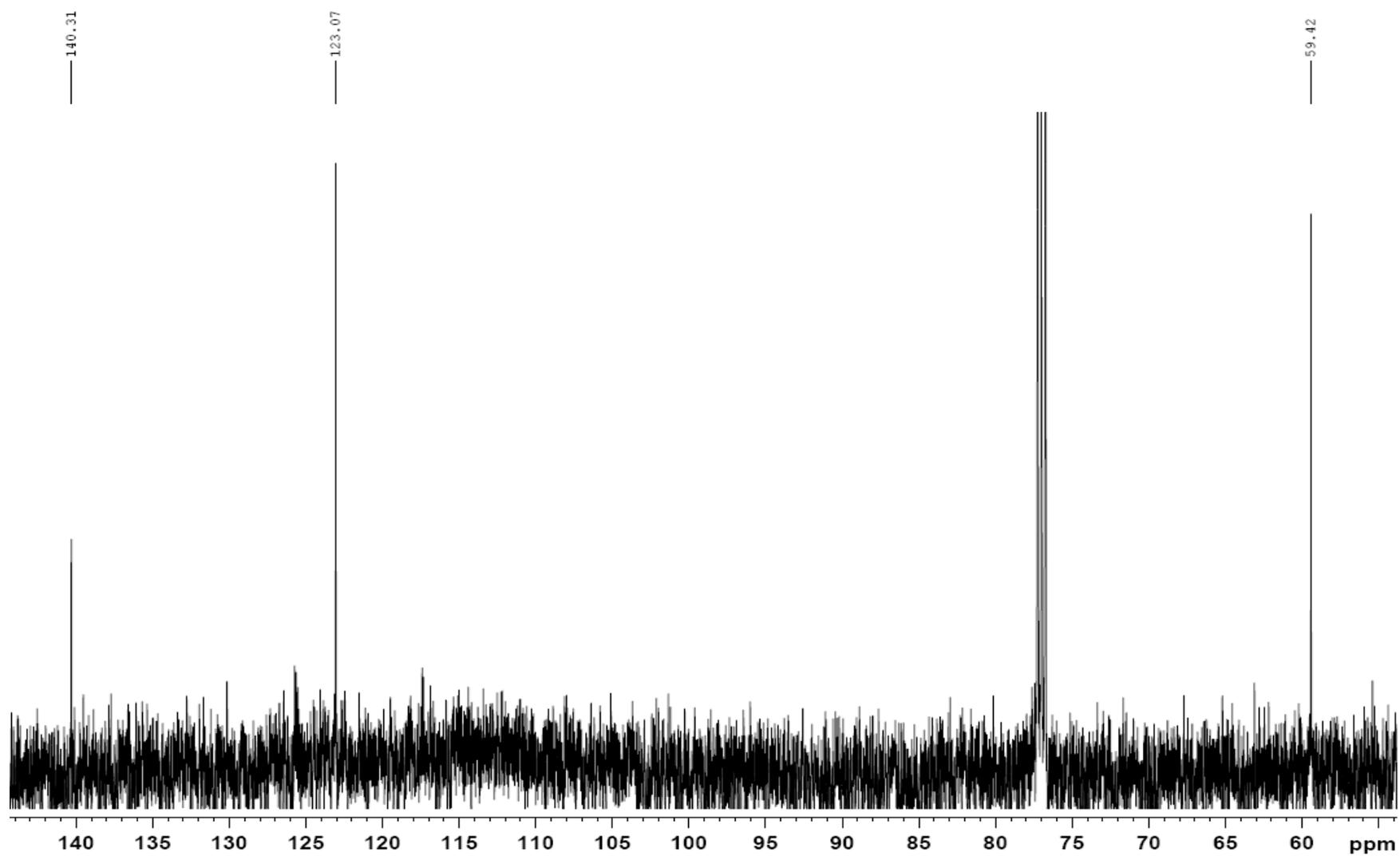
9.3. ANEXOS S5A



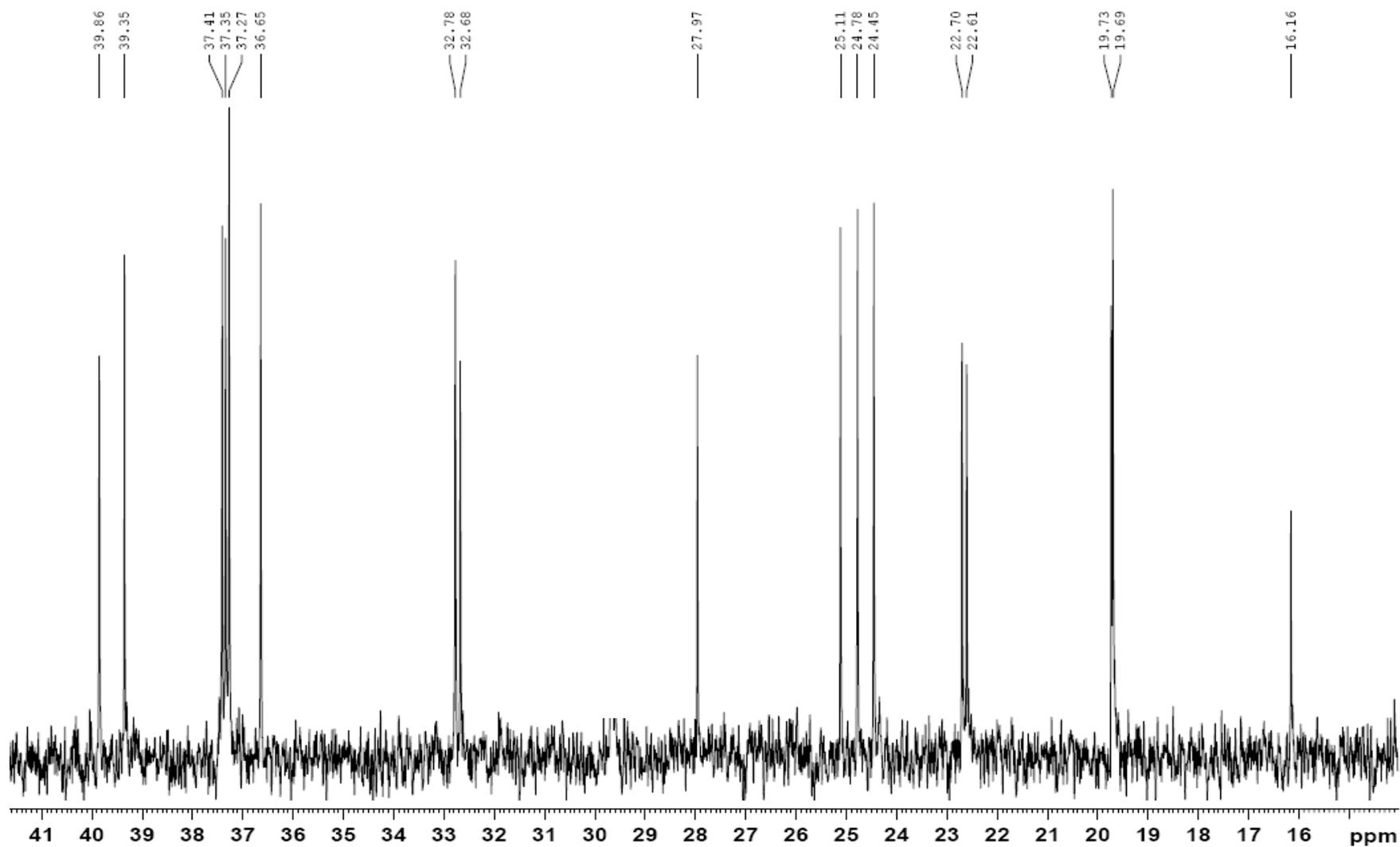
