

INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

18660

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

A QUÍMICA DE *Vidalia obtusiloba* (= *Osmundaria obtusiloba*) [RHODOPHYTA - CERAMIALES] E SUAS IMPLICAÇÕES SISTEMÁTICAS.

LUCIANA RETZ DE CARVALHO
Tese de Doutorado

Nídia Franca Roque
Orientadora

São Paulo
1999

DEDALUS - Acervo - CQ



30100002297

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

C331q Carvalho, Luciana Retz de
A química de *Vidalia obtusiloba* (= *Osmundaria obtusiloba*)
[Rhodophyta-Ceramiales] e suas implicações sistemáticas / Luciana
Retz de Carvalho. -- São Paulo, 1999.
182p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química. Departamento de
Química Fundamental.

Orientador: Roque, Nídia Franca

1. Fenóis : Química orgânica 2. Compostos halogenados :
Química orgânica 3. Produtos naturais : Química orgânica I.
T. II. Roque, Nídia Franca, orientador.

547.632 CDD

“A Química de *Vidalia Obtusiloba* (= *Osmundaria Obtusiloba*) [Rhodophyta – Ceramiales] e suas Implicações Sistemáticas”.

LUCIANA RETZ DE CARVALHO

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Química Orgânica.

Aprovada por:

Profa. Dra. NÍDIA FRANCA ROQUE
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. CLAUDIO DI VITTA
IQ - USP

Prof. Dr. PAULO ROBERTO HRIHOROWITSCH MORENO
IQ - USP

Prof. Dr. WAGNER VILEGAS
IQ – UNESP – Araraquara

Profa. Dra. MARIA CLAUDIA MARX YOUNG
Instituto de Botânica - SP

SÃO PAULO
02 DE JUNHO DE 1999.

Agradeço a todos que contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado .

Muito obrigada.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| Sumário de Tabelas | V |
| Sumário de Figuras | VIII |
| Resumo | XIII |
| Abstract | XIV |
| | |
| 1. Introdução | |
| 1.1. Conceito de alga | 1 |
| 1.2. Algas vermelhas e filogenia | 2 |
| 1.3. Evolução e metabolismo secundário | 3 |
| 1.4. Algas vermelhas: química e sistemática | 5 |
| | |
| 2. Substâncias sulfatadas e/ou halogenadas de algas. | |
| 2.1. O ambiente marinho | 7 |
| 2.2. Substâncias sulfatadas de algas | 8 |
| 2.3. Substâncias halogenadas de algas | 12 |
| 2.4. Biossíntese de substâncias fenólicas | 18 |
| | |
| 3. Objetivos | 20 |
| | |
| 4. A planta | |
| 4.1. Classificação de <i>Osmundaria</i> | 21 |
| 4.2. Descrição do material botânico | 21 |

5. Parte experimental

| | |
|---|----|
| 5.1. Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos | 24 |
| 5.2. Fracionamento dos extratos obtidos | 25 |
| 5.3. Fracionamento de VH (extrato hexânico) | 25 |
| 5.3.1. Estudo de VH-III-10 | 29 |
| 5.3.2. Estudo de VH-III-20 | 30 |
| 5.3.3. Estudo de VH-III-62 | 31 |
| 5.4. Fracionamento de VD (fase diclorometânica) | 32 |
| 5.4.1. Estudo de VD-I-18 | 32 |
| 5.4.2. Estudo de VD-I-34 | 34 |
| 5.4.3. Estudo de VD-I-47 a 51 | 34 |
| 5.5. Análise da Fase em Acetato de Etila | 35 |
| 5.6. Fracionamento da fase metanólica (VM) | 36 |
| 5.6.1. Estudo de VM-I-1 e VM-I-2 | 36 |
| 5.6.2. Estudo de VM-II-14 a VM-II-21 | 38 |
| 5.6.3. Estudo de VM-II-36 | 38 |
| 5.6.4. Estudo de VM-I-24 | 39 |
| 5.6.5. Cristalização da substância 50 | 39 |
| 5.7. Fracionamento de VP | 40 |
| 5.7.1. Estudo de VP-II-3 | 42 |
| 5.7.2. Estudo de VO-II-4 e 5 | 42 |
| 5.8. Reestudo de <i>Vidalia</i> | 43 |
| 5.8.1. Estudo de VdH-hex | 46 |
| 5.8.2. Estudo de VdH-met. e VdD-hex | 46 |

