

Vera Lúcia Mendes Gouveia

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE METABOLITOS
SECUNDÁRIOS DE *CYTOSEIRA ABIES-MARINA***

Dissertação apresentada ao Departamento
de Biologia, no âmbito do Mestrado em
Ciências Biomédicas para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biomédicas.

**Orientadores: Doutora Maria do Carmo Barreto
Doutora Ana Maria Loureiro Seca**



UNIVERSIDADE DOS AÇORES
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS E DESENVOLVIMENTO
PONTA DELGADA, 2012

A mim...

Índice

Resumo	ix
Abstract.....	x
Abreviaturas	xi
CAPITULO I.....	1
1. Introdução	3
1.1 Objectivos	3
1.2 Descrição da espécie e <i>habitat</i>	3
1.3 Aplicações das algas.....	5
1.4 Estudos fitoquímicos/farmacológicos já realizados no género <i>Cystoseira</i>	9
CAPITULO II.....	33
2. Apresentação e discussão dos resultados	35
2.1 Caracterização estrutural dos compostos isolados de <i>Cystoseira abies-marina</i>	35
2.1.1 Composto A: ácido benzóico.....	35
2.1.2 Composto B: cystoazores A.....	39
2.1.3 Composto C: cystoazores B	44
2.1.4 Composto D: cystoazorona A.....	46
2.1.5 Composto E: cystoazorona B.....	50
2.2 Resultados das actividades biológicas dos compostos isolados de <i>Cystoseira abies-marina</i>	52
2.2.1 Actividade antitumoral.....	52
2.2.2 Actividade antioxidante	54
2.2.3 Actividade anticolinesterásica.....	56
2.2.4 Actividade anti-inflamatória	57

2.3 Discussão dos resultados das actividades biológicas	60
2.4 Conclusões e perspectivas futuras.....	64
CAPÍTULO III.....	67
3. Parte experimental	69
3.1 Condições experimentais usados no isolamento dos compostos A-E.....	69
3.1.1 Solventes utilizados.....	69
3.1.2 Tipos de sílica usados nas cromatografias	69
3.1.3 Equipamento usado	70
3.1.4 Análise da Amostra	70
3.1.5 Dados espectroscópicos dos compostos isolados de <i>Cystoseira abies-marina</i>	75
3.2 Determinação das actividades biológicas dos compostos A-E	78
3.2.1 Actividade antitumoral.....	78
3.2.2 Actividade antioxidante	80
3.2.3 Actividade anticolinesterásica.....	81
3.2.4 Actividade anti-inflamatória	82
BIBLIOGRAFIA	85

Agradecimentos

Este trabalho não é diferente dos outros, e como é óbvio não poderia ter sido concluído sem o apoio e compreensão de muitas pessoas. Portanto tenho muitos agradecimentos a fazer e espero não me esquecer de ninguém, assim como nomear alguém que não merece. Passo a citar os meus agradecimentos:

Um agradecimento especial para as minhas orientadoras, Doutor Maria do Carmo Roque Lino Felgueiras Barreto e Doutora Ana Maria Loureiro Seca, por toda a paciência, compreensão, motivação, confiança depositada e pela disponibilidade não só nas alturas em que tive dúvidas como em todas, inclusive nas questões pessoais.

A todas as pessoas do Departamento de Ciências Tecnológicas e Desenvolvimento pela ajuda disponibilizada, em especial à Elisabete Rego pelo apoio prestado.

Não me poderia esquecer também dos meus amigos e colegas de trabalho Duarte Toubarro e Mário Teixeira, que além de me terem acompanhado e apoiado nesta etapa, também demonstraram o seu carinho e amizade.

À minha amiga Mafalda Raposo que exigiu um parágrafo de agradecimento só para ela e que me tem aturado não só durante este mestrado, mas em várias ocasiões do meu dia-a-dia, demonstrando a sua amizade e carinho. Assim como à minha amiga Mafalda Cruz pelo apoio, carinho e amizade demonstrada durante todos estes anos. Para a Andreia Teixeira um obrigado especial por atender os meus telefonemas e me dar uma palavra amiga sempre que necessário.

Um agradecimento a todos os meus professores que despertaram em mim a vontade de querer saber mais, em especial ao Professor Doutor Nelson Simões.

Um especial agradecimento, como não poderia deixar de ser, aos meus “super” pais que sempre me apoiaram incondicionalmente e que se hoje sou quem sou, a eles devo. Também gostaria de agradecer a alguns membros da minha família e a algumas pessoas que não são da família mas que são considerados como tal, em especial à minha afilhada Margarida que adoro e que tantas vezes com a sua voz meiga, doce e com a sua maneira de ser única me fez sorrir em alturas menos boas.

Fundação para a Ciência e Tecnologia de Portugal (projecto PTDC/MAR/100482/2008) pelo suporte financeiro na bolsa que decorreu entre 12 de Dezembro 2011 até 12 de Junho de 2012.

Por último, mas não menos importante aos que me esqueci de referir, se me esqueci, as minhas desculpas e o meu agradecimento pelo apoio.

Resumo

A pesquisa de Produtos Naturais com propriedades farmacológicas tem vindo a crescer, destacando-se a descoberta de moléculas vindas de organismos marinhos, que devido à sua considerável biodiversidade se reflecte em metabolitos secundários com estruturas únicas e com várias funcionalidades. Este trabalho surge no seguimento de uma investigação feita com algas do mar dos Açores, cujas actividades biológicas se mostraram promissoras. Nesta tese intitulada “Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*”, faz-se um estudo fitoquímico e determinam-se algumas actividades biológicas de compostos isolados.

No capítulo I apresentam-se os objectivos e faz-se uma descrição das características da alga em estudo, bem como um pequeno resumo da literatura referente aos compostos isolados de algas do género *Cystoseira*. A elucidação estrutural dos cinco compostos isolados (o ácido benzóico, um composto natural já conhecido, o cystoazores A, o cystoazores B, o cystoazorona A e o cystoazorona B, meroditerpenos isolados pela primeira vez), e as actividades destes compostos (antitumoral, antioxidante, anticolinesterásica e anti-inflamatória) são apresentadas e discutidas no Capítulo II. Os resultados mostram que os compostos cystoazores A, cystoazores B e cystoazorona A apresentam actividade antitumoral, mas com baixa selectividade entre a linhagem tumoral HeLa e a linhagem não tumoral Vero usada como referência. Na actividade antioxidante, nenhum dos compostos testados apresentaram $IC_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$. Os compostos mais activos como anticolinesterásicos foram o cystoazores A e B, apesar de não terem atingido 50% de inibição do enzima à concentração máxima testada (125 $\mu\text{g/mL}$). Quanto à actividade anti-inflamatória *in vitro*, o ácido benzóico e a cystoazorona B foram os únicos que inibiram ambas as formas da cicloxigenase (COX1 e COX2), comportando-se no entanto como pro-inflamatórios em relação à lipoxigenase 15-LOX. No capítulo III são apresentados os detalhes dos procedimentos experimentais utilizados neste trabalho de investigação.

Palavras-chave: *Cystoseira abies-marina*, antitumoral, antioxidantes, anti-inflamatórios, anticolinesterásicos, meroditerpenos, metabolitos secundários.

Abstract

The search for Natural Products with pharmacological properties has been increasing, particularly the discovery of molecules isolated from marine organism, whose considerable biodiversity is reflected in secondary metabolites with unique structures and functions. This work is carried out in the sequence of a preliminary investigation on the marine algae of the Azores, which detected promising biological activities. In this thesis, entitled "Evaluation of the pharmacological potential of secondary metabolites from *Cystoseira abies-marina*", a phytochemical study is carried out and several biological activities of isolated compounds are determined.

Chapter I presents the objectives and characterizes the under study, and also a summary of the literature concerning compounds isolated from the *Cystoseira* genus. The structural elucidation of five isolated compounds (benzoic acid, a known natural compound, cystoazores A, cystoazores B, cystoazorone A and cystoazorone B, meroditerpenes isolated for the first time) and the activity of these compounds (antitumour, antioxidant, anticholinesterasic and anti-inflammatory) are presented and discussed in Chapter II. The results show that cystoazores A, cystoazores B and cystoazorone A are actively cytotoxic, but with low selectivity between HeLa tumour cell line and Vero non tumour cell line, used as reference. Concerning antioxidant activity, none of the compounds tested presented $IC_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$. Cystoazores A and B had the strongest anticholinesterasic activity, although 50% inhibition of enzyme activity was not attained at the highest concentration tested (125 $\mu\text{g/mL}$). Regarding *in vitro* anti-inflammatory activity, benzoic acid and cystoazorone B were the only two that inhibited both isoforms of cyclooxygenase (COX1 and COX2), although they behaved as pro-inflammatory towards lipoxygenase 15-LOX. Chapter III presents details of experimental procedures used in this research.

Keywords: *Cystoseira abies-marina*, antitumour, antioxidant, anti-inflammatory, anticholinesterasic, meroditerpenes, secondary metabolites.

Abreviaturas

AChE	Acetilcolinesterase
BHT	Hidroxitolueno butilado
cc	Cromatografia em coluna
COSY	Espectro bidimensional de correlação espectroscópica homonuclear
COX-1	Cicloxygenase 1
COX-2	Cicloxygenase 2
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	Radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
EC ₅₀	Concentração que provoca 50 % de mortalidade
ECACC	European Collection of cell Cultures
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EM	Espectrometria de massa
FBS	Soro fetal de bovino
HMBC	Espectro bidimensional de correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância
HSQC	Espectro bidimensional de correlação espectroscópica heteronuclear a uma ligação
IC ₅₀	Concentração que provoca 50 % de inibição
IS	Índice de selectividade da actividade antitumoral, definido como EC ₅₀ células controlo/EC ₅₀ células alvo
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LOX	Lipoxigenase
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa carga (em espectrometria de massa)
MTT	(3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium)

NOE	Efeito nuclear de Overhauser
NOESY	Espectro bidimensional de efeito nuclear de Overhauser e de troca
OMe	Grupo metoxilo
PGF _{2α}	Prostaglandinas F _{2α}
PGH ₂	Prostaglandinas H ₂
PG _s	Prostaglandinas
ppm	Parte por milhão
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de próton
<i>s</i>	Singuleto
<i>t</i>	triplete
tlc	Cromatografia em camada fina
TMS	Tetrametilsilano
δ	Desvio químico
ω-3	Ómega 3
ω-6	Ómega 6

CAPITULO I

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Objectivos

Neste trabalho propõe-se o estudo de novos compostos bioactivos com potencial farmacológico em espécies de macroalgas marinhas dos Açores. O estudo recai sobre a macroalga *Cystoseira abies-marina* que já se tinha mostrado promissora em alguns ensaios biológicos preliminares. Como tal, este estudo teve como base os seguintes objectivos: (i) contribuir para a valorização do mar dos Açores, no que respeita à sua biodiversidade; (ii) aumentar o conhecimento sobre a composição química de *Cystoseira abies-marina* do mar dos Açores; (iii) isolar compostos naturais com potencial aplicação farmacológica, nomeadamente, metabolitos secundários com estruturas novas; (iv) purificar e caracterizar estruturalmente esses compostos isolados e (v) determinação de algumas actividades desses mesmos compostos isolados.

1.2 Descrição da espécie e *habitat*

As macroalgas são organismos fotossintéticos que vivem no meio marinho, podendo estar presentes quer em água doce, quer em água salgada. Esta designação de macroalgas dá-se às algas multicelulares com órgãos diferenciados. Estas podem ser classificadas em Rhodophyta (algas vermelhas), Chlorophyta (algas verdes) e Phaeophyta (algas castanhas). A família Cystoseiraceae pertence à Phaeophyta (Ordem Fucales, Classe Phaeophyceae) e inclui os géneros *Acrocarpia*, *Acystis*, *Bifurcariopsis*, *Carpoglossum*, *Caulocystis*, *Cocophora*, *Cystophora*, *Cystoseira*, *Halidrys*, *Hormophysa*, *Lundsburgia*, *Scaberia* e *Stolonophora* (Amico, 1995). Dentro do género *Cystoseira* estão compreendidas cerca de 294 espécies, entre as quais encontra-se a alga em estudo, *Cystoseira abies-marina* (figura 1) que foi identificada

Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*

pela primeira vez em 1820 por Agardh (<http://www.algaebase.org>; pesquisado a 10 Fevereiro de 2012).

Cystoseira abies-marina encontra-se na Europa, em África e nas Ilhas do Atlântico. Nos Açores, esta espécie é comum em todo o arquipélago, no limite inferior da zona das marés, em poças e na zona submersa superior. Com cerca de 1-2 mm de espessura os talos desta alga podem atingir 50 cm de comprimento mas normalmente não excedem os 15 a 20 cm (Neto *et al.*, 2006).



Figura 1. *Cystoseira abies-marina* (<http://www.algaebase.org>; pesquisado a 10 Fevereiro de 2012).

O arquipélago dos Açores está localizado entre as coordenadas 37°-40° N e 25°-31° W (figura 2) e inclui nove ilhas de origem vulcânica e vários ilhéus, organizados em três grupos distintos: Ocidental, Central e Oriental. Devido à sua localização, distante dos continentes Americano e Europeu, o clima é fortemente influenciado pelo oceano, fonte permanente de humidade (Mata, 2001).



Figura 2. Localização do arquipélago dos Açores.

A zona das marés no arquipélago muda de aspecto nos períodos de praia e baixa-mar, ficando uma porção de costa a descoberto, duas vezes por dia. Para os organismos marinhos a zona das marés é um ambiente bastante irregular. As algas e animais que lá habitam estão sujeitos a exposição ao ar, variações extremas de temperatura, alterações bruscas de salinidade e sofrem a forte acção das ondas e correntes. Em zonas protegidas das grandes tempestades marinhas, as algas podem chegar a ser exuberantes, o que nos Açores só ocorre nos portos, estando todo a zona costeira muito exposta à ondulação. Consequentemente, as costas são dominadas por algas de pequeno porte (Neto *et al.*, 2006).

1.3 Aplicações das algas

O uso de algas na alimentação humana é conhecido desde o século IV, no Japão e desde o século VI na China (McHugh, 2003). Nos Açores, as algas também são utilizadas na alimentação. Por exemplo, a alga castanha *Fucus spiralis* (figura 3a), de nome comum “tremoço do mar”, é considerada um petisco; a alga vermelha *Porphyra sp.* (figura 3b) de

Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*

nome comum “erva patinha” é consumida frita e usada na confecção de sopas, omeletes ou tortas; as algas vermelhas *Laurencia viridis* (figura 3c) e *Osmundea pinnatifida* (figura 3d), sendo esta última conhecida como “erva malagueta”, são conservadas em vinagre e consumidas ao longo de todo o ano em algumas ilhas (Neto *et al.*, 2006). Apesar de, em algumas ilhas do arquipélago dos Açores, o consumo de algas ser considerado uma prática comum, não existe actualmente legislação em Portugal em relação ao uso destas como produto alimentar (Patarra *et al.*, 2011).



Figura 3. a) *Fucus spiralis*; b) *Porphyra sp.*; c) *Laurencia viridis*; d) *Osmundea pinnatifida*; e) *Pterocladia capilacea*; f) *Gelidium microdon* (<http://www.algaebase.org>; pesquisado a 10 Fevereiro de 2012).

Nos últimos 50 anos houve um aumento da procura de algas e os *stocks* naturais deixaram de conseguir corresponder a esta exigência. A investigação sobre o ciclo de vida destes organismos permitiu o desenvolvimento de indústrias de cultivo, que actualmente, produzem cerca de 90% do exigido pelo mercado. Actualmente, o Japão, a China e a Coreia

do Sul, são os maiores consumidores de algas. Nos Açores, as algas vermelhas *Pterocladia capillacea* (figura 3e) e *Gelidium microdon* (figura 3f) são recolhidas manualmente ou por mergulho, posteriormente secas ao ar e preparadas para exportação (Neto *et al.*, 2006).

O agar, os alginatos e os carraginatatos, agentes espessantes e gelificantes extraídos de macroalgas marinhas, são a base do uso industrial de algas, embora os primeiros extractos só tenham sido comercializados a partir do ano de 1930 (McHugh, 2003).

As macroalgas marinhas exibem propriedades nutricionais importantes que justificam a sua aplicação na alimentação humana.

Os principais constituintes das macroalgas marinhas segundo estudos realizados por vários investigadores (Burtin, 2003; Patarra *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2012; Barreto *et al.*, 2012), são os polissacáridos e fibras dietéticas, minerais, proteínas e aminoácidos, lípidos e ácidos gordos e micronutrientes, como as vitaminas, polifenóis e carotenóides.

- Polissacáridos e fibras dietéticas: as algas possuem grande quantidade de polissacáridos tipo alginatos e carraginatatos, especialmente presentes nas paredes celulares. As algas castanhas contêm polissacáridos de armazenamento, como a laminarina. A maior parte destes polissacáridos não são digeridos pela flora intestinal bacteriana dos humanos e assim podem ser considerados como fibras dietéticas (Burtin, 2003; Patarra *et al.*, 2011).

- Minerais: a fracção mineral de algumas algas corresponde a 36 % do seu peso total. As algas castanhas são conhecidas como uma fonte rica em iodo, sendo a *Laminaria* a que apresenta maior teor (Burtin, 2003; Mohamed *et al.*, 2012).

- Proteínas e aminoácidos: o teor de proteínas das algas difere consoante a espécie. O conteúdo de proteínas em algas castanhas é geralmente baixo, ao contrário das algas verdes e vermelhas que apresentam valores mais elevados. O ácido aspártico e glutâmico constitui

a maior fracção de aminoácidos para a maior parte das algas marinhas (Burtin 2003; Mohamed *et al.*, 2012; Patarra *et al.*, 2011).

- Lípidos: os lípidos representam apenas entre 1-5 % do peso seco das algas, mas oferecem uma composição em ácidos gordos polinsaturados muito interessantes (ácidos gordos ω -3 e ω -6) (Patarra *et al.*, 2012). As algas castanhas são ricas em carotenóides, especialmente em fucoxantina, β -caroteno e violaxantina; as algas vermelhas em β -caroteno, α -caroteno e seus derivados dihidroxilados (Zeaxantina e luteína). A composição em carotenóides das algas verdes é semelhante ao das plantas superiores: β -caroteno, luteína, violaxantina, anteraxantina, zeaxantina e neoxantina (Burtin, 2003; Patarra *et al.*, 2012; Mohamed *et al.*, 2012).

- Micronutrientes: as algas são fonte de vitaminas do grupo B e vitamina C principalmente as algas verdes e castanhas, sendo os valores mais baixos em algas vermelhas. No entanto, o teor de vitamina E é mais elevado em algas castanhas, relativamente às algas verdes e vermelhas. Os níveis de polifenóis mais elevados são encontrados nas algas castanhas, onde os florotaninos podem variar entre 5 e 15 % do peso seco de alga (Burtin, 2003; Mohamed *et al.*, 2012; Barreto *et al.*, 2012).

Em conclusão, as algas comestíveis são ricas em antioxidantes bioactivos, fibras dietéticas, proteínas, minerais, vitaminas, metabolitos secundários e ácidos gordos polinsaturados (Plaza *et al.*, 2008). Anteriormente, as algas eram apenas usadas como agentes gelificantes e de espessamento nas indústrias alimentares e indústrias farmacêuticas. Mais recentemente, as algas vermelhas, verdes e castanhas têm mostrado o seu potencial terapêutico, como por exemplo, antiobesidade (Sekmokienè *et al.*, 2007), antidiabético, anti-hipertensivos (Thomas and Kim, 2011), antioxidante (Ruperez *et al.*, 2002; Sekmokienè *et al.*, 2007), antiinflamatória, antiproliferativo (Sekmokienè *et al.*, 2007);

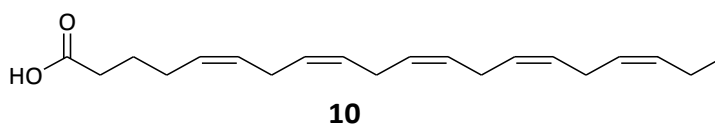
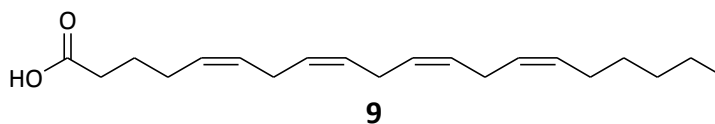
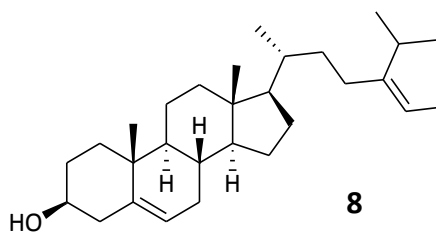
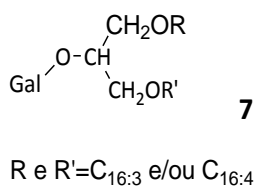
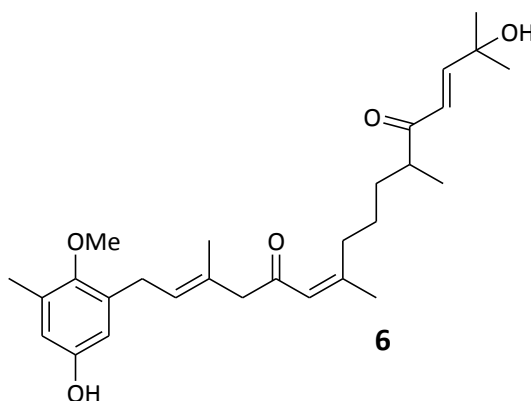
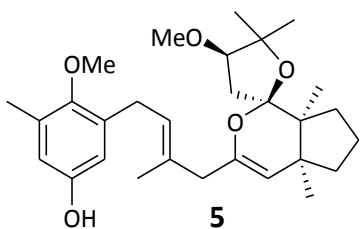
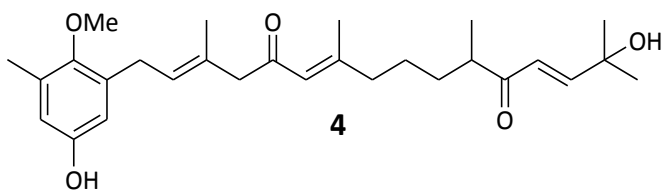
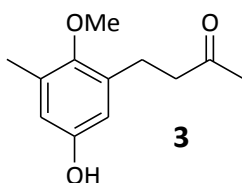
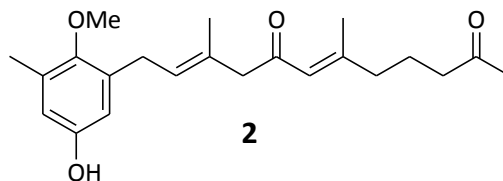
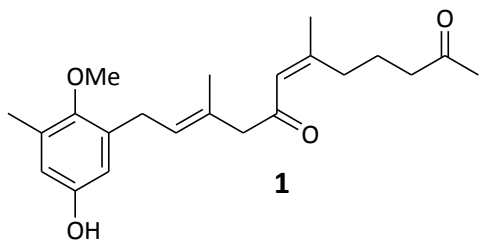
Mhadhebi *et al.*, 2011), antiviral, antifúngico e antimicrobial (Ozdemir *et al.*, 2006). Segundo Mohamed *et al.*, (2012), os compostos activos incluem sulfatos, carotenóides, minerais, peptídeos e sulfolípidos com benefícios em doenças metabólicas degenerativas.

Nos últimos anos, o número de estudos sobre a composição química, as propriedades terapêuticas e aplicações tecnológicas envolvendo macroalgas aumentou exponencialmente (Sekmokienè *et al.*, 2007). Este facto implicou que as algas se tornassem num foco de interesse científico e comercial provocando um aumento do seu uso.

1.4 Estudos fitoquímicos/farmacológicos já realizados no género *Cystoseira*

No ano de 1972 apenas se conheciam 210 compostos isolados e caracterizados de organismos marinhos. No entanto, entre o período de 1973 e 1994, mais de 6000 estruturas tinham sido identificadas, das quais 2072 diziam respeito a algas. Neste mesmo período só ao género *Cystoseira* correspondiam cerca de 100 compostos (Amico, 1995).