Espectro RMN ^1H da substância S5A em CDCl_3



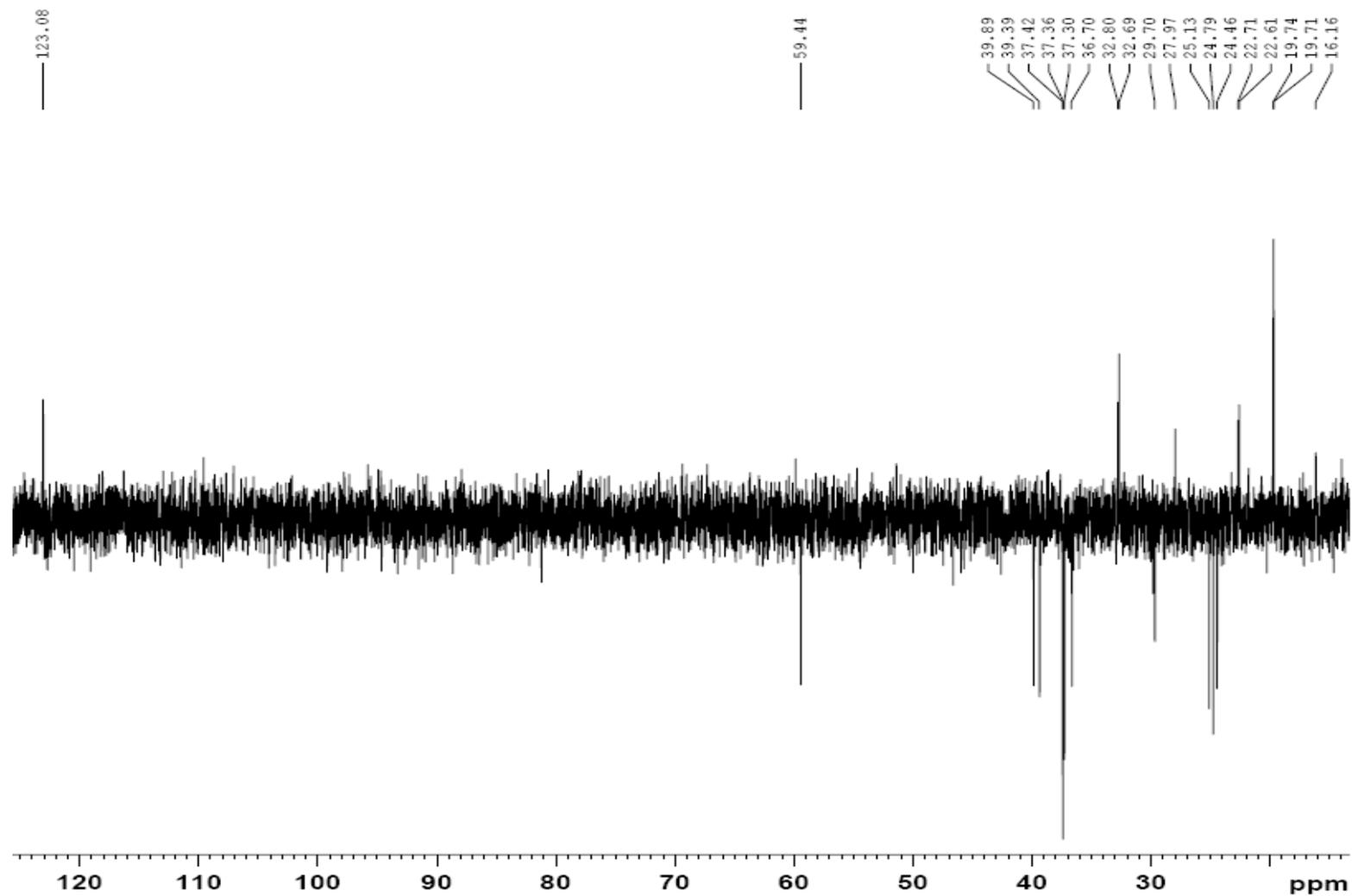
Espectro expandido de RMN ^1H da substância S5A em CDCl_3 , região entre 5,6 e 3,4 ppm.