| | |
|--|----|
| 5.8.3.Estudo de VdD-met | 46 |
| 5.8.4.Estudo de VdM-hex | 46 |
| 5.8.5.Estudo de VdM-dcm | 47 |
| 5.8.6.Estudo de VdM-dcm 11 e 12 | 50 |
| 5.8.7.Estudo de VdM-dcm-I 15 e 16 | 50 |
| 5.8.8.Análise de VdM-dcm-I 19 e 20 | 51 |
| 5.8.9.Estudo da fração VdP | 51 |
| 5.9.Material e equipamentos utilizados | 52 |
| 5.10.Dados físicos das substâncias isoladas | 54 |
| | |
| 6. Identificação ou determinação estrutural das substâncias isoladas de <i>Vidalia obtusiloba</i> | |
| 6.1.Substâncias de <i>Vidalia</i> | 56 |
| 6.2. Identificação de 44 | 59 |
| 6.3. Identificação do digeneasídeo (45) | 62 |
| 6.4. Identificação de 46 | 64 |
| 6.5. Identificação de 27 | 70 |
| 6.6. Identificação de 1 | 73 |
| 6.7. Determinação da estrutura da substância 47 | 77 |
| 6.8. Determinação da estrutura da substância 48 | 82 |
| 6.9. Determinação da estrutura da substância 49 | 85 |
| 6.10. Substância 50 | 88 |
| | |
| 7. Correlações quimiossistemáticas em <i>Vidalia obtusiloba</i> | 89 |
| | |
| 8. Referências bibliográficas | 93 |

.

Sumário de Tabelas

| | Página |
|---|--------|
| Tabela 1. Substâncias sulfatadas isoladas de macroalgas marinhas | 8 |
| Tabela 2. Oligofenóis de macroalgas marinhas | 13 |
| Tabela 3. Reestudo de <i>Vidalia</i> . Pesos dos concentrados dos extratos obtidos desta alga e dos concentrados das fases provenientes das diversas partições efetuadas nestes extratos. | 45 |
| Tabela 4. Dados de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de 44 e dos modelos 1 e 2 (todos em CDCl_3). | 60 |
| Tabela 5. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (50MHz, D_2O) do digeneasídeo, da α -D-manose e da β -D-manose . | 63 |
| Tabela 6. Dados de microanálise elementar das substância porcentagens observadas e/ou calculadas das substâncias 46,27,1,47,48 e 49 | 65 |
| Tabela 7. Dados de RMN ^1H (em ppm), das substâncias 46, 46 metilada, 27, 1, 47, 48 e 49. | 66 |

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 8. | Dados de RMN ^{13}C das substâncias 1,47,48,49,46,46 metilada e 27. | 67 |
| Tabela 9. | Correlações ^{13}C - ^1H a longa distância observadas no espectro HMBC de 46. | 68 |
| Tabela 10. | Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 27 (CDCl_3) e do 2,2', 3,3'-tetrabromo-4,4',5,5'- tetraidroxidifenilmetano. | 71 |
| Tabela 11. | Correlações a longa distância observadas no espectro HMBC da substância 27 (CDCl_3). | 71 |
| Tabela 12. | Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 1. | 74 |
| Tabela 13. | Fatores de correção para substituição de grupos -OH por -OSO ₃ K, em anel aromático. | 76 |
| Tabela 14. | Comparação entre os valores observados para a substância 1, no espectro de RMN ^{13}C e os calculados para os modelos 1,2 e 3. | 76 |
| Tabela 15. | Dados de RMN ^1H e ^{13}C , reunidos segundo as correlações observadas no espectro de HMQC e HMBC, de 47 [75 MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$] | 80 |

| | |
|--|----|
| Tabela 16. Correlações ^{13}C - ^1H a longa distância observadas no espectro HMBC de 47 [75 MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$]. | 80 |
| Tabela 17. Ocorrência de terpenos, fenóis, floridosídeos e digeneasídeo, em Ceramiales. | 91 |