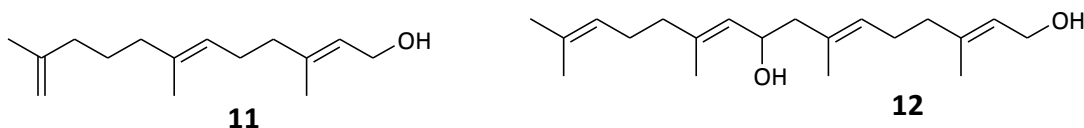
No que diz respeito à *Cystoseira abies-marina*, os primeiros estudos fitoquímicos foram realizados por Moreno *et al.* (1998) e levaram ao isolamento de dois norsesquiterpenoides que foram a cystemexicona A (**1**) e cystemexicona B (**2**), e de um novo composto de mais baixa massa molecular derivado hidroquinónico da butanona (**3**). No mesmo estudo referem terem sido isolados, em 1995, da mesma espécie os seguintes compostos: 1'-metoxiametadiona (**4**), 1',14-dimetoxiametol (**5**) e (6Z) 1'-metoxiametadiona (**6**) (referência original em Amico, 1995). No mesmo ano, estudos realizados por Fernández *et al.* (1998), permitiram isolar os seguintes compostos da *Cystoseira abies-marina*: derivado galactosídeo do diacilglicerol contendo os ácidos C_{16:3} e/ou C_{16:4} (**7**), fucosterol (**8**) e fosfolípidos e triglicéridos dos ácidos araquidónicos e eicosapenténico (estruturas dos ácidos representadas abaixo (**9** e **10**)).



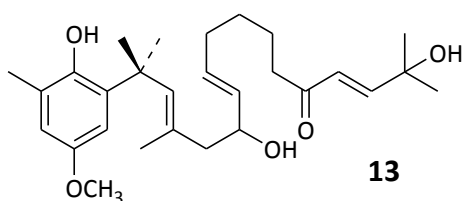
Do ponto de vista do potencial farmacológico da *Cystoseira abies-marina*, Barreto *et al.* (2012) avaliou a actividade antitumoral, antioxidante e o teor de fenóis totais de fracções e extractos de algumas algas, entre elas, a *Cystoseira abies-marina*, tendo-se revelado uma alga com grande potencial farmacológico.

A falta de maior conhecimento sobre metabolitos secundários biosintetizados e potencial biológico desta alga, obrigou a uma pesquisa dentro do género *Cystoseira*. Pretende-se conhecer o tipo de compostos mais caracterizados deste género e que, muitas vezes, são marcadores quimiotaxonómicos.

Estudos realizados por Fattorusso *et al.* (1976) contribuíram para o isolamento a partir do extracto de diclorometano da *Cystoseira crinita*, de dois compostos conhecidos como oxocrinol (**11**) e crinitol (**12**).



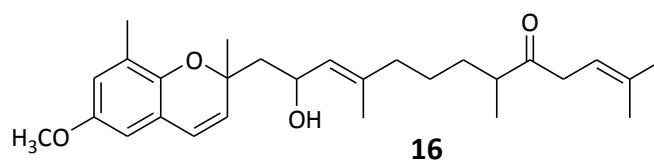
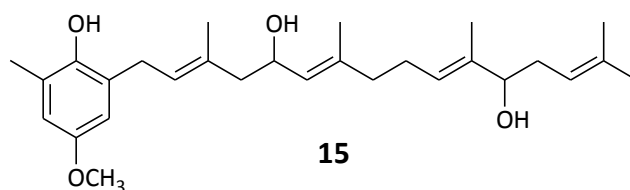
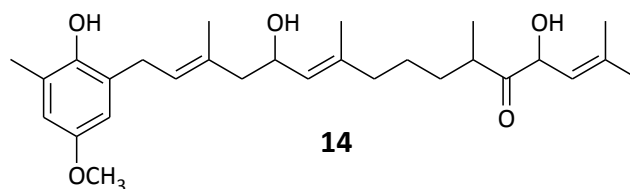
Mais tarde, Banaigs *et al.* (1982) isolaram do extracto de metanol da *Cystoseira elegans* um novo derivado hidroquinónico de diterpeno (**13**).



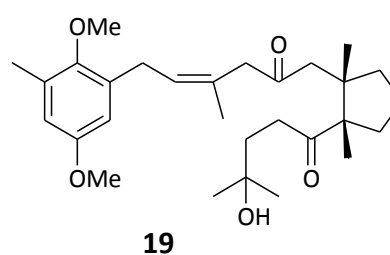
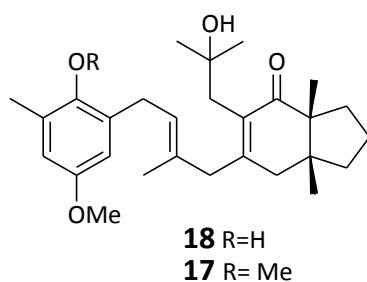
Um ano mais tarde, os mesmos autores isolaram três novos diterpenos do extracto de metanol de *Cystoseira elegans*: composto (**14**), composto (**15**) (sendo este uma mistura de

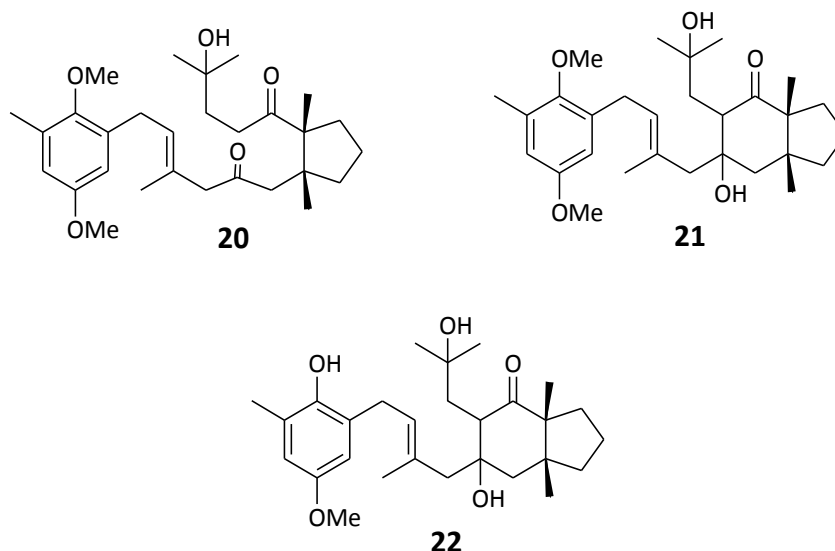
Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*

dois epímeros) e composto (**16**). Para estes três compostos foi testada a actividade antimicrobiana, sendo que, o composto (**14**) mostrou actividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, não mostrando actividade sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. Os compostos **15** e **16** não exibiram qualquer actividade (Banaigs *et al.* 1983).



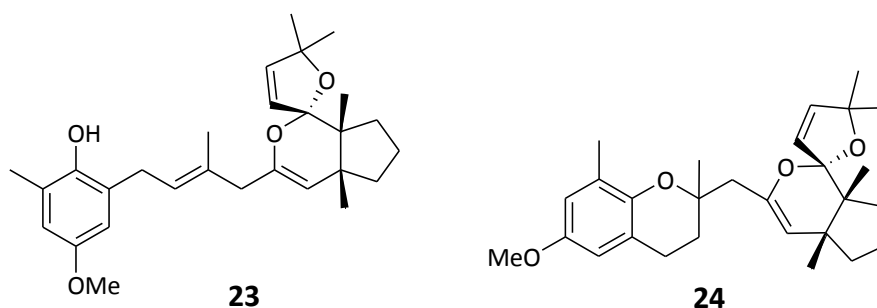
Amico *et al.* (1984a) isolaram um novo composto a partir de *Cystoseira algeriensis* conhecido como cystalgerone (**17**). Também isolaram do extracto de clorofórmio da mesma espécie cinco novos derivados de tetraprenil-toluquinol (**18 – 22**) (Amico *et al.*, 1984b).



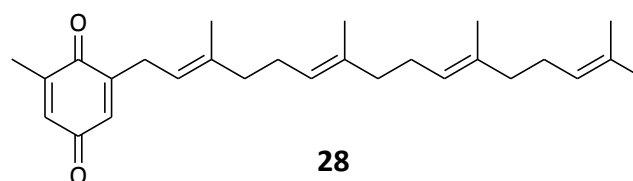
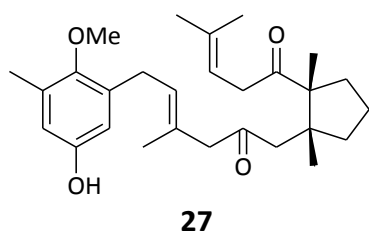
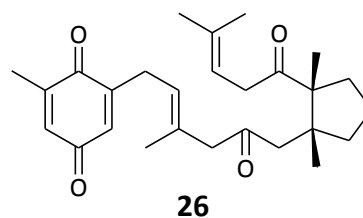
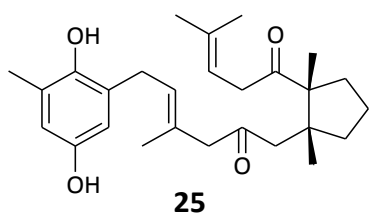


Estes foram os dois primeiros trabalhos publicados pela equipa de Amico *et al.*. Com os muitos trabalhos que se lhe seguiram, este grupo de investigadores revelou-se um grupo de topo, sendo ainda hoje o grupo com maior número de publicações sobre fitoquímica do género *Cystoseira*.

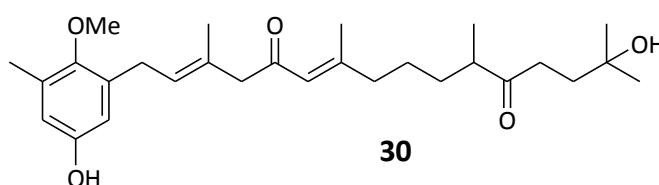
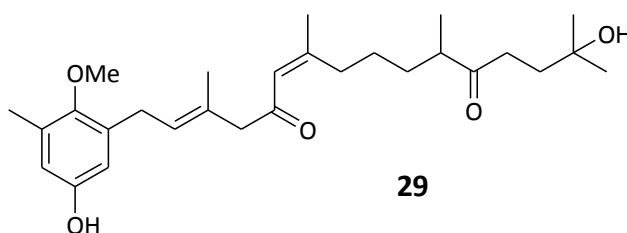
Ainda no mesmo ano, a mesma equipa de investigadores, ao estudar um extracto de clorofórmio da alga *Cystoseira balearica* isolaram um novo composto com nome comum cystoketal (**23**) e um composto cuja estrutura já era conhecida o cystoketal cromona (**24**) (Amico *et al.*, 1984c).



Outros quatro novos compostos (dois derivados de tetraprenil-toluquinol, (**25**) e (**27**), e dois derivados de tetraprenil-toluquinona, (**26**) e (**28**)) foram isolados de um extracto de clorofórmio da alga *Cystoseira jabukae* (Amico *et al.*, 1985a).



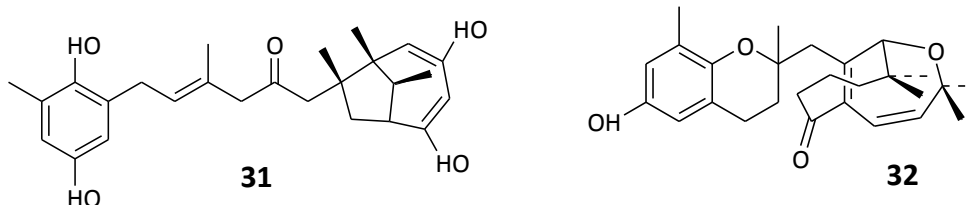
Posteriormente, ainda no mesmo ano, também pela mesma equipa de investigadores, dois novos tetraprenil-toluquinóis (**29** e **30**) foram isolados também a partir de um extracto de clorofórmio mas, desta vez da *Cystoseira sauvageuana* (Amico *et al.*, 1985b).



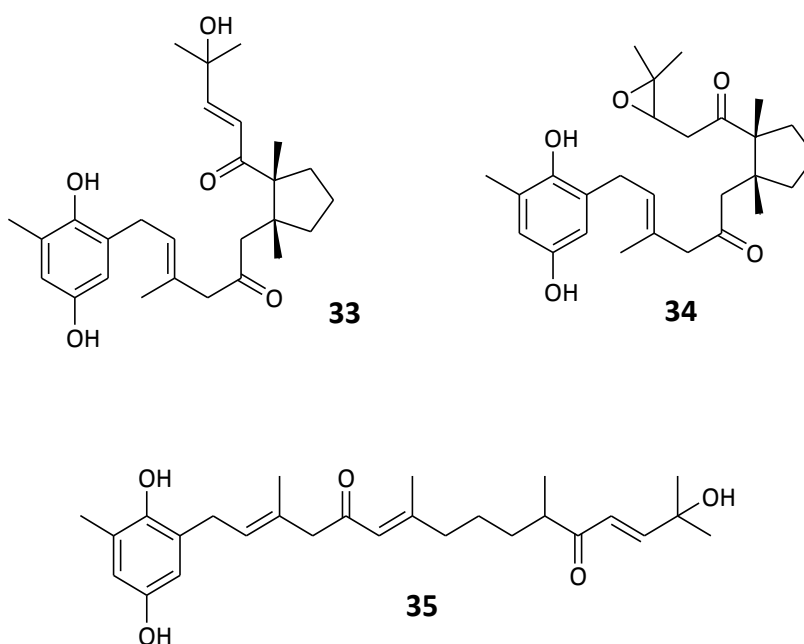
Francisco *et al.* (1985a), estudaram o extracto de clorofórmio/metanol (1:1) da alga *Cystoseira mediterranea* e isolaram um novo composto o qual foi atribuído o nome comum mediterraneol A (**31**) e que, segundo os autores, possui capacidade inibitória da divisão

Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*

celular. A partir do extracto de éter também da alga *Cystoseira mediterranea* os mesmo autores isolaram o cystoseirol A (**32**) (Francisco *et al.*, 1985a). Para além de ter sido isolado nesta espécie, este composto também já tinha sido identificado em *Cystoseira stricta* e em *Cystoseira tamariscifolia* (Francisco *et al.*, 1985b).

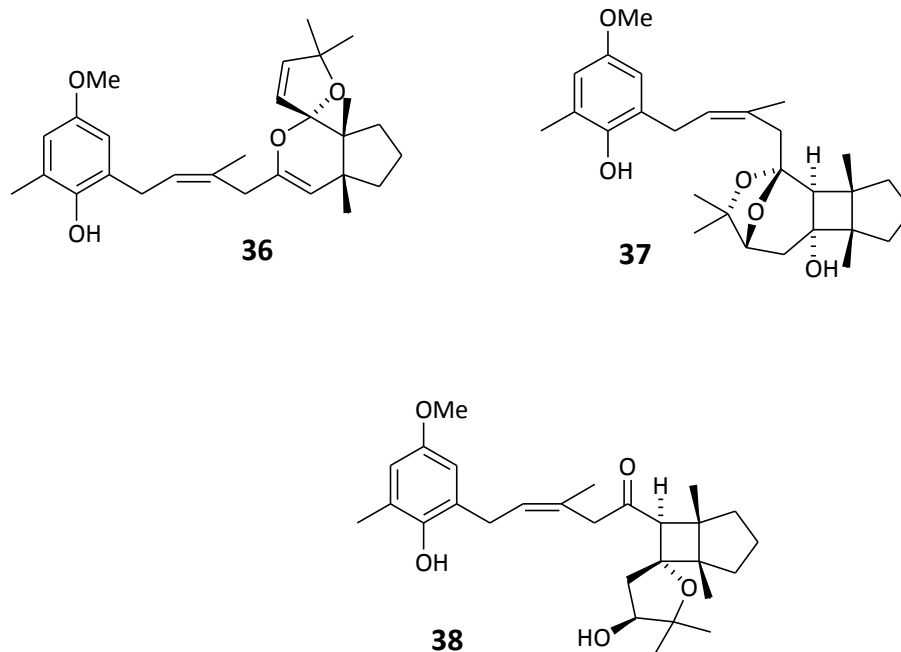


Amico *et al.* (1987a) isolaram outros derivados de tetraprenil-toluquinol com estruturas novas, a partir do extracto de diclorometano da *Cystoseira stricta*. São eles o 2(*E*)-bifurcarenona (**33**), amentaepoxido (**34**) e amentadiona (**35**).

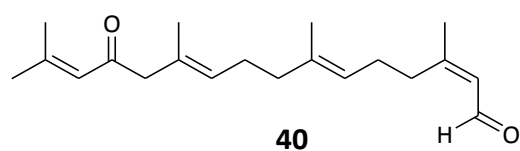
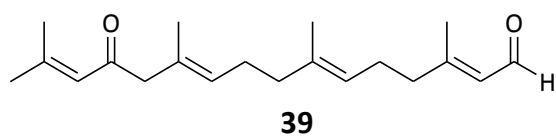


Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*

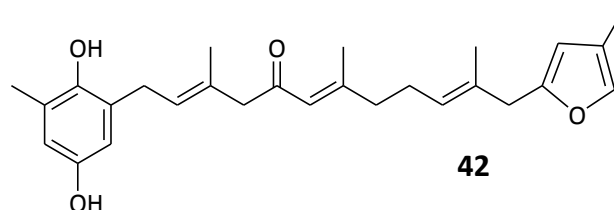
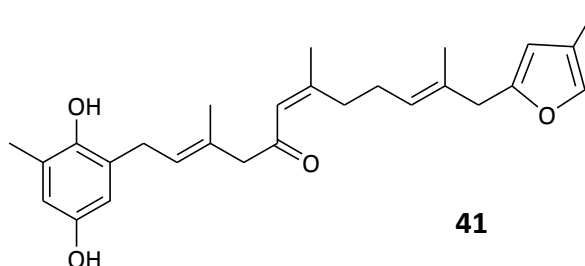
No mesmo ano estes autores estudaram o extracto de diclorometano de *Cystoseira stricta* de onde conseguiram isolar três novos tetraprenil-toluquinóis (isocystoketal (**36**), isostrictaketel (**37**) e isobalearona (**38**)). Referem ainda outros quatro compostos da mesma família, mas sem indicarem uma estrutura inequívoca (Amico *et al.*, 1987b).

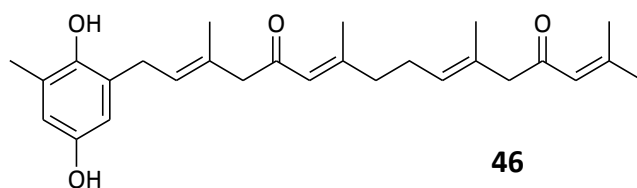
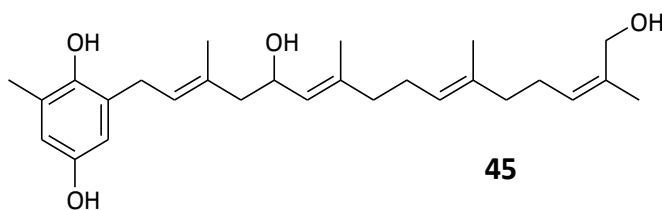
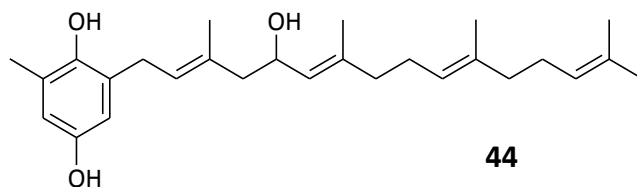
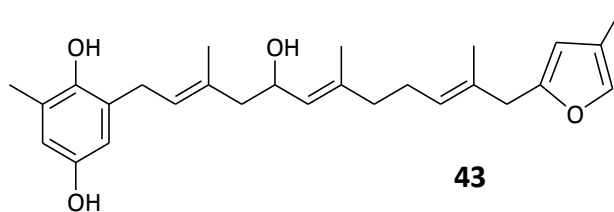


Dois diterpenos acíclicos isómeros foram isolados a partir do extracto de diclorometano da alga *Cystoseira balearica*. São eles o eleanonal (**39**) e o iso-eleanonal (**40**) (Amico *et al.*, 1987c).

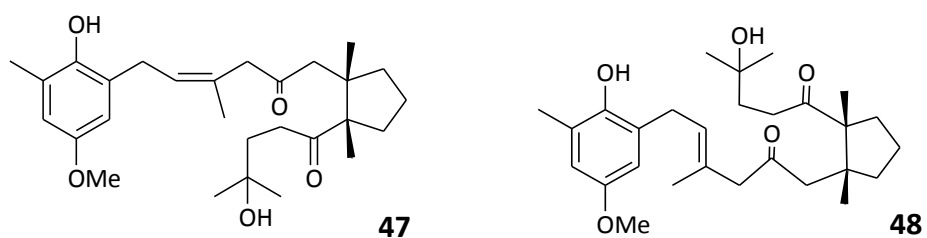


A partir do extracto de diclorometano da *Cystoseira spinosa* var. *squarrosa* foram isolados seis novos tetraprenil-toluquinóis. São eles o 5-oxo-isocystofuranoquinol (**41**), o 5-oxo-cystofuranoquinol (**42**), o 5-hidroxi-cystofuranoquinol (**43**) e os compostos (**44 – 46**), cujas estruturas estão apresentadas a seguir mas, para os quais não foi atribuído qualquer nome comum (Amico *et al.*, 1988a). Cada um destes compostos foi testado para análise da actividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptomyces faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*) e gram-negativas (*Aeromonas hydrophyla*, *Hafnia alvei*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*). O composto **43** registou actividade contra todas as bactérias patogénicas utilizadas com excepção de *S. faecalis*; o composto **45** mostrou uma actividade moderada contra *S. aureus*, *A. Hydrophyla* e *M. luteus* enquanto o composto **41** exhibe actividade moderada contra *S. aureus*. Os restantes compostos não mostraram possuir qualquer actividade antimicrobiana.

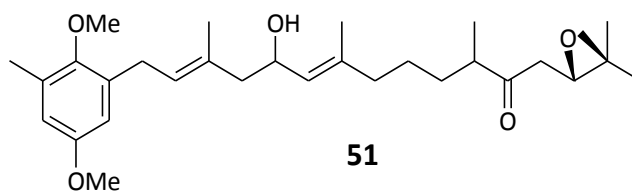
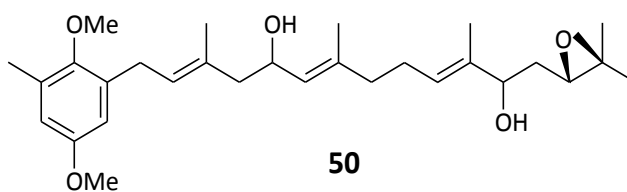
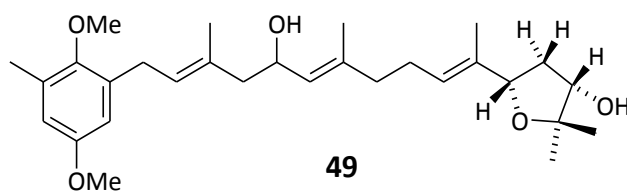


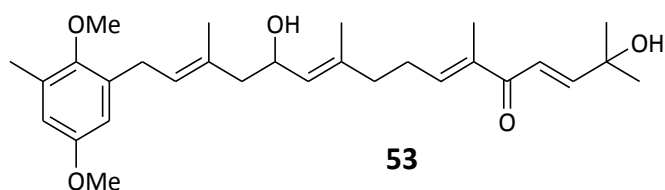
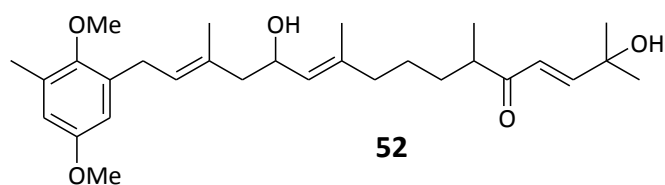


Também em 1988, o estudo fitoquímico do extracto de clorofórmio de *Cystoseira elegans* feito pelos mesmos autores, levou à identificação de dois novos tetraprenil-toluquinóis (**47** e **48**), sendo que este último não é mais que um isómero do composto **19** isolado da *Cystoseira algeriensis* (Amico *et al.*, 1988b).