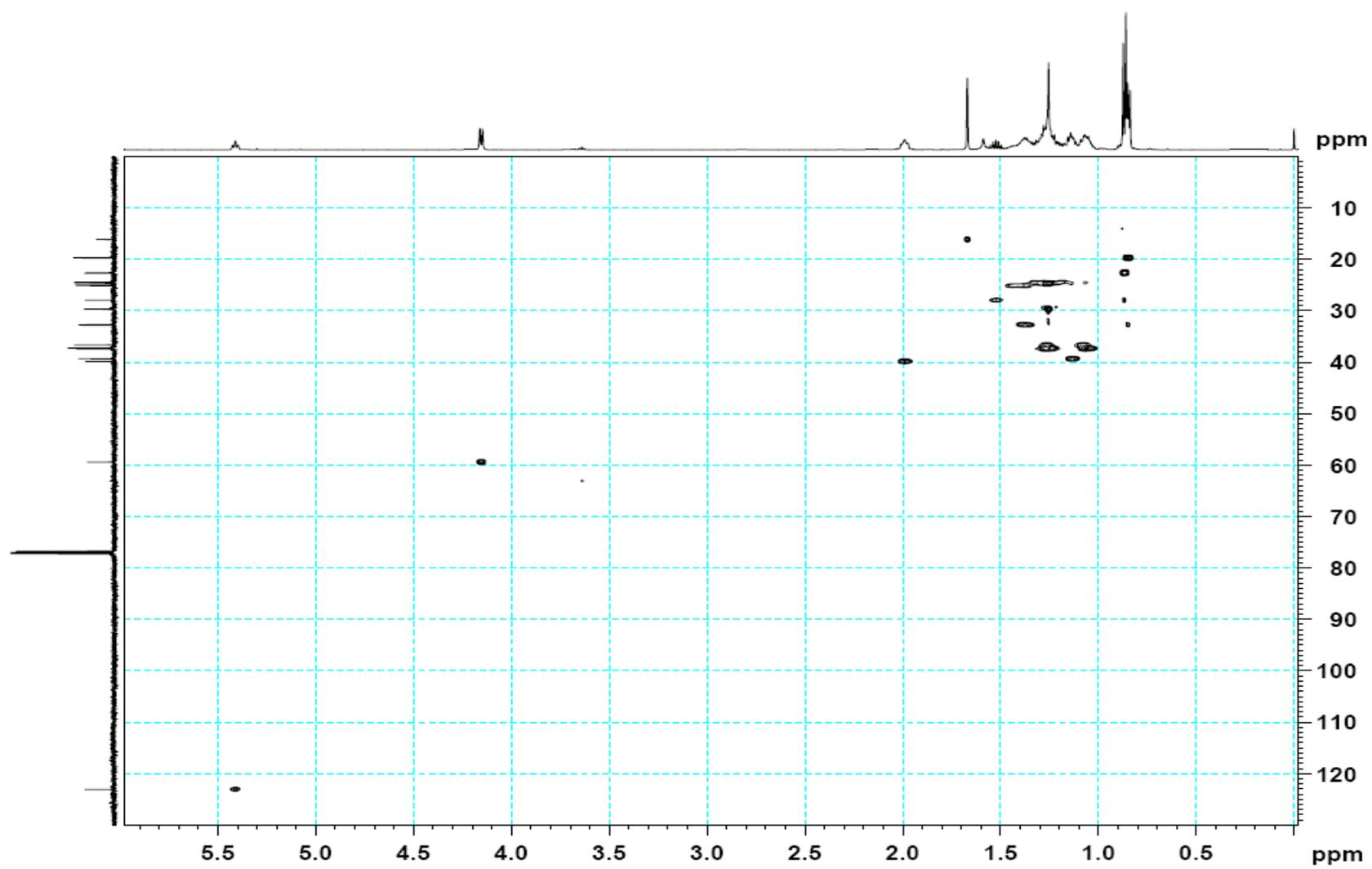
Espectro expandido de RMN ^{13}C da substância S5A em CDCl_3 , região entre 140 e 50 ppm.