Sumário de Figuras

| | Página | |
|-------------|---|-----|
| Figura 1 | Árvore filogenética de Rhodophyta | 4 |
| Figuras 2-4 | Hábito de <i>Osmundaria obtusiloba</i> (= <i>Vidalia obtusiloba</i>). | 23 |
| Figura 5 | Esquema do fracionamento dos extratos VH,VD,VAc,VM, | 26 |
| Figura 6. | Espectro de RMN ^1H do extrato VH (200 MHz, CDCl_3) | 27 |
| Figura 7. | Esquema de fracionamento do extrato hexânico VH. | 119 |
| Figura 8. | Espectro de RMN ^1H da fração VH-V-9, (200MHz, CDCl_3) | 120 |
| Figura 9. | Espectro de RMN ^{13}C (PND) da fração VH-V-9 (50MHz, CDCl_3) | 121 |
| Figura 10 | Espectro de massas da fração VH-V-9, após metilação | 122 |
| Figura 11. | Espectro de RMN ^1H da fração VH-V-10 (200 MHz, CDCl_3) | 122 |
| Figura 12 | Espectro de RMN ^{13}C da fração VH-VI-10 (50 MHz, CDCl_3) | 123 |
| Figura 13. | Espectro de massas da fração VH-VI-10, após metilação. | 124 |
| Figura 14 | Esquema de fracionamento do extrato diclorometânico VD. | 33 |
| Figura 15. | Espectro de RMN ^1H do concentrado VAc (300MHz, D_2O) | 125 |
| Figura 16 | Espectro de RMN ^1H da fração VAc-I-10 (300MHz, CDCl_3) | 126 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Figura 17. | Espectro de RMN ^1H do concentrado VM (300MHz, D_2O) | 127 |
| Figura 18. | Esquema de fracionamento do concentrado VM. | 37 |
| Figura 19. | Espectro de RMN ^1H da fração VM-III-116 (200MHz, D_2O) | 128 |
| Figura 20. | Espectro de RMN ^{13}C (PND) da fração VM-III-116(50 MHz, D_2O) | 129 |
| Figura 21. | Espectro de RMN ^1H da fração VM-III-147 (200MHz, D_2O) | 130 |
| Figura 22. | Espectro de RMN ^{13}C da fração VM-III-147 (50MHz, D_2O) | 131 |
| Figura 23. | Espectro de RMN ^1H da fração VM-I-24 (200 MHz, D_2O) | 132 |
| Figura 24. | Espectro de RMN ^{13}C da fração VM-I-24 (50MHz, D_2O) | 133 |
| Figura 25. | Esquema de fracionamento de VP. | 41 |
| Figura 26. | Reestudo de <i>Vidalia</i> . Fluxograma da obtenção dos diferentes extratos de <i>Vidalia</i> e de suas subsequentes partições | 44 |
| Figura 27. | Esquema do fracionamento cromatográfico de VdD-met. | 48 |
| Figura 28. | Esquema do fracionamento cromatográfico de VdM-dcm | 49 |
| Figura 29. | Substâncias isoladas de <i>Vidalia obtusifolia</i> | 57 |
| Figura 30. | Espectro de RMN ^{13}C (PND) do colesterol (50 MHz, CDCl_3) | 134 |
| Figura 31. | Espectro de RMN ^1H de 44 (200MHz, CDCl_3) | 135 |
| Figura 32. | Espectro de RMN ^{13}C (PND) de 44 (50 MHz, CDCl_3) | 136 |
| Figura 33. | Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135°) de 44 (50 MHz, CDCl_3) | 137 |
| Figura 34. | Espectro de RMN ^1H de 45 (200 MHz, D_2O) | 138 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Figura 35. | Espectro de RMN ^{13}C (PND) de 45 (50 MHz, D_2O) | 139 |
| Figura 36. | Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135°) 45 (50 MHz, D_2O) | 140 |
| Figura 37. | Espectro de I.V. (KBr) de 46 . | 141 |
| Figura 38. | Espectro de massas (CG-EM) de 46 . | 142 |
| Figura 39. | Espectro de RMN ^1H de 46 [200 MHz, CDCl_3 , (DMSO)] | 143 |
| Figura 40. | Espectro de RMN ^{13}C (PND) de 46 [200MHz, CDCl_3 (DMSO)] | 144 |
| Figura 41. | Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135°) de 46 (300 e 75MHz) | 145 |
| Figura 42 | Espectro de RMN HMQC (correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) de 46 (300 e 75 MHz). | 146 |
| Figura 43 | Espectro de RMN HMBC de 46 | 147 |
| Figura 44 | Espectro de RMN ^1H de 46 metilado (200MHz, CDCl_3) | 148 |
| Figura 45 | Espectro de RMN ^{13}C (PND) de 46 metilado (50 MHz, CDCl_3) | 149 |
| Figura 46. | Espectro de massas de 46 (CG-EM) metilado | 150 |
| Figura 47. | Espectro de I.V. (KBr) de 27 | 151 |
| Figura 48. | Espectro de massas (eletrospray) de 27 . | 152 |
| Figura 49 | Espectro de RMN ^1H de 27 (200 MHz, CDCl_3 , CD_3OD) | 153 |
| Figura 50. | Espectro de RMN ^{13}C (PND) de 27 (50 MHz) | 154 |
| Figura 51. | Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135°) de 27 (125MHz, CDCl_3 e CD_3OD) | 155 |
| Figura 52. | Espectro de RMN COSY $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ de 27 (500 e 125 MHz; CDCl_3 e CD_3OD) | 156 |
| Figura 53 | Espectro de RMN HMBC (correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) de 27 (500 e 125 MHz, CDCl_3 e CD_3OD) | 157 |
| Figura 54 | Espectro de I.V. (KBr) de 1 . | 158 |