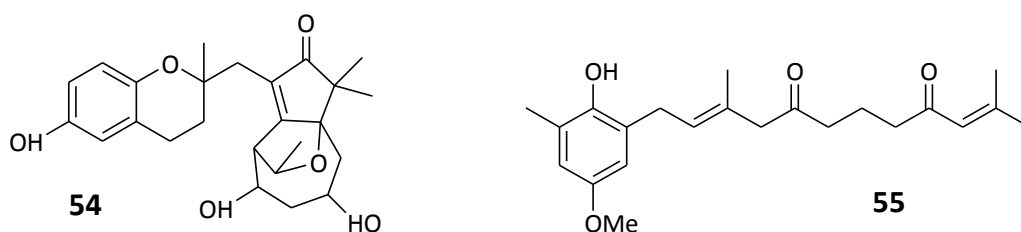


Estudos realizados em *Cystoseira zosteroides* pelo mesmo grupo de investigadores contribuíram para o isolamento de cinco novos tetraprenil-toluquinóis a partir de um extracto de diclorometano: zosterdiol A (**49**), zosterdiol B (**50**), zosteronol (**51**), zosterondiol A (**52**) e zosterondiol B (**53**), cujas estruturas estão apresentadas a seguir (Amico *et al.*, 1988c).





Fadli *et al.* (1991a) isolaram de *Cystoseira mediterranea* o mediterraneol E (**54**), um composto obtido do extracto de clorofórmio/metanol (1:1). Os mesmos autores, no mesmo ano isolaram da mesma espécie de alga o mediterraneona (**55**) (Fadli *et al.*, 1991b).

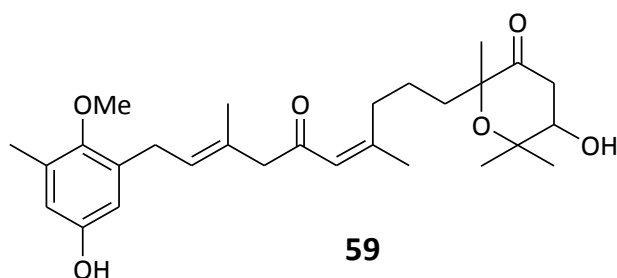
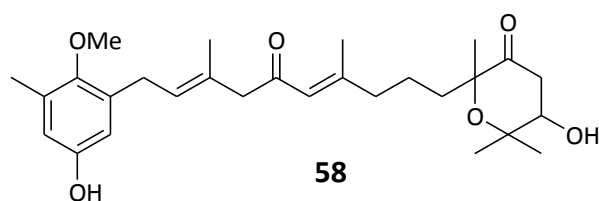
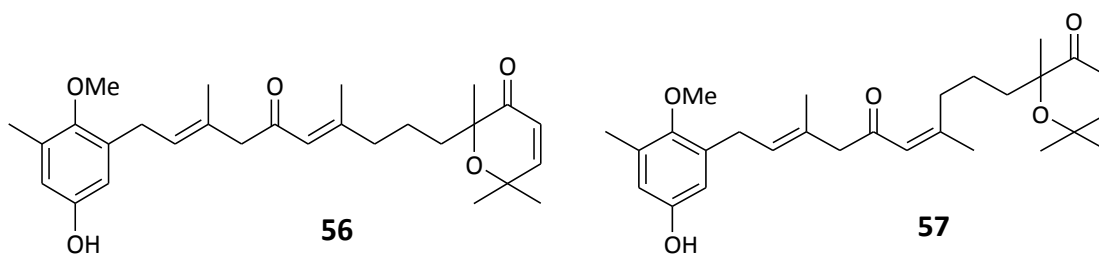


Os compostos (**56** e **57**) (usneoidona E e usneoidona Z, respectivamente) foram isolados do extracto de clorofórmio da *Cystoseira usneoides* (Urones *et al.*, 1992a). Estes dois compostos foram testados quanto à sua actividade antitumoral e antiviral. No que respeita a actividade antitumoral, os compostos **56** e **57** apresentaram uma elevada actividade contra as linhagens celulares P-388, A-549, HeLa e B-16, bem como elevada citotoxicidade. Estes compostos mostraram ter elevada actividade contra CV-1 (células de rim de macaco africano) infectado com HSV-1 (vírus herpes simplex-1), mas não contra BHK (células de rim de hamster bebé) infectado com VSV (vírus vesicular estomacal).

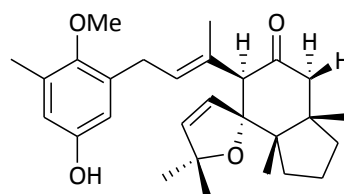
Poucos meses depois, os mesmos autores isolaram outros dois compostos (usneoidol E (**58**) e usneoidol Z (**59**)) da mesma alga (Urones *et al.*, 1992b), mas desta vez partindo de

Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*

um extracto de clorofórmio/metanol (1:1). Para estes dois compostos também foi avaliada a sua actividade antitumoral e antiviral, no qual se verificou que ambos os compostos eram activos.

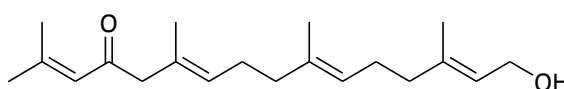


Em 1993, Norte *et al.* isolaram um meroditerpeno de nome comum Claraenone (**60**) a partir do extracto de acetona de *Cystoseira* sp. (os autores não identificam a espécie). Este composto foi submetido a testes antitumorais contra a linhagem P-388, e mostrou ser activo.

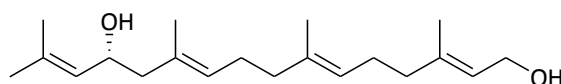


60

Do extracto de clorofórmio/metanol (9:1) de *Cystoseira balearica* (nome alterado posteriormente para *Cystoseira brachycarpa* (J. Agardh) var. *balearica* (Suav.) Giaccone) foram isolados os compostos eleganolona (**61**) e elegandiol (**62**). Ambos os compostos exibiram actividade vasodilatadora, actividade relaxante da musculatura da aorta e da traqueia do rato, e inibiram a actividade estimulante da isoprenalina em preparações cardíacas de cobaias. Este conjunto de actividades sugere o potencial destes compostos como agentes hipertensores (Della Pietà *et al.*, 1993).



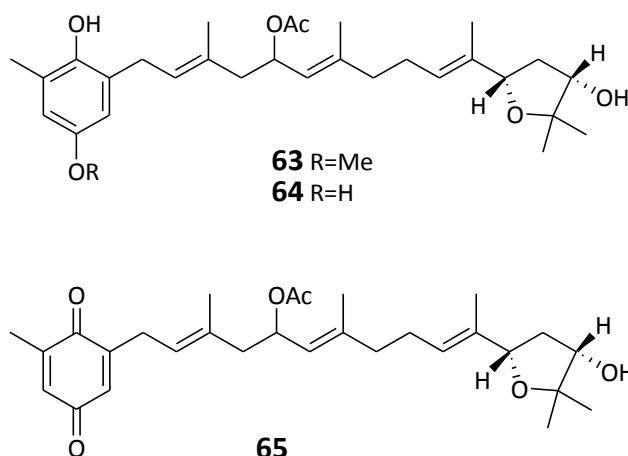
61



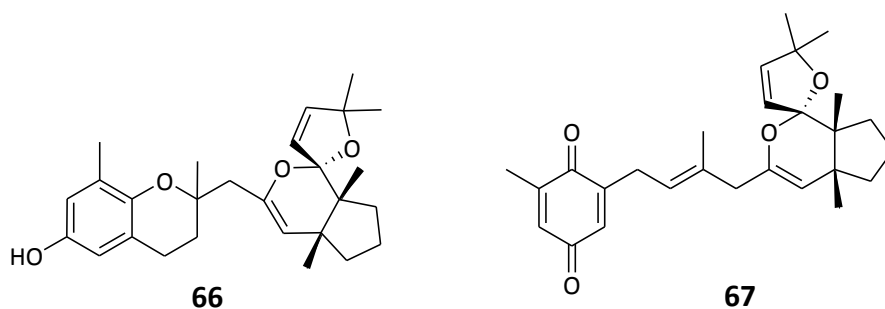
62

Posteriormente avaliou-se a actividade relaxante destes dois compostos tendo-se verificado que ambos inibem a actividade de contracção estimulada pela acetilcolina e histamina na musculatura do ileum (Della Pietà *et al.*, 1995).

Os compostos **63**, **64** e **65**, três novos derivados de tetratoluquinol foram isolados da *Cystoseira critina* colhida na costa Francesa (Praud *et al.*, 1995).



Da *Cystoseira amentacea* var. *stricta* também colhida na costa francesa foram isolados dois novos meroditerpenos (compostos **66** e **67**), cujas estruturas são as que se seguem (Valls *et al.*, 1996).

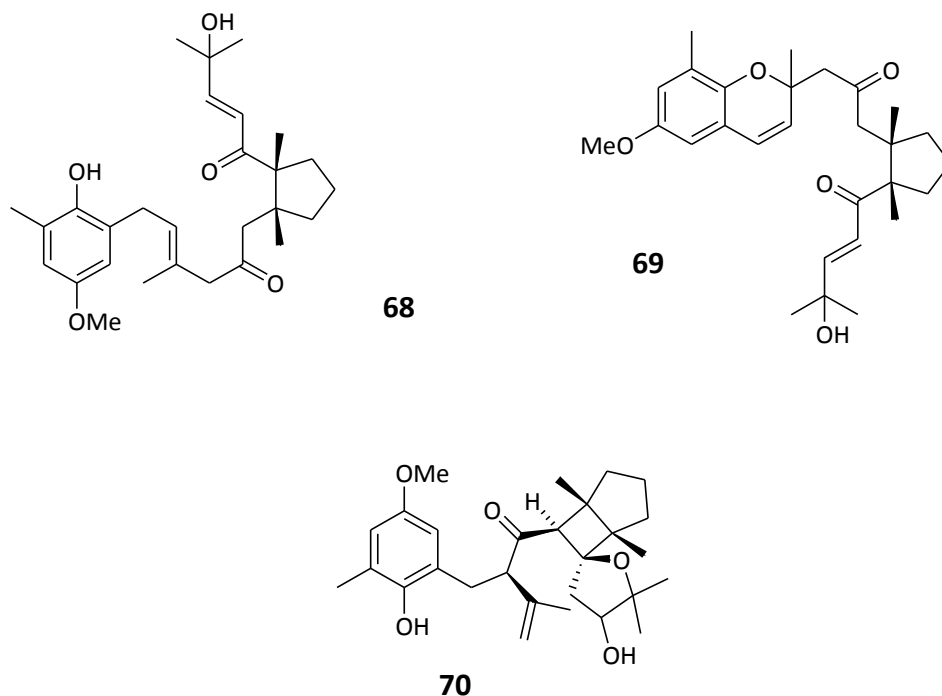


Os compostos cystoketal (**23**) e cystoketal cromona (**24**) já anteriormente identificados foram também isolados da *Cystoseira amentacea* var. *stricta* (Amico *et al.* 1984c) identificados nesta espécie (Valls *et al.*, 1996; Mesguiche *et al.*, 1997).

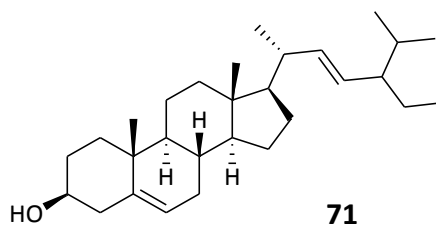
Mesguiche *et al.* (1997) isolou da mesma espécie, *Cystoseira amentacea* var. *stricta*, colhida na costa Mediterrânea os novos compostos 4'-metoxi-(2*E*)-bifurcarenona (**68**) e o seu derivado de nome comum metoxibifurcarenona (**69**). Os compostos **68** e **69** revelaram ter actividade citotóxica inibindo o desenvolvimento de ovos fertilizados de ouriço-do-mar

Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*

(*Paracentrotus lividus*). A partir da mesma espécie mas colhida na costa da ilha Galite (Tunísia) os mesmos autores isolaram o 2,12-diepineobalearona (**70**), um composto com uma estrutura até a altura desconhecida. Este trabalho revelou que a mesma espécie em ambientes distintos poderá ter perfil fitoquímico diferente (Mesguiche *et al.*, 1997).



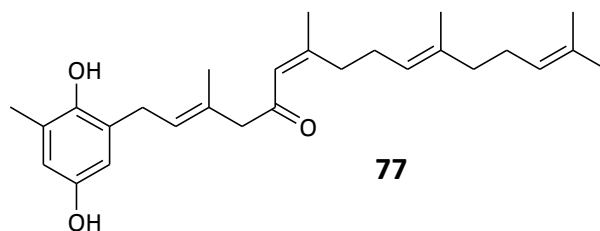
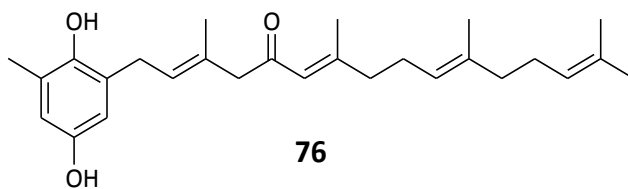
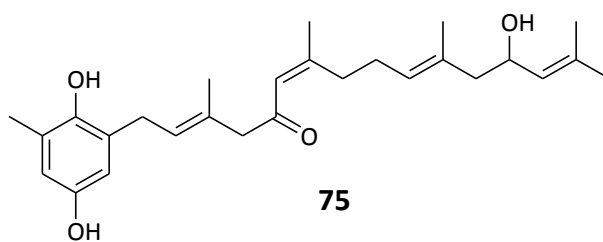
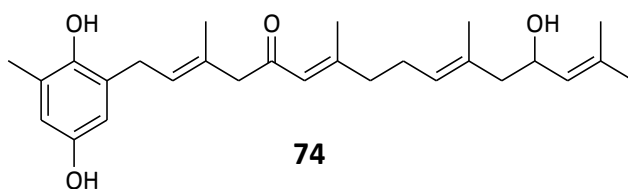
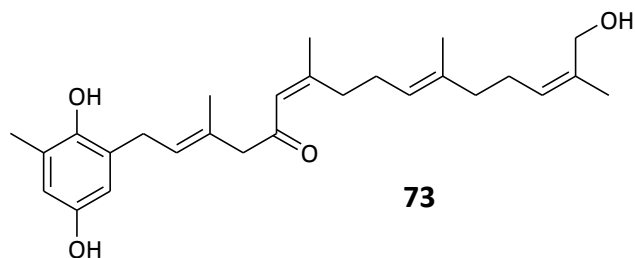
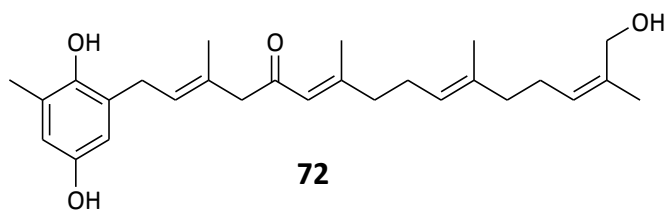
O conteúdo em esteróis e voláteis da *Cystoseira barbata* e *Cystoseira crinita* foi estudada por Milkova *et al.* (1997) tendo-se concluído que na *Cystoseira barbata* a mistura de esteróis é constituída quase exclusivamente por fucosterol (**8**) enquanto a *Cystoseira crinita* além de fucosterol possui quantidades significativas de 24-etil-coleste-5,22-dien-3 β -ol (**71**). Em relação ao conteúdo volátil na *Cystoseira barbata*, em maioria estão os hidrocarbonetos halogenados, enquanto em *Cystoseira crinita* predominam os monoterpenóides.

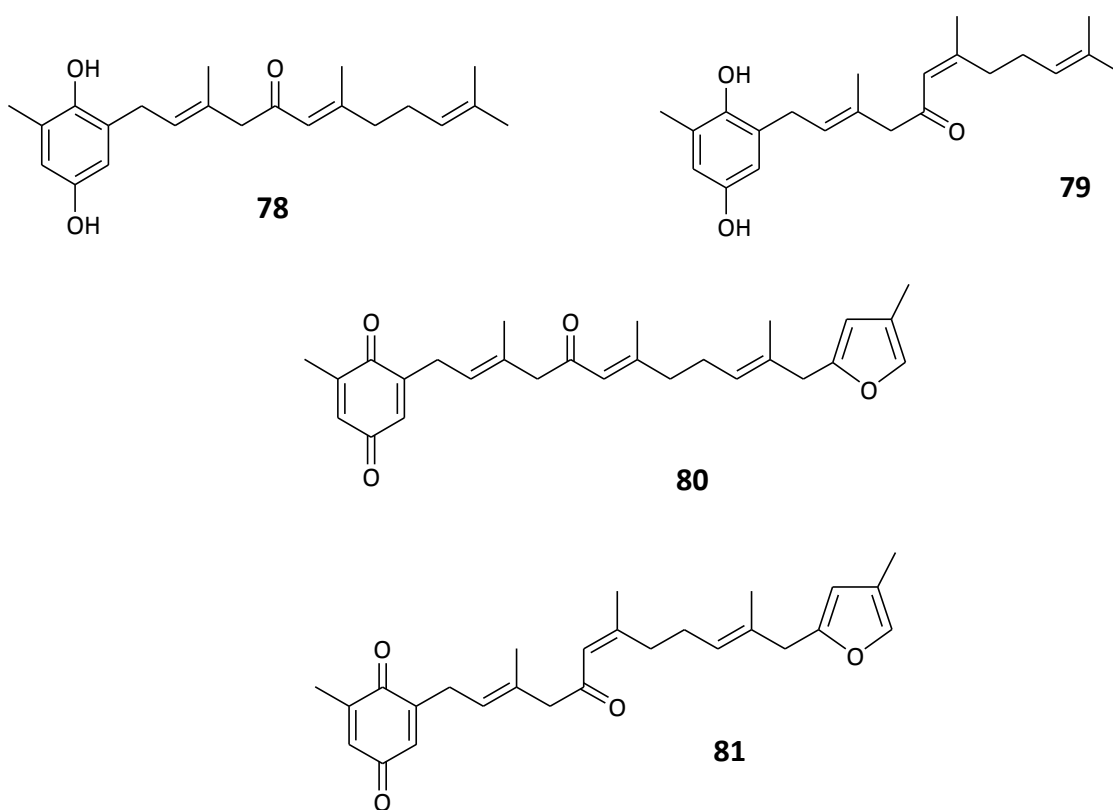


Bennamara *et al.* (1999) isolaram a partir de um extracto de clorofórmio/etanol (5:5) de *Cystoseira tamariscifolia* o composto (**69**) já identificado anteriormente por Mesguiche *et al.* (1997) na *Cystoseira amentacea* var. *stricta*. Este composto **69** foi testado contra três fungos patogénicos do tomate (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* sp. *mycopersici* e *Verticillium alboatrum*), exibindo actividade, sendo que os valores mais elevados foram contra *Botrytis cinerea*. Também foi testada a actividade antibacteriana contra *Agrobacterium tumefaciens* e *Escherichia coli*, sendo activo contra as duas espécies.

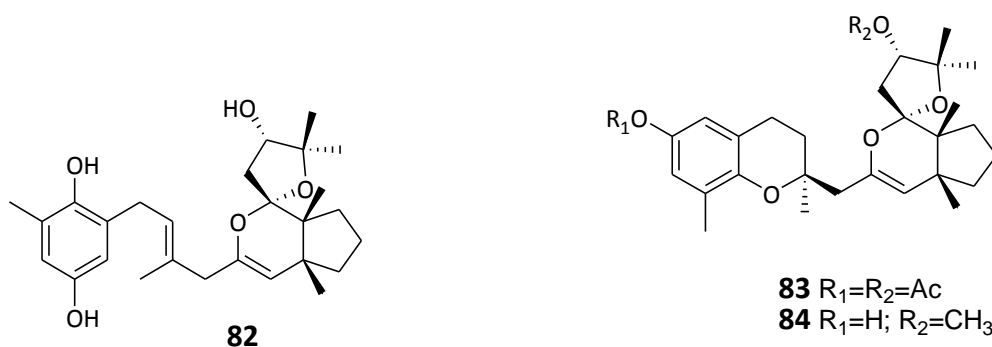
A *Cystoseira crinita* foi novamente investigada do ponto de vista fitoquímico em 2003 (Fisch *et al.* 2003) tendo-se isolado mais seis novos derivados de tetraprenil-toluquinol (**72** - **77**), dois novos triprenil-toluquinóis (**78** e **79**) e dois derivados de tetraprenil-toluquinona (**80** e **81**). Para além destes novos compostos, também se isolaram quatro compostos (**41**, **42**, **45** e **46**) já anteriormente identificados na *Cystoseira spinosa* var. *squarrosa* (Amico *et al.* 1988a). Os compostos (**72-78**) foram avaliados quanto à sua actividade antibiótica (contra as bactérias *Bacillus megaterium* e *Escherichia coli*, os fungos *Microbotrium violaceum*, *Eurotium repens* e *Mycotypha microspora*) tendo-se revelado inactivos à concentração testada. Também foi avaliado o efeito citotóxico dos compostos **72**, **73**, **42**, **41**, **45**, contra as linhagens celulares HM02, HepG2 e MCF-7 em que todos estes compostos apresentaram uma actividade moderada. Já no que diz respeito ao poder antioxidante, estes compostos

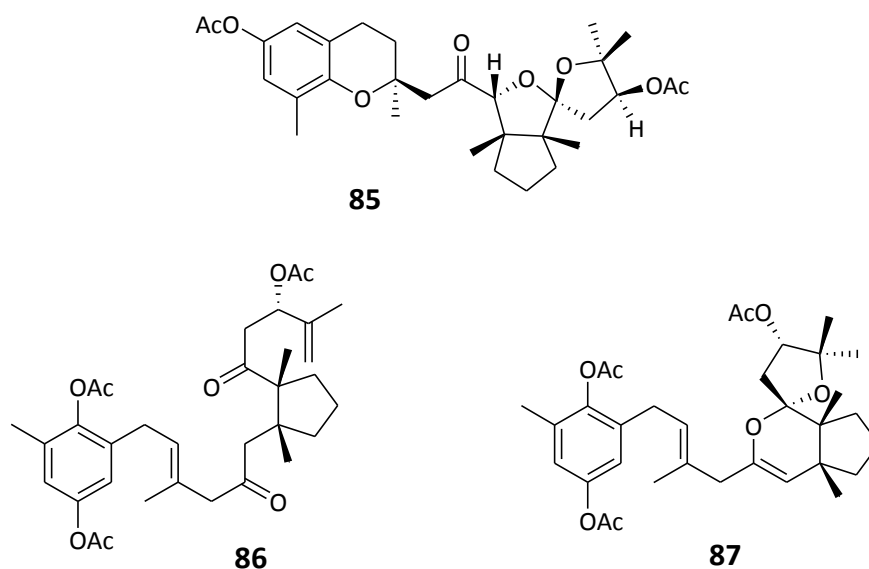
mostraram ter grande actividade quando comparados com o BHT e α - tocoferol usados como controlo positivo (Fisch *et al.*, 2003).



