

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

DANIEL BARROSO DE ALENCAR

PROSPECÇÃO QUÍMICA DA MACROALGA MARINHA VERDE *Ulva fasciata* DELILE

FORTALEZA

2010

DANIEL BARROSO DE ALENCAR

PROSPECÇÃO QUÍMICA DA MACROALGA MARINHA VERDE *Ulva fasciata* DELILE

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Pesca.

Orientadora: Prof^a Dr^a Silvana Saker-Sampaio

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Arnaldo Viana

FORTALEZA

2010

A353p Alencar, Daniel Barroso de
Prospecção química da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* Delile/
Daniel Barroso de Alencar, 2010.
68 f. ;il. color. enc

Orientadora: Profa. PhD. Silvana Saker-Sampaio
Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Arnaldo Viana
Área de concentração: Recursos Pesqueiros
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro
de Ciências Agrárias. Depto. de Engenharia de Pesca , Fortaleza, 2010.

1. Compostos bioativos 2. Produtos naturais marinhos 3. Hexadecanoato
de etila I. Saker-Sampaio, Silvana (orient.). II. Viana, Francisco Arnaldo
(co-orient.). III. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de Pesca. IV. Título.

CDD 639.2

DANIEL BARROSO DE ALENCAR

PROSPECÇÃO QUÍMICA DA MACROALGA MARINHA VERDE *Ulva fasciata* DELILE

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Pesca.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Silvana Saker-Sampaio, Ph.D. (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará

Prof. Francisco Arnaldo Viana, D.Sc. (Co-orientador)

Universidade do Estado do Rio Grande do Norte

Prof. Alexandre Holanda Sampaio, Ph.D.

Universidade Federal do Ceará

A Deus.

Ao meu amor por minha família.

Aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, e a espiritualidade maior, pelo dom da vida, pelos bons pensamentos, coragem e perseverança durante caminhada em minha vida.

Aos meus pais, Gilberto Monteiro de Alencar e Angela Maria Barroso de Alencar, ao meu irmão Gilberto Monteiro de Alencar Júnior e a minha cunhada Livia de Paulo Pereira de Alencar, pelo apoio, amor, incentivo e por sempre estarem comigo nos momentos mais felizes da minha vida.

A professora Silvana Saker-Sampaio pela orientação, amizade, confiança, dedicação, seriedade, paciência e principalmente por ter acreditado em mim contribuindo assim na minha formação científica e humana desde a graduação por ser um exemplo de disciplina e honestidade para a profissão e como cidadã.

Ao professor Francisco Arnaldo Viana da Faculdade de Ciências Naturais e Exatas da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, pela orientação, dedicação e amizade bem como pelas oportunidades concedidas para meu aperfeiçoamento acadêmico, as quais têm me permitido acessar novos campos de estudo.

Ao professor Alexandre Holanda Sampaio pela amizade por ser um dos incentivadores que me fizeram procurar uma nova linha pesquisa, e sempre nos proporcionando boas condições de trabalho no laboratório BIOMAR – HPLC, em uma época de trevas sem projetos.

Ao professor Jaécio Carlos Diniz da Faculdade de Ciências Naturais e Exatas da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, pela amizade e valiosas contribuições, que foram de grande importância para a realização deste trabalho, me repassando parte do seu conhecimento sobre técnicas cromatográficas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), por ter financiado este projeto de pesquisa e pela concessão de bolsa para a realização deste trabalho.

A minha amiga iluminada Kelma Maria dos Santos Pires-Cavalcante, uma pessoa abençoada que Deus colocou no meu caminho e sou agradecido do fundo do meu coração por ela ter entrado na minha vida.

A Márcia Barbosa de Sousa, Jefferson Pablo de Sousa Saboya e José Sousa Júnior pela amizade e companheirismo durante toda a trajetória acadêmica.

Aos amigos valiosos que fiz no laboratório de Produtos Naturais da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Adriana Paula Batista dos Santos, Jéssica Souza Marques, Ivan Bandeira de Oliveira, Gustavo Thalmer de Medeiros e Silva, Fernanda Maria de Oliveira, Jéssica Nayara Costa e Silva, Rosineide Irismar da Silva, Franciel Aurealiano Bezerra, que me ajudaram na execução das técnicas cromatográfica.

A aluna de doutorado em Química Orgânica Maria da Conceição de Menezes Torres e a Professora Otília Deusdênia Pessoa, ambas da Universidade Federal do Ceará, por me ajudarem a levar as amostras para Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) para a caracterização estrutural delas.

Aos companheiros do curso de mestrado, com quem compartilhei experiências inesquecíveis e valiosas

A Rogéria Maria de Oliveira Setúbal, secretária do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, pela a sua eficiência, atenção e consideração.

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais volta ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

As macroalgas marinhas são consideradas fontes promissoras de compostos bioativos para estudos fitoquímicos. Tais compostos possuem diferentes propriedades biológicas, funcionando como antibacterianos, antifúngicos, antivirais, anti-inflamatórios, anti-helmínticos, antileishmaniose, antimalária, antioxidantes, antitumorais cuja utilização como fármacos tem despertado o interesse de muitos pesquisadores. O objetivo deste trabalho foi realizar a investigação fitoquímica do extrato etanólico da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*. O material foi coletado em abril de 2008, na Praia do Pacheco, no município de Caucaia-CE. As macroalgas *in natura* foram desidratadas em estufa com recirculação de ar a 40°C por 15 horas e, em seguida, trituradas, obtendo-se 500 g, os quais foram submetidos primeiramente a uma extração a frio com hexano (UFH), e posteriormente com etanol a 70% (UFE). Para o isolamento e a purificação dos constituintes fixos foi empregada uma combinação de técnicas cromatográficas clássicas em que foram isolados UF-1, UF-2 e UF-3. Na amostra UF-1 foi observada a presença de um constituinte majoritário (86,17%) com tempo de retenção de 24,940 min, cujo espectro de massas o caracterizou por apresentar o íon molecular M^+ 284. A sugestão fornecida pela análise CG-EM e a comparação visual do espectro do composto analisado com os da literatura, bem como pela proposta mecanística de formação dos principais fragmentos reforçaram sua identificação como hexadecanoato de etila com um índice de similaridade de 96%. Os compostos UF-2 e UF-3 foram encaminhados para o Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará, para a determinação sua estrutura química através de técnicas espectroscópicas de RMN 1H e ^{13}C uni- e bidimensionais (1H , 1H -COSY, gs-HMQC, gs-HMBC, ROESY, NOESY e TOCSY), bem como por espectrometria de massa (EM).

Palavras-chave: Produtos naturais marinhos. *Ulva fasciata*. Hexadecanoato de etila.

ABSTRACT

Marine macroalgae have been considered promising sources of bioactive compounds. These compounds exhibit different biological properties, such as antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, antihelminthic, antileishmaniose, antimalaria, antioxidants, and antitumor. Their use as medicine has spurred the interest of many researchers. The objective of this work was to carry out a phytochemistry investigation of the ethanolic extract of green marine macroalga *Ulva fasciata*. The plant material was collected in April 2008 at Pacheco Beach, Caucaia-CE. Macroalgae *in natura* were dehydrated in an air-circulation oven at 40°C for 15 hours. After the drying process, the material was cut into small pieces. 500 grams were submitted to a cold extraction with hexane (UFH) followed by an extraction with 70% ethanol (UFE). Both isolation and purification from fixed constituents were performed using a combination of classic chromatographic techniques. Three samples were isolated and named UF-1, UF-2 and UF-3. The presence of a major constituent (86.17%) with retention time of 24.940 min was observed in the first sample (UF-1), and its mass spectrum was characterized by the molecular ion M^+ 284. The GC-MS analysis suggestion and the comparison of its spectrum with literature reinforce its identification as ethyl hexadecanoate with a similarity index of 96%. Compounds UF-2 and UF-3 have been taken to the Northeastern Center of Application and Use of Nuclear Magnetic Resonance (CENAUREMN) of Federal University of Ceara, to determine the chemical structure by spectroscopy techniques such as uni- and bidimensional (^1H , ^1H -COSY, gs-HMQC, gs-HMBC, ROESY, NOESY and TOCSY) ^1H -NMR and ^{13}C -NMR, as well as mass spectrometry (MS).

Keywords: Marine natural products. *Ulva fasciata*. Hexadecanoate ethyl.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Estruturas químicas dos nucleosídeos esponouridina (a), espongotimidina (b), adenina-arabinosídeo (c) e citosina-arabinosídeo (d) (BERGMANN; FEENEY, 1951). 19
- Figura 2. Estrutura química de um esteróide poli-hidroxiado isolado da gorgônia *Lophogorgia punicea* (EPIFÂNIO *et al.*, 1998). 20
- Figura 3. Macroalga marinha verde *Ulva fasciata* Delile. 22
- Figura 4. Estrutura química do 2-2(2',4'-dibromofenox)-4-6 dibromoanisol isolado da macroalga marinha verde *Cladophora fascicularis* (KUNIYOSHI; YAMADA; HIGA, 1985). 23
- Figura 5. Estrutura química do isorawsonol isolado da macroalga marinha verde *Arrainvilla rawsonii* (CHEN *et al.*, 1994). 23
- Figura 6. Estrutura química do halimedatrial (a) e halimedalactona (b), isolados da macroalga marinha verde *Halimeda* sp (PAUL; FENICAL, 1984). 24
- Figura 7. Estrutura química do halitunal isolado da macroalga marinha verde *Halimeda tuna* (KOEHN *et al.*, 1991). 24
- Figura 8. Estrutura química do iengarosídeo A isolado da macroalga marinha verde *Codium iyengarii* (ALI *et al.*, 2002). 25
- Figura 9. Estrutura química do *N*-palmitoil-2-amino 1,3,4,5-tetrahydroioctadecano isolado da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* (GARG *et al.*, 1992). 26
- Figura 10. Estrutura química do 3-O- β -D-glucopiranosil-estigmasta 5, 25 dieno isolado da macroalga marinha verde *Ulva lactuca* (AWAD, 2000). 27
- Figura 11. Estruturas químicas de sete labdanos diterpenóides isolados da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* (CHAKRABORTY *et al.*, 2010a). 27
- Figura 12. Estruturas químicas de 2,5,5-trimetil-4-(4'-metil-3'-pentenil)-2-ciclohexen-1-ol (a); 4-isopentil-3,4,5,5-tetrametil-2-ciclohexen-1-ol (b e c); 6-isopentil-1,5,5,6-tetrametil-1-ciclohexeno (d) e 3,4,5,5-tetrametil-4-(3'-oxopentil)-2-ciclohexen-1-ona (e) (CHAKRABORTY; PAULRAJ, 2010). 28
- Figura 13. Estruturas químicas de guai-2-en-10 α -ol (a) e guai-2-en-10 α -metanol (b) isolados da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* (CHAKRABORTY *et al.*, 2010b). 29
- Figura 14. Estruturas químicas de ácido hexadeca-4,7,10,13-tetraenóico (a), ácido octadeca-6,9,12,15 tetraenóico (b) e ácido α -linolênico (c) isolados da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* (ALAMSJAH *et al.*, 2005). 29

Figura 15. Rota esquemática para obtenção dos extratos hexânico e etanólico da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> .	34
Figura 16. Esquema dos procedimentos adotados na prospecção fitoquímica do extrato etanólico da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> .	35
Figura 17. Rota esquemática do isolamento dos constituintes químicos (UF-1, UF-2 e UF-3), obtidos a partir do extrato etanólico da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> .	43
Figura 18. Perfil cromatográfico em camada delgada da fração UFE – F ₇ da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> , no sistema hexano:acetato de etila (85:15, v/v).	48
Figura 19. Perfil cromatográfico em camada delgada da fração UFE – F ₁₄₋₁₆ da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> , no sistema hexano:acetato de etila (80:20, v/v).	48
Figura 20. Perfil cromatográfico em camada delgada da fração UFE – F ₁₇₋₁₉ da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> , no sistema hexano:acetato de etila (60:40, v/v).	49
Figura 21. Cromatografia em camada delgada da amostra UF-1 da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> , no sistema hexano:acetato de etila (80:20, v/v).	50
Figura 22. Cromatograma – CG (cromatografia gasosa) da amostra UF-1 da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> .	51
Figura 23. Espectro de massa (EM) do hexadecanoato de etila da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> .	52
Figura 24. Proposta mecanística para justificar a formação dos principais fragmentos do hexadecanoato de etila (UF-1) da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> .	52
Figura 25. Cromatografia em camada delgada das frações F ₁₄₋₁₆₍₆₎ ; F ₁₄₋₁₆₍₇₎ ; F ₁₄₋₁₆₍₈₎ ; F ₁₄₋₁₆₍₉₎ obtidas da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> , em 100% de diclorometano.	54
Figura 26. Cromatografia em camada delgada da F ₆₋₉ (F _{14-16(6/9)}) oriundas do UFE – F ₁₄₋₁₆ obtido da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> , no sistema diclorometano:metanol (90:10, v/v).	55
Figura 27. Cromatografia em camada delgada das frações F ₁₄₋₁₆₍₆₆₎ a F ₁₄₋₁₆₍₇₃₎ obtidas da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> , no sistema diclorometano:metanol (95:5, v/v).	55
Figura 28. Cromatografia em camada delgada das frações F ₁₇₋₁₉₍₄₎ , F ₁₇₋₁₉₍₅₎ , F ₁₇₋₁₉₍₆₎ , F ₁₇₋₁₉₍₇₎ e F ₁₇₋₁₉₍₈₎ obtidas da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> , no sistema hexano:acetato de etila (80:20, v/v).	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Constituintes químicos e atividades biológicas em extratos das macroalgas marinhas verdes do gênero <i>Ulva</i> .	26
Tabela 2.	Provas fitoquímicas das classes de antocianinas, antocianidinas e flavonóides.	36
Tabela 3.	Provas fitoquímicas das classes de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas.	36
Tabela 4.	Cromatografia em gel de sílica do extrato etanólico da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> (UFE).	38
Tabela 5.	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico do extrato etanólico (UFE) da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> .	39
Tabela 6.	Cromatografia por exclusão molecular em matriz de Sephadex LH-20 do extrato etanólico (UFE – F ₇) da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> .	40
Tabela 7.	Cromatografia em gel de sílica da subfração UFE – F ₇₍₇₎ da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> .	40
Tabela 8.	Cromatografia em gel de sílica do extrato etanólico (UFE – F ₁₄₋₁₆) da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> .	41
Tabela 9.	Cromatografia em gel de sílica do extrato etanólico (UFE – F ₁₇₋₁₉) da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> .	42
Tabela 10.	Dados referentes aos rendimentos dos extratos hexânico (UFH) e etanólico (UFE) da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> .	44
Tabela 11.	Prospecção fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários na macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> .	45
Tabela 12.	Dados referentes à junção das frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> (UFE).	47
Tabela 13.	Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da subfração UFE – F ₇₍₇₎ da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> .	50
Tabela 14.	Composição química da amostra UF-1 isolada da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> .	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Histórico dos produtos naturais	18
2.2 Consideração botânica da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> Delile	21
2.3 Constituintes químicos isolados do filo Chlorophyta	22
2.4 Constituintes químicos isolados da macroalga marinha <i>Ulva fasciata</i>	25
2.5 Técnicas cromatográficas	30
2.5.1 Cromatografia por adsorção	30
2.5.2 Cromatografia em camada delgada	31
2.5.3 Cromatografia por exclusão molecular	31
2.5.4 Cromatografia gasosa	32
2.5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Coleta e Identificação do material botânico	33
3.2 Desidratação da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> e Preparação dos extratos	33
3.3 Prospecção fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i>	34
3.3.1 Teste para fenóis e taninos	35
3.3.2 Testes para antocianinas, antocianidinas e flavonóides	35
3.3.3 Testes para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas	36
3.3.4 Teste para flavonóis, flavononas, flavanonóis e xantonas	36
3.3.5 Teste para esteróides e triterpenóides (Lieberman-Burchard)	37
3.3.6 Teste para saponinas	37
3.3.7 Teste para alcalóides	37
3.4 Isolamento dos constituintes químicos da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> Delile	38
3.4.1 Fracionamento do extrato etanólico da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> - UFE	38
3.4.2 Elaboração da fração do extrato etanólico (UFE – F ₇) da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i>	39
3.4.2.1 Elaboração da subfração do extrato etanólico UFE – F ₇₍₇₎ da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> e Obtenção de UF-1 [UFE – F ₇₍₇₎₍₂₎]	40
3.4.3 Elaboração da fração do extrato etanólico (UFE – F ₁₄₋₁₆) da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> e Obtenção de UF-2 [UFE – F _{14-16(6/9)}]	41
3.4.4 Elaboração da fração do extrato etanólico (UFE – F ₁₇₋₁₉) da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> e Obtenção de UF-3 [UFE – F ₁₇₋₁₉₍₈₎]	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Rendimento dos extratos hexânico e etanólico da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i>	44
4.2 Prospecção fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i>	44
4.3 Fracionamento do extrato etanólico – UFE	47
4.4 Purificação da fração do extrato etanólico (UFE – F ₇) da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i>	49

4.5	Elaboração da subfração do extrato etanólico UFE – F ₇₍₇₎ da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> e Análise por CG-EM da amostra UF-1 [UFE – F ₇₍₇₎₍₂₎]	49
4.6	Elaboração da fração do extrato etanólico (UFE – F ₁₄₋₁₆) da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> e Isolamento do composto UF-2 [UFE – F _{14-16(6/9)}]	53
4.7	Elaboração da fração do extrato etanólico (UFE – F ₁₇₋₁₉) da macroalga marinha verde <i>Ulva fasciata</i> e Isolamento do composto UF-3 [UFE – F ₁₇₋₁₉₍₈₎]	56
5	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

Muitos vegetais têm sido utilizados no tratamento de doenças ao longo da história da humanidade. O conhecimento gerado sobre o uso de plantas medicinais e seus benefícios terapêuticos foi se acumulando e se incorporando nas populações durante séculos. Ainda hoje, mesmo com os avanços na área médica, as plantas medicinais continuam a desempenhar um papel importante como terapêuticos nos países em desenvolvimento. O aumento da demanda por novos agentes terapêuticos provenientes de produtos naturais tem forte apelo comercial e estimula o interesse de se estudar novas fontes, entre as quais se destacam os organismos marinhos, especialmente as macroalgas marinhas (DI STASI, 1996; KHAN *et al.*, 2008; MARGRET; KUMERASAN; RAVIKUMAR, 2009).