| | | |
|------------|--|-----|
| Figura 55 | Espectro de I.V. (KBr) do: 1'-4-dissulfato de potássio do álcool 2,3-dibromo-1',4,5-triidroxibenzílico (KBr), apresentado na literatura ⁶² | 158 |
| Figura 56 | Espectro de massas (eletrospray) de 1 | 159 |
| Figura 57 | Espectro de RMN ¹ H de 1 (200 MHz, D ₂ O) | 160 |
| Figura 58 | Espectro de RMN ¹³ C (PND) de 1 (50 MHz, D ₂ O) | 161 |
| Figura 59. | Espectro de I.V. (KBr) de 47 . | 162 |
| Figura 60 | Espectros de massas (inserção direta e eletrospray) de 47 . | 163 |
| Figura 61 | Espectro de RMN ¹ H de 47 (300MHz, CDCl ₃ e MeD ₃ OD) | 164 |
| Figura 62 | Espectro de RMN ¹³ C (PND) de 47 (75 MHz,CDCl ₃ e CD ₃ DD) | 165 |
| Figura 63 | Espectro de RMN ¹³ C (DEPT135 ⁰) de 47 (75 MHz,CDCl ₃ e CD ₃ OD) | 166 |
| Figura 64 | Espectro de RMN HMBC de 47 (500 e 125 MHz, CDCl ₃ e CD ₃ OD) | 167 |
| Figura 65 | Espectro de RMN HMBC de 47 (500 e 125 MHz, CDCl ₃ e CD ₃ OD) | 168 |
| Figura 66 | Espectro de massas (eletrospray) de 48 | 169 |
| Figura 67 | Espectro de I.V. (KBr) de 48 | 170 |
| Figura 68 | Espectro de RMN ¹ H de 48 (200 MHz, D ₂ O) | 171 |
| Figura 69 | Espectro de RMN ¹³ C (PND) de 48 (50MHz, D ₂ O) | 172 |
| Figura 70 | Espectro de RMN ¹³ C (DEPT 135 ⁰) de 48 (50MHz, D ₂ O) | 173 |
| Figura 71 | Espectro de RMN ¹ H da fração VP-I-71(300MHz, D ₂ O) | 174 |
| Figura 72 | Espectro de RMN ¹ H da fração VP-I-71, após hidrólise [200MHz,CD ₃ OD(D ₂ O)] | 175 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| Figura 73 | Espectro de RMN ^1H da fração VP-I-71 hidrolisada e metilada (200MHz, CDCl_3) | 176 |
| Figura 74 | Espectro I.V. (KBr) de 49 | 177 |
| Figura 75 | Espectro de massas (eletrospray) de 49 | 178 |
| Figura 76 | Espectro de RMN ^1H da fração VP-I-13 (300 MHz, D_2O) | 179 |
| Figura 77 | Espectro de RMN ^1H da fração VP-I-13 (300MHz, D_2O) | 180 |
| Figura 78 | Espectro de RMN ^{13}C PND da fração VP-I-13 (50MHz, D_2O) | 181 |
| Figura 79 | Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135 $^\circ$ da fração VP-I-13 (50 MHz, D_2O) | 182 |

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos realizar o estudo da rodofícea marinha *Vidalia obtusiloba* (= *Osmundaria obtusiloba*), visando o isolamento e a identificação ou elucidação estrutural de seus metabólitos principais e avaliar estas substâncias segundo critérios quimiosistemáticos, buscando situá-los em padrões já estabelecidos.