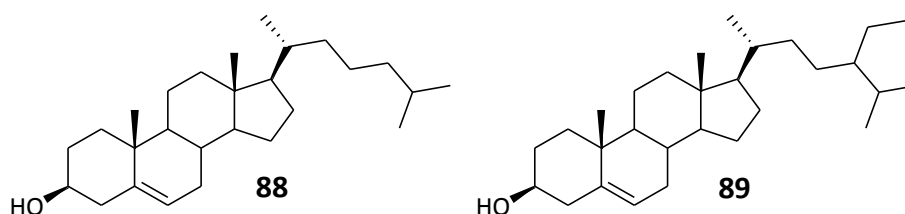


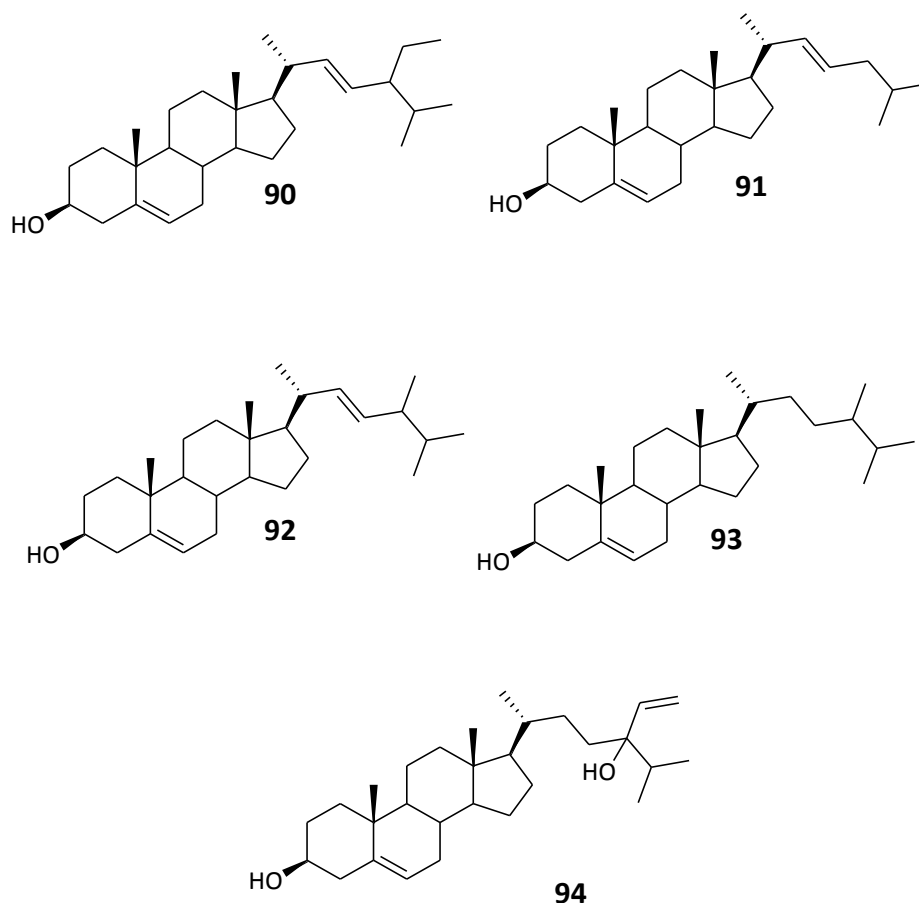
Navarro *et al.* (2004) isolaram a partir do extracto de acetona de uma alga *Cystoseira* sp. (espécie não referida pelo autor) colhida perto das Ilhas das Canárias, um composto maioritário, o amentol (**82**), e cinco novos meroditerpenos, o diacetato de amentol cromona (**83**), o 1,4-metoxi-amentol cromona (**84**), o diacetato de cystoseirona (**85**), o triacetato de preamentol (**86**) e triacetato de 14-*epi*-amentol (**87**).





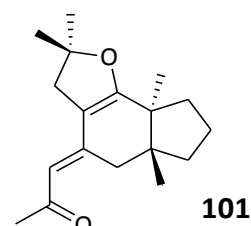
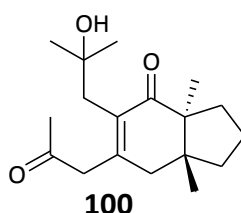
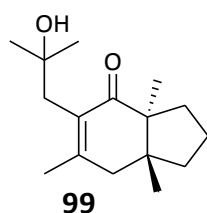
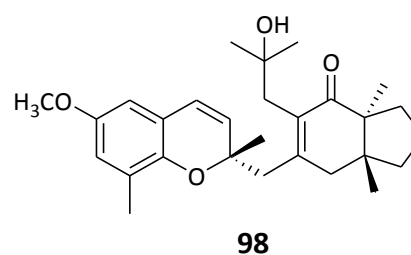
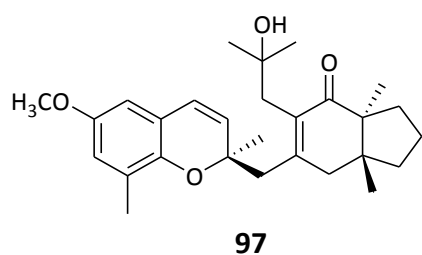
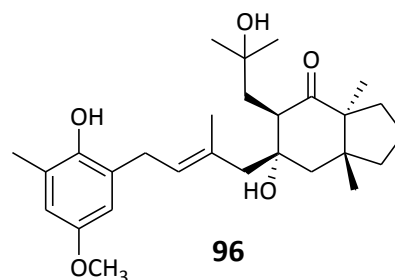
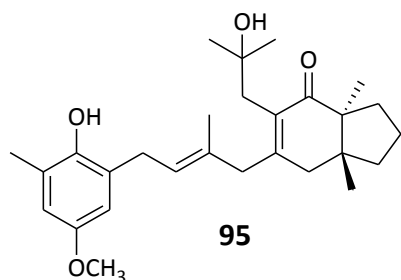
A composição em esteróis da *Cystoseira adriatica* foi estudada por Kapetanovic *et al.* (2005), concluindo que esta fracção possui uma composição diversificada. Neste trabalho foram identificados oito esteróis distintos. São eles o colesterol (**88**), o (24*R*)-estigmast-5-en-3 β -ol (**89**) (maioritários); o estigmast-5,22-dien-3 β -ol (**90**), o 22-desidrocolesterol (**91**), o ergosta-5(22)-dien-3 β -ol (**92**), o ergosta-5-en-3 β -ol (**93**), o estigmast-5,28-dien-3 β ,24-diol (**94**) e o fucosterol (**8**). O teor de fucosterol revelou-se surpreendentemente baixo comparado com o obtido em outras espécies do mesmo género, onde normalmente o fucosterol é o esteroide mais abundante.





Mokrini *et al.* (2008) estudaram o extracto de metanol/clorofórmio/água (4:3:1) de *Cystoseira baccata*, colhida ao longo da costa de Marrocos, tendo isolado sete novos meroditerpenoides, os compostos (95, 96, 97, 98) e os seus derivados, os compostos (99, 100, 101). A actividade anti-incrustante (antifouling) e antibacteriana dos compostos 95-99 e 101 foram avaliadas, bem como a sua toxicidade. Não foi observada actividade nem contra as bactérias marinhas (*Pseudoalteromonas elyakovii*, *Vibrio aestuarianus* e *Polaribacter irgensii*) nem contra as terrestres testadas (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*). Das três microalgas estudadas (*Exanthemachrysis gayraliae*, *Cylindrotheca closterium* e *Pleurochrysis roscoffensis*), apenas o crescimento de *E. gayraliae* foi inibido pelo composto 99. Os resultados para os testes das actividades antimacroalgal e anti-invertebrados foram promissores para os compostos 98, 99 e 101. Relativamente à

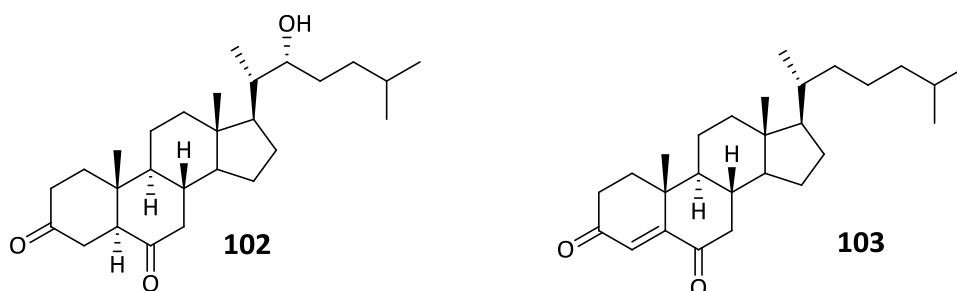
toxicidade, nenhum dos compostos mostrou significativa toxicidade para as larvas de ouriço-do-mar (*Echinus esculentus*) ou ostras (*Crassostrea gigas*) ($LC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) (Mokrini *et al.*, 2008).



Recentemente foi avaliada a actividade antioxidante e antitumoral (contra as linhagens celulares tumorais Daudi, Jurkat e K562) dos extractos de diclorometano/metanol (1:1) de dez espécies de Phaeophyta provenientes da costa Britânica, entre as quais se incluía *Cystoseira tamariscifolia*. No que diz respeito ao poder antioxidante, esta alga castanha mostrou ser uma das mais activas ($EC_{50} = 0,49 \text{ mg/mL}$), e também a que apresentou uma maior percentagem de fenóis totais (Zubia *et al.*, 2009). Relativamente aos estudos

antitumorais, o extracto de *Cystoseira tamariscifolia* revelou ser dos mais activos contra as três linhagens celulares testadas (Zubia *et al.*, 2009).

Hamdy *et al.* (2009), ao estudar um extracto de etanol de *Cystoseira myrica*, isolaram um esteroide, cuja estrutura foi elucidada pela primeira vez, 3-keto-22-epi-28-nor-cathasterone (**102**) e outro cuja estrutura já era conhecida, de nome cholest-4-ene-3,6-dione (**103**). Estes dois compostos foram sujeitos a testes antitumorais contra as linhagens celulares tumorais HEPG-2 e HCT116, verificando-se que ambos os compostos (**102** e **103**) eram significativamente citotóxico para as duas linhagens celulares.



Na fracção lipídica do extracto de etanol da *Cystoseira hakodatensis* foi determinado o perfil de ácidos gordos (constituído maioritariamente por ácido palmítico e com um teor significativo de ácidos gordos ω -3), o teor em fucoxantina e o teor de fenóis totais. Os autores estudaram a metabolização desta fracção no fígado de rato *kk-A^y* (um tipo de rato geneticamente obeso), pretendendo avaliar a influência desta fracção lipídica no nível de oxidação dos lípidos no fígado (Widjaja-Adhi Airanthi *et al.*, 2011).

A pesquisa bibliográfica apresentada mostra que:

- a) Pouco se conhece da composição e metabolitos secundários da *Cystoseira abies-marina* e do seu potencial farmacológico;

- b) Os derivados de tetraprenil-toluquinóis e tetraprenil-toluquinonas são a família de compostos mais abundantes em espécie do género *Cystoseira*. No entanto, também os meroditerpenos e merosesquiterpenos de biossíntese mista estão presentes em grande número.
- c) Das 294 espécies pertencentes ao género *Cystoseira*, apenas cerca de 20 foram estudadas do ponto de vista fitoquímico/farmacológico sendo que alguns deles têm estudos muito preliminares. Assim conclui-se que existe ainda muita investigação a fazer com espécies deste género.

CAPITULO II

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

2. Apresentação e discussão dos resultados

2.1 Caracterização estrutural dos compostos isolados de *Cystoseira abies-marina*

Os compostos descritos neste capítulo foram isolados a partir dos extractos de diclorometano e metanol de *Cystoseira abies-marina* por métodos cromatográficos preparativos. A estrutura química dos compostos isolados foi determinada recorrendo principalmente a estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , mono e bidimensional, e espectrometria de massa (EM). A seguir serão apresentadas as evidências espectroscópicas mais relevantes, observadas nos espectros analisados e que permitira elucidar inequivocamente a estrutura química dos compostos.

2.1.1 Composto A: ácido benzóico

No espectro de RMN de ^1H do composto **A** (figura 4), observam-se três grupos de sinais (ressonâncias a δ 7,47; 7,61 e 8,12 ppm), em forma de *m*, *tt* e *dd*, cujo integral corresponde respectivamente a 2, 1 e 2 prótons e cujo desvio químico sugere tratar-se de prótons aromáticos.

No espectro de RMN ^{13}C do composto **A** (figura 5) observa-se a presença de dois sinais com ressonância a δ 128,5 e 130,2 ppm, correspondentes, cada uma, à ressonância de dois carbonos equivalentes (a intensidade destes sinais é o dobro da de outros correspondentes a carbonos do mesmo tipo);

O mesmo espectro apresenta ainda um sinal a δ 133,7 ppm, cuja intensidade é metade da dos sinais indicados no ponto anterior e que por isso corresponde à ressonância de um carbono apenas;

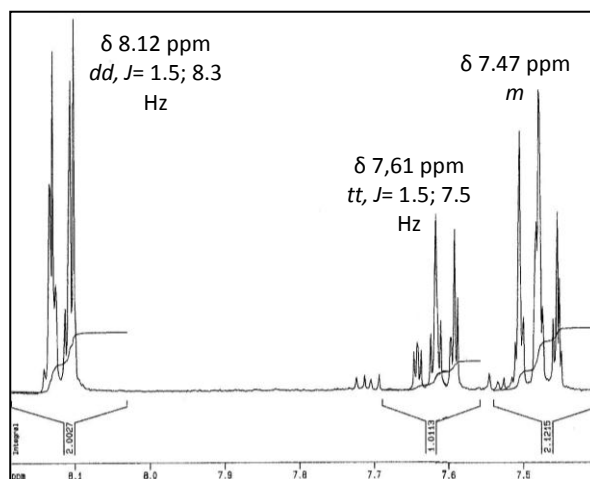


Figura 4. Ampliação do espectro de RMN ^1H do composto A.

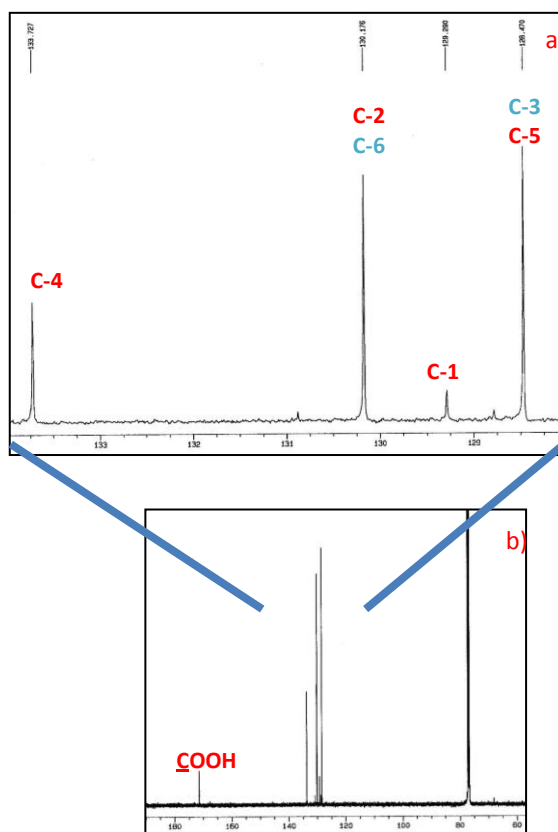


Figura 5. a) Espectro de RMN ^{13}C do composto A.

b) Ampliação do espectro na zona dos 120-140 ppm.

A análise do espectro de correlação heteronuclear a uma ligação com detecção inversa (HSQC) (figura 6) mostra haver correlação entre os sinais de RMN de ^1H referidos inicialmente (δ 7,47; 7,61 e 8,12 ppm) e os de ^{13}C a δ 128,5, 130,2 e 133,7 ppm. Isto

confirma que os carbonos cujas ressonâncias dão origem aos sinais a δ 128,5, 130,2 e 133,7 ppm são carbonos protonados, ou seja, estão directamente ligados aos protões cujas ressonâncias correspondem aos sinais a δ 7,47; 7,61 e 8,12 ppm;

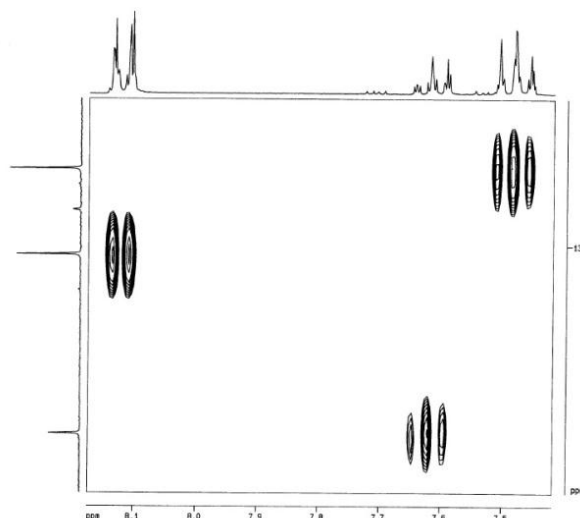


Figura 6. a) Espectro de RMN de HSQC do composto A.

Os desvios químicos dos 3 sinais no espectro de RMN ^{13}C (δ 128,5, 130,2 e 133,7 ppm) são característicos da ressonância de carbono protonado pertencentes a um anel aromático;

Ainda no espectro de RMN ^{13}C , a δ 129,3 ppm observa-se um sinal correspondente à ressonância de um carbono quaternário (significa não ligado a átomos de hidrogénio) e que, tendo em conta o valor do desvio químico, significa que também não está ligado a nenhum átomo de oxigénio. A ligação de um átomo de carbono a um átomo electronegativo como o oxigénio provoca no espectro de RMN o deslocamento do respectivo sinal de ressonância para valores de desvio químico maiores (tipicamente 140-180 ppm).

O sinal a δ 171,5 ppm no espectro de RMN de ^{13}C é indicativo da presença no composto **A** de um carbono quaternário fortemente influenciado pela ligação a átomos electronegativos como acontece num carbono de um grupo carboxílico.

A conjugação destes aspectos estruturais sugerem que o composto **A** possui 6 carbonos aromáticos, 5 dos quais protonados, um quaternário não oxigenado, e um carbono carboxílico ou seja que estamos perante um anel aromático mono substituído, sendo o substituinte um grupo carboxílico.

Esta estrutura é confirmada pelas conectividades observadas no espectro de correlação heteronuclear a longa distância, HMBC, ($J = 7$ Hz) e que permitiram fazer a atribuição dos sinais dos espectros aos átomos da estrutura do composto, cuja informação é apresentada na tabela 1 e na figura 7.

Tabela 1. Conectividade observada no espectro de HMBC para o composto **A**.

Protão	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
H-3, H-5	7,47 <i>m</i>	129,3 (C) 128,5 (CH; CH)
H-4	7,61 <i>tt</i> , $J = 1,5; 7,5$ Hz,	130,2 (CH; CH)
H-2, H-6	8,12 <i>dd</i> , $J = 1,5; 8,3$ Hz,	171,5 (COOH) 133,7 (C-H) 130,2 (CH; CH)

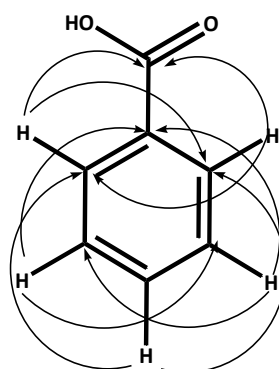
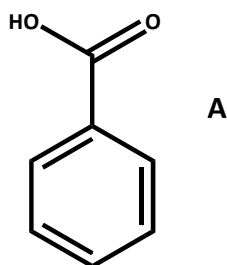


Figura 7. Conectividades $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ a longa distância observadas no espectro de HMBC do composto **A**.

No espectro de massa do composto **A** é visível o pico correspondente ao ião molecular com um átomo de sódio $[M+Na]^+$ a uma razão massa carga (m/z) de 145, que permite concluir que este composto tem uma massa molecular de 122 correspondente à fórmula $C_7H_6O_2$, tratando-se portanto do ácido benzóico cuja estrutura química está representada abaixo.



2.1.2 Composto B: cystoazores A

A análise muito preliminar dos espectros de RMN de 1H e sobretudo de ^{13}C (figura 8) do composto **B** mostra claramente que se trata de um composto com uma estrutura muito mais complexa que o composto **A**. De facto, o espectro de RMN ^{13}C mostra a existência de pelo menos 21 átomos de carbono quimicamente não equivalentes ou seja estruturalmente muito diversificados (carbonos alifáticos, aromáticos, quaternários, vinílicos, grupos metino, metileno, metilo, ligados ou não a átomos electronegativos).

A análise do espectro de RMN de 1H do composto **B** permite retirar as seguintes ilações quanto à sua estrutura química:

A presença de dois grupos metoxilos ($-OCH_3$) não equivalentes ligados a um anel aromático (sinais a δ 3,75 e 3,68 ppm em forma de singuleto, cujo integral corresponde a três protões cada, correspondentes à ressonância dos protões dos grupos metoxilo);

Possui apenas 2 protões aromáticos e equivalentes cuja ressonância dá origem a um sinal a δ 6,57 ppm, em forma de singuleto, e cujo integral corresponde a dois protões.

Isto leva a concluir que o composto **B** possui um anel aromático tetrasubstituído sendo dois desses substituintes os grupos metoxilo referidos anteriormente.

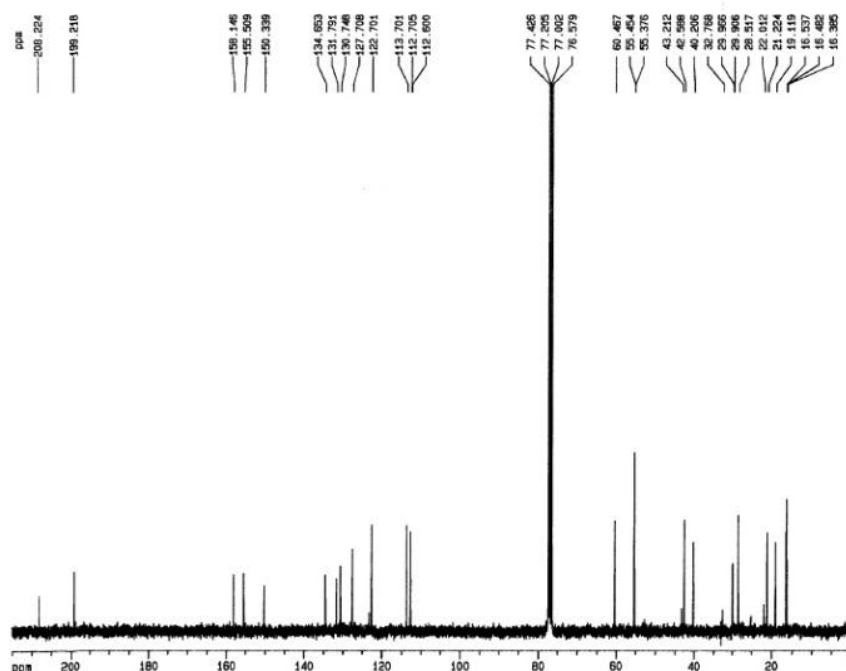


Figura 8. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **B**.

A análise do espectro de HSQC permite confirmar que cada um dos 2 prótons aromáticos (δ 6,57 ppm) está ligado a um carbono aromático cuja ressonância origina sinais a δ 112,7 e 113,7 ppm.

O composto **B** também possui na sua estrutura quatro grupos metilo (CH_3) ligados a carbonos quaternários uma vez que a ressonância dos respectivos prótons origina 4 sinais a δ 1,75; 2,13; 2,12 e 2,28 ppm, em forma de singuleto, com integral proporcional a 3 prótons cada;

A análise do espectro de HMBC permite concluir que um dos grupos metilo está ligado ao anel aromático uma vez que os prótons do grupo metilo estão à distância de 3 ligações do carbono aromático protonado cuja ressonância surge a δ 113,7 ppm.

Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*

A existência de dois grupos cetona na estrutura do composto **B** é deduzida da análise do espectro de RMN de ^{13}C devido à presença dos sinais a δ 199,2 e 208,2 ppm, característicos da ressonância de carbonos carbonílicos.