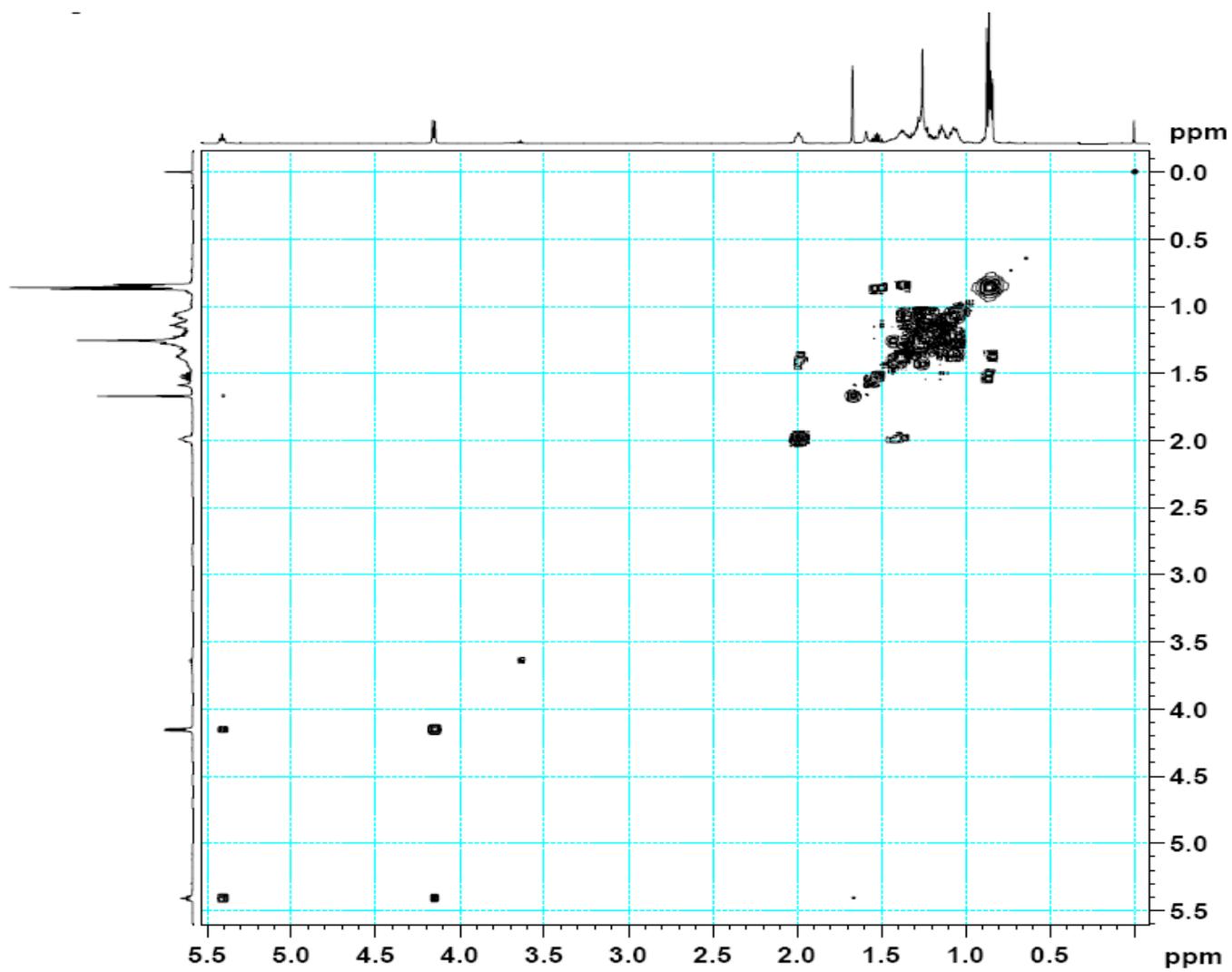
Espectro expandido de RMN ^{13}C da substância S5A em CDCl_3 , região entre 42 e 14 ppm.