De extratos obtidos com solventes de diferentes polaridades foram isoladas, através de técnicas cromatográficas, nove substâncias, sendo quatro delas inéditas. São elas fenóis e oligofenóis bromados, com e sem grupos sulfatos, além de esteróide, glicerídeo e glicosídeo aminado.

As análises estruturais foram efetuadas com base em dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C , incluindo experimentos bidimensionais, em dados obtidos dos espectros de massas, de infravermelho, e análise elementar e no caso do glicosídeo aminado, em difração de raios X.

Do ponto de vista quimiosistemático, as substâncias enquadram-se nos padrões esperados para rodofíceas marinhas. Através de um levantamento bibliográfico descobriu-se que o padrão quimiotaxonômico que correlaciona a ocorrência de determinados metabólitos primários com a de metabólitos secundários, ou seja, que relaciona a ocorrência do(s) floridosídeo(s) com a de terpenos e a do digeneasídeo com a de fenóis bromados é uma constante nestas macro algas, enquadrando-se a *V. obtusiloba* neste último caso.

ABSTRACT

The present work has as its objective to carry out a study of the marine red alga *Vidalia obtusiloba* (= *Osmundaria obtusiloba*), with intent to isolate, identify and/or elucidate the structure of its principal metabolites and to evaluate these substances according to chemosystematic criteria so as to situate them within established patterns.

From extracts obtained through the use of solvents of different polarities, we were able to isolate through chromatographic techniques nine substances, of which 4 had not been seen before. These are phenols and bromate oligophenols, with and without sulphate groups, in addition to a steroid, a glyceride and an amine glycoside.

Structural analyses were carried out based on RMN ^1H and ^{13}C spectroscopic data, including bidimensional experiments, on data obtained through infrared mass spectrum and elementary analysis. In the case of the amine glycosides, these were based on X-ray diffraction.

From the chemosystematic point of view, these substances fall into the expected patterns for marine rhodophytes. Through bibliographical research we were able to find that the chemotaxonomic patterns that correlate the occurrence of certain primary metabolites with secondary metabolites, i.e., that relate the occurrence of the floridosides with terpenes, and of digeneaside with bromate phenols, are a constant in these macroalgae. *V. obtusiloba* falls into the latter case.

A QUÍMICA DE *Vidalia obtusiloba* (= *Osmundaria obtusiloba*) [RHODOPHYTA - CERAMIALES] E SUAS IMPLICAÇÕES SISTEMÁTICAS.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Conceito de alga

Atualmente, as algas são reconhecidas como integrantes dos Reinos Monera e Protista, agrupados segundo características comuns; todos são organismos fotossintetizantes, não vasculares, que contém clorofila a e estruturas reprodutivas, sem a proteção de células estéreis^{1,2,3}.

Este conceito abrange um grupo não homogêneo de organismos, contendo desde organismos unicelulares microscópicos até os gigantescos " kelps ", distribuídos por diferentes " habitat ": oceanos, corpos de água doce, solos, rochas e mesmo vegetais^{1,2}.

As algas estão dispostas em onze divisões, segundo critérios químicos, citológicos e morfológicos que são: a) tipos e combinações de pigmentos fotossintetizantes presentes; b) natureza química das substâncias de reserva e das paredes celulares; c) ausência ou presença de flagelos, d) padrão e curso da mitose e da citocinese; e) presença ou ausência de membrana no retículo endoplasmático; f) tipo de ciclo de vida, etc^{1,2}.

Essas 11 divisões são:

- I- Cyanophyta;
- II- Prochlorophyta;
- III- Glaucophyta;
- IV- Rhodophyta;
- V- Heterokontophyta;

- VI- Haptophyta;
- VII- Cryptophyta;
- VIII- Dinophyta;
- IX- Euglenophyta;
- X- Chlorarachnophyta;
- XI- Chlorophyta.