A existência de duas duplas ligações na estrutura do composto **B** (para além das existentes no anel aromático) é deduzida a partir das seguintes evidências espectroscópicas: a) presença dos sinais no espectro de RMN de ^1H a δ 5,45 e 6,10 ppm, desvio químico característico da ressonância de prótons vinílicos e cujo integral corresponde a 1 próton cada; b) estes sinais surgem na forma de duplete ($J= 1,1$ Hz) e duplo tripleto ($J= 1,2$ e $7,2$ Hz) correspondendo a acoplamentos a longa distância (entre prótons não adjacentes) e com prótons não vinílicos, indicativo da presença de duplas ligações com um único próton vinílico cada. Constantes de 8-10 Hz ou 14-17 Hz são característicos de duplas ligações com 2 prótons vinílicos cada, em configuração *cis* ou *trans* respectivamente; c) o espectro de HSQC mostra que estes sinais (δ 5,45 e 6,10 ppm) têm correlação com os sinais de ^{13}C a δ 127,7 e 122,7 ppm ou seja com desvios químicos característicos de carbonos protonados vinílicos;

A presença de vários grupos CH_2 alifáticos (grupo metileno) é deduzida da presença de sinais no espectro de ^1H a desvios químicos entre δ 1-3,5 ppm, com integral correspondente a 2 prótons cada e que o espectro de HSQC mostra terem correlação, a 1 ligação, com os sinais de ^{13}C entre 16-55 ppm.

Pelo exposto conclui-se que o composto **B** possui na sua estrutura um anel aromático tetrasubstituído em que os substituintes são 2 grupos metoxilo, 1 grupo metilo, e uma cadeia carbonada longa; Esta cadeia carbonada é composta por grupos metilo (CH_3), metileno (CH_2), vinílico ($\text{HC}=\text{C}$) e grupos carbonilo ($\text{C}=\text{O}$).

A posição relativa de cada um dos grupos estruturais apresentados na estrutura do composto **B** foi determinada através da análise exaustiva do espectro de COSY, que mostra

os acoplamentos entre prótons adjacentes, e pelas conectividades exibidas no espectro HMBC (figura 9).

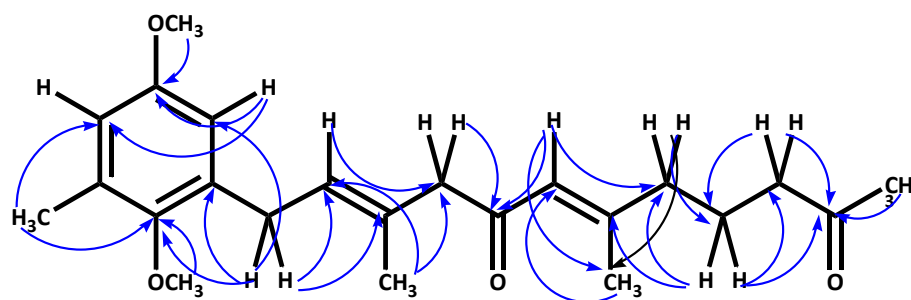


Figura 9. Conectividades ¹H/¹³C a longa distância observadas no espectro de HMBC do composto **B**.

A presença de ligações duplas levanta a questão da determinação da sua configuração.

Uma vez que são ligações duplas com um único próton vinílico cada, não é possível deduzir a configuração da ligação dupla a partir da constante de acoplamento exibida pelo próton vinílico em cada dupla ligação.

Assim, só é possível determinar a configuração das duplas ligações recorrendo à análise do espectro de RMN de NOESY que mostra as proximidades espaciais dos vários átomos de hidrogénio na molécula de composto **B**.

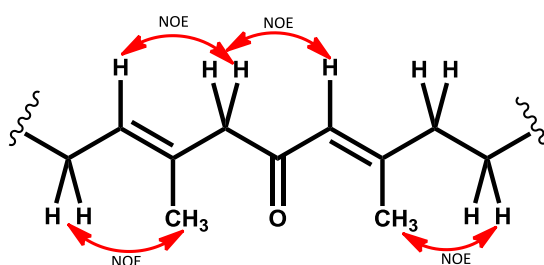
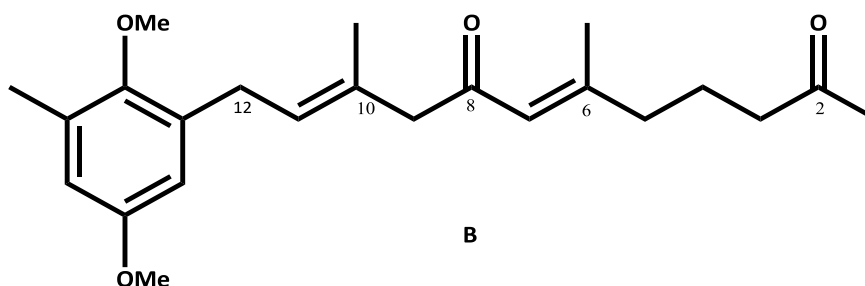


Figura 10. Efeitos de NOE observados no espectro de NOESY do composto **B**.

Os efeitos NOE observados no espectro de RMN de NOESY e que são relevantes para a determinação da configuração das ligações duplas estão indicadas na figura abaixo (figura

10). Conclui-se assim que as duas ligações duplas têm configuração *E* uma vez que é aquela em que os grupos de maior prioridade estão para lados opostos da ligação dupla.

Conjugando todos estes dados com os dados de espectrometria de massa cujo espectro mostra um pico a m/z 395, correspondente ao íon $[M+Na]^+$ podemos concluir que este composto tem massa molecular 372 correspondente à fórmula $C_{23}H_{32}O_4$. O conjunto dos dados estruturais apresentados até aqui, permite concluir que a estrutura do composto **B** é a apresentada abaixo e cujo nome IUPAC é (6*E*,10*E*)-12-(2,5-dimetoxi-3-metilfenil)-6,10-dimetildodeca-6,10-dieno-2,8-diona. Após pesquisa exaustiva verificou-se que esta é a 1ª vez que um composto com esta estrutura foi isolado e caracterizado. Trata-se assim, de um composto novo ao qual foi atribuído o nome comum cystoazores A. No entanto, um composto muito semelhante a este, já foi isolado da *Cystoseira abies-marina*, *cystomexicona* B (**2**), cuja única diferença estrutural é possuir apenas um grupo metoxilo (Moreno *et al.*, 1998).



Embora o nome do composto **B** segundo a nomenclatura IUPAC não o reflecta, em termos de biossíntese este é um composto de biossíntese mista, derivado de sesquiterpeno que perdeu um carbono (daí dizer-se ser um norsesquiterpeno) e que tem um anel aromático como substituinte.

2.1.3 Composto C: cystoazores B

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **C** são muito idênticos aos do composto **B**, evidenciando uma estrutura semelhante. Assim, identificam-se os sinais correspondentes a ressonância dos prótons e carbonos pertencentes a um anel aromático tetrasubstituído (tendo como substituintes dois grupos metoxilo, um grupo metilo e uma cadeia carbonada de catorze carbonos), dois grupos carbonilo, três grupos metilo, dois sistemas vinílicos e cinco grupos metileno.

A análise dos espectros de massa mostra um pico a m/z 395, correspondente ao ião $[\text{M}+\text{Na}]^+$ permitindo concluir que este composto tem massa molecular 372 correspondente à fórmula $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_4$. Confirma-se assim que o composto **B** e **C** apresentam a mesma fórmula molecular, ou seja, trata-se de dois compostos isómeros.

As diferenças nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C restringem-se a: a) desaparecimento dos sinais correspondentes à ressonância do grupo metilo ligado ao carbono 6 da cadeia principal (6- CH_3) e do sinal correspondente a ressonância do grupo metileno na posição 5 da cadeia principal; b) ao aparecimento de um duplete a δ 1,87 ppm ($J= 1,2$ Hz) cujo espectro de HSQC mostra ter correlação com o sinal de RMN ^{13}C a δ 25,2 ppm correspondente a um grupo metilo; e ao aparecimento de um tripleto a δ 2,56 ppm ($J= 7,9$ Hz) correspondente a ressonância dos prótons de um grupo metileno e cujo espectro de HSQC mostra ter correlação com sinal de RMN ^{13}C a δ 32,8 ppm.

As evidências referidas atrás mostram que a diferença entre os compostos se reflecte apenas nos desvios químicos de um grupo metilo e um grupo metileno, ambos substituintes de um sistema vinílico, ou seja que essa diferença está no arranjo espacial dos referidos substituintes.

A análise das conectividades exibidas no espectro de HMBC (figura 11) permitiu o assinalamento inequívoco dos carbonos e prótons do composto **C**, confirmando que os compostos são muito semelhantes.

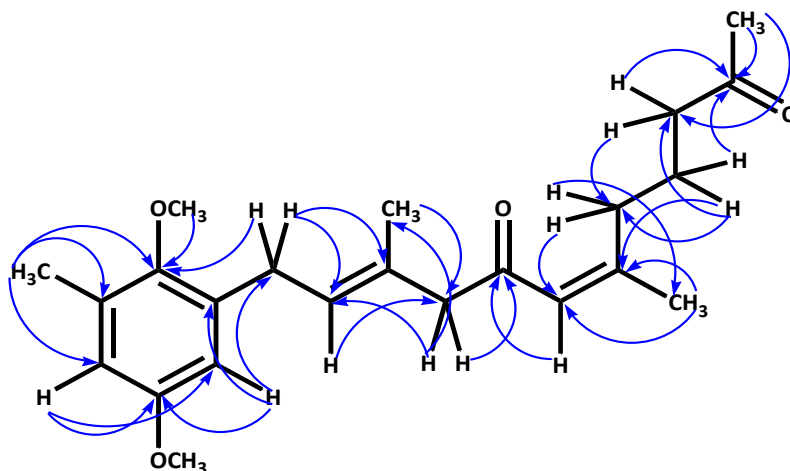


Figura 11. Conectividades ¹H/¹³C a longa distância observadas no espectro de HMBC do composto **C**.

A análise do espectro de RMN de NOESY evidenciou os efeitos NOE indicados na figura 12. Esta figura mostra claramente que no composto **C**, o sistema vinílico C₆=C₇, exibe uma configuração *Z*, em oposição à configuração *E* que ficou estabelecida para o sistema vinílico C₆=C₇ no composto **B**.

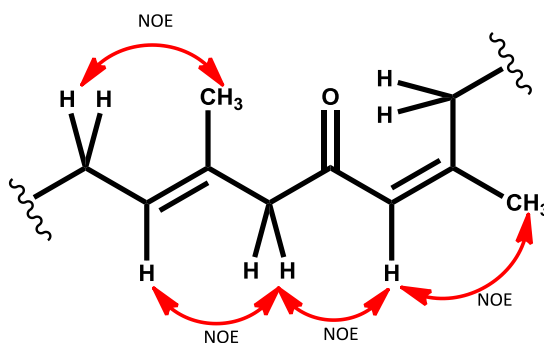
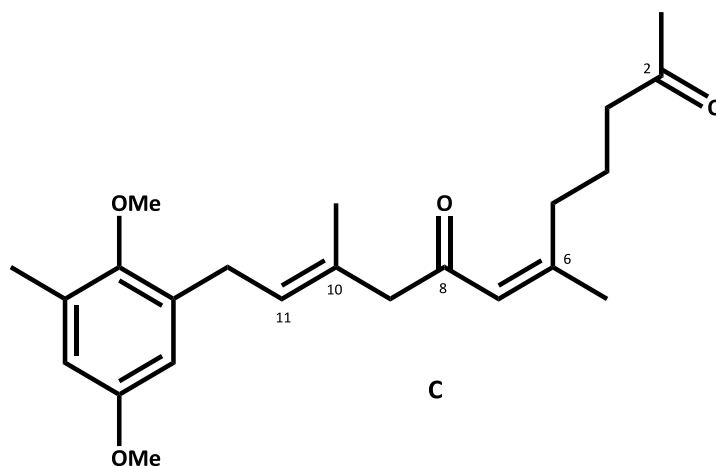


Figura 12. Efeitos de NOE observados no espectro de NOESY do composto **C**.

Conjugando todos estes dados fica identificado o composto **C** com o nome IUPAC (6Z,10E)-12-(2,5-dimetoxi-3-metilfenil)-6,10-dimetildodeca-6,10-dieno-2,8-diona. Após pesquisa exaustiva verificou-se que esta é a 1^o vez que um composto com esta estrutura foi isolado e caracterizado. Trata-se assim, de um composto novo ao qual foi atribuído o nome comum cystoazores B e cuja estrutura está representada abaixo.



2.1.4 Composto D: cystoazorona A

Relativamente ao composto **D**, a análise espectroscópica mostra a presença de muitos elementos estruturais idênticos aos exibidos pelos compostos **B** e **C**. A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , confirma que o composto **D** possui um anel aromático tetrasubstituído, dois sistemas vinílicos, um grupo metilo ligado a cada um dos sistemas vinílicos e um grupo carbonilo, em tudo idênticos aos já descritos para os compostos **B** e **C**.

No entanto, a análise dos espectros de massa mostram que o composto **D** possui uma massa molecular de 472 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$ a m/z 495) compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_5$ revelando que o composto **D** possui mais 5 carbonos e 2 oxigénios que os compostos **B** e **C**. Ou seja, o composto **D** não é um composto isómero dos anteriores.

Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*

A conjugação dos dados anteriores permitem concluir estarmos na presença de um composto que possui uma cadeia carbonada de 20 carbonos, em vez de 15 existentes nos compostos **B** e **C**, evidenciando que o composto **D** é um derivado de diterpeno e não de um sesquiterpeno.

As diferenças estruturais entre o composto **D** e os anteriores são identificadas pelas seguintes evidências espectroscópicas:

O espectro de RMN ^{13}C do composto **D** mostra que na sua estrutura apenas está presente um grupo carbonilo (um só sinal na zona do espectro característico da ressonância de carbonos carbonílicos a δ 199,5 ppm) em vez de 2 grupos carbonilo identificados nas estruturas dos compostos **B** e **C**;

O espectro de RMN de ^1H exibe sinal a δ 3,31 ppm em forma de duplo duplete ($J= 1,8$ e $8,6$ Hz), que mostra ter, no espectro de HSQC, correlação com o sinal de RMN ^{13}C a δ 78,0 ppm.

O espectro de RMN ^{13}C possui ainda um sinal δ 73,0 ppm que não exibe correlação com qualquer sinal de ressonância de protão. Estes dois dados conjugam-se no sentido de o composto **D** possuir dois carbonos alifáticos ligados a átomos electronegativos como o oxigénio, sendo um deles um carbono protonado e o outro um carbono quaternário;

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , conjugados com a informação do espectro de HSQC indicam a presença de um protão pertencente a um sistema insaturado (δ_{H} 5,13 ppm, m ; δ_{C} 123,7 ppm), e um grupo metilo (δ_{H} 1,61 ppm, d , $J=0,8$ Hz; δ_{C} 15,9 ppm) ligado a esse sistema insaturado (informação obtida por análise do espectro de HMBC) que não existiam nos compostos **B** e **C**;

A análise conjunta dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e HSQC revelam a existência de vários grupos metileno e dois grupos metílicos alifáticos para além dos identificados como idênticos aos existentes nos compostos **B** e **C**.

O número de sinais de RMN de ^1H e a sua multiplicidade, aliada à consequente sobreposição dos mesmos, implicaram uma grande complexidade do espectro e dificultaram bastante o assinalamento inequívoco de todos os carbonos e prótons da estrutura.

Apesar disso, a localização relativa da grande maioria das unidades estruturais identificadas como pertencentes à estrutura do composto **D**, foi possível através da análise exhaustiva do espectro de RMN 2D de HMBC, cujas conectividades observadas estão indicadas na figura 13.

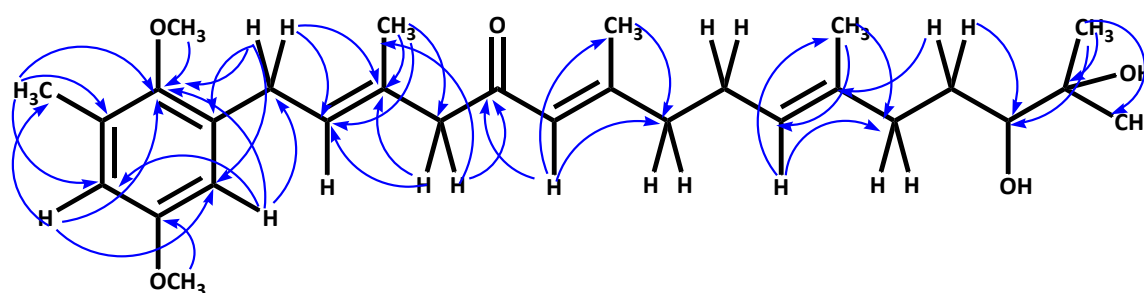


Figura 13. Conectividades $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ a longa distância observadas no espectro de HMBC do composto **D**.

A caracterização inequívoca da estrutura só ficou concluída através da análise conjunta dos dados indicados na figura anterior (Fig.13) e a análise do espectro de RMN 2D de COSY (mostra os acoplamentos $^1\text{H}-^1\text{H}$ adjacentes) indicados na figura 14.

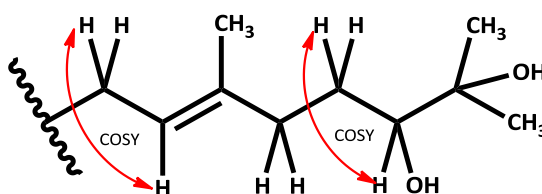


Figura 14. Acoplamentos homonucleares observados no espectro de COSY para parte da estrutura **D**.

Só foi possível estabelecer a configuração de cada um dos três sistemas vinílicos por análise do espectro de RMN de NOESY. O efeito de NOE observado evidência que todos os sistemas

vinílicos C₂=C₃; C₆=C₇ e C₁₀=C₁₁ do composto **D** exibem uma configuração *E* como mostra a figura 15 abaixo apresentada.

A configuração relativa dos grupos hidroxilo foi também estabelecida por análise do espectro de NOESY, tendo-se concluído que o centro quiral C-14 tem uma configuração relativa *S*.

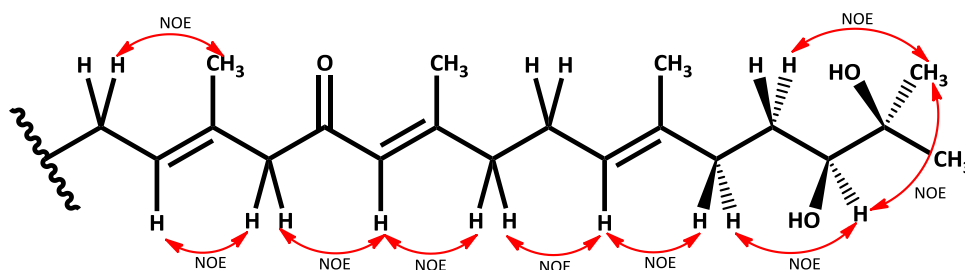
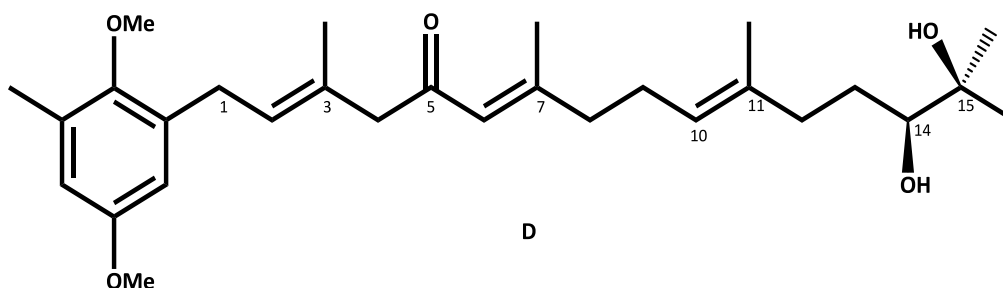


Figura 15. Efeitos NOE observados no espectro de NOESY do composto **D**.

Todos estes dados permitem identificar o composto **D** com o nome IUPAC (1*S**,2*E*,6*E*,10*E*)-14,15-dihidroxi-1-(2,5-dimetoxi-3-metilfenil)-3,7,11,15-tetrametilhexadeca-2,6,10-trien-5-ona, cuja estrutura está abaixo representada. Após aturada pesquisa bibliográfica, verifica-se que esta é a primeira vez que este composto é isolado, ou seja, trata-se de um composto novo ao qual se atribuiu o nome comum cystoazorona A.



2.1.5 Composto E: cystoazorona B

No que respeita à análise espectroscópica do composto **E**, este evidencia inúmeras semelhanças com o composto **D**. Uma análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permite confirmar essas semelhanças: a presença de um anel aromático tetrasubstituído, os três sistemas vinílicos, um grupo metílico ligado a cada um dos sistemas vinílicos, um grupo carbonilo e dois metilos terminais). A análise dos espectros de massa mostram que o composto **E** possui uma massa molecular de 488 (pico a m/z 511 correspondente ao ião $[\text{M}+\text{Na}]^+$) compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_6$ revelando que o composto **E** possui mais um oxigênio que o composto **D**. Uma vez que o número de hidrogênios é idêntico nos dois compostos conclui-se que o composto **E** possui mais um grupo hidroxilo que o composto **D**. Assim sendo, o composto **E**, à semelhança do composto **D**, é um derivado de diterpeno mas com maior grau de oxigenação.

Através da análise exaustiva do espectro de RMN de HMBC (conectividades observadas indicadas na figura 16) e do espectro de RMN de COSY (acoplamentos indicados na figura 17) foi possível determinar a localização relativa da grande maioria das unidades estruturais identificadas como pertencentes à estrutura do composto **E**.

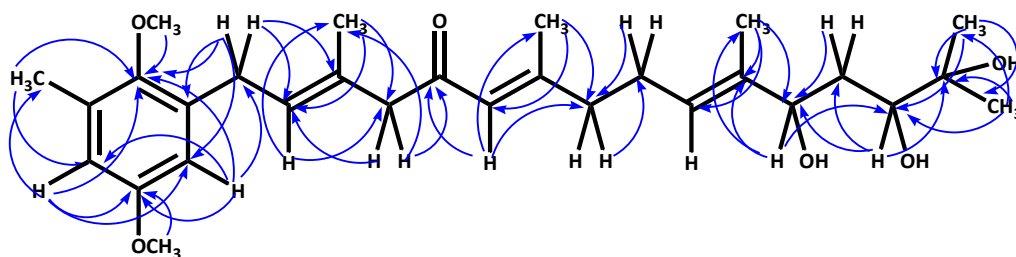


Figura 16. Conectividades $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ a longa distância observadas no espectro de HMBC do composto **E**.

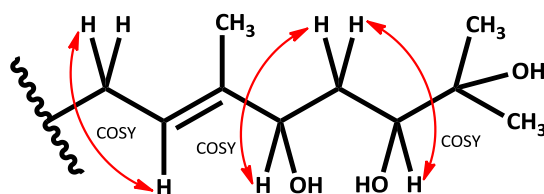


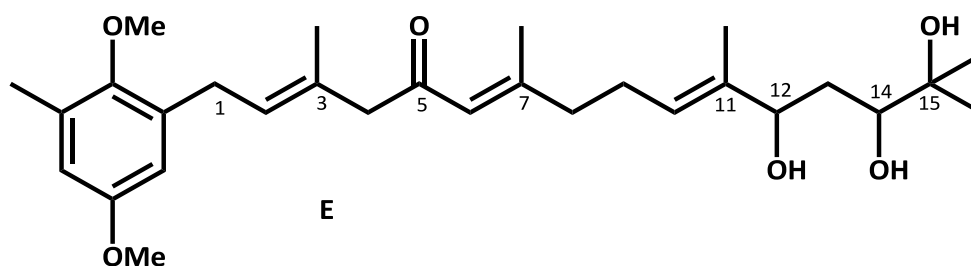
Figura 17. Acoplamentos homonucleares observados no espectro de COSY para parte da estrutura **E**.

A configuração dos três sistemas vinílicos $C_2=C_3$; $C_6=C_7$ e $C_{10}=C_{11}$ no composto **E**, foi estabelecida por comparação dos desvios químicos e multiplicidades dos sinais correspondentes à ressonância dos prótons vinílicos e adjacentes nos espectros dos compostos **D** e **E**, tendo-se concluído que todos os sistemas vinílicos têm uma configuração *E*.

A configuração relativa dos centros quirais não foi estabelecida por falta do espectro de RMN de NOESY.

Todos estes dados conjugados permitem identificar o composto **E** com o nome IUPAC (2*E*,6*E*,10*E*)-12,14,15-trihidroxi-1-(2,5-dimetoxi-3-metilfenil)-3,7,11,15-tetrametilhexadeca-2,6,10-trien-5-ona, cuja estrutura está apresentada abaixo.