As macroalgas constituem um grupo diversificado de vegetais pertencentes ao Reino Plantae, sendo encontradas em ambientes marinhos e continentais. As macroalgas marinhas bentônicas habitam ao longo dos costões rochosos e dos recifes de maré, onde são distribuídas em faixas bem definidas e visíveis em relação aos níveis de marés. A complexidade estrutural das macroalgas marinhas reflete sua capacidade de sobrevivência na zona de marés, onde estão sujeitas a amplas flutuações de umidade, temperatura, salinidade e luz. No ambiente marinho, exercem função comparada àquela exercida pelos vegetais no ambiente terrestre, fornecendo proteção para diversos organismos microscópicos, invertebrados e peixes que, inclusive, podem utilizá-las como alimento (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; SZE, 1997).

As macroalgas marinhas são reconhecidas como fontes naturais de uma grande variedade de compostos bioativos que são biossintetizados para desempenhar funções vitais, tais como defesa contra infecções causadas por micro-organismos, herbivoria de moluscos, competição por espaço e epifitismo de diferentes organismos. A atividade biológica desses compostos pode ser importante para os seres humanos, pela possibilidade de terem aplicação terapêutica, atuando como medicamento (DWORJANYN; DES NYS; STEINBERG, 1999; EL GAMAL, 2010; GONZÁLEZ DEL VAL *et al.*, 2001; GOODWIN; NORTH; LIDSTROM, 1997; IMMANUEL *et al.*, 2004; MAGALLANES; CÓRDOVA; OROZCO, 2003; MAYER; HAMANN, 2005; SMIT, 2004).

Nas últimas décadas intensificaram-se as descobertas de novas substâncias biologicamente ativas isoladas de macroalgas marinhas com propriedades biológicas definidas, como por exemplo, antitumorais (LINS *et al.*, 2009; MAYER; HAMANN, 2005),

anti-inflamatórias (AWAD, 2000; MARGRET; KUMERASAN; RAVIKUMAR, 2009; SIQUEIRA *et al.*, *in press*), antioxidantes (CHAKRABORTY; PAULRAJ, 2010; RAYMUNDO; HORTA; FETT, 2004), antivirais (GARG *et al.*, 1992; MENDES *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 1999; YASUHARA-BELL; LU, 2010), antifúngicas (RIZVI; SHAMEEL, 2005; STIRK; REINECKE; VAN STADEN, 2007) antimicrobianas (CHAKRABORTY *et al.*, 2010a; CHAKRABORTY *et al.*, 2010b; LIMA-FILHO *et al.*, 2002), antileishmaniose (FELICIO *et al.*, 2010; SABINA *et al.*, 2005; SPAVIERI *et al.*, 2010), antiplasmódico (ORHAN *et al.*, 2006).

No Brasil apenas três artigos científicos foram publicados com a macroalga marinha verde *Ulva fasciata*, dois deles tratando de atividade antiviral e um de atividade antioxidante. Mendes *et al.* (2010) relatam o isolamento de ácidos graxos, com atividade antiviral sobre a replicação do metapneumovírus humano (HMPV) e Santos *et al.* (1999), contra o vírus da herpes simplex tipo I. Raymundo; Horta e Fett (2004) verificaram atividade antioxidante tanto em extrato metanólico quanto em aquoso.

A existência de poucas informações na literatura sobre os compostos químicos isolados das macroalgas marinhas verdes, quando comparadas com as algas vermelhas que são as mais estudadas e reconhecidamente as maiores produtoras de compostos ativos, nos instigou a estudar a espécie *Ulva fasciata* Delile do filo Chlorophyta para contribuir com o conhecimento químico desta alga.

O presente trabalho teve o objetivo de isolar e caracterizar os metabólitos secundários do extrato etanólico da macroalga marinha verde *U. fasciata*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico dos produtos naturais

Tradicionalmente os seres humanos sempre recorreram à natureza em busca do alívio e da cura de doenças através da ingestão de ervas e folhas. Este comportamento certamente pode ser considerado uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais com finalidade terapêutica (VIEGA JR; BOLZANI, 2006).

As plantas formam a base da medicina tradicional cuja existência data de milênios. Os primeiros relatos do uso dos produtos naturais referem-se a 2600 a.C. na Mesopotâmia, tendo sido documentadas na escrita cuneiforme mais de mil substâncias derivadas de plantas, incluindo os óleos essenciais de cedro, cipreste, alcaçuz, mirra e papoula. Ainda hoje esses óleos são usados para tratamento de diversos males, desde tosse e resfriado até infestação parasitária e inflamação (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; YESILADA, 2005).

Com base nos registros da literatura, o uso de vegetais na medicina egípcia data de 2900 a.C., porém em 1500 a.C. foi encontrado o papiro de Ebers onde estão registrados mais de 700 princípios ativos isolados de plantas, preparo de infusões, pílulas e pomadas (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; YESILADA, 2005).

Desde 1100 d.C. a medicina tradicional chinesa vem se desenvolvendo com grandiosidade e eficiência e, até hoje, muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS JR; BOLZANI, 2006).

A contribuição dos gregos para o desenvolvimento racional do uso dos fitoterápicos foi substancial. Eles passaram seus conhecimentos a vários povos próximos ao mar Mediterrâneo e escreveram livros contendo prescrições e fórmulas utilizadas na composição de drogas derivadas de várias plantas. Eles também observaram que alguns organismos marinhos como peixes, moluscos, caranguejos e esponjas possuíam atividades antibióticas, antitumorais e outras atividades farmacológicas (LEV, 2006; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; VOULTSIADOU, 2010; YESILADA, 2005).

Mares e oceanos cobrem 70% da superfície da Terra e abrigam cerca de 200.000 espécies de macroalgas e invertebrados marinhos como esponjas, octocorais, ascídeas,

briozoários, pepinos-do-mar e bactérias. Este ecossistema bastante diversificado tem um potencial biotecnológico associado que pode ser considerado praticamente ilimitado (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009; MUNRO *et al.*, 1999; PINTO *et al.*, 2002).

Até os anos 50, o ambiente marinho foi pouco explorado pela comunidade científica, devido à dificuldade de acesso e obtenção de matéria-prima, por sua profundidade. Na década de 50, o grupo do pesquisador Werner Bergmann da Universidade de Yale (EUA) iniciou os estudos dos produtos naturais marinhos, através do isolamento dos nucleosídeos esponouridina (Figura 1a) e espongotimidina (Figura 1b) da esponja marinha *Tethya crypta* (*Cryptotethya crypta*). Estas substâncias possuem atividade antiviral, e o estudo de análogos sintéticos levou ao desenvolvimento de agentes com atividades diversas, de antivirais a antileucêmicos, tais como adenina-arabinosídeo (Figura 1c) e citosina-arabinosídeo (Figura 1d) (BERGMANN; FEENEY, 1951; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

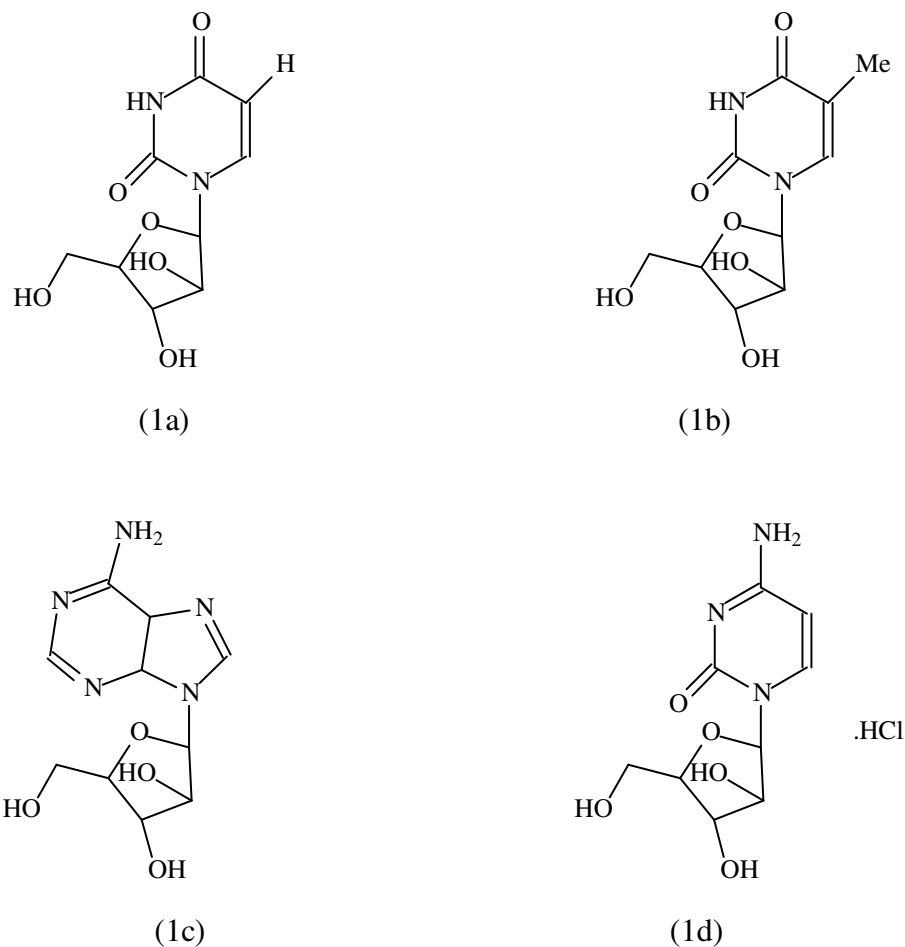


Figura 1 – Estruturas químicas dos nucleosídeos esponouridina (a), espongotimidina (b), adenina-arabinosídeo (c) e citosina-arabinosídeo (d) (BERGMANN; FEENEY, 1951).

Com o avanço das técnicas e de equipamentos seguros de mergulho, na década de 70, algas e invertebrados marinhos foram utilizados para extração e isolamento de compostos bioativos e verificação de suas atividades biológicas (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009; FENICAL, 2006).

No final da década de 70, os pesquisadores Alfred J. Weinheimer e Robert L. Spraggins da Universidade de Oklahoma (EUA) isolaram grandes quantidades de prostaglandinas do octocoral *Plexaura homonalla*. A partir de então, as indústrias farmacêuticas demonstraram interesse e passaram a investir nos laboratórios de pesquisa de produtos naturais na busca de novos fármacos de origem marinha (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

No Brasil as pesquisas com produtos naturais marinhos tiveram início na década de 60, com o pesquisador Bernand Tursch da Universidade de Bruxelas (Bélgica), isolando um colesterol do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* em 1963. Nesse mesmo ano foi formado o primeiro grupo de pesquisa, denominado Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (NPPN-UFRJ), para estudar a química dos produtos naturais de invertebrados marinhos (BERLINCK *et al.*, 2004).

No final da década de 90, o grupo liderado pela pesquisadora Rosângela de A. Epifânio, do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense isolou um esteróide poli-hidroxilado denominado purnicina (Figura 2) de uma espécie de gorgônia *Lophogorgia punicea* (BERLINCK *et al.*, 2004; EPIFÂNIO *et al.*, 1998).

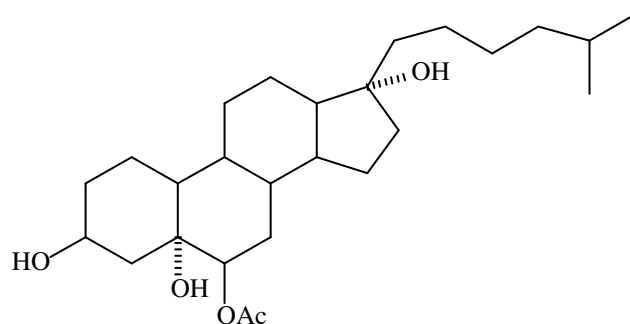


Figura 2 – Estrutura química de um esteróide poli-hidroxilado isolado da gorgônia *Lophogorgia punicea* (EPIFÂNIO *et al.*, 1998).

Esse grupo de pesquisadores abriu perspectivas às descobertas de novas fontes de compostos bioativos isolados de organismos marinhos. Muitos desses compostos possuem atividades biológicas diversas como: antitumoral, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral,

anticoagulante, antitrombótica, antioxidante entre outras (EL GAMAL, 2010; FAULKNER, 2000; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; SMIT, 2004).

2.2 Consideração botânica da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* Delile

Segundo a base de dados Algaebase (2010), as macroalgas são classificadas em quatro filós: Cyanophyta (algas azuis); Chlorophyta (algas verdes) que podem ser encontradas em ambientes marinhos, continentais ou mesmo terrestres como neve, tronco de árvores e solos; Rhodophyta (algas vermelhas) e Heterokontophyta (algas pardas) que são primariamente marinhas existindo poucos gêneros de água doce. A classificação das macroalgas está baseada na grande variação de suas características tais como: pigmentos fotossintéticos, polissacarídeos de reserva, organização celular, filogenia molecular, ciclo de vida, morfologia e ecologia (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; SZE, 1997).

A macroalga marinha verde *Ulva fasciata* Delile (Figura 3) pertence à classe Ulvophyceae, ordem Ulvales, que é a segunda maior ordem do filo Chlorophyta, consistindo em 252 espécies (ALGAEBASE, 2010). Esta espécie é encontrada em toda a costa brasileira compreendida entre o Ceará e o norte do Rio de Janeiro (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004), sendo popularmente conhecida como “alface do mar”. Morfologicamente, ela apresenta um talo em forma de fita, constituído por duas camadas de células, próximas umas das outras ou separadas por paredes gelatinosas, de cor verde-claro por causa da presença das clorofilas *a* e *b*, que se fixa ao substrato por um pequeno apressório discóide (COTO; PUPO, 2009; JOLY, 1965; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). A macroalga *U. fasciata* é considerada um indicador biológico de contaminação do ambiente marinho com altas concentrações de matéria orgânica resultante do lançamento de grande quantidade de efluentes não tratados, através de esgoto doméstico clandestinos e/ou industrial nas praias do litoral brasileiro (ORTEGA, 2000; SOUSA; COCENTINO, 2004; TAOUIL; YONESHIGUE-VALENTIN, 2002).

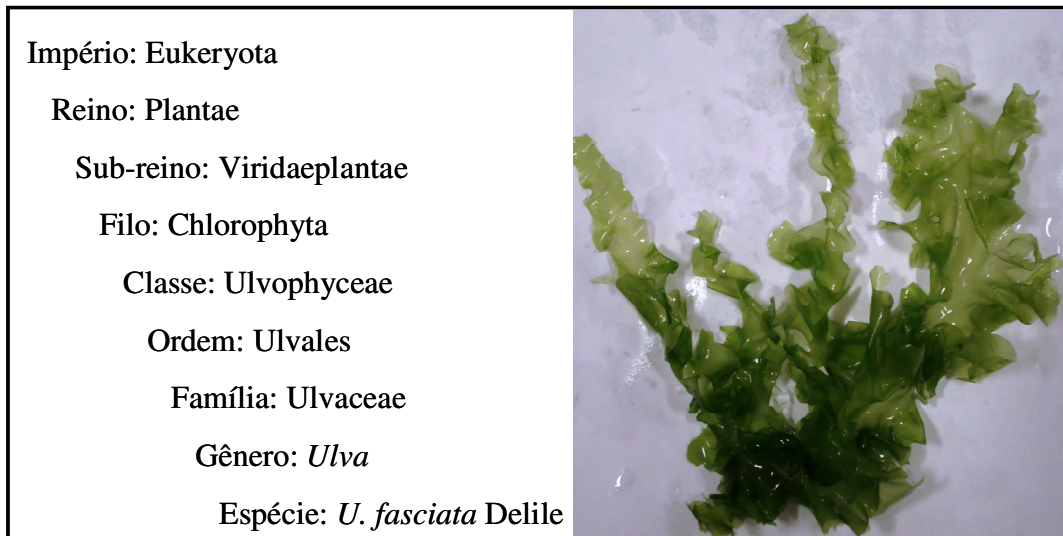


Figura 3 – Macroalga marinha verde *Ulva fasciata* Delile.

As algas marinhas verdes têm valor industrial comparativamente menor do que aquele das algas vermelhas ou pardas, contudo, com os avanços na área da prospecção de novos compostos bioativos para uso farmacêutico e/ou alimentício, torna-se cada vez mais importante o conhecimento da flora ficológica brasileira (COTO; PUPO, 2009).

2.3 Constituintes químicos isolados do filo Chlorophyta

Há relativamente poucos estudos sobre o isolamento de metabólitos secundários das espécies de macroalgas marinhas verdes quando comparados com aqueles envolvendo macroalgas vermelhas, que são reconhecidas como as maiores produtoras de substâncias halogenadas do meio marinho (EL GAMAL, 2010; PEREIRA, TEIXEIRA, 1999).