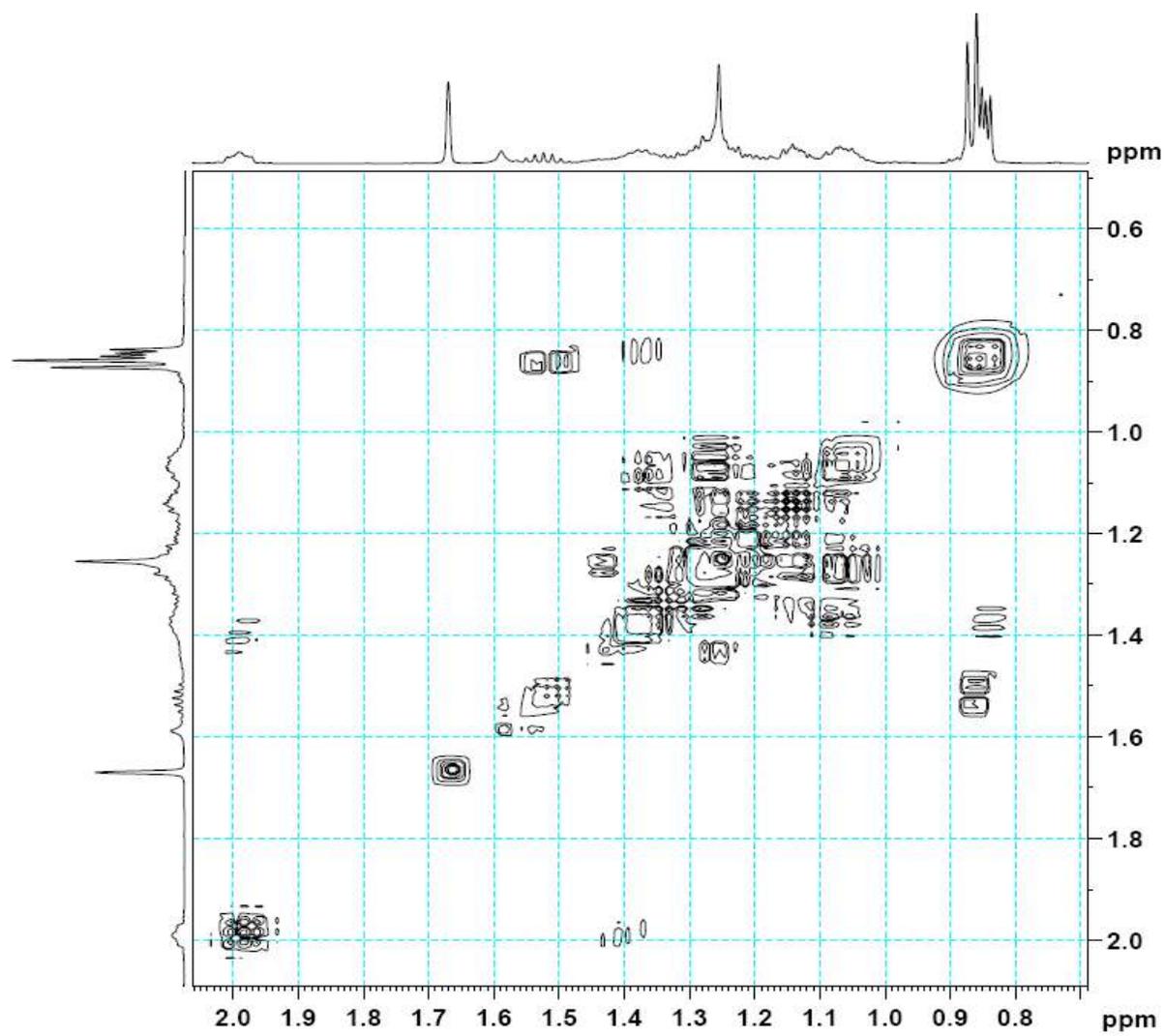
Espectro DEPT 135° da substância S5A em



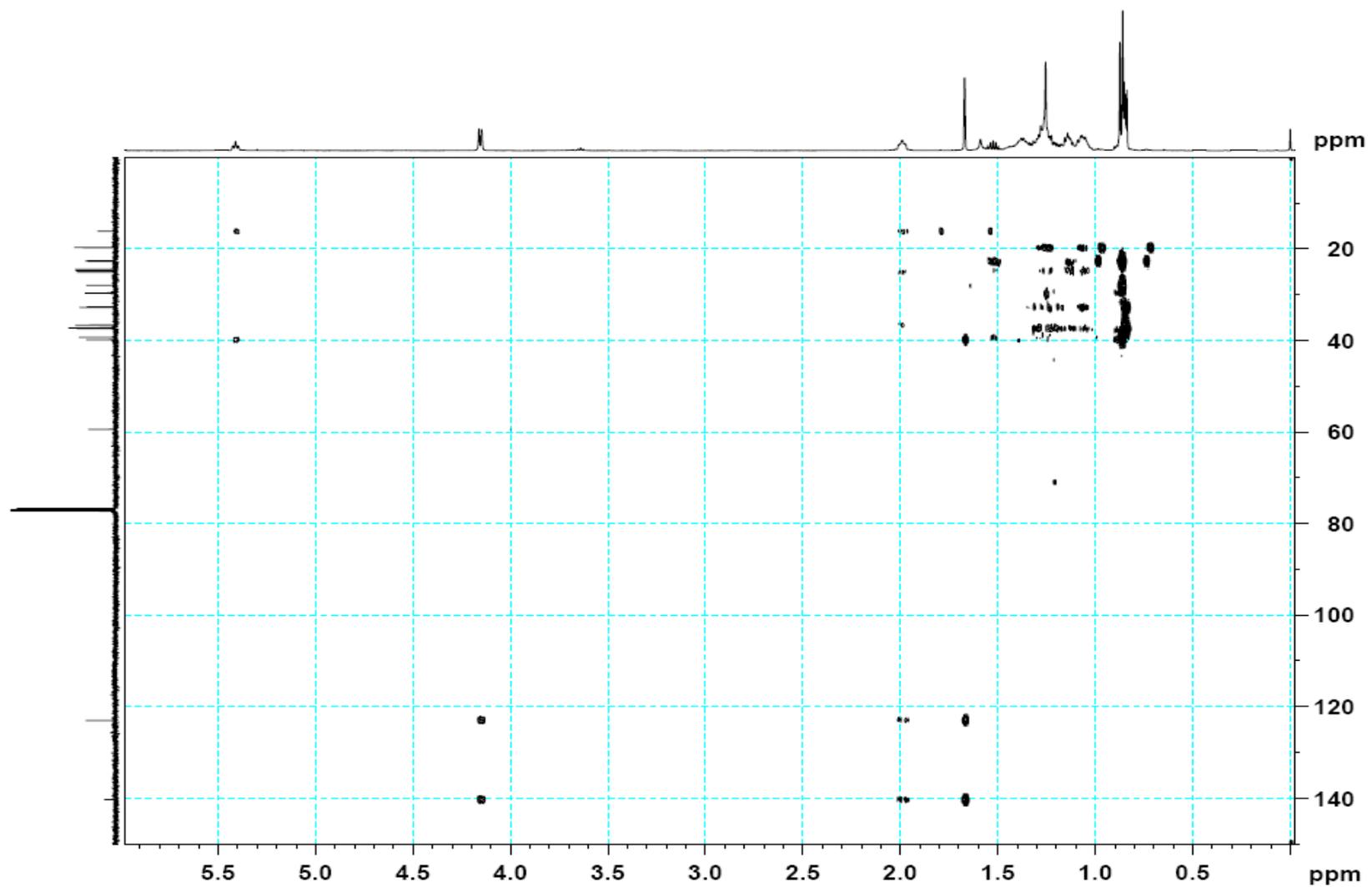
Espectro HSQC da substância S5A em CDCl_3