Após pesquisa adequada, verifica-se que este composto foi isolado pela primeira vez, ou seja, trata-se de um composto novo ao qual se atribuiu o nome comum cystoazorona B.



2.2 Resultados das actividades biológicas dos compostos isolados de *Cystoseira abies-marina*

2.2.1 Actividade antitumoral

O efeito inibitório de crescimento e a citotoxicidade dos compostos isolados foram determinados expondo as linhagens celulares HeLa (linhagem tumoral) e Vero (linhagem não tumoral), em fase lag e log de crescimento celular, a concentrações diferentes, até um máximo de 40 µg/mL. O resultado de ambas as actividades foi expressa em termos de EC₅₀ (concentração de composto que provoca 50% de mortalidade celular). Os resultados obtidos são apresentados na tabela 2.

Como se pode verificar na tabela 2, no teste para inibição de crescimento (fase lag), o composto que mostrou ser mais activo foi o cystoazorona A (composto **D**) com um EC₅₀= 10,2 ± 0,19 µg/mL para a linhagem celular HeLa e um EC₅₀= 16,7 ± 0,08 µg/mL para as células Vero. Apesar do EC₅₀ de ambas as linhagens serem relativamente baixos, verifica-se uma diferença de sensibilidade entre as duas linhagens, com um IS (índice de selectividade, definido como EC_{50Vero}/EC_{50HeLa}) = 1,64, indicando assim um efeito mais pronunciado sobre a linhagem tumoral. Se analisarmos o efeito do mesmo composto quando adicionado às células em fase log, ou seja, a sua citotoxicidade para as células em crescimento exponencial, os valores de EC₅₀ para as células HeLa e Vero são de 2,8 ± 1,16 e 6,9 ± 0,52 µg/mL, respectivamente, ou seja, não só o índice de selectividade é maior (IS=2.46), mas as células apresentam uma maior sensibilidade à presença do composto. O cystoazores A (composto **B**) é o segundo composto mais activo e no teste de inibição apresenta um EC₅₀= 25,0± 1,28 µg/mL para as células HeLa e EC₅₀= 28,0± 1,74 µg/mL para as células Vero. No

Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*

teste de citotoxicidade o cystoazores A mostrou ser mais activo que no teste anterior com um EC₅₀ mais baixo ($17,3 \pm 1,64 \mu\text{g/mL}$ e $16,5 \pm 5,30 \mu\text{g/mL}$ para as células HeLa e Vero, respectivamente). Verificou-se uma menor actividade no cystoazores B (composto C) sendo que o seu EC₅₀ para a citotoxicidade foi de $20,1 \pm 1,67 \mu\text{g/mL}$ para as HeLa e $22,1 \pm 1,84 \mu\text{g/mL}$ para as Vero. O ácido benzóico e o cystoazorona B (compostos A e E respectivamente) foram os que apresentaram menos actividade ultrapassando o limite estabelecido como concentração máxima testada (EC₅₀>40 $\mu\text{g/mL}$) em ambos os testes nas duas linhagens.

Tabela 2. Actividade inibidora de crescimento celular e citotoxicidade dos compostos isolados de *Cystoseira abies-marina* contra as linhagens celulares HeLa e Vero.

Compostos	Inibição EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) ^a		Citotoxicidade EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) ^b	
	HeLa	Vero	HeLa	Vero
Ácido Benzóico	>40	>40	>40	>40
Cystoazores A	$25 \pm 1,28$	$28 \pm 1,74$	$17,3 \pm 1,64$	$16,5 \pm 5,30$
Cystoazores B	$32,0 \pm 8,40$	>40	$20,1 \pm 1,67$	$22,1 \pm 1,84$
Cystoazorona A	$10,2 \pm 0,19$	$16,7 \pm 0,08$	$2,8 \pm 1,16$	$6,9 \pm 0,52$
Cystoazorona B	>40	>40	>40	>40

^aTaxol foi usado como controlo positivo no teste de inibição (EC₅₀ = $0,12 \pm 0,073$ contra HeLa e $0,18 \pm 0,036$ contra Vero).

^bTaxol foi usado como controlo positivo no teste de citotoxicidade (EC₅₀ = $0,06 \pm 0,005$ contra HeLa e $0,03 \pm 0,014$ contra Vero).

Globalmente, pode-se verificar que os compostos cystoazores A, cystoazores B e cystoazorona A apresentaram maior actividade para as células tumorais HeLa quando comparadas com a linhagem não tumoral de referência, sendo o maior índice de

selectividade IS encontrado em cystoazorona A. Apesar de este não ser um valor muito elevado, saliente-se que é comparável ao de alguns dos agentes quimioterápicos actualmente utilizados, como por exemplo o Taxol, com IS=1.5 (Tabela 2), ou o Tamoxifen, com um IS=1.29 (Badisa *et al.*, 2009). O anel aromático não parece ser determinante para a actividade, uma vez que existe nos quatro meroditerpenos, quer sejam mais quer menos activos. Comparando o cystoazorona A com o cystoazorona B, é possível que a introdução do grupo OH na posição 12 seja um factor determinante para a perda de actividade, embora sejam necessários mais estudos para estabelecer relações estrutura / actividade.

Por outro lado, deve-se realçar a maior sensibilidade apresentada pelas células em fase log de crescimento quando comparadas com as células em fase lag, evidenciada pela diferença dos valores de EC₅₀ de inibição de crescimento e citotoxicidade, respectivamente. Sendo a inibição de crescimento (fase lag) determinada por exposição das células ao composto na fase inicial de crescimento, estará a testar-se principalmente o efeito a nível da adesão celular ao substrato, nomeadamente no que diz respeito à expressão de moléculas de adesão como as E-cadherins (Bahrawi & Pignatelli, 1998). No que diz respeito às células em fase log, está-se a testar o efeito a nível de diversos mecanismos relacionados com a divisão celular, que também são detectáveis nos ensaios anteriores, mas são mais evidentes os agentes que provocam a apoptose das células, como é o caso da Actinomicina D (Bock *et al.*, 2002).

2.2.2 Actividade antioxidante

O método do DPPH permite avaliar a capacidade que um composto tem na captação de radicais livres e espécies reactivos de oxigénio. Deste modo, podemos dizer que todos os compostos testados possuem alguma actividade, sendo que uns mais activos que outros. A

Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*

concentração máxima testada foi igual para todos os compostos e padrões (500 µg/mL), no entanto, não foi possível calcular o EC₅₀, uma vez que nenhum dos compostos atingiu 50% de poder antioxidante. Como tal, os resultados estão expressos em percentagem de poder antioxidante à máxima concentração testada. Como se pode verificar na figura 18, o cystoazorona A e cystoazorona B (compostos **D** e **E** respectivamente) foram os que apresentaram uma actividade mais elevada com 28,5 e 30,1 %, respectivamente. Abaixo dos 10% de actividade surgem os restantes três compostos, o cystoazores A, o cystoazores B e o ácido benzóico (compostos **A**, **B** e **C**, respectivamente). Comparando os valores de % de poder antioxidante dos compostos testados relativamente aos padrões trolox e quercetina (cuja actividade está entre os 70 e 80 %), conclui-se que os compostos não parecem ser promissores como antioxidantes. No entanto, quando comparados com o padrão BHT (composto frequentemente utilizado como antioxidante na indústria alimentar), a perspectiva muda e verifica-se que os valores obtidos para a cystoazorona A e cystoazorona B podem ser considerados elevados, uma vez que os seus valores são mais do dobro relativamente ao BHT. Assim, os resultados sugerem que, pelo menos como antioxidantes industriais (em oposição a antioxidantes em sistemas *in vivo*), os compostos cystoazorona A e cystoazorona B parecem ser úteis.

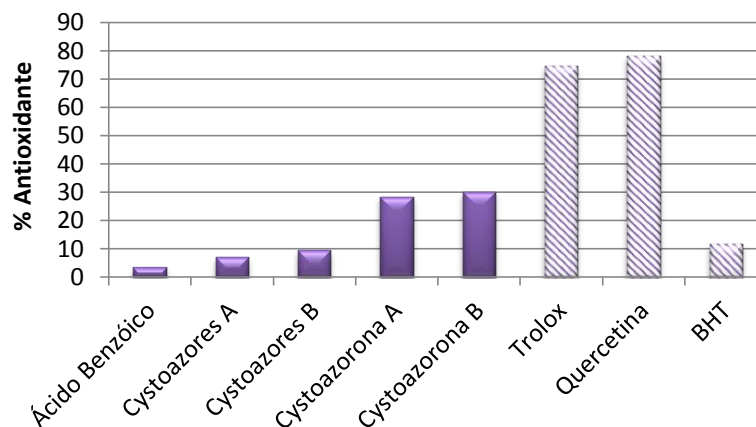


Figura 18. Actividade antioxidante dos compostos isolados de *Cystoseira abies-marina* expressa em percentagem. Como controlo para esta actividade foram utilizados os padrões (Trolox, Quercetina e BHT). A concentração utilizada neste ensaio, quer para os compostos quer para os padrões, foi de 500 $\mu\text{g/mL}$.

2.2.3 Actividade anticolinesterásica

Neste ensaio, foram utilizadas duas concentrações (125 $\mu\text{g/mL}$ e 62,5 $\mu\text{g/mL}$), o α -pineno foi utilizado como padrão para a inibição da enzima acetilcolinesterase. Não foi possível determinar o IC_{50} (concentração que provoca 50 % de inibição), pois nenhum dos compostos testados conseguiu atingir 50 % de actividade inibitória para as concentrações testadas, portanto, os resultados foram expressos em percentagem de inibição a estas duas concentrações. Como se pode verificar na figura 16, os compostos que apresentam maior actividade de inibição são o cystoazores A (composto **B**) e o cystoazores B (compostos **C**), com 37,2 e 38,1 %, respectivamente, na concentração mais elevada. Tendo em conta que o valor do α -pineno nesta mesma concentração é de 49,5 %, pode dizer-se que estes dois compostos são promissores como inibidores da acetilcolinesterase. Com actividade moderada apresentam-se os restantes compostos testados, o cystoazorona A (26%), o cystoazorona B (20,1 %) e o ácido benzóico (18,4 %) (compostos **D**, **E** e **A**, respectivamente)

na concentração mais elevada. Ainda na figura 19, podemos também verificar que a percentagem de inibição é dependente da concentração.

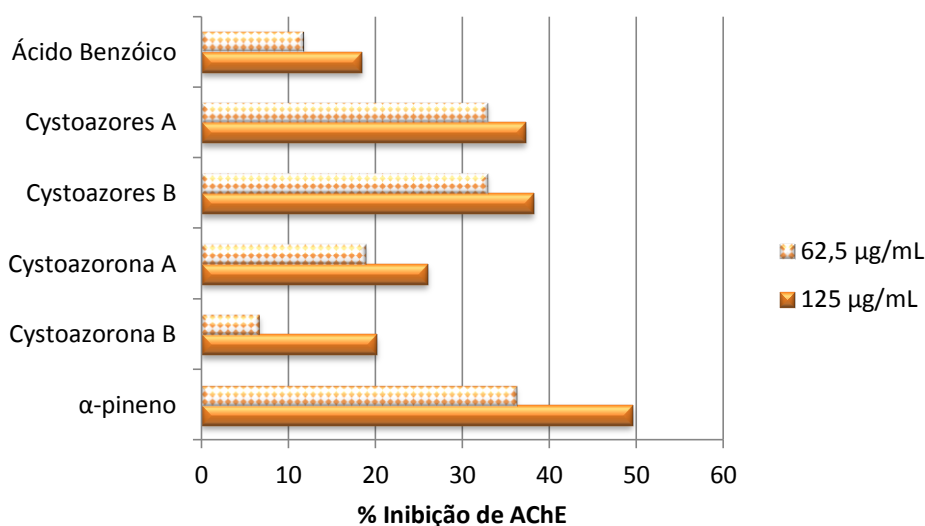


Figura 19. Efeito anticolinesterásico dos compostos isolados de *Cystoseira abies-marina* expressa em percentagem. O α-pineno foi utilizado como controlo para esta actividade.

2.2.4 Actividade anti-inflamatória

2.2.4.1 COX-1 e COX-2

Os anti-inflamatórios não esteróides têm como mecanismo a inibição da actividade das cicloxigenases, impedindo assim a síntese de eicosanoides pela via metabólica da cascata do ácido araquidónico, o que faz parte do processo inflamatório. A cicloxigenase tem duas isoformas, uma constitutiva, a COX-1 e outra induzida pelo processo inflamatório, a COX-2. São preferíveis os medicamentos que actuem como inibidores selectivos da COX-2, uma vez que a COX-1 é responsável por funções fisiológicas importantes (Botting, 2006). Dos resultados obtidos (figura 20), pode-se verificar que, no que respeita à inibição da COX-1, o ácido benzóico, o cystoazorona A e o cystoazorona B (compostos **A**, **D** e **E**, respectivamente) foram os compostos que apresentaram ser inibitórios deste enzima, o que se poderá

traduzir em efeitos secundários negativos, ao inibir a formação de prostaglandinas de importância fisiológica. Em oposição a estes estão os compostos cystoazores A e cystoazores B (compostos **B** e **C**) que estimularam a actividade deste enzima. No que diz respeito à COX-2 o ácido benzóico, o cystoazores B e o cystoazorona B (compostos **A**, **C** e **E**, repectivamente) foram os compostos que mostraram elevada inibição, seguindo-se o cystoazores A (composto **B**) com uma inibição moderada deste enzima e por último, o cystoazorona A (composto **D**) foi o único composto que mostrou ter um comportamento diferente, ou seja, com uma actividade bastante elevada, mas como pró-inflamatório. Os compostos que parecem ter características mais positivas como anti-inflamatórios são o cystoazores A e cystoazores B, uma vez que se comportam como inibidores selectivos da COX-2, tendo conhecimento de que estas substâncias apresentam um menor risco de toxicidade intestinal quando comparados com os AINEs tradicionais (Charlier & Michaux, 2003).

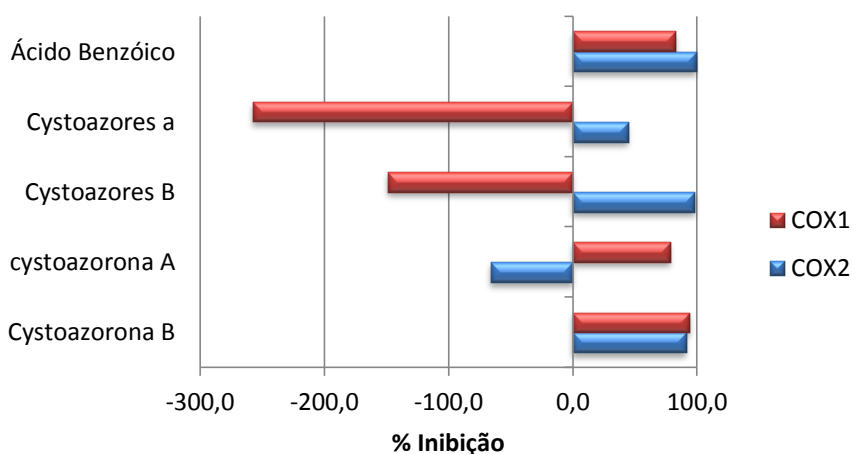


Figura 20. Actividade anti-inflamatória por inibição da cicloxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) dos compostos isolados de *Cystoseira abies-marina* com concentração de 100 µg/mL, expressa em percentagem.

2.2.4.2 LOX

Os inibidores da lipoxigenase 15-LOX podem ter um papel importante na terapêutica de alguns processos patológicos que envolvem inflamação, como a aterosclerose (Walther *et al.*, 1999) Dos resultados obtidos pelo ensaio da 15-LOX, (figura 21) pode-se verificar que apenas o cystoazorona A (composto **D**) possui alguma actividade contra este enzima (cerca de 35,5 % de actividade numa concentração de 50 µg/mL), embora o cystoazores A (composto **B**) também tenha exibido alguma actividade mas com uma percentagem muito mais baixa (3,6 %, numa concentração de 100 µg/mL). A figura 21 permite verificar que a diferentes concentrações, o comportamento dos compostos testados diferem, sendo que, podem funcionar como anti-inflamatórios (nos dois casos referidos acima), e como pró-inflamatórios (os restantes casos).

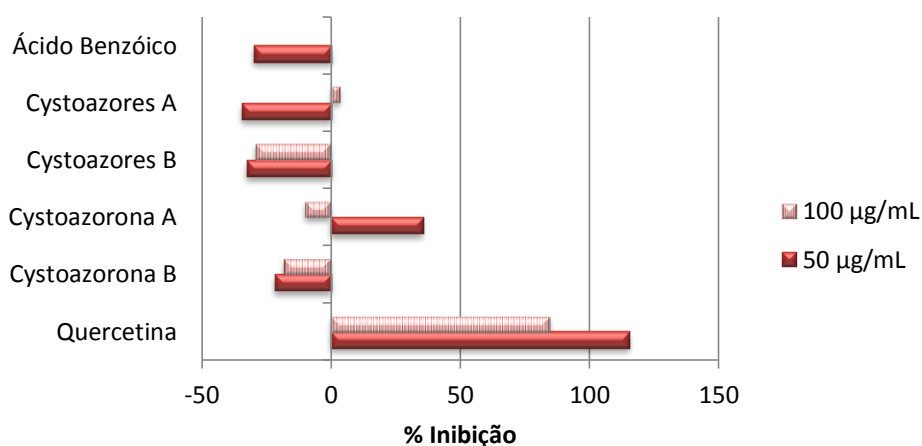


Figura 21. Actividade anti-inflamatória por inibição da lipoxigenase dos compostos isolados de *Cystoseira abies-marina*, expressa em percentagem. Nesta actividade foi utilizado como solução padrão a quercetina.

Estes compostos não parecem, assim, ser candidatos a uma terapia de inibição dupla COX-2/15-LOX, que lhes conferiria potencialidades no tratamento de diversas doenças crónicas com um componente inflamatório, como o cancro e a aterosclerose.

2.3 Discussão dos resultados das actividades biológicas

As algas castanhas têm mostrado uma enorme capacidade de produzir metabolitos secundários muito diferentes no que diz respeito à sua estrutura química e à sua funcionalidade.

Em estudos anteriores da espécie *Cystoseira abies-marina*, um extracto de diclorometano demonstrou actividade de inibição do crescimento contra a linhagem celular HeLa (Barreto *et al.* 2012). Outros estudos revelaram que extractos de acetato de etilo e de clorofórmio de *Cystoseira crinita* (Mhadhebi *et al.*, 2011a) e *Cystoseira sedoides* (Mhadhebi *et al.*, 2011b) apresentavam um poder antiproliferativo elevado. Há também algumas referências a compostos com propriedades antitumorais isolados de algas deste género. Segundo Norte *et al.*, (1993) o meroditerpeno claraenona, isolado de *Cystoseira sp.*, demonstrou ter actividade antitumoral contra a linhagem celular tumoral P-388. Os compostos cystoazorona A e cystoazorona B (compostos **D** e **E**) isolados no presente trabalho pertencem à mesma família, sendo que o cystoazorona A foi o que se mostrou mais activo na inibição e citotoxicidade contra as células tumorais HeLa, apresentando, no entanto, uma menor selectividade entre as linhagens HeLa e Vero do que a referida por Barreto *et al.* (2012) para o extracto de diclorometano de *Cystoseira abies-marina*. Outras famílias de compostos do género *Cystoseira* também exibiram actividade antitumoral, como por exemplo: o mediterraneol extraído de *Cystoseira mediterranea* que possui uma capacidade inibitória da divisão celular (Francisco *et al.* 1985a); os meroditerpenos: usneoidona E, usneoidona Z, usneoidol E e usneoidol Z de *Cystoseira usneoides*, sendo que os dois primeiros foram testados contra as linhagens celulares P-388, A-549, HeLa e B-16, e os restantes dois testados contra a linhagem P-388, mostrando-se activos (Urones *et al.*, 1992a; Urones *et al.*, 1992b); e ainda cinco compostos derivados de tetraprenil-toluquinol

que apresentaram uma actividade moderada no seu efeito citotóxico contra as linhagens celulares tumorais HM02, HepG2 e MCF-7 (Fischet *et al.*, 2003). As algas do género *Cystoseira* parecem assim ter potencial na pesquisa de substâncias com actividade antitumoral, estando ainda em curso a continuação da caracterização fitoquímica de *Cystoseira abies-marina*, que poderá resultar na identificação de outros compostos com elevada actividade.

As algas marinhas podem ser uma importante fonte de substâncias naturais antioxidantes (Rocha *et al.*, 2007). Mhadhebi *et al.* (2011a), relata no seu estudo, compostos que foram identificados como antioxidantes, como por exemplo enzimas protectoras (Nakano *et al.*, 1995), o ácido ascórbico (Morgan *et al.*, 1980), antioxidantes lipofílicos (Takamatsu *et al.* 2003), os florotaninos (Jimenez-Escriget *et al.*, 2001) e as catequinas (Yoshie *et al.*, 2000). Segundo Rocha *et al.* (2007), meroditerpenos isolados de algas do mar Mediterrâneo do género *Cystoseira* são análogos aos tocoferóis e, portanto, com potencial para uma boa actividade antioxidante. Como tal, fizeram uma avaliação das propriedades dessas substâncias como quelantes de $^1\text{O}_2$ através de vários testes, nos quais se mostraram activos (Foti *et al.*, 1994). Ruberto *et al.* (2001), descreve no seu estudo que extractos lipídicos de oito espécies do género *Cystoseira*, no que diz respeito ao seu poder antioxidante, apresentam um potencial diferenciado entre as espécies de acordo com o conteúdo em tetraprenilquinóis, sendo que quanto mais rica é a espécie em tetraprenilquinóis, maior o seu poder antioxidante. Extractos de acetato de etilo e de clorofórmio de *Cystoseira crinita* e de *Cystoseira sedoides* possuem uma elevada actividade antioxidante no método DPPH (Mhadhebi *et al.*, 2011a; Mhadhebi *et al.*, 2011b). Assim como, Fisch *et al.* (2003), verificou o poder antioxidante dos 5 compostos derivados de tetraprenil-toluquinóis já referidos anteriormente com actividade antitumoral, concluindo que todos eles possuíam elevada actividade antioxidante (quando comparados com BHT e α -

tocoferol). No estudo de Zubia *et al.* (2009), um extracto da *Cystoseira tamariscifolia* foi classificado como sendo um potencial antioxidante, com valores semelhantes ao α -tocoferol (composto usado como referência). Como já foi referido, os compostos cystoazores A e cystoazores B (compostos **B** e **C**) foram aqueles que apresentaram uma actividade antioxidante mais elevada de entre os testados neste trabalho. Comparando com o estudo preliminar a este, em que a actividade antioxidante de *Cystoseira abies-marina* era superior quer na fracção de hexano do extracto metanólico quer no extracto de diclorometano (Barreto *et al.*, 2012), ($EC_{50} = 137,2 \pm 8,26$ e 329.5 ± 18.61 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), pode-se concluir que muito provavelmente os compostos responsáveis por essa actividade podem ser os que foram isolados neste estudo, uma vez que estes compostos estão distribuídos nos vários extractos fraccionados vindo da colecção de Outono e Inverno.

Apenas alguns trabalhos têm sido relatados sobre as actividades da acetilcolinesterase, no que respeita à sua inibição usando algas. Recentemente, Ghannadi *et al.* (2013), estudou 11 algas, nas quais duas delas pertenciam à família *Cystoseira*, (*Cystoseira indica* e a *Cystoseira merica*), que mostraram uma actividade moderada na inibição da enzima acetilcolinesterase. Sabe-se que as principais classes de compostos descritos como possuindo actividade acetilcolinesterásica são os alcalóides, glicosídeos e terpenos (Ghannadi *et al.*, 2013). No entanto, o facto de algas deste género serem activamente evitadas pelos predadores (Granado e Caballero, 2001), aponta para a probabilidade de existirem compostos com esta característica, uma vez que um dos mecanismos de defesa anti-predação consiste em sintetizar compostos que paralisam os predadores por inibição deste enzima.