As macroalgas marinhas são utilizadas como alimentos pelos povos do oriente (China, Japão e Coreia), pois apresentam características importantes como elevado teor de proteínas, baixo valor calórico, sendo ricas em vitaminas B, C e E e provitamina A, minerais (Ca, Mg, P, K, Na, Fe e I) e fibras dietárias (ITO; HORI, 1989) e também são utilizadas em preparações medicinais para tratamento de várias doenças, tais como: deficiência de iodo (bócio, doença de Basedow e hipertireoidismo), tratamento de distúrbios intestinais, vermífugos, hipocolesterolêmico e hipoglicêmico. Atualmente, vários estudos vêm sendo realizados com a finalidade de isolar os compostos bioativos de macroalgas marinhas

possuidores de atividades farmacológicas (EL GAMAL, 2010; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; SMIT, 2004).

O extrato da macroalga marinha verde *Cladophora fascicularis* foi submetido a vários métodos cromatográficos para isolar e purificar a substância 2-2(2',4'-dibromofenox)-4-6 dibromoanisol (Figura 4). A descoberta desse composto em uma macroalga marinha verde foi um relato inédito na literatura. Esse composto foi eficiente nos ensaios anti-inflamatórios em ratos e inibiu o crescimento das bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (KUNIYOSHI; YAMADA; HIGA, 1985).

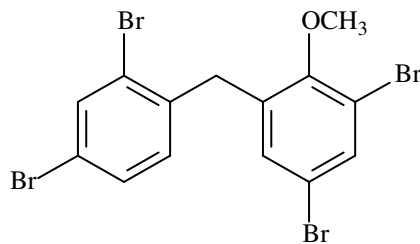


Figura 4 – Estrutura química do 2-2(2',4'-dibromofenox)-4-6 dibromoanisol isolado da macroalga marinha verde *Cladophora fascicularis* (KUNIYOSHI; YAMADA; HIGA, 1985).

O isorawsonol é um composto derivado do difenilmetano bromado (Figura 5), isolado da macroalga marinha verde *Arrainvilla rawsonii*. Foi constatado que esse composto age na inibição da enzima inosina 5'-monofosfato desidrogenase, que está relacionada com a proliferação celular, e sua inibição demonstrou ter efeitos antitumorais e imunossupressivos (CHEN *et al.*, 1994).

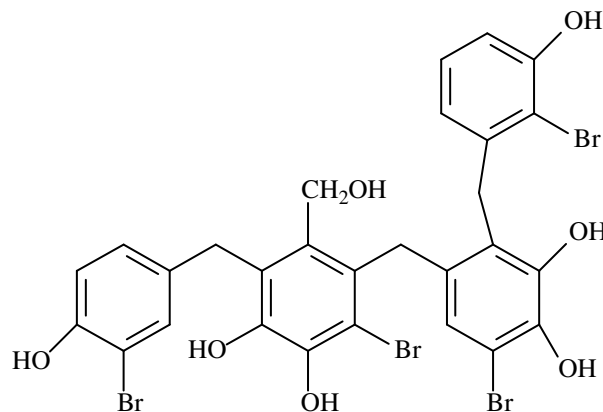


Figura 5 – Estrutura química do isorawsonol isolado da macroalga marinha verde *Arrainvilla rawsonii* (CHEN *et al.*, 1994).

Paul e Fenical (1984) isolaram dois diterpenóides, denominados de halimedatrial (Figura 6a) e halimedalactona (Figura 6b), da macroalga marinha verde *Halimeda* sp. (Halimedaceae), com potenciais atividades antimicrobianas e citotóxicas.

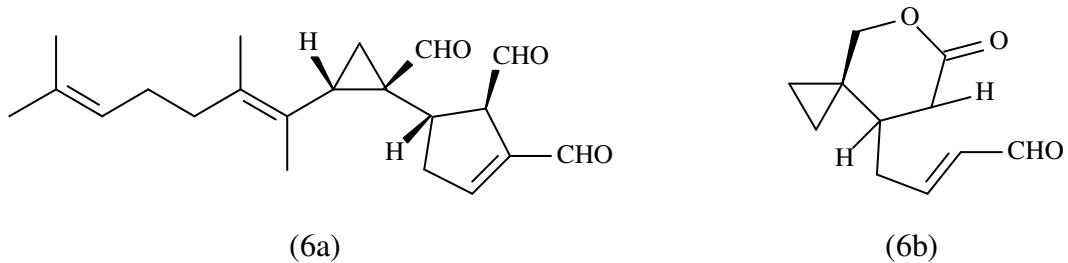


Figura 6 – Estrutura química do halimedatrial (a) e halimedalactona (b), isolados da macroalga marinha verde *Halimeda* sp (PAUL; FENICAL, 1984).

Em outra espécie do mesmo gênero, *Halimeda tuna*, Koehn *et al.* (1991) isolaram um diterpeno aldeídico denominado halitunal (Figura 7), com um anel pirano (um ciclopentadieno) em sua estrutura química. Este composto possui atividade *in vitro* contra o coronavírus que provoca infecção dos tratos respiratório e gastrointestinal humanos.

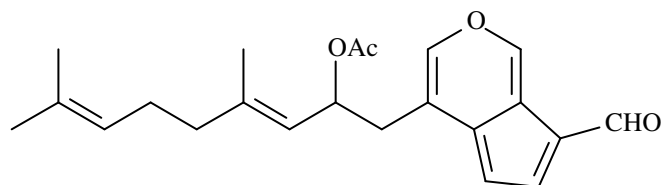


Figura 7 – Estrutura química do halitunal isolado da macroalga marinha verde *Halimeda tuna* (KOEHN *et al.*, 1991).

O composto iengarosídeo A (Figura 8) foi isolado de outra macroalga marinha verde *Codium iyengarii* e apresentou uma moderada atividade antibacteriana contra *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysentri* (*Shigella dysenteriae*) e *Staphylococcus aureus* (ALI *et al.*, 2002).

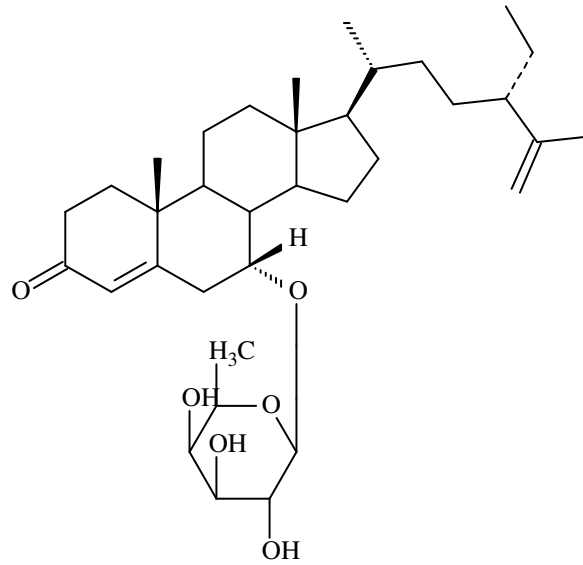


Figura 8 – Estrutura química do iengarosídeo A isolado da macroalga marinha verde *Codium iyengarii* (ALI *et al.*, 2002).

2.4 Constituintes químicos isolados da macroalga marinha *Ulva fasciata*

Neste levantamento bibliográfico são apresentadas as espécies do gênero *Ulva* estudadas quimicamente, bem como as atividades biológicas apresentadas pelos extratos, frações e compostos puros. Estas informações constam em artigos científicos publicados até julho de 2010, de acordo com pesquisas realizadas nas seguintes bases de dados: *Web of Science*, *Science Direct*, *PubMed* e *Scopus*. Os estudos a respeito de isolamento de constituintes químicos da macroalga do gênero *Ulva* são escassos.

Das 97 espécies pertencentes ao gênero *Ulva* já identificadas e catalogadas no mundo (ALGAEBASE, 2010), somente *U. fasciata*, *U. lactuca*, *U. rigida*, *U. olivascens* e *U. reticulata* foram objetos de algum estudo fitoquímico relativo a atividade biológica que foi investigada em extratos preparados com diferentes solventes, conforme mostrado na Tabela 1.

Além dos estudos das atividades biológicas realizados com os extratos algais, outros avançaram no sentido de isolar os constituintes químicos revelando classes de compostos como: terpenos, esteróides, esfingosina, compostos fenólicos e ácidos graxos.

Tabela 1 – Constituintes químicos e atividades biológicas em extratos das macroalgas marinhas verdes do gênero *Ulva*.

Espécie	Solvente	Atividade Biológica	Referência
<i>U. fasciata</i>	etanol	antileishmaniose	Sabina <i>et al.</i> (2005)
	metanol	imunoestimulante	Lipton; Pramitha; Jose (2009)
	água	antiviral	Santos <i>et al.</i> (1999)
<i>U. lactuca</i>	metanol	anti-inflamatória	Margret; Kumaresan; Ravikumar (2009)
	acetona	potencial alelopático e antioxidante	Hassan; Ghareib (2009)
	etanol	antileishmaniose, antiplasmódica e inibidora de FAB I	Orhan <i>et al.</i> (2006)
	clorofórmio:metanol	antituberculose, antiprotozoário e antileishmaniose	Spavieri <i>et al.</i> (2010)
<i>U. rigida</i>	etanol	antimutagênica, antihiperlipidêmica, antígenotóxica e antileishmaniose	Sabina <i>et al.</i> (2005); Celikler <i>et al.</i> (2008); Celikler <i>et al.</i> (2009)
<i>U. olivascens</i>	metanol	antibacteriana	Chiheb <i>et al.</i> (2009)
<i>U. reticulata</i>	benzeno, éter dietílico e éter de petróleo	antibacteriana	Bhadury; Wright (2004)

Garg *et al.* (1992) isolaram o composto *N*-palmitoil-2-amino 1,3,4,5-tetrahidroxioctadecano (Figura 9) da macroalga marinha *U. fasciata*, que apresentou atividade antiviral *in vivo* contra o vírus Semliki Forest, do gênero *Alphavirus* (família *Togaviridae*), que é capaz de provocar uma encefalite letal em mamíferos.

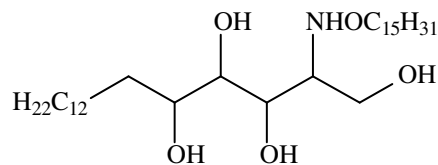


Figura 9 – Estrutura química do *N*-palmitoil-2-amino 1,3,4,5-tetrahidroxioctadecano isolado da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* (GARG *et al.*, 1992).

Awad (2000) isolou uma molécula inédita da macroalga marinha *U. lactuca*, referida como 3-O- β -D-glucopiranosil-estigmasta 5, 25 dieno (Figura 10). Esse composto apresentou atividade anti-inflamatória através de um modelo experimental de edema de orelha em ratos. Também foram realizados ensaios antimicrobianos em que se observou a inibição do crescimento de dez espécies de micro-organismos (bactérias Gram positivas e negativas, fungos e leveduras).

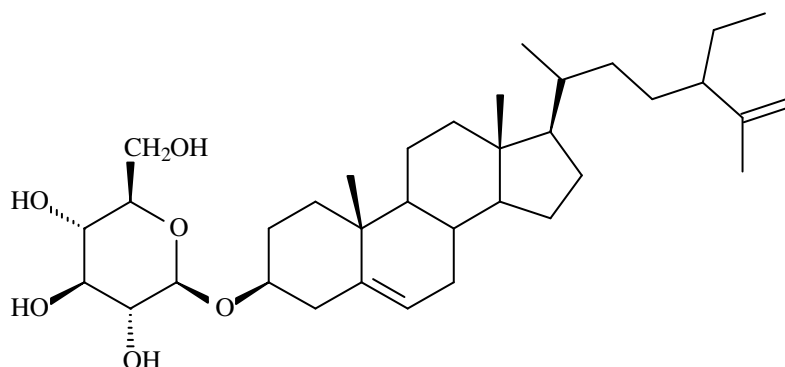
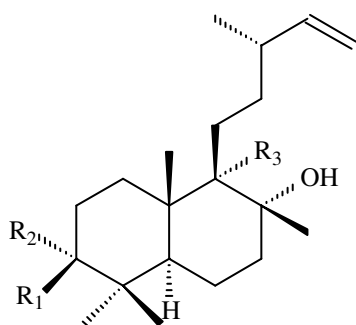


Figura 10 – Estrutura química do 3-O- β -D-glucopiranosil-estigmasta 5, 25 dieno isolado da macroalga marinha verde *Ulva lactuca* (AWAD, 2000).

Chakraborty *et al.* (2010a) isolaram sete labdanos diterpenóides (Figura 11) como constituintes majoritários na macroalga marinha *U. fasciata*. Esses compostos foram testados em ensaios antimicrobianos e os resultados mostraram que os compostos labda-14-eno-3 α ,8 α -diol e labda-14-eno-8 α -hidroxi-3-ona inibiram o crescimento de *Vibrio parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* com concentrações mínimas inibitórias de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.



Composto	R ₁	R ₂	R ₃
Labda -14-eno-8-ol	H	H	H
Labda-14-eno-3 α ,8 α -diol	OH	H	H
Labda-14-eno-8 α ,9 α -diol	H	H	OH
Labda-14-eno-8 α -hidroxi-3-ona	=O	-	H
ent-Labda-13(16),14-dieno-3-ona	=O	-	-
ent-Labda-13(16),14-dieno	H	H	-
ent-Labda-13(16),14-dieno-3 α -ol	H	OH	-

Figura 11 – Estruturas químicas de sete labdanos diterpenóides isolados da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* (CHAKRABORTY *et al.*, 2010a).

Ainda na macroalga marinha *U. fasciata*, Chakraborty e Paulraj (2010) isolaram cinco sesquiterpenóides (Figura 12), como constituintes majoritários. Esses compostos foram testados quanto à atividade antioxidante, verificando-se que o composto 3,4,5,5-tetrametil-4-(3'-oxopentil)-2-ciclohexen-1-ona apresentou atividade superior ($71,4\% \pm 1,5\%$) àquela do antioxidante sintético Trolox que foi de $44,1\% \pm 1,5\%$. Desse modo, o composto isolado da macroalga pode ser considerado como um potencial antioxidante natural para ser utilizado nas indústrias de alimentos.

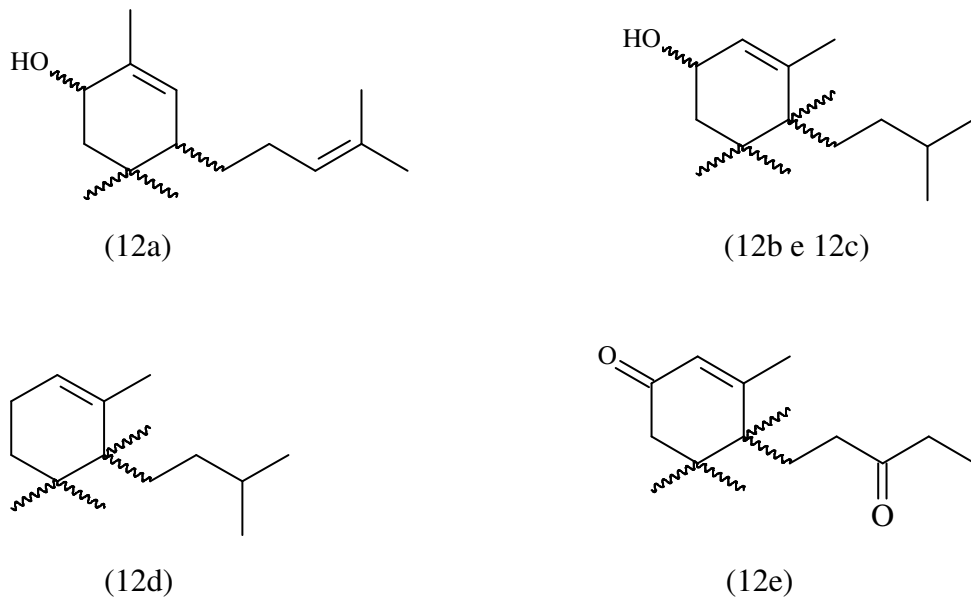


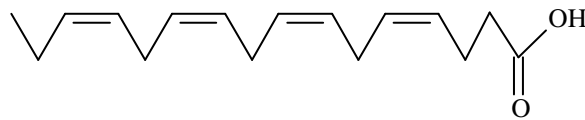
Figura 12 – Estruturas químicas de 2,5,5-trimetil-4-(4'-metil-3'-pentenil)-2-ciclohexen-1-ol (a); 4-isopentil-3,4,5,5-tetrametil-2-ciclohexen-1-ol (b e c); 6-isopentil-1,5,5,6-tetrametil-1-ciclohexeno (d) e 3,4,5,5-tetrametil-4-(3'-oxopentil)-2-ciclohexen-1-ona (e) (CHAKRABORTY; PAULRAJ, 2010).

Chakraborty *et al.* (2010b) isolaram dois sesquiterpenóides do tipo guaiano, denominados guai-2-en-10 α -ol (Figura 13a) e guai-2-en-10 α -metanol (Figura 13b) da macroalga marinha *U. fasciata*. Esses compostos inibiram o crescimento de *Vibrio parahaemolyticus* em concentrações mínimas inibitórias de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $35 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.



Figura 13 – Estruturas químicas de guai-2-en-10 α -ol (a) e guai-2-en-10 α -metanol (b) isolados da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* (CHAKRABORTY *et al.*, 2010b).