1.2 Algas vermelhas e filogenia

Existem cerca de 5000-5500 espécies de algas vermelhas, distribuídas entre 500-600 gêneros. Destas, somente 150 espécies (20 gêneros) ocorrem em água doce; a maior parte são marinhas e vivem presas a rochas ou a outro substrato sólido. As rodofíceas marinhas estão restritas a uma estreita faixa costeira, delimitada pela penetração, ou seja, pela possibilidade de o meio transmitir luz suficiente para a fotossíntese^{1,2}.

Os fósseis das rodófitas identificados com algum grau de certeza pertencem ao período Cambriano (cerca de 590 milhões de anos atrás), embasando a idéia geral de que as algas vermelhas são uma antiga linhagem, de avanço evolucionário lento. Entretanto, não fornecem informações a respeito dos relacionamentos filogenéticos dentro das divisões destas algas^{1,3}.

Para obter essas informações, o recurso usado até o momento é comparar caracteres morfológicos dos organismos vivos, apontando ganhos e perdas filogenéticas (aquisição de caracteres mais evoluídos e perda de

determinados caracteres, respectivamente), deduzindo deste balanço quais são as ordens primitivas e quais as derivadas.

A árvore filogenética (Figura 1, p. 4) construída para Rodophyta situa Rhodochaetales como o grupo ancestral de todas as rodofíceas, e Ceramiales como um dos mais evoluídos¹.