A inibição da produção de prostaglandinas pela via da COX permite uma diminuição da resposta inflamatória em doenças crónicas como cancro, asma, artrite reumatóide e nas

doenças auto-imunes (Harizi *et al.*, 2008; Masresha *et al.*, 2012). Já a inibição da produção de hidroperóxidos pela via da 15-LOX promove uma redução da acumulação celular de lípidos e das citocinas pró-inflamatórias na aterosclerose (Walther *et al.*, 1999). Portanto, a inibição da biossíntese destes mediadores inflamatórios pelo bloqueio das enzimas COX e LOX poderá representar uma importante alternativa no tratamento de muitos estados patológicos que têm por base uma resposta inflamatória. A inibição preferencial da COX-2 sobre a COX-1 aliada à inibição da 15-LOX é de interesse actual no desenvolvimento de novos agentes anti-inflamatórios (Charlier & Michaux, 2003; Reddy *et al.*, 2008). Embora os estudos referentes ao género *Cystoseira* sobre o seu poder anti-inflamatório sejam muito poucos, Mahdhebi *et al.*, (2011a) relata na sua investigação que extractos de acetato de etilo, clorofórmio e metanol de *Cystoseira crinita* revelaram ser muito promissores, assim como as fracções de clorofórmio e acetato de etilo da *Cystoseira sedoides*, que também mostraram ser uma potencial fonte de compostos naturais com actividade anti-inflamatória (Mhadhebi *et al.*, 2011b).

2.4 Conclusões e perspectivas futuras

O estudo fitoquímico da macroalga *Cystoseira abies-marina* (que ainda está muito no início) permitiu isolar e caracterizar completamente 5 compostos (o ácido benzóico, 2 derivados acíclicos de norsesquiterpenos com um substituinte tipo toluquinol e 2 derivados de diterpenos acíclicos também com substituinte tipo toluquinol). O mais extraordinário é, em 5 compostos isolados, 4 deles serem compostos naturais com estruturas químicas nunca antes identificadas, confirmando o enorme potencial desta alga.

Dos cinco compostos isolados desta alga, verifica-se que o composto cystoazorona A é um composto bastante activo no que respeita a actividade antitumoral. Já na actividade antioxidante os compostos que se realçaram com maior poder antioxidante foram o cystoazorona A e o cystoazorona B. No que respeita ao poder inibitório do enzima acetilcolinesterase, o cystoazores A e cystoazores B foram compostos os mais activos. Quanto aos anti-inflamatórios concluímos que a dose aplicada pode variar o efeito, isto é, ou os compostos se comportam como anti-inflamatórios ou como pró-inflamatórios. No geral, como anti-inflamatório apresentaram maior actividade o ácido benzóico, o cystoazorona A e o cystoazorona B.

Este foi apenas um estudo ainda muito preliminar, no que diz respeito à quantidade de compostos naturais que esta alga marinha consegue sintetizar.

Em conclusão, poderá dizer-se que a macroalga *Cystoseira abies-marina* tem potencial como fonte de novos compostos naturais bioactivos com aplicações farmacológicas diversificadas.

Futuramente, pretende-se continuar a pesquisa de mais compostos, quer dentro desta espécie quer noutras que sejam abundantes nos Açores, como *Fucus spiralis*, bem como alargar o *screening* das actividades como por exemplo, testar os compostos com mais

Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*

actividade antitumoral e através da técnica de microscopia de fluorescência, utilizando corantes vitais (Hoechst, Dapi, BCECF, anexina V, Iodeto de propídio) perceber de que forma este compostos afectam as células (necrose ou apoptose) bem como através de testes de via das caspases, verificar de que forma ou por que via este composto poderá provocar morte celular nas células.

Tão importante como determinar a forma de acção destes compostos, é também importante a realização de mais estudos para se poder estabelecer uma relação estrutura / actividade do composto.

Também se pretende, realizar testes antimicrobianos, com bactérias gram positivas e gram negativas, a fim de encontrar algum composto que seja capaz de inibir o crescimento bacteriano ou capaz de actuar como antibiótico (ou seja, capacidade que o composto pode ter em interagir com estes microorganismos matando-os ou inibindo o seu metabolismo e/ou mecanismo de reprodução).

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3. Parte experimental

3.1 Condições experimentais usados no isolamento dos compostos A-E

3.1.1 Solventes utilizados

Os solventes (diclorometano e metanol) utilizados na obtenção dos extractos eram analiticamente puros. Os solventes utilizados no fraccionamento dos extractos, quer por partição líquido/líquido quer por cromatografia, eram bidestilados (n-hexano, diclorometano, clorofórmio, acetona e metanol) sendo que os restantes foram solventes puros. O solvente usado no registo dos espectros de RMN foi o clorofórmio deuterado (CDCl_3) com 0,03% de TMS.

3.1.2 Tipos de sílica usados nas cromatografias

Os sistemas de eluentes usados nos fraccionamentos por cromatografia preparativa, foram otimizados usando cromatografia em camada fina analítica, em folhas plastificadas revestidas de sílica gel com indicador 60 GF₂₅₄ da Merck.

Nas purificações por cromatografia de camada fina preparativa foram utilizadas placas de vidro, (20x20 cm), previamente revestidas com uma camada de sílica gel 60 GF₂₅₄ da Fluka, com espessura de 500 μm e activadas a 110 °C durante 12 horas. A localização das manchas correspondentes à presença de compostos nas placas foi conseguida por observação das mesmas à luz ultravioleta a 254 e/ou 365 nm.

Os fraccionamentos por cromatografia preparativa em coluna foram efectuados usando como fase estacionária sílica gel 60, 230-400 Mesh da Acne Synthetic Chemicals.

3.1.3 Equipamento usado

a) Espectro de RMN

Os espectros de RMN de 1D (^1H e de ^{13}C) e 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY) foram obtidos num aparelho Bruker Avance 300 operando a uma frequência de ressonância de próton de 300,13 MHz e 75,47 MHz para ^{13}C). Os desvios químicos são expressos em δ (ppm) relativamente ao tetrametilsilano (TMS) usado como padrão interno. As constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hz.

O espectro de massa foi obtido num espectrómetro de massa Q-TOF2, por electrospray em modo positivo (ESI (+)), operando com o cone a 30 V.

3.1.4 Análise da Amostra

a) Recolha da amostra

A *Cystoseira abies-marina* foi colhida em dois períodos, no Outono de 2010 (entre Outubro e Novembro de 2010), e na Primavera de 2011 (entre Março e Maio de 2011) nos Mosteiros, Ilha de S. Miguel.

Os vouchers foram identificados pela Doutora Ana Neto da Universidade dos Açores e depositados no Herbário Ruy Telles Palhinha, com a referência SMG-10-54 para a colheita de Outono e SMG-11-34 para a colheita da Primavera.

b) Obtenção dos extractos

O material vegetal recolhido foi limpo, lavado com água destilada, caracterizado morfológicamente e devidamente acondicionado a -80°C . O material vegetal fresco (massas de material usados indicados na tabela 2), recolhido em Outono 2010 e Primavera 2011 foi

Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*

separadamente submetido a extracções sequenciais (2 ciclos de durante 12 h, com renovação de solvente no 2º ciclo), primeiro com metanol e depois com diclorometano, à temperatura ambiente com agitação, usando uma razão alga fresca/solvente de 1:4 (g/mL). Cada extracto foi evaporado à secura a pressão reduzida a uma temperatura de 40°C, tendo-se obtido as massas de extracto apresentadas na tabela 2.

Tabela. 2: Rendimentos das extracções relativos à alga *Cystoseira abies-marina* nas colheitas de Outono e Primavera.

Alga	Estação	Solvente	Massa alga usado na extracção (g)	Massa de extracto obtido (g)
<i>Cystoseira abies-marina</i>	Outono 2010	MeOH	2915,8	125,81
		DCM		4,75
	Primavera 2011	MeOH	4330,0	197,38
		DCM		5,21

Os extractos de metanol de *Cystoseira abies-marina* de cada uma das colheitas, foram separadamente fraccionados por partição líquido/líquido, cromatografia em coluna (cc) e cromatografia em camada fina preparativa (tlc) conforme esquemas abaixo.

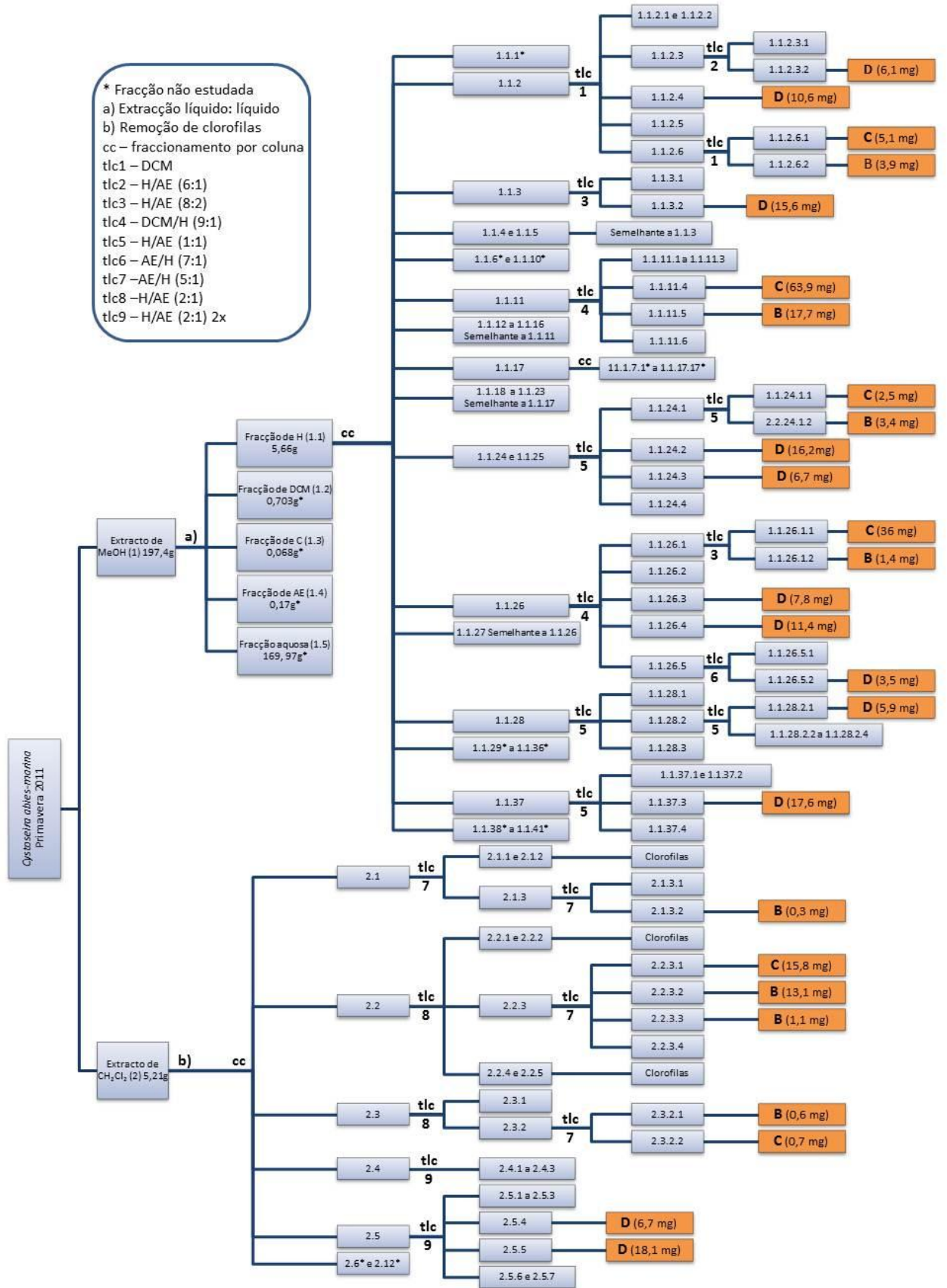
No que diz respeito ao extracto de diclorometano antes do fraccionamento cromatográfico, o extracto foi submetido a um procedimento para remoção de clorofilas descrito na literatura (Kijjoa *et al.*, 2002). O extracto foi dissolvido em etanol (750 mL), sendo posteriormente adicionada à solução aquosa acetato de chumbo (28 mg) e ácido acético glacial (8 mL). Toda esta solução permaneceu no escuro durante 48h. A solução foi filtrada e concentrada a pressão reduzida, para remover o etanol presente. Após a eliminação do etanol, extraiu-se com clorofórmio (4x300 mL), passou-se o extracto por sulfato de sódio

Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*

anidro e foi posteriormente evaporado até a secura para posterior fraccionamento cromatográfico segundo o esquema abaixo.

Por uma questão de espaço os solventes usados são indicados de forma abreviada. Assim, A significa acetona; DCM- diclorometano; AE- acetato de etilo; H- hexano; M- metanol; C- clorofórmio.

Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*



3.1.5 Dados espectroscópicos dos compostos isolados de *Cystoseira abies-marina*

Composto A: Ácido benzóico

RMN de ¹H: 7,47 (2H, *m*, H-3, H-5); 7,61, (1H, *tt*, *J*= 1,5; 7,5 Hz, H-4); 8,12 (2H, *dd*, *J*= 1,5; 8,3 Hz, H-2, H-6).

RMN de ¹³C: 128,5 (C-3, C-5); 129,3 (C-1); 130,2 (C-2, C-6); 133,7 (C-4); 171,5 (COOH).

EM (TOF MS ESI+): *m/z*: 145 [M+Na]⁺

Composto B: Cystoazores A

RMN de ¹H: 1,75 (3H, *s* largo, 10-CH₃); 1,76 (2H, *m*, H-4); 2,12 (2H, *m*, H-5); 2,12 (3H, *s* largo, 6-CH₃); 2,13 (3H, *s*, H-1); 2,28 (3H, *s*, 3'-CH₃); 2,41 (2H, *t*, *J*= 7,3 Hz, H-3); 3,11 (2H, *s*, H-9); 3,40 (2H, *d*, *J*= 7,2 Hz, H-12); 3,68 (3H, *s*, 2'-OCH₃); 3,75 (3H, *s*, 5'-OCH₃); 5,45 (1H, *dt*, *J*= 1,2; 7,2 Hz, H-11); 6,10 (1H, *d*, *J*= 1,1 Hz, H-7); 6,57 (2H, *s*, H-4', H-6').

RMN de ¹³C: 16,4 (3'-CH₃); 16,5 (10-CH₃); 19,1 (6-CH₃); 21,2 (C-4); 28,5 (C-12); 30,0 (C-1); 40,2 (C-5); 42,6 (C-3); 55,4 (C-9, 5'-OCH₃); 60,5 (2'-OCH₃); 112,7 (C-6'); 113,7 (C-4'); 122,7 (C-7); 127,7 (C-11); 130,7 (C-10); 131,8 (C-3'); 134,7 (C-1'); 150,3 (C-2'); 155,5 (C-5'); 158,1 (C-6); 199,2 (C-8); 208,2 (C-2).

EM (TOF MS ESI+): *m/z*: 395 [M+Na]⁺

Composto C: Cystoazores B

RMN de ^1H : 1,73 (3H, s largo, 10- $\underline{\text{CH}}_3$); 1,73 (2H, m, H-4); 2,56 (2H, m, H-5); 1,87 (3H, d, $J= 1,2$ Hz, 6- $\underline{\text{CH}}_3$); 2,13 (3H, s, H-1); 2,28 (3H, s, 3'- $\underline{\text{CH}}_3$); 2,48 (2H, t, $J= 7,4$ Hz, H-3); 3,09 (2H, s, H-9); 3,40 (2H, d largo, $J= 7,2$ Hz, H-12); 3,68 (3H, s, 2'- $\underline{\text{OCH}}_3$); 3,75 (3H, s, 5'- $\underline{\text{OCH}}_3$); 5,43 (1H, dt, $J= 1,2; 7,2$ Hz, H-11); 6,13 (1H, d, $J= 1,2$ Hz, H-7); 6,57 (2H, s, H-4', H-6').

RMN de ^{13}C : 16,4 (3'- $\underline{\text{CH}}_3$); 16,5 (10- $\underline{\text{CH}}_3$); 22,0 (C-4); 28,5 (C-12); 29,9 (C-1); 32,8 (C-5); 43,2 (C-3); 55,4 (C-9, 5'- $\underline{\text{OCH}}_3$); 60,4 (2'- $\underline{\text{OCH}}_3$); 112,7 (C-6'); 113,7 (C-4'); 123,3 (C-7); 127,8 (C-11); 130,7 (C-10); 131,8 (C-3'); 134,6 (C-1'); 150,3 (C-2'); 155,5 (C-5'); 159,2 (C-6); 198,8 (C-8); 208,9 (C-2).

EM (TOF MS ESI+): m/z : 395 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Composto D: cystoazorona A

RMN de ^1H : 1,15 (3H, s, H-16); 1,20 (3H, s, 15- $\underline{\text{CH}}_3$); 1,39 (2H, m, H-13); 1,61 (3H, d, $J= 0,8$ Hz, 11- $\underline{\text{CH}}_3$); 2,06 (1H, m, H-12); 2,12 (3H, d, $J= 1,1$ Hz, H-7); 2,15 (2H, s, H-8); 2,16 (2H, m, H-9); 2,22 (1H, m, H-12); 1,75 (3H, d, $J= 1,3$ Hz, 3- $\underline{\text{CH}}_3$); 2,28 (3H, s, 3'- $\underline{\text{CH}}_3$); 3,11 (2H, s, H-4); 3,31 (1H, dd, $J= 1,8$ e $8,6$ Hz, H-14); 3,41 (2H, d largo, $J= 7,2$ Hz, H-1); 3,68 (3H, s, 2'- $\underline{\text{OCH}}_3$); 3,74 (3H, s, 5'- $\underline{\text{OCH}}_3$); 5,13 (1H, m, H-10); 5,43 (1H, dt, $J= 7,2$ e $1,3$ Hz, H-2); 6,11 (1H, s largo, H-6); 6,57 (2H, s, H-4', H-6').

RMN de ^{13}C : 15,9 (11- $\underline{\text{CH}}_3$); 16,4 (3'- $\underline{\text{CH}}_3$); 16,5 (3- $\underline{\text{CH}}_3$); 19,3 (7- $\underline{\text{CH}}_3$); 23,1 (C-16); 25,9 (C-9); 26,4 (15- $\underline{\text{CH}}_3$); 28,5 (C-1); 29,6 (C-13); 36,7 (C-12); 41,1 (C-8); 55,4 (5'- $\underline{\text{OCH}}_3$, C-4); 60,5 (2'- $\underline{\text{OCH}}_3$); 73,0 (C-15); 78,0 (C-14); 112,7 (C-6'); 113,7 (C-4'); 122,5 (C-6); 123,7 (C-10); 127,7 (C-2); 130,8 (C-3); 131,8 (C-3'); 134,7 (C-1'); 135,8 (C-11); 150,3 (C-2'); 155,5 (C-5'); 158,9 (C-7); 199,5 (C-5);

EM (TOF MS ESI+): m/z : 495 [M+Na]⁺

Composto E: cystoazorona B

RMN de ¹H: 1,16 (3H, *s*, H-16*); 1,19 (3H, *s*, 15-CH₃*); 1,67 (2H, *m*, H-13); 1,59 (3H, *s*, 11-CH₃); 1,74 (3H, *s*, 3-CH₃); 2,11 (3H, *d*, $J= 1,1$ Hz, 7-CH₃); 2,20 (2H, *s*, H-8); 2,20 (2H, *m*, H-9); 2,28 (3H, *s*, 3'-CH₃); 3,12 (2H, *s*, H-4); 3,40 (2H, *d*, $J= 7,6$ Hz, H-1); 3,62 (1H, *m*, H-14); 3,68 (3H, *s*, 2'-OCH₃); 3,74 (3H, *s*, 5'-OCH₃); 4,30 (1H, *t*, $J= 4,9$ Hz, H-12); 5,43 (1H, *t*, $J= 7,6$ Hz, H-2); 5,44 (1H, *m*, H-10); 6,12 (1H, *s*, H-6); 6,57 (2H, *s*, H-4', H-6').* Estes assinalamentos podem estar trocados.

RMN de ¹³C: 12,9 (11-CH₃); 16,4 (3'-CH₃); 16,5 (3-CH₃); 19,3 (7-CH₃); 23,3 (16-CH₃*); 25,5 (C-9); 26,4 (15-CH₃*); 28,5 (C-1); 35,2 (C-13); 40,7 (C-8); 55,3 (C-4); 55,4 (5'-OCH₃); 60,5 (2'-OCH₃); 72,7 (C-15); 74,2 (C-12); 75,0 (C-14); 112,7 (C-6'); 113,7 (C-4'); 122,8 (C-6); 123,5 (C-10); 127,7 (C-2); 131,8 (C-3 e C-3'); 134,7 (C-1'); 137,7 (C-11); 150,3 (C-2'); 155,5 (C-5'); 158,5 (C-7); 199,7 (C-5).)* Estes assinalamentos podem estar trocados

EM (TOF MS ESI+): m/z : 511 [M+Na]⁺

3.2 Determinação das actividades biológicas dos compostos A-E

3.2.1 Actividade antitumoral

3.2.1.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas duas linhagens celulares, uma tumoral e outra não tumoral que serviu de controlo. A linhagem tumoral HeLa foi imortalizada a partir de células humanas de cancro do colo do útero (ECACC, European Collection of cell Cultures). A linhagem não tumoral Vero foi estabelecida em 1962 a partir de células isoladas de rim de macaco verde africano, da espécie *Cercopithecus aethiops* (Linnaeus, 1758), por Yasumura (ECACC).

3.2.1.2 Cultura de células

Ambas as linhagens foram cultivadas em monocamada, com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com estreptomicina (750 U/mL)/penicilina (1000 U/mL), L-glutamina (2 mM) e ácido *p*-hidroxibenzóico (2×10^4 mg/mL). As células foram mantidas em meio com soro fetal de bovino (FBS) numa incubadora (SANYO CO₂ Incubator) a 37 °C, 5 % de CO₂ e 80 % de humidade relativa (Moujir *et al.* 2012).

3.2.1.3 Ensaio antitumorais

Os ensaios foram realizados em microplacas ELISA de 96 poços. Realizaram-se dois tipos de ensaio, (i) de inibição de crescimento (fase lag) e (ii) de citotoxicidade (fase log). No primeiro tipo de ensaio as células são adicionadas às microplacas junto com os compostos a testar, de modo a que estas estejam sujeitas à acção dos compostos durante a fase inicial de adesão ao substrato. No segundo, os compostos são adicionados às microplacas após 24h de crescimento das células, encontrando-se estas já na fase de crescimento exponencial. O

meio utilizado foi DMEM com 2 % de FBS, tendo sido os compostos diluídos nesse mesmo meio, nas concentrações apropriadas, ficando em contacto com as células durante 48h (Moujir *et al.* 2012).

3.2.1.4 Revelação dos resultados

Para a revelação dos resultados foi utilizado o MTT (3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium). Este método avalia a actividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, resultando na produção de cristais de formazano, intensamente coloridos de roxo, no interior das células. Estes cristais podem ser observados ao microscópio ou dissolvidos em solventes orgânicos, como por exemplo o DMSO, permitindo a sua quantificação através da espectrofotometria. É de referir, no entanto, que esta redução apenas toma lugar quando as enzimas redutases mitocondriais estão activas (figura 22), pelo que é proporcional à quantidade de células vivas (Moujir *et al.*, 2012).

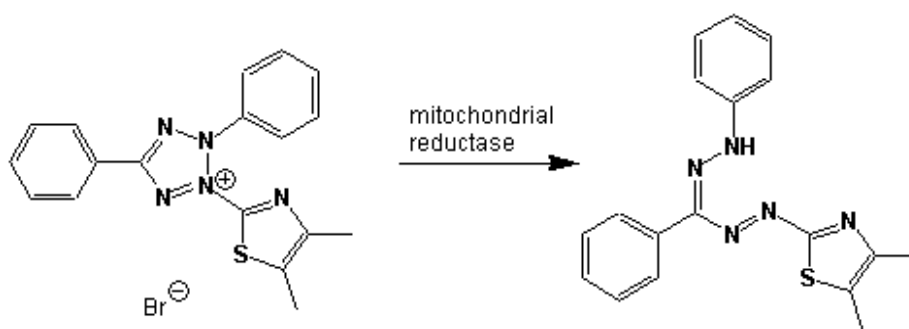


Figura 22. MTT (3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium).