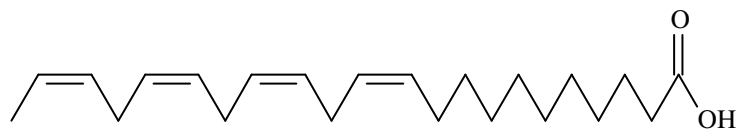
Alamsjah *et al.* (2005) isolaram três ácidos graxos poli-insaturados da macroalga marinha *U. fasciata*: ácido hexadeca-4,7,10,13-tetraenóico (Figura 14a), ácido octadeca-6,9,12,15 tetraenóico (Figura 14b) e ácido α -linolênico (Figura 14c). Esses compostos apresentaram atividade algicida contra o fitoplâncton da classe Raphidophyceae *Heterosigma akashiwo*, um dos organismos responsáveis por florações de algas nocivas na costa da cidade de Nagasaki, Japão.



(14a)



(14b)



(14c)

Figura 14 – Estruturas químicas de ácido hexadeca-4,7,10,13-tetraenóico (a), ácido octadeca-6,9,12,15 tetraenóico (b) e ácido α -linolênico (c) isolados da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* (ALAMSJAH *et al.*, 2005).

A separação, o isolamento e a identificação de compostos presentes nos extratos das macroalgas marinhas e de outros organismos de origem vegetal ou animal são conseguidos através de técnicas cromatográficas clássicas aliadas às cromatografias modernas.

2.5 Técnicas cromatográficas

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como espectrofotometria ou espectrometria de massas (COLLINS, 2007).

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato estreito. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes. Existem várias formas de realizar o processo cromatográfico, tais como: cromatografia por adsorção, cromatografia em camada delgada, cromatografia por exclusão molecular, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência (COLLINS, 2007).

2.5.1 Cromatografia por adsorção

O método cromatográfico líquido-sólido é realizado em uma coluna preenchida com um sólido, denominado de fase estacionária e uma fase móvel líquida, onde a sorção isotérmica (adsorção) refere-se a um aumento da concentração do soluto (que está em excesso na fase móvel), entre as superfícies das fases móvel e estacionária. Empiricamente, essa técnica cromatográfica pode ser primeiramente escolhida porque é tecnicamente mais simples, não exigindo instrumentação esmerada. Dependendo do tamanho da coluna usada, é

facilmente aplicada para fins preparativos, devendo ser monitorada, principalmente por cromatografia em camada delgada (VICHENEWSKI, 2007).

2.5.2 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi desenvolvida em 1938 pelos pesquisadores russos Izmailov e Sharaib e consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O grande desenvolvimento dessa técnica é consequência natural das múltiplas vantagens que ela oferece, como fácil compreensão e execução, separações rápidas, versatilidade, grande repetibilidade e baixo custo. Pode ser de aplicação analítica ou preparativa, cuja escala está na dependência da espessura da camada de adsorvente e na quantidade da amostra a ser analisada (LOPES, 2007).

2.5.3 Cromatografia por exclusão molecular

A cromatografia por exclusão molecular promove uma distribuição seletiva e dinâmica das moléculas do soluto entre duas fases líquidas separadas, dependentes de uma estrutura estacionária contendo poros de tamanho definido. Entre outros usos, quando aplicada a uma série homóloga de polímeros como proteínas de densidades e formas semelhantes, pode fornecer um método rápido e útil de determinar a massa molar e a forma dessas macromoléculas. Esse tipo de cromatografia é também conhecido por filtração em gel, permeação em gel ou cromatografia em peneira molecular. A cromatografia por exclusão molecular tem propriedades desejáveis, como simplicidade, versatilidade, possibilidade de regeneração do gel, que não se degrada em condições amenas de temperatura nem devido ao solvente (ROTHSCHILD, 2007).

2.5.4 Cromatografia gasosa

Gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separados utilizando-se a técnica denominada cromatografia gasosa (CG). A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa). Algumas técnicas semelhantes a CG começaram na década de 1930; no entanto, seu desenvolvimento só foi acelerado depois da introdução da cromatografia gás-líquido, em 1952, por James e Martin. Esse trabalho pioneiro mostrou a separação de ácidos carboxílicos com 1 a 12 átomos de carbono, através da partição contínua entre um filme líquido espalhado sobre um suporte sólido (fase estacionária) e um gás (fase móvel). O interesse pela CG fez com que houvesse um grande desenvolvimento de equipamentos e métodos, principalmente a partir da introdução de capilares por Golay em 1958 (BONATO, 2007).

Desde o seu aparecimento, a cromatografia gasosa demonstrou ter uma enorme potencialidade devido a sua eficiência, facilidade, baixo custo e possibilidade de analisar misturas voláteis de alta complexidade, como por exemplo, óleos essenciais, gorduras de todas as espécies, frações de petróleo, produtos petroquímicos, inseticidas residuais, formulações de inseticidas, gases industriais, açúcares, monômeros etc (CIOLA, 2003).

2.5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica de separação mais importante, uma vez que consegue separar misturas que contêm um grande número de compostos similares. Vários nomes têm sido utilizados para denominar esta técnica de cromatografia líquida: alta velocidade, alta pressão, alto desempenho, alta resolução e alta eficiência. A CLAE utiliza instrumentos que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas preenchidas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e Identificação do material botânico

Os exemplares da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* Delile foram coletados em abril de 2008, na Praia do Pacheco, no Município de Caucaia-CE, em condições de maré baixa. As macroalgas foram colocadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório, onde foram lavadas com água destilada para retirar as epífitas e outros organismos.

O espécime vegetal coletado foi identificado no Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará. A exsicata da espécie encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da mesma Universidade, sob o número 47.246.

3.2 Desidratação da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* e Preparação dos extratos

As macroalgas *in natura* foram desidratadas em estufa com recirculação de ar a 40°C por 15 horas e, em seguida, trituradas. Uma porção de 500 g de material desidratado foi submetida à extração exaustiva a frio com hexano e, posteriormente, com etanol a 70%. Os extratos hexânico e etanólico, denominados respectivamente UFH e UFE, foram concentrados por destilação do solvente sob pressão reduzida e foi calculado o rendimento de cada extração.

O procedimento utilizado para a obtenção de UFH e UFE está apresentado na Figura 15.

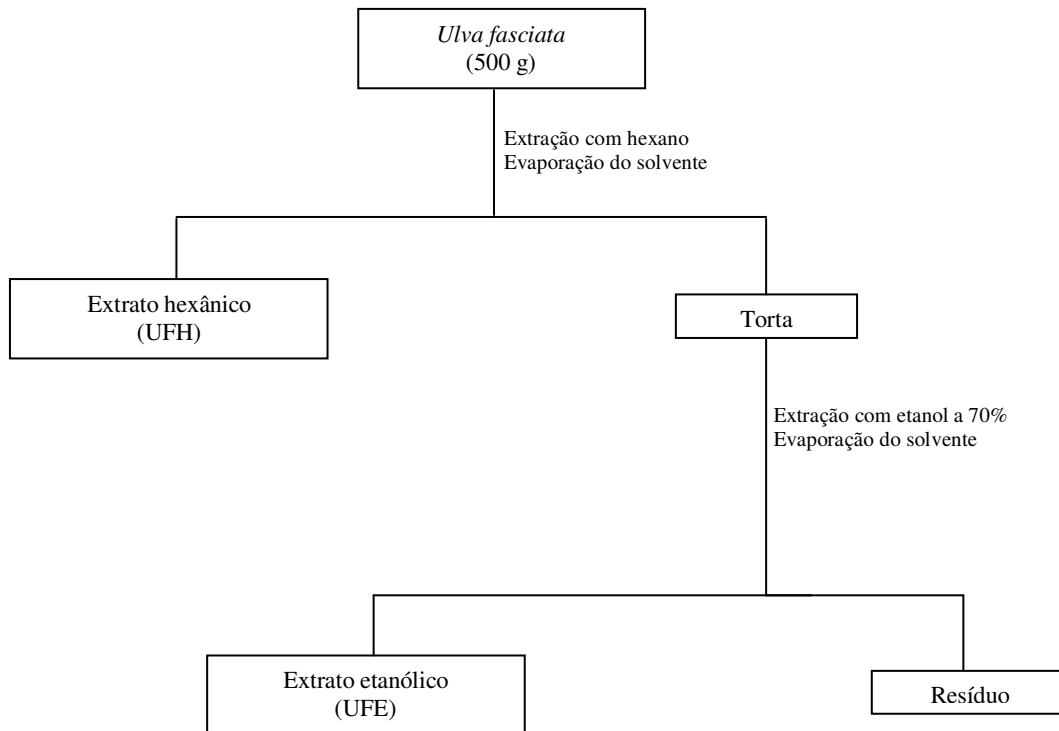


Figura 15 – Rota esquemática para obtenção dos extratos hexânico e etanólico da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*.

3.3 Prospecção fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários na macroalga marinha verde *Ulva fasciata*

O método empregado neste trabalho foi descrito por Matos (2009) e as metodologias empregadas para as principais classes de compostos estão resumidas na Figura 16 e descritas nos itens subsequentes.

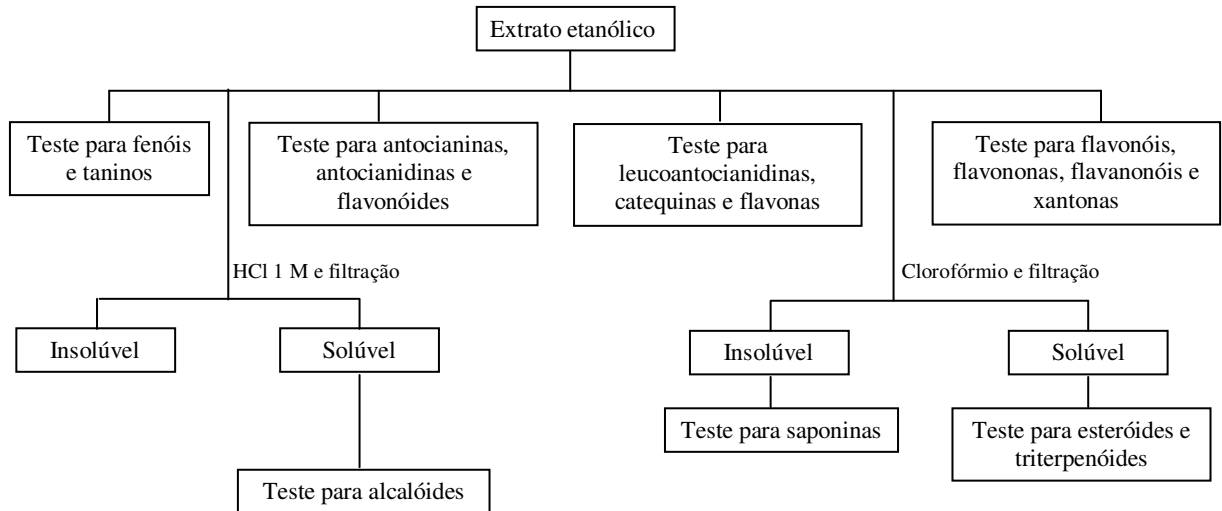


Figura 16 – Esquema dos procedimentos adotados na prospecção fitoquímica do extrato etanólico da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*.

3.3.1 Teste para fenóis e taninos

Em uma alíquota de 5 mL do UFE foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico. Após agitação vigorosa, observou-se qualquer variação de sua cor e/ou formação de um precipitado escuro e abundante. A presença de fenóis foi indicada pelo aparecimento de coloração entre o azul e o vermelho. A formação de precipitado escuro revelou a presença de taninos. A tonalidade do precipitado indicava a presença de taninos pirogálicos ou taninos hidrolisáveis (azul) ou de taninos flobabênicos ou taninos condensados ou catéquicos (verde). Um branco foi preparado substituindo-se o extrato etanólico por água destilada.

3.3.2 Testes para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Foram separadas três alíquotas de 5 mL do UFE em três tubos de ensaio. O primeiro foi acidificado a pH 3,0; o segundo e o terceiro foram alcalinizados a pH 8,5 e 11,0, respectivamente. A presença de antocianinas, antocianidinas e flavonóides foi determinada de acordo com o aparecimento de colorações, que variavam com o pH (Tabela 2).

Tabela 2 – Provas fitoquímicas das classes de antocianinas, antocianidinas e flavonóides.

Constituintes	Coloração em meio		
	Ácido (pH 3,0)	Alcalino (pH 8,5)	Alcalino (pH 11,0)
Antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
Chaconas e auronas	Vermelha	-	Vermelho-púrpura
Flavonóis	-	-	Vermelho-laranja

3.3.3 Testes para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas

Foram separadas duas alíquotas de 5 mL do UFE em dois tubos de ensaio. O primeiro foi acidificado com HCl para pH 3,0 e o segundo foi alcalinizado com NaOH para pH 11,0. Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 60°C durante 10 min. As alterações na coloração do extrato foram observadas quanto à presença dos metabólitos leucoantocianidinas, catequinas e flavonas de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 – Provas fitoquímicas das classes de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas.

Constituintes	Coloração em meio	
	Ácido (pH 3,0)	Alcalino (pH 11,0)
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas	Pardo-amarelada	-
Flavononas	-	Vermelho-laranja

3.3.4 Teste para flavonóis, flavononas, flavanonóis e xantonas

A um tubo contendo 5 mL de UFE foram adicionadas algumas centigramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. Aguardou-se o término da reação indicada pelo fim da efervescência e observou-se a mudança da coloração. O aparecimento ou intensificação de cor vermelha era indicativo da presença de flavonóis, flavononas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

3.3.5 Teste para esteróides e triterpenóides (Lieberman-Burchard)

Um volume de 30 mL do UFE foi evaporado em banho-maria a 60°C até a secura, e o resíduo foi dissolvido em 5 mL de clorofórmio. Alíquotas de 0,1; 0,5 e 1,0 mL do extrato clorofórmico foram transferidas para três tubos de ensaio, cujos volumes finais foram completados para 2 mL com o mesmo solvente. Em seguida, foram adicionados aos tubos de ensaio 1 mL de anidro acético e lentamente 2 mL de H₂SO₄ concentrado. O desenvolvimento de uma coloração rósea ou azul esverdeada indicava a presença de esteróide, enquanto o aparecimento de uma coloração variando de parda a vermelha, a presença de policíclicos triterpênicos.

3.3.6 Teste para saponinas

Ao resíduo do UFE insolúvel em clorofórmio do teste Lieberman-Burchard foram adicionados 5 mL de água destilada. A solução foi filtrada e transferida para um tubo de ensaio que foi agitado vigorosamente. A presença de espuma permanente e persistente indicou a ocorrência de saponinas. Para confirmar a presença de saponinas foi adicionado 2 mL de HCl concentrado ao tubo de ensaio e levado ao banho-maria por 1 h. Após esse período o tubo foi agitado e a presença de precipitado e a não formação de espuma confirmam a presença de saponinas, que foram submetidas ao teste de Lieberman-Burchard.

3.3.7 Teste para alcalóides

Foram evaporados 25 mL do UFE até a secura em banho-maria a 60°C, sendo o resíduo dissolvido em 10 mL de HCl a 1 M. Este extrato hidrocloreídrico foi distribuído em três tubos de ensaio em alíquotas de 0,5 mL, efetuando-se o teste para alcalóides com os reagentes gerais: reagentes de Mayer, Dragendorff e Wagner. A formação de precipitado de colorações branca, laranjada e marrom, de acordo com o reagente utilizado, respectivamente, indicava a presença dos alcalóides.

3.4 Isolamento dos constituintes químicos da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* Delile

3.4.1 Fracionamento do extrato etanólico da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* - UFE

Para a preparação do UFE, 33,825 g foram misturados a 20 g de gel de sílica 60, com granulometria 70–230 mesh, pulverizados em gral de porcelana e acondicionados sobre 67,673 g de gel de sílica em uma coluna de vidro (40 x 3,5 cm). A eluição foi realizada com os solventes hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade, conforme descrição feita na Tabela 4.

Tabela 4 – Cromatografia em gel de sílica do extrato etanólico da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* (UFE).

Eluentes	Concentração (%)	Volume coletado (mL)	Frações obtidas
Hexano	100	100	1-3
Hexano/Acetato de etila	5	100	4-7
Hexano/Acetato de etila	10	50	8-11
Hexano/Acetato de etila	15	50	12-17
Hexano/Acetato de etila	20	50	18-20
Hexano/Acetato de etila	25	100	21
Hexano/Acetato de etila	30	100	22-25
Hexano/Acetato de etila	50	100	26-27
Acetato de etila	100	100	28-29
Metanol	100	500	30

Após o fracionamento as frações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada (CCD) em cromatoplasas de gel de sílica 60 G (Φ 5-40 μ m), com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm. As revelações das substâncias foram realizadas em câmara escura UV (Cienlab), através da exposição em lâmpada de irradiação em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), por vapores de iodo sublimado presentes em câmara saturada, ou pela pulverização com as soluções *p*-anisaldeído ou vanilina, seguida de aquecimento em estufa a 100°C por 5 min. Após análise das frações obtidas por CCD, aquelas que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas para otimizar o rendimento, como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico do extrato etanólico (UFE) da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*.