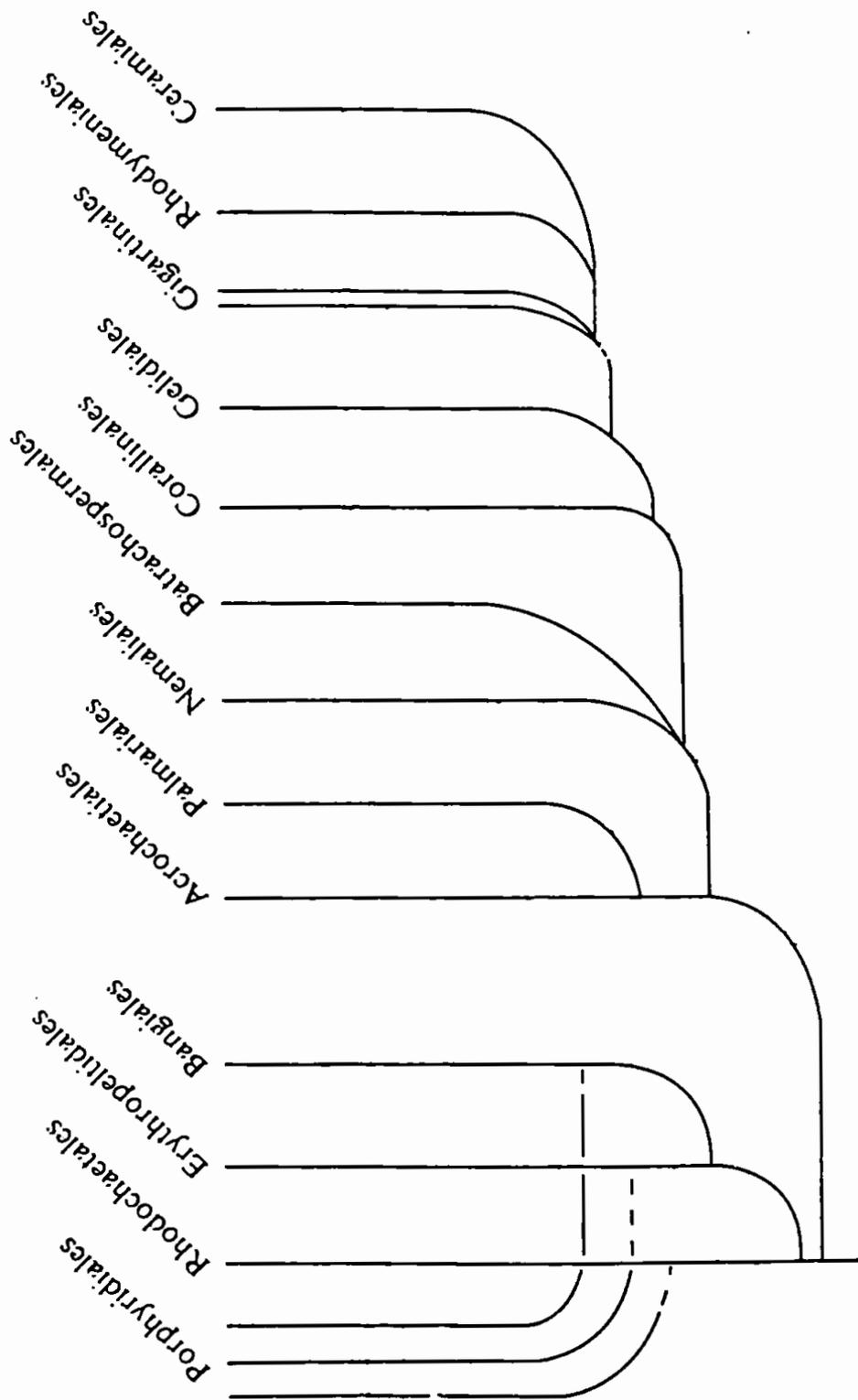
1.3 Evolução e metabolismo secundário

Diferentes grupos de algas podem adaptar-se ao mesmo ambiente através de canais evolucionários distintos, mas determinados pelas informações genéticas existentes, surgindo assim distintas estratégias de sobrevivência as quais influenciaram enormemente a morfologia, a fisiologia e a bioquímica das macroalgas marinhas, ao longo de sua existência^{4,5,6}.

A interação alga-herbívoro, de comprovada importância evolucionária e ecológica, alterou características morfológicas — como a forma geral, o tamanho e a dureza do talo — e características bioquímicas, promovendo a produção das defesas químicas^{7,8,9}.

A dureza do talo é uma das mais importantes defesas contra determinados herbívoros^{10,11} enquanto que as defesas químicas são efetivas contra outros^{8,12}. Existem ainda casos onde a dureza do talo aparece associada às defesas químicas¹³.

Como defesas químicas, as macroalgas marinhas, produzem terpenos, acetogeninas, substâncias derivadas de aminoácidos, fenóis simples e polifenóis^{14a25} diferindo das plantas porque incorporam



BIBLIOTECA
 INSTITUTO DE QUÍMICA
 Universidade de São Paulo

Figura 1. Árvore filogenética de Rhodophyta(segundo Floek, C.van den).

frequentemente halogênios a seus metabólitos secundários²⁶ e não produzem alcalóides¹².

1.4 Algas vermelhas: química e sistemática

As algas vermelhas formam um grupo natural, apesar da grande diversidade de macroestruturas e de padrões de reprodução existentes entre elas. Como todas as outras algas, todas as vermelhas contém clorofila *a* porém, algumas pertencentes à Florideophyceae possuem, também, clorofila *d*^{1,27}. Os carotenóides (pigmentos acessórios) são praticamente idênticos nas duas classes de Rhodophyta (Bangiophyceae e Florideophyceae), diferindo, em certo grau, dos existentes nas outras divisões^{1,28,29}.

O componente fibrilar que forma o esqueleto da parede celular é celulose, um polímero de 1,4- β -D-glicose, que é substituído pelo manano (polímero de 1,4- β -D-manose) em *Porphyra* e *Bangia*. Xilano pode ocorrer em *Porphyra*, *Rhodochorton*, *Laurencia* e *Rhodymenia*. A mucilagem amorfa que embebe o esqueleto celulósico da parede é composta de polissacarídeos — os galactanos- polímeros de 1,3 - β e 1,4- β -galactose, que incluem o agar, o carragenano, o porfirano, o furcelerano e o funorano^{30,31,32}.

Esses polissacarídeos de alto peso molecular compõem, juntamente com os glicerídeos glicosilados ou determinados polióis, o material de reserva das algas vermelhas. Os glicerídeos são o floridosídeo e os D- e L-isofloridosídeos, presentes em ambas as classes de Rhodophyta, estando

ausentes apenas em determinados membros de Ceramiales, onde são substituídos pelo digeneasídeo^{33,34,35,36}.

Os principais produtos secundários das algas vermelhas são halogenados e compreendem as classes dos terpenos e dos fenóis^{14a26.37}.