3.2.1.5 Determinação de EC₅₀

O EC₅₀ (µg/ml) corresponde à concentração de produto que é necessária para causar 50 % de inibição de crescimento das células, utilizando-se como referência as células controlo em cada microplaca. O valor de EC₅₀ foi calculado por interpolação da curva de inibição de crescimento em função da concentração de composto.

3.2.2 Actividade antioxidante

Na determinação da actividade antioxidante foi usado um método espectrofotométrico, modificado a partir de Blois (1958). Este método tem como fundamento avaliar a actividade de redução do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), de coloração púrpura, que absorve a 517 nm. Por acção de um antioxidante (AH), o DPPH é reduzido formando difenil-picrilhidrazina, de coloração amarela, quantificando-se a actividade antioxidante pelo decréscimo da absorvância.

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, colocando-se os compostos, em diluições seriadas, em presença de uma solução de DPPH 0,04mg/mL em metanol, utilizando-se como controlo poços da microplaca sem a presença de compostos. Ao fim de 30 minutos ao abrigo da luz, leu-se a absorvância a 517 nm e calculou-se percentagem de actividade antioxidante (AA %) usando a seguinte fórmula:

$$AA \% = 1 - (Ac - As)/Ac \times 100$$

em que Ac é a absorvância do controlo e As é a absorvância da amostra. Esta percentagem de actividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH neutralizada pelo antioxidante. Sempre que possível expressou-se a actividade em EC₅₀ correspondente à quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração do radical a 50 %

(EC₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será o seu EC₅₀ e maior a sua actividade antioxidante. Como referência foram utilizados Trolox, BHT e Quercetina (Barreto *et al.* 2012).

3.2.3 Actividade anticolinesterásica

A actividade enzimática de AChE foi avaliada pelo método colorimétrico de Ellman (1961) modificado por Arruda *et al.* (2012). Este método baseia-se na medida da velocidade da produção da tiocolina através da hidrólise do análogo do substrato de AChE, a acetilcolina. A tiocolina reage com o chamado reagente de Elman (DTNB ou Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico), formando uma mistura de dissulfetos e um anião amarelo (nitrobenzoato) com intensa absorção a 415 nm. O esquema que se segue apresenta as reacções que estão na base do método:

Acetilcolina \longrightarrow Acetato + Tiocolina

Tiocolina + DTNB \longrightarrow Anião Amarelo

Neste caso foi quantificada a inibição da acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (Sigma C2888) em presença dos compostos a testar, em microplacas de 96 poços, de acordo com o descrito em Barreto *et al.* (2012). A concentração de DMSO no meio de ensaio foi sempre inferior a 0.25%, para minimizar a interferência deste solvente com a reacção enzimática.

3.2.4 Actividade anti-inflamatória

3.2.4.1 COX

A inibição das cicloxigenases, COX-1 e COX-2, foi determinada com o kit *COX Inhibitor Screening Assay* da *Cayman Chemical Co.*, nº 560131, de acordo com o protocolo do fabricante. Neste ensaio o substrato (ácido araquidónico) liga-se à enzima COX-1 ou COX-2 que posteriormente se vai transformar em PGH₂ e por acção do cloreto de chumbo vai ser transformada em PGF_{2α}. Portanto, se o composto testado tiver a capacidade de se ligar a COX-1 ou COX-2 em vez do substrato, este não se vai formar. É a quantidade de prostaglandinas que vai ser medida, sendo que existe uma relação directamente proporcional, quanto maior a quantidade de prostaglandinas, menor absorvância, logo, menor actividade. A quantificação foi feita a uma absorvância de 415 nm (num leitor de microplacas Biorad modelo 680). O ensaio foi realizado em duplicado para todas as amostras e o efeito inibidor foi calculado como se segue:

$$\% \text{ inibição COX-1/COX-2} = ([\text{PG}_5]\text{A} - [\text{PG}_5]\text{B}) / [\text{PG}_5]\text{A} \times 100$$

Em que [PG₅]A corresponde à concentração de prostaglandinas nos tubos controlo (100% de actividade da enzima COX-1) e [PG₅]B correspondente à concentração de prostaglandinas nos tubos da amostra.

3.2.4.2 LOX

Para determinação desta actividade foi utilizado o Kit *Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay (LISA)* da *Cayman Chemical Co.*, nº 760700, e o protocolo foi realizado de acordo com o manual do fabricante. Este avalia a inibição da enzima lipoxigenase através da quantificação de hidroperóxidos produzidos pela 15-LOX a partir de um substrato (que pode ser o ácido

Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*

araquidónico ou o ácido linoleico), sendo que quanto menor a quantidade de hidroperóxido produzido, maior será a capacidade de um composto inibir a enzima lipoxigenase.

O nível de hidroperóxidos produzidos pela 15-LOX a partir do ácido araquidónico foi quantificado a uma absorvância de 490 nm (num leitor de microplacas Biorad modelo 680).

O valor de absorvância do branco foi subtraído ao valor da absorvância dos poços com 100% de actividade da enzima e dos poços com inibidores. O ensaio foi realizado em duplicado para todas as amostras e o efeito inibidor foi calculado como se segue:

$$\% \text{ inibição } 15\text{-LOX} = (A - B)/A \times 100$$

Em que A é a absorvância a 490 nm da actividade controlo da enzima LOX (100%) e B corresponde à absorvância a 490 nm da amostra.

BIBLIOGRAFIA

- Agardh, C.A. (1820 '1821'). *Species algarum rite cognitae, cum synonymis, differentiis specificis et descriptionibus succinctis. Volumen primum. Pars prima.* pp. [i-iv], [1]-168. Lundae [Lund]: ex officina Berlingiana.
- Amico, V., Neri, P., Oriente, G., Piatelli, M. (1988c). Tetraprenyltoluquinol derivatives from the brown alga *Cystoseira zosteroides*. *Phytochemistry*. **28**: 215-219.
- Amico, V. (1995). Marine Brown Algae Family Cystoseiraceae: Chemistry and Chemotaxonomy. *Phytochemistry*. **39**:1257-1279.
- Amico, V., Cunsolo, F., Neri, P., Piatelli, M., Ruberto, G. (1988a). Antimicrobial tetraprenyltoluquinol derivatives from *Cystoseira apinosa* var. *squarrosa*. *Phytochemistry*. **27**: 1327-1331.
- Amico, V., Cunsolo, F., Oriente, G., Piattelli, M. (1984c). Cystoketal, a new metabolite from the brown alga *Cystoseira balearica*. *Journal of Natural Products*. **47**: 947-952.
- Amico, V., Cunsolo, F., Piatelli, M., Ruberto, G. (1984b). Five novel tetrapreniltoluquinols from the brown alga *Cystoseira algeriensis*. *Phytochemistry*. **23**: 2017-2020.
- Amico, V., Cunsolo, F., Piatelli, M., Ruberto, G. (1985a). Tetrapreniltoluquinols from the brown alga *Cystoseira jabukae*. *Phytochemistry*. **24**: 1047-1050.
- Amico, V., Cunsolo, F., Piatelli, M., Ruberto, G. (1985b). Acyclic tetraprenyltoluquinols from *Cystoseira sauvageana* and their possible role as biogenetic precursors of the cyclic *Cystoseira* metabolites. *Phytochemistry*. **24**: 2663-2668.
- Amico, V., Cunsolo, F., Piatelli, M., Ruberto, G. (1987b). Prenylated *O*-methyltoluquinols from *Cystoseira stricta*. *Phytochemistry*. **26**: 1719-1722.

- Amico, V., Giaccone, G., Piatelli, M., Ruberto, G. (1988b). Inheritance of chemical constituents in algae: tetraprenyltoluquinols of *Cystoseira elegans* x *C. algeriensis*. *Phytochemistry*. **27**: 1069-1071.
- Amico, V., Neri, P., Piatelli, M., Ruberto, G. (1987c). Linear diterpenoids from *Cystoseira balearica*. *Phytochemistry*. **26**: 2637-2639.
- Amico, V., Oriente, G., Neri, P., Piatelli, M., Ruberto, G. (1987a). Tetraprenyltoluquinols from the brown alga *Cystoseira stricta*. *Phytochemistry*. **26**: 1715-1718.
- Amico, V., Oriente, G., Piattelli, M., Ruberto, G. (1984a). Cystalgerone, a novel metabolite from the brown alga *Cystoseira-algeriensis*. *Gazzetta Chimica Italiana*. **114**: 169-172.
- Arruda, M., Viana, H., Rainha, N., Neng, N. R., Rosa, J. S., Nogueira, J. M. F., Barreto, M. C. (2012). Anti-acetylcholinesterase and antioxidant activity of essential oils from *Hedychium gardnerianum* Sheppard ex Ker-Gawl. *Molecules*. **17**: 3082-3092.
- Badisa, R. B., Darling-Reed, S. F., Joseph, P., Cooperwood, J. S., Latinwo, L. M., and Goodmen, C. B. (2009). Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 Cells. *Anticancer Research*. **29**: 2993-2996.
- Banaigs, B., Francisco, C., Gonzalez, E. (1983). Diterpenoid metabolites from the marine alga *Cystoseira elegans*. *Tetrahedron Letters*. **39**: 629-638.
- Banaigs, B., Francisco, C., Gonzalez, E., Codomier, L., Fenical, W. (1982). Hydroxylated diterpenoid-hydroquinones from *Cystoseira elegans*: significant products or artifacts? *Tetrahedron Letters*. **23**: 3271-3272.
- Barreto, M. C. & Simões, N. (eds.) (2012). Determination of biological activities. A laboratory manual. Universidade dos Açores, Ponta Delgada.

Avaliação do potencial farmacológico de metabolitos secundários de *Cystoseira abies-marina*

- Barreto, M. C., Arruda, M., Rego, E., Gouveia, V., Medeiros, J., Rainha N. (2012). Cell-free assays. *In*: Barreto, M. C. & Simões, N. (eds.) (2012). Determination of biological activities. A laboratory manual, pp. 65-81. Universidade dos Açores, Ponta Delgada.
- Barreto, M. C., Mendonça, E., Gouveia, V., Anjos, C., Medeiros, J., Seca, A., Neto, A. (2012). Macroalgae from S. Miguel Island as a potential source of antiproliferative and antioxidant products *Arquipélago. In Press*
- Bennamara, A., Abourriche, A., Berrada, M., Charrouf, M., Chaib, N., Boudouma, M., Garneau, F. (1999). Methoxybifurcarenone: na antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. *Phytochemistry*. **52**: 37-40.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. **181**: 1199-1200.
- Bock, J., Szabó, I., Jekle, A., and Gulbins, E. (2002). Actinomycin D-induced apoptosis involves the potassium channel Kv1.3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **295**:526–531.
- Botting, R. M. (2006). Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *Journal of Physiology and Pharmacology*. **57**: 113-124.
- Burtin, P. (2003). Nutritional value of seaweeds. *Electronic Journal of Environmental, Agriculture and Food Chemistry*. **2**: 498-503.
- Cérantola, S., Breton, F., Gall, E., and Deslandes, E. (2006). Co-occurrence and antioxidant activities of fucol and fucophlorethol classes of polymeric phenols in *Fucus spiralis*. *Botanica Marina*. **49**: 347-351.

- Charlier, C., and Michaux, C. (2003). Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *European Journal of Medical Chemistry*. **38**: 645-659.
- Della Pietá, F., Bilia, A. B., Breschi, M. C., Cinelli, F., Morelli, I., Scatizzi, R. (1993). Crude extracts and two linear diterpenes from *Cystoseira balearica* and their activity. *Planta Medica*. **59**: 135-138.
- Della Pietá, F., Breschi, M. C., Scatizzi, R., Cinelli, F. (1995). Relaxing activity of two linear diterpenes from *Cystoseira brachycarpa* var. *balearica* on the contractions of intestinal preparations. *Planta Medica*. **61**: 493-496.
- El-Bahrawy, M. A., and Pignatelli, M. (1998). E-Cadherin and catenins: molecules with versatile roles in normal and neoplastic epithelial cell biology. *Microscopy Research and Technique* **43**:224–232.
- Elman, G. L., Lourtney, D. K., Andres, V., Gmelin, G. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. **7**: 88-95.
- Fadli, M., Aracil, M., Jeanty, G., Banaigs, B., Francisco, C. (1991b). Novel meroterpenoidis from *Cystoseira mediterranea*: use of the crown-gall bioassay as a primary screen for lipophilic antineoplastic agents. *Journal of Natural Products*. **54**: 261-264.
- Fadli, M., Aracil, M., Jeanty, G., Banaigs, B., Francisco, C., Moreau, S. (1991a). Méditerranéol E: proposition de structure pour un méroditerpène transpose de l'algue brune *Cystoseira mediterranea*. *Tetrahedron Letters*. **32**: 2477-2480.
- Fattorusso E., Magno, S., Mayol, L., Santacroce, C., Sica, D., Amico, V., Oriente, G., Piattelli, M., Tringali, C. (1976). Oxoxcrintol and crinitol, novel linear terpenoids from de brown alga *Cystoseira critina*. *Tetrahedron Letters*. **12**: 937-940.

- Fernández, J., Navarro, G., and Norte, M. (1998). Novel metabolites from the Brown alga *Cystoseira-abies-marina*. *Natural Product Research*. **12**: 285-291.
- Fisch, K., Böhm, V., Wright, A., König, G. (2003). Antioxidative meroterpenoids from the brown alga *Cystoseira crinite*. *Journal of Natural Products*. **66**: 968-975.
- Foti, M., Piattelli, M., Amico, V., Ruberto, G., (1994). Antioxidant activity of phenolic meroditerpenoids from marine algae. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **26**: 159-164.
- Francisco, C., Banaigs, L., Codomier, L., Cave, A. (1985b). Cystoseirol A. A novel rearranged diterpene of mixed biosynthesis from the brown alga *Cystoseira mediterranea*. *Tetrahedron Letters*. **26**: 4919-4922.
- Francisco, C., Banaigs, L., Valls, R., Codomier, L. (1985a). Mediterraneol A, a novel rearranged diterpenoid-hydroquinone from the marine alga *Cystoseira mediterranea*. *Tetrahedron Letters*. **26**: 2629-2632.
- Ghannadi, A., Plubrukarn, A., Zandi, K., Sartavi, K., Yegdaneh, A. (2013). Screening for antimalarial and acetylcholinesterase inhibitory activities of some Iranian seaweeds. *Research in Pharmaceutical Sciences*. **8**: 113-118.
- Granado, I., Caballero, P. (2001). Feeding rates of *Litorina striata* and *Osilinus atratus* in relation to nutritional quality and chemical defenses of seaweeds. *Marine Biology*. **138**: 1213-1224.
- Hamdy, A.-H., Aboutabl, E., Sameer, S., Hussein, A., Díaz-Marrero, A., Darias, J., Cueto, M. (2009). 3-keto-22-epi-28-nor-cathasterone, a brassinosteroid-related metabolite from *Cystoseira myrica*. *Steroids*. **74**: 927-930.
- Harizi, H., Corcuff, J., Gualde, N. (2008). Arachidonic-acid derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine*. **14**: 461-469.

- Jimenez-Escrig, A., Jimenez-Jimenez, I., Pulido, R., Saura-Calixto, F. (2001). Anti-oxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of Science Food Agriculture*. **81**: 530-534.
- Kapetanovic, R., Sladic, D., Popov, S., Zlatovic, M., Kljajic, Z., Gasic, M. (2005). Sterol composition of the Adriatic sea algae *Ulva lactuca*, *Codium dichotomum*, *Cystoseira adriatica* and *Fucus virsoides*. *Journal Serbian Chemical Society*. **70**: 1395-1400.
- Kijjoo, A., Bessa, J., Pinto, M., Anatachoke, C., Silva, A., Eaton, G., Herz, W. 2002. Polyoxygenated cyclohexene derivatives from *Ellipeiosis cherrevensis*. *Phytochemistry*. **59**: 543-549.
- Linnaeus, C. (1753). *Species plantarum*, exhibentes plantas rite cognitatas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas. Vol. 2 pp. [i], 561-1200, [1-30, index], [i, err.]. Holmiae [Stockholm]: Impensis Laurentii Salvii.
- Masresha, B., Makonnen, E., Debella, A. (2012). In vivo anti-inflammatory activities of *Ocimum suave* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. **142**: 201–205.
- Mata, P. (2001). O clima dos Açores: Algumas particularidades. *Açoreana* **9**: 299-306.
- McHugh, D.J. (2003). A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper 441, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. [<http://www.fao.org/docrep/006/y4765e/y4765e00.htm#Contents>] consultado a 05 de Setembro de 2012.
- Mesguiche, V., Valls, R., Piovetti, L., Banaigs, B. (1997). Meroditerpenes from *Cystoseira amentacea* var. *stricta* collected off the mediterranean coasts. *Phytochemistry*. **45**: 1489-1494.

- Mhadhebi, L., Laroche-Clary, A., Robert, J., Bouraoui, A. (2011a). Anti-inflammatory, anti-proliferative and antioxidant activities of organic extracts from the Mediterranean seaweed, *Cytoseira crinite*. *African Journal of Biotechnology*. **10**: 16682-16690.
- Mhadhebi, L., Laroche-Clary, A., Robert, J., Bouraoui, A. (2011b). Antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferative activities of organic fractions from the Mediterranean brown seaweed *Cytoseira sedoides*. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. **89**: 911-921.
- Milkova, T., Talev, G., Christov, R., Stefka, D.-K., Popov, S. (1997). Sterols and volatils in *Cytoseira barbata* and *Cytoseira crinita* from the black sea. *Phytochemistry*. **45**: 93-95.
- Mohamed, S., Hashim, S., and Rahman, A. (2012). Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science and Technology*. **23**:83-96.
- Mokrini, R., Mesaoud, M., Daoudi, M., Hellio, C., Maréchal, J.-P., Hattab, M., Ortalo-Magné, A., Pioveti, L., Culioli, G. (2008). Meroditerpenoids and derivatives from the brown alga *Cytoseira baccata* and their antifouling properties. *Journal of Natural Products*. **71**: 1809-1811.
- Moreno, P., Petkov, G., Ramazanov, Z., Garsia, G. (1998). Lipids, fatty-acids and sterols of *Cytoseira-abies-marina*. *Botanica Marina*. **41**: 375-378.
- Morgan, K. C., Wright, J. L. C., Simpson, F. L. (1980). Review of chemical constituents of the red alga *Palmaria palmate* (dulse). *Economic Botany*. **34**: 27-50.
- Moujir, L., Gouveia, V., Toubarro, D., Barreto, M. C. (2012). Determination of cytotoxicity against tumour cell lines. In: Barreto, M. C. & Simões, N. (eds.) (2012). Determination of biological activities. A laboratory manual, pp. 41-64. Universidade dos Açores, Ponta Delgada.

- Nakano, T., Watanabe, M., Sato, M., Takeuchi, M. (1995). Characterization of catalase from the seaweed *Porphyra yezoensis*. *Plant Science*. **104**: 127-133.
- Navarro, G., Fernández, J., Norte, M. (2004). Novel meroditerpenes from the brown alga *Cystoseira* sp. *Journal of Natural Products*. **67**: 495-499.
- Neto, A. (2000). Ecology and dynamics of two intertidal algal communities on the littoral of the island of São Miguel (Azores). *Hydrobiologia*. **432**: 135-147.
- Neto, A., Tittley, I., Raposeiro, P. (2006). Flora Marinha do Litoral dos Açores. Edição Secretaria Regional do Ambiente e do Mar, Horta, Portugal, pp67-95.
- Norte, M., Sánchez, A., González, G. (1993). Claraenone, a new meroditerpene from brown alga. *Tetrahedron Letters*. **24**: 3485-3486.
- Ozemir, G., Horzum, Z., Sukatar, A., Karabay-Yavasoglu, N.U. (2006). Antimicrobial activities of volatile components and various extracts of *Cystoseira barbata* from the Coast of Izmir, Turkey. *Pharmacology Biology*. **44**: 183-188.
- Patarra, R., Leite, J., Pereira, R., Baptista, J., Neto, A. (2012). Fatty acid composition of selected macrophytes. *Natural Product Research*. DOI:10.1080/14786419.2012.688048
- Patarra, R., Paiva, L., Neto, A., Lima, E., and Baptista, J. (2011). Nutritional value of selected macroalgae. *Journal of Applied Phycology*. **23**: 205-208.
- Plaza, M., Cifuentes, A., Ibañez, E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science and Technology*. **19**: 31-39.
- Praud, A., Valls, R., Piovetti, L., Banaigs, B., Benaim, J.-Y. (1995). Meroditerpenes from the brown alga *Cystoseira crinita* off the french mediterranean coast. *Phytochemistry*. **40**: 495-500.
- Reddy, M. V. R., Billa, V. K., Pallela, V. R., Mallireddigari, M. R., Boominathan, R., Gabriel, J. L., Reddy, E. P. (2008). Design, synthesis, and biological evaluation of 1-(4-sulfamylphenyl)-3-

- trifluoromethyl-5-indolyl pyrazolines as cyclooxygenase-2 (COX-2) and lipoxygenase (LOX) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **16**: 3907–3916.
- Rocha, F., Pereira, R., Kaplan, M., Teixeira, V. (2007). Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. *Revista Brasileira de Farmacologia*. **17**: 631-639.
- Ruberto, G., Baratta, M., Biondi, D., and Amico, V. (2001). Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus *Cystoseira* in a micellar model system. *Journal of Applied Phycology*. **13**: 403-407.
- Ruperez, P., Ahrazem, O., Leal, J. A. (2002). Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**: 840-845.
- Sekmokienė, D., Liutkevicius, A., Malakauskas, M. (2007). Functional food and its ingredients. *Veterinarija ir Zootechnika*. **37**: 72-78.
- Takamatsu, S., Hodges, T. W., Rajbhandari, I., Gerwick, W. H. Hamann, M. T., Nagle, D. C. (2003). Marine natural products as novel antioxidant prototypes. *Journal of Natural Products*. **66**: 605-608.
- Thomas, N., and Kim, S. (2011). Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **32**: 325-335.
- Urones, J., Araújo, M., Palma F., Basabe, P., Marcos, I., Moro, R., Lithgow, A., Pineda, J. (1992b). Meroterpenes from *Cystoseira usneoides* II. *Phytochemistry*. **31**: 2105-2109.
- Urones, J., Basabe, P., Marcos, I., Pineda, J., Lithgow, A., Moro, R., Palma, F., Araújo, M., Gravalos, D. (1992a). Meroterpenes from *Cystoseira usneoides*. *Phytochemistry*. **31**: 179-182.

- Valls, R., Mesguiche, V., Piovetti, L., Prost, M., Peiffer, G. (1996). Meroditerpenes from the brown alga *Cystoseira amentacea* var. *stricta* collected off the french mediterranean coast. *Phytochemistry*. **41**: 1367-1371.
- Walther, M., Holzhütter, H.-G., Kuban, R. J., Wiesner, R., Rathmann, J., Kühn, H. (1999). The inhibition of mammalian 15-lipoxygenases by the anti-inflammatory drug ebselen: dual-type mechanism involving covalent linkage and alteration of the iron ligand sphere. *Molecular Pharmacology*. **56**:196–203.
- Widjaja-Adhi Airanthi, M., Sasaki, N., Iwasaki, S., Baba, N., Abe, M., Hosokawa, M., Miyashita, K. (2011) Effect of brown seaweed lipids on fatty acid composition and lipid hydroperoxide levels of mouse liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **59**: 4156-4163.
- Yoshie, Y., Wang, W., Petillo, D., Suzuki, T. (2000). Distribution of catechins in Japanese seaweeds. *Fisheries Science*. **66**: 998-1000.
- Zubia, M., Fabre, M., Kerjean, V., Le Lann, K., Stiger-Pouvreau, V., Fauchon, M., Deslandes, E. (2009). Antioxidant and antitumoral activities of some Phaeophyta from Brittany coast. *Food Chemistry*. **116**: 693-701.