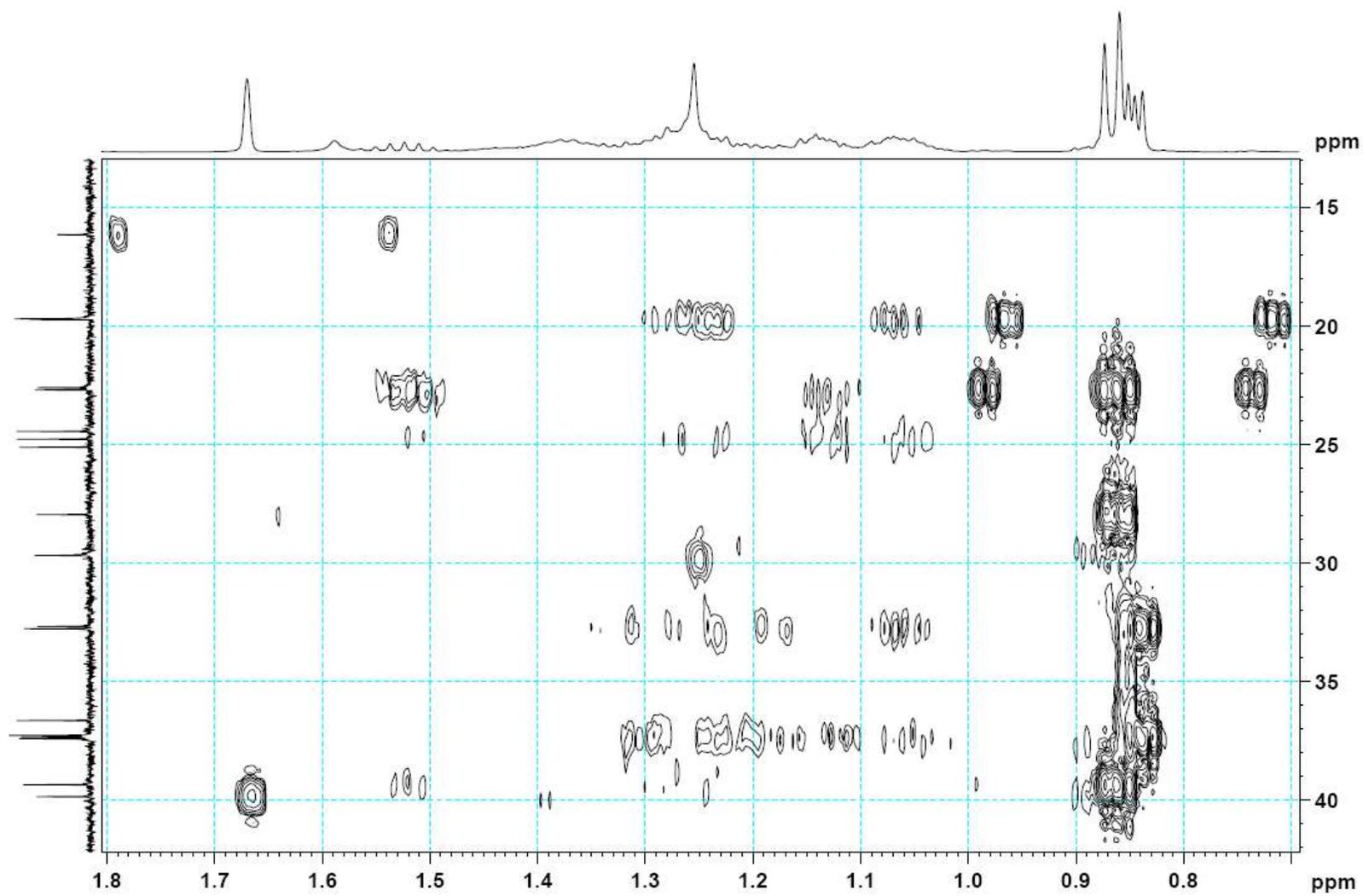


Espectro ^1H ^1H -COSY da substância S5A em CDCl_3



Espectro ^1H ^1H -COSY da substância S5A em CDCl_3 , região entre 2,0 e 0,7

Espectro HMBC da substância S5A em CDCl₃



Espectro HMBC da substância S5A em CDCl₃, região entre 1,8 e 0,7