Frações	Massa (mg)	Rendimento (%)	Frações	Massa (mg)	Rendimento (%)
UFE – F ₁	1,8	0,005	UFE – F ₁₆	228,0	0,674
UFE – F ₂	33,5	0,099	UFE – F ₁₇	157,7	0,466
UFE – F ₃	6,0	0,018	UFE – F ₁₈	216,2	0,639
UFE – F ₄	2,3	0,007	UFE – F ₁₉	253,1	0,748
UFE – F ₅	3,9	0,012	UFE – F ₂₀	153,8	0,455
UFE – F ₆	3,1	0,009	UFE – F ₂₁	162,6	0,481
UFE – F ₇	1.458,8	4,313	UFE – F ₂₂	119,3	0,353
UFE – F ₈	140,1	0,414	UFE – F ₂₃	55,5	0,164
UFE – F ₉	131,0	0,387	UFE – F ₂₄	32,4	0,096
UFE – F ₁₀	119,5	0,353	UFE – F ₂₅	65,3	0,193
UFE – F ₁₁	314,0	0,928	UFE – F ₂₆	96,8	0,286
UFE – F ₁₂	338,6	1,001	UFE – F ₂₇	49,8	0,147
UFE – F ₁₃	294,3	0,870	UFE – F ₂₈	183,5	0,542
UFE – F ₁₄	226,8	0,671	UFE – F ₂₉	338,7	1,001
UFE – F ₁₅	219,8	0,650	UFE – F ₃₀	17.849,0	52,769

*Rendimentos baseados no peso do UFE (33,825 g)

Nas frações submetidas a CCD, o fator de retenção (Rf), definido pela razão entre a distância percorrida pelos componentes (d_r) e a distância percorrida pela fase móvel (d_m) (COLLINS, 2007), foi calculado pela fórmula abaixo:

$$Rf = \frac{d_r}{d_m}$$

3.4.2 Elaboração da fração do extrato etanólico (UFE – F₇) da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*

A fração UFE – F₇ (1.458,8 mg), com aspecto de um óleo amarelo claro, foi submetida ao processo de cromatografia por exclusão molecular em matriz de dextrana Sephadex LH-20 em uma coluna de vidro (30 x 2,5 cm). A eluição foi realizada em um sistema isocrático tendo como fase móvel 100% de diclorometano, obtendo-se 20 frações, denominadas F₇₍₁₎ a F₇₍₂₀₎ (Tabela 6).

Tabela 6 – Cromatografia por exclusão molecular em matriz de Sephadex LH-20 do extrato etanólico (UFE – F₇) da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*.

Frações	Massa (mg)	Rendimento (%)	Frações	Massa (mg)	Rendimento (%)
UFE – F ₇₍₁₎	zero	-	UFE – F ₇₍₁₁₎	14,3	0,980
UFE – F ₇₍₂₎	0,5	0,034	UFE – F ₇₍₁₂₎	9,6	0,658
UFE – F ₇₍₃₎	0,5	0,034	UFE – F ₇₍₁₃₎	10,1	0,692
UFE – F ₇₍₄₎	11,7	0,802	UFE – F ₇₍₁₄₎	5,6	0,384
UFE – F ₇₍₅₎	213,7	14,601	UFE – F ₇₍₁₅₎	4,4	0,302
UFE – F ₇₍₆₎	683,1	46,826	UFE – F ₇₍₁₆₎	4,9	0,336
UFE – F ₇₍₇₎	135,0	9,254	UFE – F ₇₍₁₇₎	3,1	0,212
UFE – F ₇₍₈₎	59,6	4,086	UFE – F ₇₍₁₈₎	4,3	0,295
UFE – F ₇₍₉₎	27,1	1,858	UFE – F ₇₍₁₉₎	3,2	0,219
UFE – F ₇₍₁₀₎	15,2	1,042	UFE – F ₇₍₂₀₎	3,0	0,206

*Rendimentos baseados no peso do UFE – F₇ (1.458,8 g)

3.4.2.1 Elaboração da subfração UFE – F₇₍₇₎ da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* e Obtenção de UF-1 [UFE - F₇₍₇₎₍₂₎]

A subfração UFE – F₇₍₇₎ foi recromatografada em coluna de gel de sílica 60, com granulometria 70–230 mesh. Foram utilizados 5,349 g de gel de sílica em uma coluna de vidro (15 x 2 cm) e a eluição foi realizada com os solventes hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade, conforme descrição na Tabela 7.

Tabela 7 – Cromatografia em gel de sílica da subfração UFE – F₇₍₇₎ da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*.

Eluentes	Concentração (%)	Volume coletado (mL)	Frações obtidas
Hexano	100	20	F ₇₍₇₎₍₁₎ – F ₇₍₇₎₍₂₎
Hexano/Acetato de etila	5	20	F ₇₍₇₎₍₃₎ – F ₇₍₇₎₍₄₎
Hexano/Acetato de etila	10	20	F ₇₍₇₎₍₅₎ – F ₇₍₇₎₍₆₎
Hexano/Acetato de etila	20	20	F ₇₍₇₎₍₇₎ – F ₇₍₇₎₍₈₎
Hexano/Acetato de etila	40	20	F ₇₍₇₎₍₉₎ – F ₇₍₇₎₍₁₀₎
Hexano/Acetato de etila	80	20	F ₇₍₇₎₍₁₁₎ – F ₇₍₇₎₍₁₂₎
Acetato de etila	100	20	F ₇₍₇₎₍₁₃₎ – F ₇₍₇₎₍₁₄₎
Metanol	100	20	F ₇₍₇₎₍₁₅₎ – F ₇₍₇₎₍₁₆₎

A fração UFE – F₇₍₇₎₍₂₎ eluída em 100% de hexano, mostrou-se pura segundo a análise por CCD, sendo denominada UF-1. Este material foi submetido à análise no Laboratório de CG-EM, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, onde a composição química e caracterização foram determinadas utilizando-se o equipamento Shimadzu GCMS QP5050 com coluna capilar DB-1 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x filme de 0,25 µm). A metodologia empregada foi previamente padronizada (temperatura de injeção de 280°C, hélio como gás carreador com fluxo na coluna de 1,0 mL min⁻¹, pressão de 62,9 kPa, tempo de equilíbrio de 1 min, com razão de aquecimento do injetor de 80-180°C por 5°C min⁻¹ e 180-300°C por 10°C min⁻¹). Para a identificação dos compostos utilizou-se o banco de dados *Wiley 229 Library*.

3.4.3 Elaboração da fração do extrato etanólico (UFE – F₁₄₋₁₆) da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* e Obtenção do composto UF-2 [UFE – F_{14-16(6/9)}]

Uma alíquota da fração UFE – F₁₄₋₁₆ (367,9 mg) com características físicas sólidas, de cor amarelada e aspecto oleaginoso foi misturada ao gel de sílica 60, com granulometria 70-230 mesh, pulverizados em gral de porcelana e aplicados sobre 16,775 g de gel de sílica em uma coluna de vidro. A eluição foi realizada com os solventes, diclorometano e acetato de etila, puros e obedeceu a ordem crescente de polaridade (Tabela 8).

Tabela 8 – Cromatografia em gel de sílica do extrato etanólico (UFE – F₁₄₋₁₆) da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*.

Eluentes	Concentração (%)	Volume coletado (mL)	Frações obtidas
Diclorometano	100	10	F ₁₄₋₁₆₍₁₎ – F ₁₄₋₁₆₍₅₇₎
Acetato de etila	100	10	F ₁₄₋₁₆₍₅₈₎ – F ₁₄₋₁₆₍₁₀₄₎

3.4.4 Elaboração da fração do extrato etanólico (UFE – F₁₇₋₁₉) da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* e Obtenção do composto UF-3 [UFE – F₁₇₋₁₉₍₈₎]

Uma parte da fração UFE – F₁₇₋₁₉ (572,0 mg) foi misturada ao gel de sílica 60, com granulometria 70-230 mesh; amostra e gel foram pulverizados em gral de porcelana e

aplicados sobre 11,440 g de gel de sílica em uma coluna de vidro. A eluição foi realizada com os solventes hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade, conforme descrição feita na Tabela 9.

Tabela 9 – Cromatografia em gel de sílica do extrato etanólico (UFE – F₁₇₋₁₉) da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*.

Eluentes	Concentração (%)	Volume coletado (mL)	Frações obtidas
Hexano/Acetato de etila	25	20	F ₁₇₋₁₉₍₁₎ – F ₁₇₋₁₉₍₂₉₎
Hexano/Acetato de etila	50	20	F ₁₇₋₁₉₍₃₀₎ – F ₁₇₋₁₉₍₄₀₎
Hexano/Acetato de etila	75	20	F ₁₇₋₁₉₍₄₁₎ – F ₁₇₋₁₉₍₅₂₎
Acetato de etila	100	20	F ₁₇₋₁₉₍₅₃₎ – F ₁₇₋₁₉₍₆₁₎
Metanol	100	20	F ₁₇₋₁₉₍₆₂₎ – F ₁₇₋₁₉₍₆₈₎

A Figura 17 apresenta a rota esquemática do isolamento dos constituintes químicos (UF-1, UF-2 e UF-3), obtidos a partir do extrato etanólico da macroalga marinha verde *U. fasciata*.

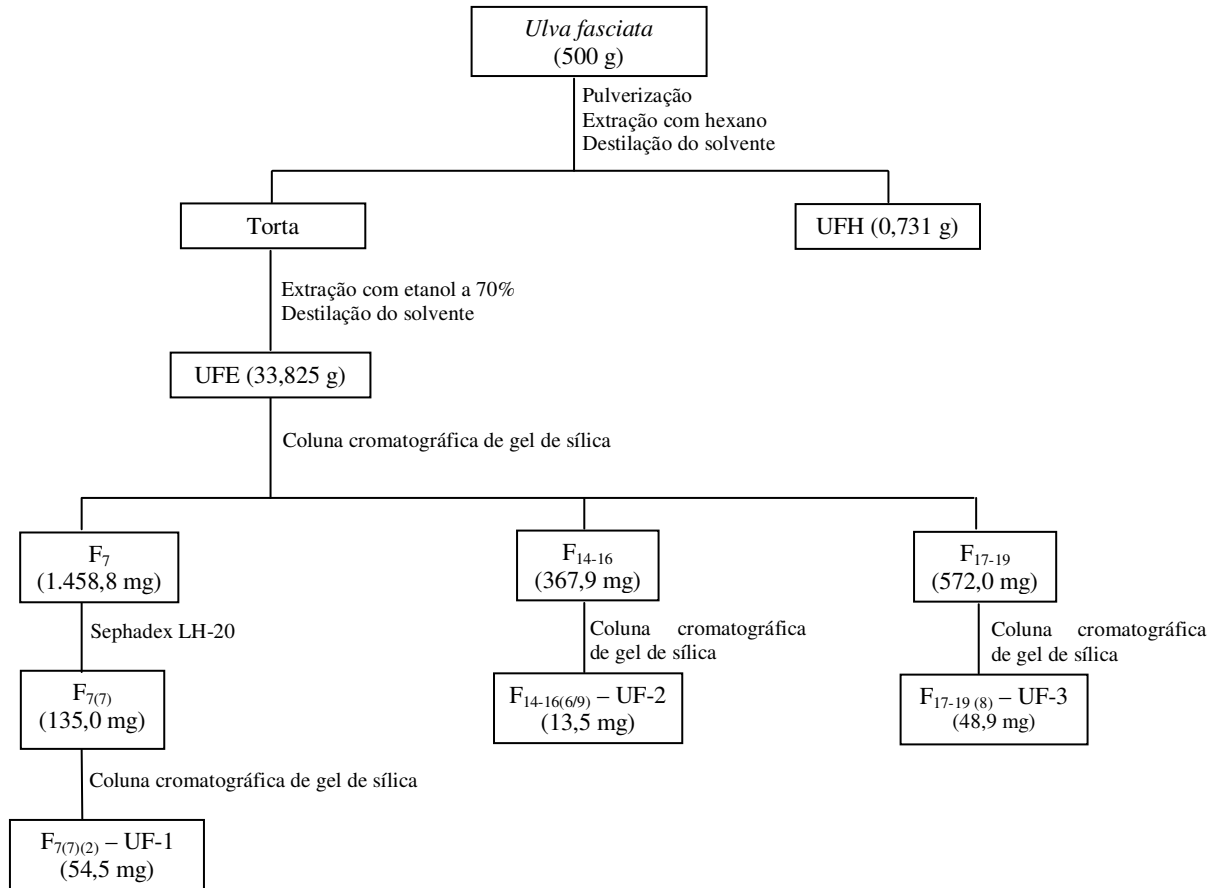


Figura 17 – Rota esquemática do isolamento dos constituintes químicos (UF-1, UF-2 e UF-3), obtidos a partir do extrato etanólico da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento dos extratos hexânico e etanólico da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*

No processo de extração dos metabólitos secundários da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*, as duas extrações, primeiramente com hexano e depois com etanol a 70%, apresentaram rendimentos de 0,15% e 6,76%, respectivamente, resultando em um rendimento total de 6,91% (Tabela 10).

Como é possível observar, o rendimento do UFE foi 45 vezes maior do que o do UFH e, por esta razão, o fracionamento cromatográfico foi realizado com UFE da alga marinha verde *U. fasciata*.

Tabela 10 – Dados referentes aos rendimentos dos extratos hexânico (UFH) e etanólico (UFE) da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*.

Extratos	Peso (g)	Rendimento (%)*
UFH	0,731	0,15
UFE	33,825	6,76

*Rendimento baseado no peso do material seco (500 g)

4.2 Prospecção fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários na macroalga marinha verde *Ulva fasciata*

Os resultados obtidos com os métodos da abordagem fitoquímica clássica, para a detecção dos constituintes químicos do extrato etanólico (UFE) da macroalga marinha verde *U. fasciata*, encontram-se listados na Tabela 11.

Tabela 11 – Prospecção fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários na macroalga marinha verde *Ulva fasciata*.

Classes de metabólitos	Resultado
Fenóis	-
Taninos	+
Antocianinas, antocianidinas e flavonóides	-
Leucoantocianidinas, catequinas e flavonas	-
Flavonóis, flavononas, flavanonóis e xantonas	-
Esteróides e triterpenóides	+
Saponinas	+
Alcalóides	+

(+) presença da substância analisada

(-) ausência da substância analisada

O teste dos taninos foi observado pela formação de um precipitado escuro no extrato etanólico de *U. fasciata*. Observou-se também a presença de esteróides e triterpenóides. A presença de triterpenóides foi identificada pelo teste de Lieberman-Burchard que resultou no aparecimento de uma coloração pardo intenso. A ocorrência de saponina foi verificada através da formação de uma espuma persistente e confirmada pela precipitação de agliconas hidrolisadas e não formação de espuma após o tratamento com HCl concentrado. Posteriormente as agliconas foram submetidas ao teste de Lieberman-Burchard, quando foi observada a formação de uma coloração verde indicando a presença de esteróides. Por fim, o resultado positivo para a presença de alcalóide em *U. fasciata*, através dos ensaios com os reagentes de precipitação para alcalóides (Dragendorff, Mayer e Wagner), foi observado pela formação de precipitado laranja intenso após a adição do reagente de Dragendorff, e confirmado pelos resultados dos ensaios com os reagentes de Mayer (precipitado branco) e Wagner (precipitado marrom), respectivamente.

Não houve indícios da presença de fenóis, antocianinas, antocianidinas, flavonóides, leucoantocianidinas, catequinas, flavonas, flavonóis, flavononas, flavanonóis e xantonas no extrato etanólico da macroalga marinha verde *U. fasciata*.

A detecção de taninos na macroalga marinha verde *U. fasciata* foi relatada pela primeira vez no presente trabalho. Apesar de não ser encontrada em algas verdes, esta classe é normalmente encontrada nas algas pardas, sendo denominada de florotaninos (ROCHA *et al.*, 2007). Os taninos são conhecidos por sua ação antioxidante, devido à capacidade de capturar radicais livres, reforçando, assim, as propriedades medicinais.

Os terpenos estão incluídos em uma diversificada classe de substâncias naturais de origem vegetal, sendo formados a partir de unidades de cinco átomos de carbonos (C₅),

denominadas de isopreno. Essas moléculas são unidades entre si em cabeça-cauda. Os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades de isoprenos que podem ser: monoterpenos (C₁₀); sesquiterpenos (C₁₅); diterpenos (C₂₀); sesterterpenos (C₂₅); triterpenos (C₃₀); tetraterpenos ou carotenóides (C₄₀) e esteróide (C₁₈ a C₂₉) (HANSON, 2003; HUMPHREY; BEALE, 2006; MANN, 2005).

A presença de triterpenóides em *U. fasciata* foi relatada pela primeira vez no presente trabalho, porém a literatura registra o isolamento de outras estruturas terpenóides em outras espécies do gênero *Ulva*, como diterpenos labdanos (CHAKRABORTY *et al.*, 2010a), sesquiterpenos (CHAKRABORTY *et al.*, 2010b; CHAKRABORTY; PAULRAJ, 2010), tetraterpenos (PIRES *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2008) e esteróides (AWAD, 2000).

Esta é também a primeira vez que a presença de saponinas esteroidais é relatada na macroalga marinha verde *U. fasciata* e, até o momento, não há registro desses compostos em nenhuma outra espécie de macroalga marinha.

Os alcalóides são um grupo de compostos orgânicos que tem átomo(s) de nitrogênio no anel cíclico. Além de carbono, hidrogênio e nitrogênio, as moléculas de alcalóides podem conter enxofre, cloro e, raramente, bromo ou fósforo (GÜVEN; PERCOT; SEZIK, 2010). A presença de alcalóides na macroalga marinha verde *U. fasciata* foi relatada por Alencar *et al.* (*in press*), que estudaram a ocorrência de dois alcalóides, a histamina (alcalóide imidazólica) e a tiramina em treze espécies de macroalgas marinha dentre elas, a *U. fasciata*, onde foi detectada a presença de histamina em uma quantidade inferior a 0,01 mg kg⁻¹ de alga desidratada. Apesar da tiramina não ter sido detectada em *U. fasciata*, ela foi encontrada nas algas marinhas parda *Laminaria saccharina* (KNEIFEL; MEINICHE; SOEDER, 1977; STEINER; HARTMANN, 1968), vermelhas *Palmaria palmata* (SAKER-SAMPAIO, 1997), *Chondrus crispus* e *Polysiphonia urceolata* (HARTMANN; AUFERMAN, 1973; KNEIFEL; MEINICHE; SOEDER, 1977; STEINER; HARTMANN, 1968) e também na microalga verde *Scenedesmus acutus* (ROLLE *et al.*, 1977). Este alcalóide possui atividade farmacológica causando a vasoconstrição, implicando no aumento da pressão arterial e dos batimentos cardíacos e também é responsável por enxaquecas (GÜVEN; PERCOT; SEZIK, 2010).

Barwell (1979) examinou a presença de histamina em 77 espécies de algas marinhas do Reino Unido. Dentre todos os membros das Chlorophyta, Rhodophyta e Phaeophyta, ela foi detectada apenas na alga marinha vermelha *Furcellaria lumbricalis*. Mais tarde, a distribuição de histamina em diferentes partes do talo da *F. lumbricalis* em estágios diferentes de desenvolvimento (gametófitas e tetraesporófitas) foi investigada e o autor

concluiu que a ocorrência de histamina pode estar associada a um mecanismo de proteção natural da alga contra organismos herbívoros, para que ela garanta sua sobrevivência até atingir a maturidade (BARWELL, 1989; BARWELL, 1994).

A presença de outro alcalóide, a hordenina, foi verificada nas macroalgas marinhas vermelhas *Phyllophora nervosa* (GÜVEN; BORA; SUNAM, 1970), *Ahnfeltia paradoxa* (KAWAUCHI; SASAKI, 1978), *Gigartina stellata* (BARWELL; BLUNDEN, 1981) e *Mastocarpus stellatus* (BARWELL; CANHAM; GUIRY, 1989).

Percot *et al.* (2009) verificaram a presença de feniletilamina em seis macroalgas marinhas com propriedades farmacológicas atuando como neurotransmissores e neuromoduladores em humanos, que foram relatadas por Güven; Percot e Sezik (2010).

Embora os compostos fenólicos não tenham sido detectados nesta prospecção fitoquímica, Raymundo; Horta e Fett (2004) comprovaram a existência de atividade antioxidante no extrato da macroalga marinha verde *U. fasciata* e Flodin; Helidoniotis e Whitfield (1999) quantificaram cinco compostos pertencentes à classe dos bromofenóis em outra espécie do mesmo gênero (*U. lactuca*).

4.3 Fracionamento do extrato etanólico – UFE

O fracionamento cromatográfico do UFE com os solventes orgânicos, hexano e acetato de etila, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade, resultou na obtenção de 30 frações, que foram reunidas para otimizar seu rendimento (Tabela 12).

Tabela 12 – Dados referentes à junção das frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* (UFE).

Extrato - Frações	Quantidade (mg)
UFE – F ₁₋₆	50,6
UFE – F ₇	1.458,8
UFE – F ₈₋₁₁	704,6
UFE – F ₁₂	338,6
UFE – F ₁₃	294,3
UFE – F ₁₄₋₁₆	674,6
UFE – F ₁₇₋₁₉	627,0
UFE – F ₂₀₋₂₇	735,5
UFE – F ₂₈₋₂₉	522,2
UFE – F ₃₀	17.849,0

Para ilustrar este resultado, as Figuras 18, 19 e 20 apresentam o perfil cromatográfico em CCD das frações do extrato UFE da macroalga marinha verde *U. fasciata* (UFE – F₇, UFE – F₁₄₋₁₆ e UFE – F₁₇₋₁₉), que foram consideradas promissoras e se investiu em sua purificação para o processo de elaboração e isolamento do(s) composto(s) de interesse.

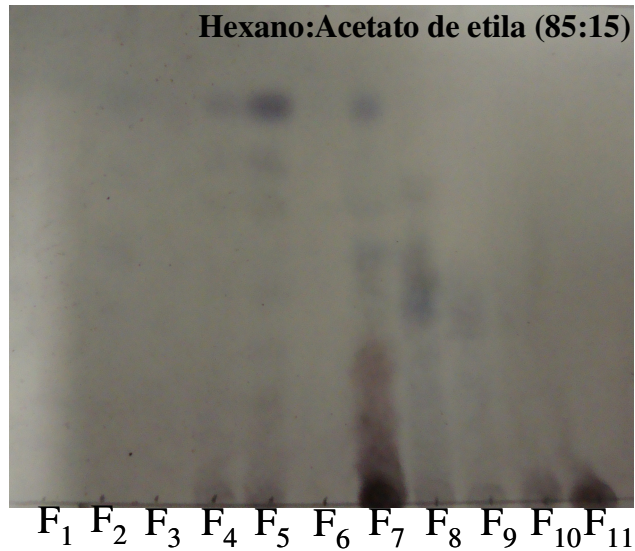


Figura 18 – Perfil cromatográfico em camada delgada da fração UFE – F₇ da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*, no sistema hexano:acetato de etila (85:15, v/v).

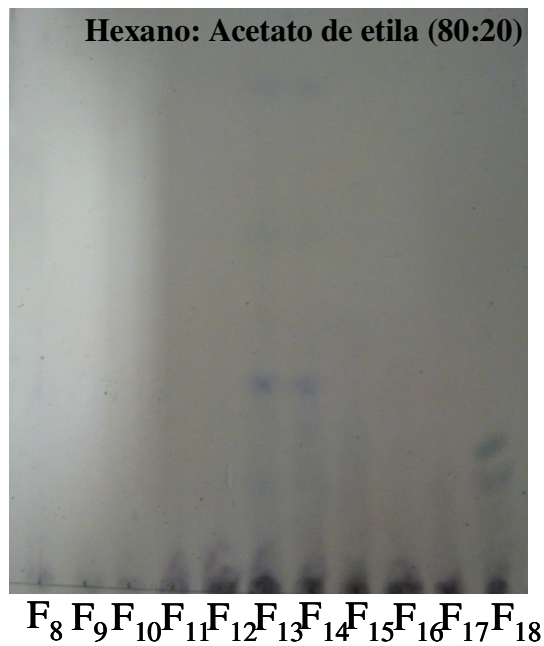


Figura 19 – Perfil cromatográfico em camada delgada da fração UFE – F₁₄₋₁₆ da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*, no sistema hexano:acetato de etila (80:20, v/v).



Figura 20 – Perfil cromatográfico em camada delgada da fração UFE – F₁₇₋₁₉ da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*, no sistema hexano:acetato de etila (60:40, v/v).

4.4 Purificação da fração do extrato etanólico (UFE – F₇) da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*

A UFE – F₇ por ter apresentado a maior massa (1.458,8 mg) foi submetida a purificação em coluna Sephadex LH-20 com 100% de diclorometano, resultando em 20 frações, em que a subfração UFE – F₇₍₇₎ foi utilizada na próxima etapa de purificação.

4.5 Elaboração da subfração UFE – F₇₍₇₎ da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* e Análise por CG-EM da amostra UF-1 [UFE – F₇₍₇₎₍₂₎]

O fracionamento cromatográfico da subfração UFE – F₇₍₇₎ com os solventes orgânicos, hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade, resultou nos rendimentos mostrados na Tabela 13.

Tabela 13 – Dados referentes ao fracionamento cromatográfico da subfração UFE – F₇₍₇₎ da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*.

Frações	Rendimento (%)	Frações	Rendimento (%)
UFE – F ₇₍₇₎ (1)	-	UFE – F ₇₍₇₎ (9)	2,82
UFE – F ₇₍₇₎ (2)	40,37	UFE – F ₇₍₇₎ (10)	6,89
UFE – F ₇₍₇₎ (3)	3,04	UFE – F ₇₍₇₎ (11)	4,74
UFE – F ₇₍₇₎ (4)	1,85	UFE – F ₇₍₇₎ (12)	13,63
UFE – F ₇₍₇₎ (5)	1,78	UFE – F ₇₍₇₎ (13)	2,00
UFE – F ₇₍₇₎ (6)	3,70	UFE – F ₇₍₇₎ (14)	0,96
UFE – F ₇₍₇₎ (7)	1,70	UFE – F ₇₍₇₎ (15)	-
UFE – F ₇₍₇₎ (8)	5,41	UFE – F ₇₍₇₎ (16)	10,82

*Rendimentos baseados no peso do UFE – F₇₍₇₎ (135 mg)

Um óleo incolor isolado em UFE-F₇₍₇₎(2) correspondeu a 54,5 mg (40,37%) e foi denominado de UF-1, apresentando fator de retenção (Rf) igual a 0,82 no sistema hexano:acetato de etila (80:20, v/v). Após a revelação com iodo sublimado, observou-se uma mancha circular (F₂) de coloração amarelada mostrada na Figura 21.

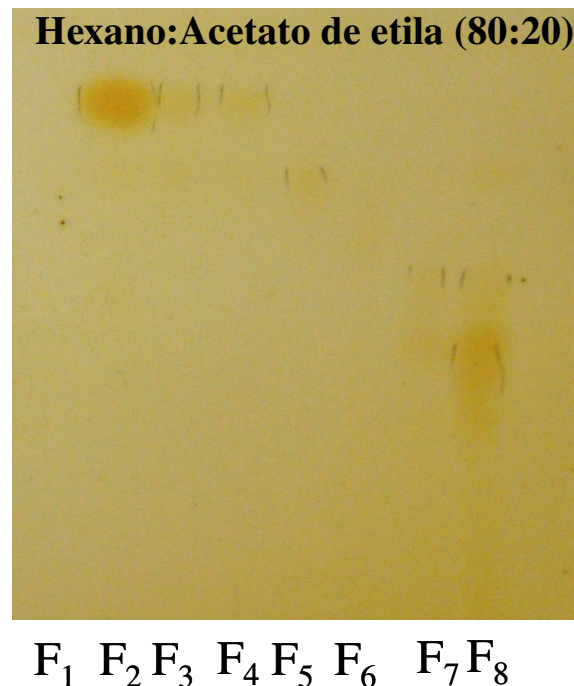


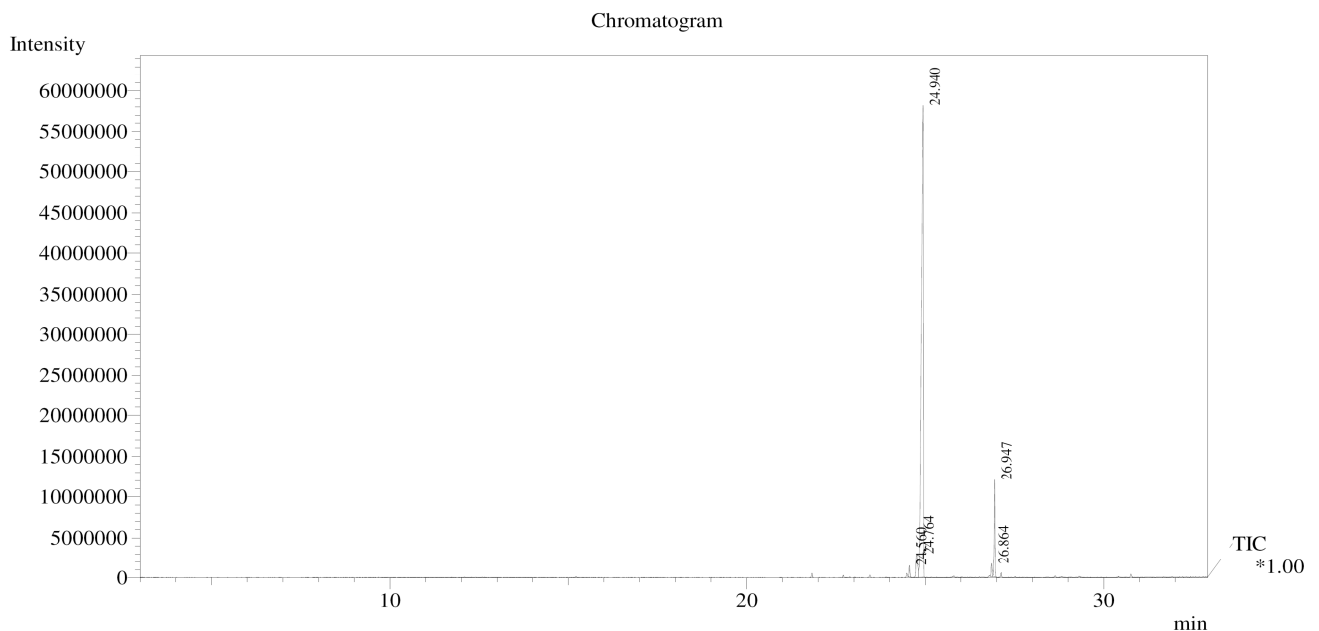
Figura 21 – Cromatografia em camada delgada da amostra UF-1 da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*, no sistema hexano:acetato de etila (80:20, v/v).

A amostra UF-1 foi analisada em CG-EM e um total de cinco compostos foram identificados, representando 99,99% do óleo total, de acordo com a Tabela 14.

Tabela 14 – Composição química da amostra UF-1 isolada da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*.

Constituintes	Tempo de retenção (min)	Rendimento (%)
1	24,560	1,00
2	24,764	3,73
3	24,940	86,17
4	26,864	1,27
5	26,947	7,82
Total	-	99,99

O cromatograma da amostra UF-1 da macroalga marinha verde *U. fasciata* mostrou a presença de um constituinte majoritário (86,17%) com tempo de retenção de 24,940 min (Figura 22), cujo espectro de massas o caracterizou por apresentar o íon molecular M^+ 284 (Figura 23). A sugestão fornecida pela análise CG-EM e a comparação visual do espectro do composto analisado com os da literatura, bem como pela proposta mecanística de formação dos principais fragmentos (Figura 24), reforçaram sua identificação como hexadecanoato de etila com um índice de similaridade de 96% (KEEN; HAMMING, 1971). Embora este composto já tenha sido encontrado em plantas superiores, esta é a primeira vez que sua ocorrência é relatada em uma espécie de macroalga marinha.

Figura 22 – Cromatograma – CG (cromatografia gasosa) da amostra UF-1 da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*.

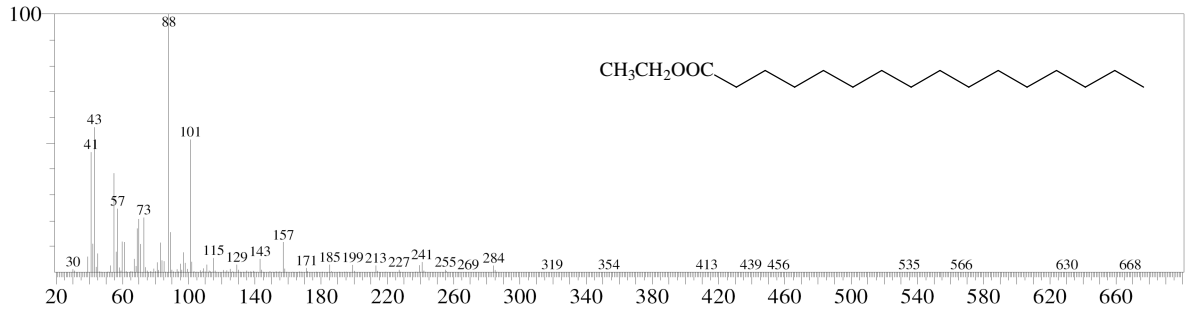


Figura 23 – Espectro de massa (EM) do hexadecanoato de etila da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*.

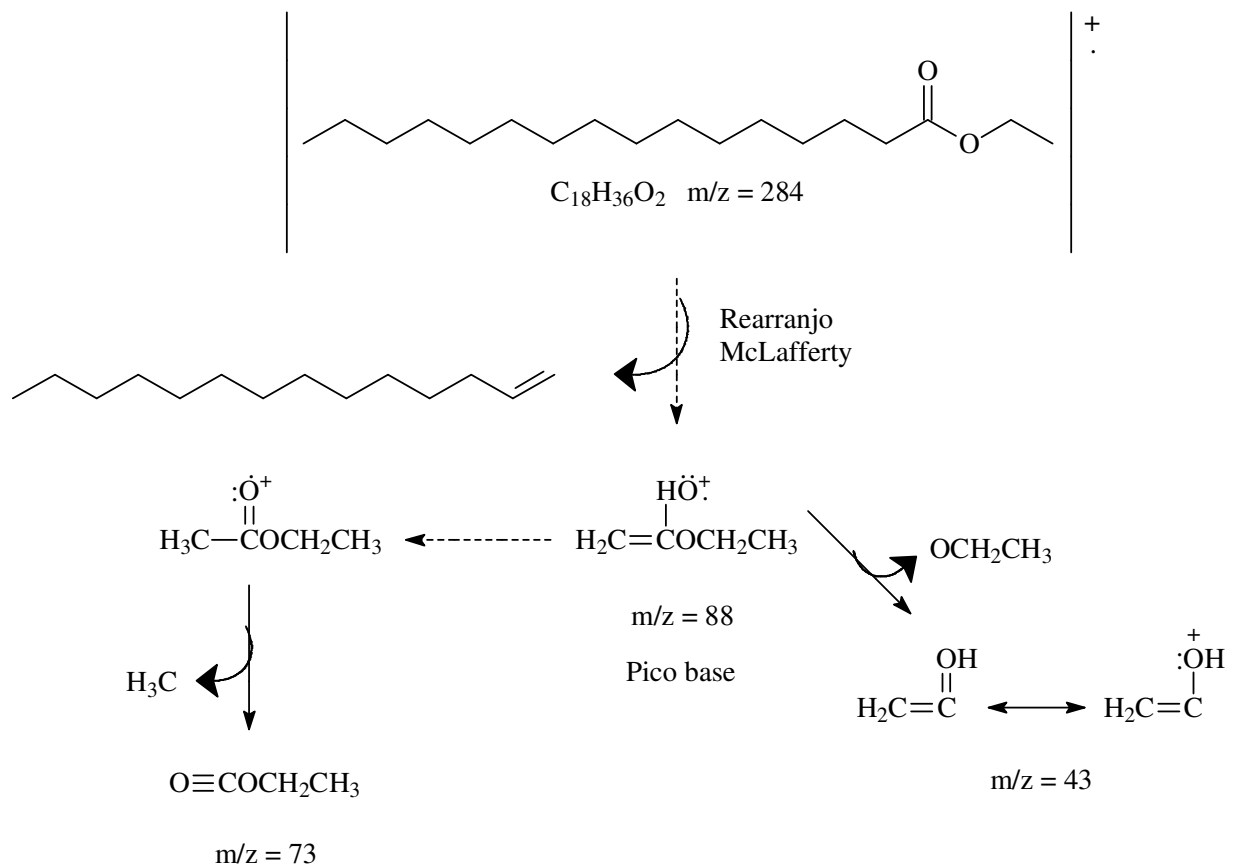


Figura 24 – Proposta mecânica para justificar a formação dos principais fragmentos do hexadecanoato de etila (UF-1) da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*.

Feitosa *et al.* (2007) e Ramirez (2008) realizaram uma abordagem fitoquímica nas plantas cipó-imbé (*Philodendron imbe*) e canela (*Cassia arborea*) utilizando técnicas cromatográficas clássicas juntamente com técnicas espectroscópicas isolando um óleo viscoso amarelo, que foi identificado como éster hexadecanoato de etila.

Peres *et al.* (2009) isolaram o mesmo composto, hexadecanoato de etila, na fração hexânica de uma planta da família das samambaias, o cipó-peludo *Microgramma vacciniifolia*. Os autores avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e as frações derivadas (hexânica, acetato de etila e EtOH-H₂O), sendo que a fração hexânica, de onde foi isolado o hexadecanoato de etila, foi a mais ativa frente à levedura *Saccharomyces cerevisiae*, ao fungo *Candida albicans*, com concentração mínima inibitória (CMI) de 0,25 mg mL⁻¹, e às bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Bacillus* e *Salmonella*, com CMI igual a 0,5 mg mL⁻¹.

Com base nestes resultados é possível sugerir a utilização do hexadecanoato de etila da macroalga marinha verde *U. fasciata* como composto promissor com relação à atividade antimicrobiana.

4.6 Elaboração da fração do extrato etanólico (UFE – F₁₄₋₁₆) da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* e Isolamento do composto UF-2 [UFE – F_{14-16(6/9)}]

No processo de elaboração desta fração, 100% de diclorometano foi a fase móvel mais adequada por conferir boa resolução na separação dos componentes da amostra na placa, quando comparada com o sistema hexano:acetato de etila (75:25, v/v).

A coluna composta por sílica gel (fase estacionária) foi preparada obedecendo-se a uma relação de aproximadamente 46 vezes entre a massa da amostra e a de sílica. Isso correspondeu a 367,9 mg de amostra e 16.774,7 mg de sílica gel, com 100 mL de diclorometano tendo sido utilizados no empacotamento da fase estacionária.

Na cromatografia em coluna (CC), 104 frações foram coletadas, com destaque para as frações 6 a 9 (F₁₄₋₁₆₍₆₎ a F₁₄₋₁₆₍₉₎) e 66 a 73 (F₁₄₋₁₆₍₆₆₎ a F₁₄₋₁₆₍₇₃₎). Houve a necessidade de mudar a fase móvel de 100% de diclorometano para 100% de acetato de etila, pois a amostra estava retida na fase estacionária, e a mudança aumentou a força do solvente, para que a amostra se desprendesse da fase estacionária.

Ao final do fracionamento, as massas foram pesadas obtendo-se um valor de 255,2 mg com rendimento de 69,36%. Considerando que o material de partida correspondeu a 367,9 mg, houve uma perda de 112,7 mg (30,64%), sendo importante ressaltar que grande parte dele ficou retido na coluna.

Nas cromatoplasas de CCD, observou-se que as frações $F_{14-16(5)}$ e $F_{14-16(9)}$ eram bastante semelhantes e com aspecto de substância pura. Com base neste resultado, outra CCD das frações intermediárias ($F_{14-16(6)}$; $F_{14-16(7)}$; $F_{14-16(8)}$; $F_{14-16(9)}$) foi realizada para confirmar a purificação da amostra. Como mostrado na Figura 25, depois de revelada com *p*-anisaldeído, essas frações apresentaram-se como bandas circulares definidas com ausência de resíduos, características de uma substância realmente pura.

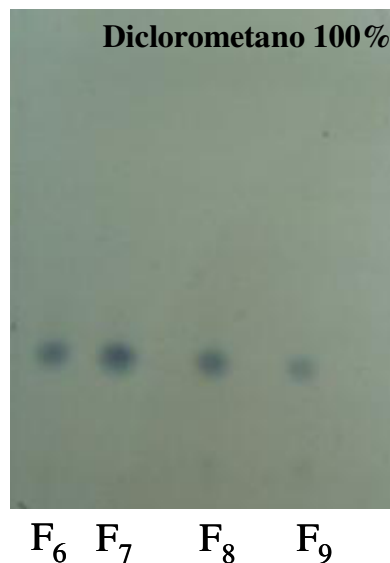


Figura 25 – Cromatografia em camada delgada das frações $F_{14-16(6)}$; $F_{14-16(7)}$; $F_{14-16(8)}$; $F_{14-16(9)}$ obtidas da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*, em 100% de diclorometano.

As frações ($F_{14-16(6)}$; $F_{14-16(7)}$; $F_{14-16(8)}$; $F_{14-16(9)}$) foram reunidas para aumentar o rendimento e, em seguida, submetidas à análise em CCD em sistema diclorometano:metanol (90:10, v/v). O resultado foi o aparecimento de uma única mancha circular e definida com aspecto de um óleo amarelo, apresentando um fator de retenção (R_f) de 0,68, comprovando que se tratava da mesma substância (Figura 26). O material isolado, denominado de UF-2 correspondendo a uma massa de 13,5 mg, foi encaminhado para o Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da UFC, para a determinação sua estrutura química através de técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C uni- e bidimensionais (^1H , ^1H -COSY, gs-HMQC, gs-HMBC, ROESY, NOESY e TOCSY), bem como por espectrometria de massa.



Figura 26 – Cromatografia em camada delgada da F₆₋₉ (F_{14-16(6/9)}) oriundas do UFE – F₁₄₋₁₆ obtido da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*, no sistema diclorometano:metanol (90:10, v/v).

As outras frações de interesse (F₁₄₋₁₆₍₆₆₎ a F₁₄₋₁₆₍₇₃₎), devido possuir uma massa relevante de 115 mg, apresentaram-se como duas bandas distintas (Figura 27). Estas frações serão submetidas a mais uma etapa de purificação através da cromatografia líquida de alta eficiência e, posteriormente, a caracterização do composto.

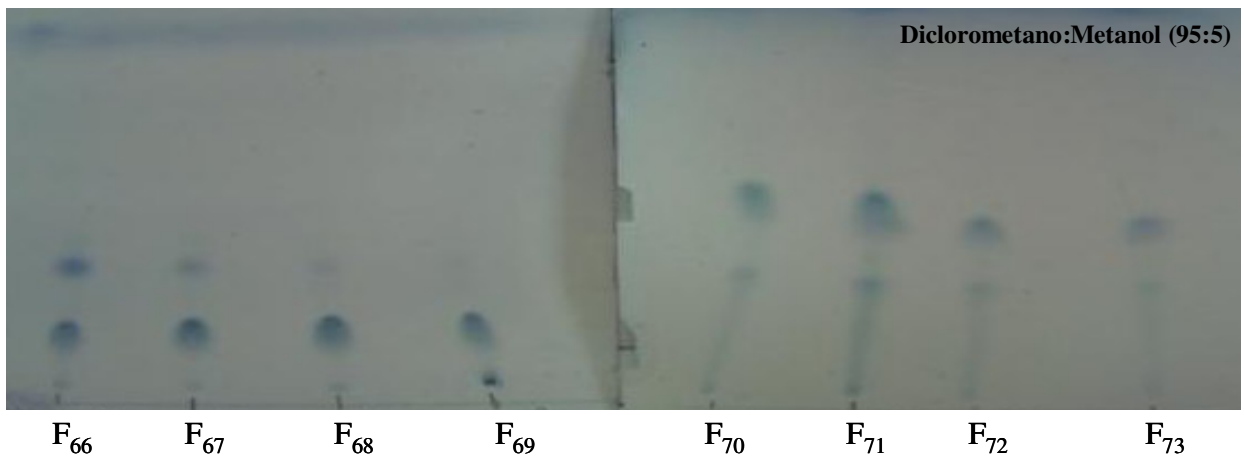


Figura 27 – Cromatografia em camada delgada das frações F₁₄₋₁₆₍₆₆₎ a F₁₄₋₁₆₍₇₃₎ obtidas da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*, no sistema diclorometano:metanol (95:5, v/v).

4.7 Elaboração da fração do extrato etanólico (UFE – F₁₇₋₁₉) da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* e Isolamento do composto UF-3 [UFE – F₁₇₋₁₉₍₈₎]

O sistema de separação dos componentes da amostra constituído da mistura binária hexano:acetato de etila (75:25, v/v) apresentou melhor desempenho quando comparado com o sistema 100% de diclorometano em virtude do primeiro ter gerado um maior número de manchas nas cromatoplaças.

A coluna preparada com sílica gel como fase estacionária obedeceu a uma relação de 20 vezes entre a massa da amostra e a de sílica e isso correspondeu a 572 mg de amostra e 11.440 mg de sílica gel.

No total foram coletadas 68 frações. Destas, apenas as frações F₁₇₋₁₉₍₄₎, F₁₇₋₁₉₍₅₎, F₁₇₋₁₉₍₆₎, F₁₇₋₁₉₍₇₎, F₁₇₋₁₉₍₈₎, F₁₇₋₁₉₍₉₎, F₁₇₋₁₉₍₁₀₎, F₁₇₋₁₉₍₁₁₎, F₁₇₋₁₉₍₁₂₎, F₁₇₋₁₉₍₁₃₎, F₁₇₋₁₉₍₁₄₎, F₁₇₋₁₉₍₁₅₎, F₁₇₋₁₉₍₆₆₎ e F₁₇₋₁₉₍₆₇₎ foram submetidas a CCD. As demais frações aparentemente não apresentarem massa e, por este motivo, foram descartadas. Dentre as 14 frações supracitadas, as frações F₁₇₋₁₉₍₇₎ e F₁₇₋₁₉₍₈₎ demonstraram estar puras (Figura 28).

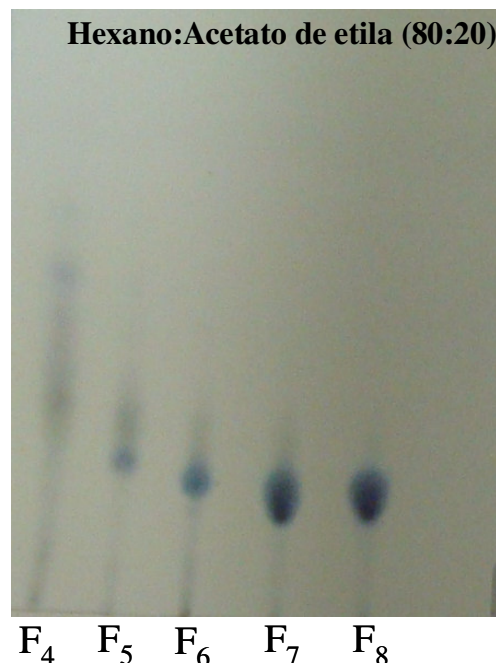


Figura 28 – Cromatografia em camada delgada das frações F₁₇₋₁₉₍₄₎, F₁₇₋₁₉₍₅₎, F₁₇₋₁₉₍₆₎, F₁₇₋₁₉₍₇₎ e F₁₇₋₁₉₍₈₎ obtidas da macroalga marinha verde *Ulva fasciata*, no sistema hexano:acetato de etila (80:20, v/v).

Ao final do fracionamento em CC, as massas correspondentes as 68 frações obtidas foram somadas obtendo-se um valor de 241,0 mg com rendimento de 42,23%,

considerando que o material de partida correspondeu a 572 mg. Esse baixo rendimento pode ser explicado pelo fato de parte da amostra ter ficado retida na coluna.

O material isolado da fração F₁₇₋₁₉₍₈₎ foi chamado de UF-3 correspondendo a uma massa de 48,9 mg, tendo uma aparência de cristais de coloração branca, apresentando um Rf de 0,20 em um sistema de hexano:acetato de etila (80:20, v/v). Este material foi encaminhado para o CENAUREMN da UFC, para a determinação da sua estrutura química através de técnicas espectroscópicas de RMN ¹H e ¹³C uni- e bidimensionais (¹H, ¹H-COSY, gs-HMQC, gs-HMBC, ROESY, NOESY e TOCSY), bem como por espectrometria de massa.

Devido à grande importância científica e médica de compostos derivados de organismos marinhos, que têm mostrado um grande potencial biotecnológico, os compostos isolados da macroalga marinha verde *U. fasciata* serão investigados quanto a(s) sua(s) atividade(s) biológica(s).

Além do material UF-1, analisado neste trabalho, UF-2 e UF-3, em análise, ainda há a fração metanólica (UFE – F₃₀), que corresponde a aproximadamente 53% do total e que deverá ser submetida aos processos de purificação para isolar os compostos de maior atividade biológica como as saponinas esteroidais, que foram detectadas na prospecção fitoquímica da *U. fasciata*.

5 CONCLUSÕES

Através da prospecção fitoquímica no extrato etanólico da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* foi possível a detecção de taninos, triterpenos, saponinas esteroidais e alcalóides. Exceto para os alcalóides, as outras classes de metabólitos secundários foram detectadas pela primeira vez em macroalgas marinhas verdes neste trabalho.

A prospecção fitoquímica do extrato etanólico da macroalga marinha verde *U. fasciata* resultou no isolamento e caracterização estrutural do hexadecanoato de etila, cuja ocorrência está sendo relatada pela primeira vez em uma espécie de macroalga marinha neste trabalho.

Os outros dois compostos purificados (UF-2 e UF-3) foram levados ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará (UFC) para a determinação sua estrutura química através de técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C uni- e bidimensionais (^1H , ^1H -COSY, gs-HMQC, gs-HMBC, ROESY, NOESY e TOCSY), bem como por espectrometria de massa.

A fração metanólica (UFE – F₃₀), com rendimento de 17.849 mg (52,769%), deverá ser submetida aos processos de purificação para isolar os compostos de maior atividade biológica como as saponinas esteroidais.

REFERÊNCIAS

ALAMSJAH, M. A.; HIRAO, S.; ISHIBASHI, F.; FUJITA, Y. Isolation and structure determination of algicidal compounds from *Ulva fasciata*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 69, n. 11, p. 2186-2192, Nov 2005.

ALENCAR, D. B.; PIRES-CAVALCANTE, K. M. S.; SOUSA, M. B.; VIANA, F. A.; SAKER-SAMPAIO, S. Aminas biogênicas em macroalgas marinhas do Estado do Ceará, Brasil. **Revista Ciência Agronômica**, *In Press*.

ALGAEBASE. **Listing the world's algae**. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>> Acesso em: 22 jun. 2010.

ALI, M. S.; SALEEM, M.; YAMDAGNI, R.; ALI, M. A. Steroid and antibacterial steroidal glycosides from marine green alga *Codium iyengarii*. **Natural Product Letters**, Oxon, v. 16, n. 6, p. 407-413, Dec 2002.

AWAD, N. E. Biologically active steroid from the green alga *Ulva lactuca*. **Phytotherapy Research**, Chichester, v. 14, n. 8, p. 641-643, Dec 2000.

BARWELL, C. J.; BLUNDEN, G. Hordenine from the red alga *Gigartina stellata*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 44, n. 4, p. 500-502, July-Aug 1981.

BARWELL, C. J.; CANHAM, C. A.; GUIRY, M. D. Hordenine content of the marine alga *Mastocarpus stellatus* and the algal food product carrageen. **Phytotherapy Research**, Chichester, v. 3, n. 2, p. 67-69, Apr 1989.

BARWELL, C. J. Distribution of histamine in the thallus of *Furcellaria lumbricalis*. **Journal of Applied Phycology**, Amsterdam, v. 1, p. 341-344, 1989.

BARWELL, C. J. Pharmacologically-active amines in some marine algae and algal food products. **Journal of Home & Consumer Horticulture**, New York, v. 1, n. 1, p. 77-82, 1994.

BARWELL, C. J. The occurrence of histamine in the red alga *Furcellaria lumbricalis* (Huds.) Lamour. **Botanica Marina**, Berlin, v. 22, n. 6, p. 399-401, 1979.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 16, n. 6, p. 981-987, 1951.

BERLINCK, R. G. S.; HAJDU, E.; ROCHA, R. M.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; HERNÁNDEZ, I. L. C.; SELEGHIM, M. H. R.; GRANATO, A. C.; ALMEIDA, E. V. R.; NUÑEZ, C. V.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; THIEMANN, O.; SILVA, M.; SOUZA, A.O.; SILVA, C. L.; MINARINI, P. R. R. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 67, n. 3, p. 510-522, Mar 2004.

BHADURY, P.; WRIGHT, P. C. Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. **Planta**, New York, v. 219, n. 4, p. 561-578, Aug 2004.

BONATO, P. S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo, UNICAMP, 2007, cap. 8, p. 203-272.

CELIKLER, S.; TAS, S.; VATAN, O.; ZIYANOK-AYVALIK, S.; YILDIZ, G.; BILALOGLU, R. Anti-hyperglycemic and antigenotoxic potential of *Ulva rigida* ethanolic extract in the experimental diabetes mellitus. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 8, p. 1837-1840, Aug 2009.

CELIKLER, S.; YILDIZ, G.; VATAN, O.; BILALOGLU, R. *In vitro* antigenotoxicity of *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyceae) extract against induction of chromosome aberration, sister chromatid exchange and micronuclei by mutagenic agent MMC. **Biomedical and Environmental Sciences**, Orlando, v. 21, n. 6, p. 492-498, Dec 2008.

CHAKRABORTY, K.; LIPTON, A. P.; PAULRAJ, R.; CHAKRABORTY, R. D. Guaiane sesquiterpenes from seaweed *Ulva fasciata* Delile and their antibacterial properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 45, n. 6, p. 2237-2244, June 2010b.

CHAKRABORTY, K.; LIPTON, A. P.; PAULRAJ, R.; VIJAYAN, K. K. Antibacterial labdane diterpenoids of *Ulva fasciata* Delile from southwestern coast of the Indian Peninsula. **Food Chemistry**, Oxford, v. 119, n. 4, p. 1399-1408, Apr 2010a.

CHAKRABORTY, K.; PAULRAJ, R. Sesquiterpenoids with free-radical-scavenging properties from marine macroalga *Ulva fasciata* Delile. **Food Chemistry**, Oxford, v. 122, n. 1, p. 31-41, Sept 2010.

CHEN, J. L.; GERWICK, W. H.; SCHATZMAN, R.; LANEY, M. Isorawsonol and related IMP dehydrogenase inhibitors from the tropical green alga *Avrainvillea rawsonii*. **Journal Natural Products**, Cincinnati, v. 57, n. 7, p. 947-952, July 1994.

CHIHEB, I.; RIADI, H.; MARTINEZ-LOPEZ, J.; DOMINGUEZ-SEGLAR, J. F.; GOMEZ-VIDAL, J. A.; BOUZIANE, H.; KADIRI, M. Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 8, n. 7, p. 1258-1262, Apr 2009.

CIOLA, R. Cromatografia. In: _____. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho – HPLC**. 2 ed. São Paulo, Edgard Blücher, 2003. cap. 1, p. 1-7.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo, UNICAMP, 2007, cap. 1, p. 17-45.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R. A. Organismos marinhos como fontes de novos fármacos e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

COTO, A. C. S. P.; PUPO, D. In: BICUDO, C. E. M. (Org.). **Flora ficológica do Estado de São Paulo – Ulvophyceae**. São Paulo: Rima, 2009, 76 p.

DI STASI, L. C. (Org.). **Plantas medicinais - arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora da UNESP, 1996. 230 p.

DWORJANYN, S. A.; DE NYS, R.; STEINBERG, P. D. Localisation and surface quantification of secondary metabolites in the red alga *Delisea pulchra*. **Marine Biology**, New York, v. 133, n. 4, p. 727-736, May 1999.

EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Riyadh, v. 18, n. 1, p. 1-25, Jan 2010.

EPIFÂNIO, R. D.; MAIA, L. F.; PINTO, A. C.; HARDT, I.; FENICAL, W. Natural products from the gorgonian *Lophogorgia punicea*: Isolation and structure elucidation of an unusual 17-hydroxysterol. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 187-192, Mar-Apr 1998.

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

FEITOSA, C. M.; BEZERRA, M. Z. B.; CITÓ, A. M. G. L.; COSTA JÚNIOR, J. S.; LOPES, J. A. D.; MOITA NETO, J. M. Constituintes químicos de *Philodendron imbe* Schott. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 41-44, jan-fev 2007.

FELICIO, R.; ALBUQUERQUE, S.; YOUNG, M. C. M.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceremiales). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 52, n. 5, p. 763-769, Sept 2010.

FENICAL, W. Marine pharmaceuticals: Past, present and future. **Oceanography**, Rockville, v. 19, n. 2, p. 110-119, June 2006.

FLODIN, C.; HELIDONIOTIS, F.; WHITFIELD, F. B. Seasonal variation in bromophenol content and bromoperoxidase activity in *Ulva lactuca*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 135-138, May 1999.

GARG, H. S.; SHARMA, M.; BHAKUNI, D. S.; PRAMANIK, B. N.; BOSE, A. K. An antiviral sphingosine derivative from the green alga *Ulva fasciata*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 33, n. 12, p. 1641-1644, Mar 1992.

GONZÁLEZ DEL VAL, A.; PLATAS, G.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; GORROCHATEGUI, J.; SUAY, I.; VICENTE, F.; PORTILLO, E.; JIMÉNEZ DEL RÍO, M.; REINA, G. G.; PELÁEZ, F. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). **International Microbiology**, Madrid, v. 4, n. 1, p. 35-40, Mar 2001.

GOODWIN, K. D.; NORTH, W. J.; LIDSTROM, M. E. Production of bromoform and dibromomethane by giant kelp: Factors affecting release and comparison to anthropogenic bromine sources. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 42, n. 8, p. 1725-1734, Dec 1997.

GÜVEN, K. C.; BORA, A.; SUNAM, G. Hordenine from alga *Phyllophora nervosa*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 9, n. 8, p. 1893, 1970.

GÜVEN, K. C.; PERCOT, A.; SEZIK, E. Alkaloids in marine algae. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, n. 2, p. 269-284, Feb 2010.

HANSON, J. R. **Natural Products**: The secondary metabolites. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2003. 154 p.

HARTMANN, T.; AUFERMAN, B. Physiology of amine formation in marine red alga *Polysiphonia urceolata*. **Marine Biology**, New York, v. 21, n. 1, p. 70-74, 1973.

HASSAN, S. M.; GHAREIB, H. R. Bioactivity of *Ulva lactuca* L. acetone extract on germination and growth of lettuce and tomato plants. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 8, n. 16, p. 3832-3838, Aug 2009.

HUMPHREY, A. J.; BEALE, M. H. Terpenes. In: CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet**. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. chapter 3, p. 47-101.

IMMANUEL, G.; VINCYBAI, V. C.; SIVARAM, A.; PALAVESAM, A.; MARIAN, M. P. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 236, n. 1-4, p. 53-65, June 2004.

ITO, K.; HORI, K. Seaweed: chemical composition and potential food uses. **Food Reviews International**, New York, v. 5, n. 1, p. 101-144, 1989.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo, UNICAMP, 2007, cap. 9, p. 273-398.

JOLY, A. B. Flora marinha do litoral norte do estado de São Paulo e regiões circunvizinhas. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo**, São Paulo, n. 294, p. 1-406, 1965.

KAWAUCHI, H.; SASAKI, T. Isolation and identification of hordenine, *p*-(2-dimethylamino)ethyl-phenol from *Ahnfeltia paradoxa*. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, Tokyo, v. 44, n. 2, p. 135-137, 1978.

KEEN, G. W.; HAMMING, M. C. Mass spectrometric analysis of aliphatic esters. **Mass Spectroscopy**, v. 19, n. 4, p. 308-315, Dec 1971.

KHAN, M. N. A.; SUK-CHOI, J.; LEE, M. C.; KIM, E.; NAM, T. J.; FUJII, H.; HONG, Y.K. Anti-inflammatory activities of methanol extracts from various seaweed species. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 29, n. 4, p. 465-469, July 2008.

KNEIFEL, H.; MEINICHE, M.; SOEDER, C.J. Analysis of amines in algae by high-performance liquid chromatography. **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 13, p. 36, Suppl. S, 1977.

KOEHN, F. E.; GUNASEKERA, S. P.; NIEL, D. N.; CROSS, S. S. Halitunal, an unusual diterpene aldehyde from the marine alga *Halimeda tuna*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 169-172, Jan 1991.

KUNIYOSHI, M.; YAMADA, K.; HIGA, T. A biologically active diphenyl ether from the green alga *Cladophora fascicularis*. **Experientia**, Basel, v. 41, n. 4, p. 523-524, 1985.

LEV, E. Healing with animals in the Levant from the 10th to the 18th century. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, London, v. 2, n. 11, p. 1-9, Feb 2006.

LIMA-FILHO, J. V.; CARVALHO, A.; FREITAS, S. M.; MELO, V. M. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 311-313, Oct-Dec 2002.

LINS, K. O. A. L.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P. N. N.; ALENCAR, N. M. N.; LIMA, M. W.; TORRES, V. M.; FARIAS, W. R. L.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 29, n. 1, p. 20-26, Jan 2009.

LIPTON, A. P.; PRAMITHA, V. S.; JOSE, J. J. Marine secondary metabolites (MSM) from macroalgae enhance bacterial clearance in hemolymph of *Penaeus monodon*. **The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh**, Ashrat, v. 61, n. 1, p. 42-47, Mar 2009.

LOPES, J. L. C. Cromatografia em camada delgada. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo, UNICAMP, 2007, cap. 3, p. 67-86.

MAGALLANES, C.; CÓRDOVA, C.; OROZCO, R. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. **Revista Peruana de Biología**, Lima, v. 10, n. 2, p. 125-132, jul-dic 2003.

MANN, J. Metabolites derived from mevalonate: isoprenoids. In: _____. **Secondary metabolites**. 2. ed. Oxford: Oxford Science Publications, 2005, chapter 3, p. 95-172.

MARGRET, R. J.; KUMARESAN, S.; RAVIKUMAR, S. A preliminary study on the anti-inflammatory activity of methanol extract of *Ulva lactuca* in rat. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 30, n. 5, p. 899-902, Sept 2009.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 2009. 150 p.

MAYER, A. M. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2001-2002: Marine compounds with antihelminthic, 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**, New York, v. 140, n. 3-4, p. 265-286, Mar-Apr 2005.

MENDES, G. S.; SOARES, A. R.; MARTINS, F. O.; ALBUQUERQUE, M. C. M.; COSTA, S. S.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; GESTINARI, L. M. S.; SANTOS, N.; ROMANOS, M. T. V. Antiviral activity of the green marine alga *Ulva fasciata* on the replication of human metapneumovirus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 52, n. 1, p. 3-10, Jan-Feb 2010.

MUNRO, M. H. G.; BLUNT, J. W.; DUMDEI, E. J.; HICKFORD, S. J. H.; LILL, R. E.; LI, S. X.; BATTERSHILL, C. N.; DUCKWORTH, A. R. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 70, n. 1-3, p. 15-25, Apr 1999.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 17, n. 3, p. 215-234, 2000.

ORHAN, I.; SENER, B.; ATICI, T.; BRUN, R.; PEROZZO, R.; TASDEMIR, D. Turkish freshwater and marine macrophyte extracts show in vitro antiprotozoal activity and inhibit FabI, a key enzyme of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis. **Phytomedicine**, Jena, v. 13, n. 6, p. 388-393, June 2006.

ORTEGA, J. L. G. Algas. In: ESPINO, G. L.; PULIDO, S. H.; PÉREZ, J. L. C. (Org). **Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (Bioindicadores)**. San Rafael, Plaza y Valdéz, 2000, p. 109-194.

PAUL, V. J.; FENICAL, W. Novel bioactive diterpenoid metabolites from tropical marine algae of the genus *Halimeda* (Chlorophyta). **Tetrahedron**, Oxford, v. 40, n. 16, p. 3053-3062, 1984.

- PERCOT, A.; YALCIN, A.; AYSEL, V.; ERDUGAN, H.; DURAL, B.; GÜVEN, K. C. Beta-phenylethylamine content in marine algae around Turkish coasts. **Botanica Marina**, Berlin, v. 52, n. 1, p. 87-90, Feb 2009.
- PEREIRA, R. C.; TEIXEIRA, V. L. Sesquiterpenos das algas marinhas *Laurencia lamouroux* (Ceramiales, Rhodophyta). 1. Significado ecológico. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 369-374, maio-jun 1999.
- PERES, M. T. L. P.; SIMIONATTO, E.; HESS, S. C.; BONANI, V. F. L.; CANDIDO, A. C. S.; CASTELLI, C.; POPPI, N. R.; HONDA, N. K.; CARDOSO, C. A. L.; FACCENDA, O. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd & Fisch) Copel (Polypodiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 897-901, 2009.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, Suppl. 1, p. 45-61, jul 2002.
- PIRES, K. M. S.; ALENCAR, D. B.; SOUSA, M. B.; SAMPAIO, A. H.; SAKER-SAMPAIO, S. Teores de alfa-caroteno e beta-caroteno em macroalgas marinhas desidratadas. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 2, p. 257-262, abr-jun 2008.
- RAMIREZ, R. R. A. **Abordagem fitoquímica de uma espécie da família Flacourtiaceae – *Casearia arborea* (Rich.) Urb.** 2008. 147 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Protista II: Heterocontas e algas verdes. In: _____. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 17, p. 356-383.
- RAYMUNDO, M. S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 495-503, out-dez 2004.
- REVIERS, B. Sub-reino Viridiplantae ou Chlorobionta. In: _____. **Biologia e filogenia das algas**. Porto Alegre: Artmed, 2006. cap. 4, p. 66-106.
- RIZVI, M. A.; SHAMEEL, M. Pharmaceutical biology of seaweeds from the Karachi coast of Pakistan. **Pharmaceutical Biology**, Philadelphia, v. 43, n. 2, p. 97-107, Mar 2005.

ROCHA, F. D.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. C.; TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, n. 4, p. 631-639, out-dez 2007.

ROLLE, I.; HOBUCHER, H. E.; KNEIFEL, H.; PASCHOLD, B.; RIEPE, W.; SOEDER, C. J. Amines in unicellular green algae. 2. Amines in *Scenedesmus acutus*. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 77, n. 1, p. 103-109, Jan 1977.

ROTHSCHILD, Z. Cromatografia por exclusão. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo, UNICAMP, 2007, cap. 6, p. 139-166.

SABINA, H.; TASNEEM, S.; SAMBREEN, KAUSAR, Y.; CHOUDHARY, M. I.; ALIYA, R. Antileishmanial activity in the crude extract of various seaweed from the coast of Karachi, Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 37, n. 1, p. 163-168, Mar 2005.

SAKER-SAMPAIO, S. **Evaluation of *Palmaria palmata* and *Laminaria digitata* as potential human food products**. 1997. 165 f. Tese (PhD) – University of Portsmouth, Portsmouth.

SANTOS, M. G. M.; LAGROTA, M. H. C.; MIRANDA, M. M. F. S.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; WIGG, M. D. A screening for the antiviral effect of extracts from Brazilian marine algae against acyclovir resistant herpes simplex virus type 1. **Botanica Marina**, Berlin, v. 42, n. 3, p. 227-230, May 1999.

SIQUEIRA, R. C. L.; SILVA, M. S. J.; ALENCAR, D. B.; PIRES, A. F.; ALENCAR, N. M. N. PEREIRA, M. G.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L.; ASSREUY, A. M. S. *In vivo* anti-inflammatory effect of a sulfated polysaccharide isolated from the marine brown algae *Lobophora variegata*. **Pharmaceutical Biology**, Philadelphia, *In Press*.

SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 16, n. 4, p. 245-262, Aug 2004.

SOUSA, G. S.; COCENTINO, A. L. M. Macroalgas como indicadoras da qualidade ambiental da praia de Piedade – PE. **Tropical Oceanography**, Recife, v. 32, n. 1, p. 1-22, 2004.

SOUSA, M. B.; PIRES, K. M. S.; ALENCAR, D. B.; SAMPAIO, A. H.; SAKER-SAMPAIO, S. Alfa-, beta-caroteno e alfa-tocoferol em algas marinhas *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 953-958, out-dez 2008.

SPAVIERI, J.; KAISER, M.; CASEY, R.; HINGLEY-WILSON, S.; LALVANI, A.; BLUNDEN, G.; TASDEMIR, D. Antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic potential of some British green algae. **Phytotherapy Research**, Chichester, v. 24, n. 7, p. 1095-1098 July 2010.

STEINER, M.; HARTMANN, T. The occurrence and distribution of volatile amines in marine algae. **Planta**, New York, v. 79, n. 2, p. 113-121, June 1968.

STIRK, W. A.; REINECKE, D. L.; VAN STADEN, J. Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 19, n. 3, p. 271-276, June 2007.

SZE, P. Introduction to algal characteristics and diversity. In: _____. **A biology of the algae**. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1997. Chapter 1. p. 1-20.

TAOUIL, A.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. Alterações na composição florística das algas da praia de Boa Viagem (Niterói, RJ). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 405-412, dez 2002.

VICHENEWSKI, W. Cromatografia por adsorção. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo, UNICAMP, 2007, cap. 4, p. 87-101.

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

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 326-337, mar-abr 2006.

VOULTSIADOU, E. Therapeutic properties and uses of marine invertebrates in the ancient Greek world and early Byzantium. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 130, n. 2, p. 237-247, July 2010.

YASUHARA-BELL, J.; LU, Y. Marine compounds and their antiviral activities. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 86, n. 3, p. 231-240, June 2010.

YESILADA, E. Past and future contributions to traditional medicine in the health care system of the Middle-East. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 100, n. 1-2, p. 135-137, Aug 2005.