Os terpenos, de estruturas complexas, são utilizados em sistemática porque têm distribuição restrita, pois quanto maior for o número de reações químicas necessárias para a síntese de um produto, mais restrita será a sua distribuição; ou seja, a probabilidade de uma rota metabólica desenvolver independentemente, durante a evolução, em diferentes grupos de organismos, diminui com o aumento da complexidade desta rota. Daí, o uso dos terpenos nas classificações sistemáticas de famílias, gêneros e espécies^{38 a 41}.

Os fenóis das algas vermelhas são bromados e teriam como precursor, a tirosina^{37,42,43}. Em Rhodomelaceae, a substância fenólica mais comum é o álcool 2,3-dibromo-4-5-diidroxibenzílico (lanosol) que é freqüentemente isolado também na forma de um éster do ácido sulfúrico (1',4-dissulfato de potássio do 2,3-dibromo-1',4, 5-triidroxibenzila)^{37,43}.

2. SUBSTÂNCIAS SULFATADAS E/OU HALOGENADAS DE ALGAS

2.1 O ambiente marinho

O oceano é resultado de uma gigantesca reação ácido-base: os ácidos que continuamente afloram do interior da terra são misturados com bases que estão sendo liberadas constantemente das rochas, pela ação do tempo. Suas águas são comparadas a um meio de cultura de composição química praticamente constante, o que é correto para a maioria dos parâmetros, por exemplo, a porcentagem total dos sais aí dissolvidos mantém-se em torno de 3,5%. Este equilíbrio é sustentado por uma série de reações químicas e de processos físico - químicos. Dentre os mais importantes íons presentes no ambiente marinho estão o sulfato, o cloreto, o brometo e o iodeto, em concentrações de 885, 19.000, 65 e 0,06 mg.L⁻¹, respectivamente^{44,45}.

Nesse imenso laboratório, os organismos aquáticos e o ambiente abiótico estão interrelacionados e interagem entre si. Portanto, é natural que esses organismos desenvolvam mecanismos para utilizar os solutos ali disponíveis: por exemplo, a incorporação do sulfato, nas algas, é intermediada por nucleotídeos sulfatados^{46,47} e a dos íons haleto é feita por difusão seletiva, através das paredes celulares, seguida de acúmulo em vesículas²⁶.

São numerosas as substâncias sulfatadas isoladas de organismos marinhos⁴⁸, estas substâncias parecem estar envolvidas na transferência do enxofre do estado inorgânico para o orgânico, pois somente os ambientes com altas concentrações do íon sulfato produzem organismos capazes de acumular este íon. A sulfatação é também um modo efetivo de tornar

solúveis em água determinadas substâncias, favorecendo assim, sua excreção⁴⁹.

2.2 Substâncias sulfatadas de algas

Dentre os metabólitos sulfatados isolados de macroalgas são muito importantes os já extensivamente estudados polissacarídeos sulfatados⁵⁰, que possuem propriedades gelatinizantes e espessantes, e por isso, razoável valor comercial^{51.52.53}. Eles apresentam também, atividades farmacológicas^{54.55.56}.

São conhecidas poucas substâncias sulfatadas, extraídas de algas, que pertençam a outras classes químicas: apenas um grupo de fenóis sulfatados, alguns lipídeos e dois ribosídeos, relacionados na Tabela 1.

Tabela 1. Substâncias sulfatadas isoladas de macroalgas marinhas.

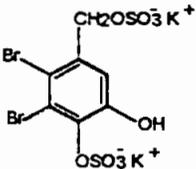
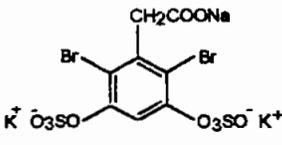
| Substância | Espécie | Classe | Ref. | |
|--|--|----------------------------------|--|-----------|
| <p>1</p>  <p>1' - 4 - dissulfato de potássio do 2,3 - dibromo - 1,4,5 - trihidróxi benzila</p> | <p><i>Brongniartella byssoides</i> <i>Halophtys incurvus</i> <i>Odonthalia corymbifera</i> <i>Polysiphonia brodiaei</i> <i>P. elongata</i> <i>P. fruticulosa</i> <i>P. lanosa [=P. fastigiata]</i> <i>P. nigra</i> <i>P. nigrescens</i> <i>P. thuyoides</i> <i>P. violacea</i> <i>Rhodomeia larix</i> <i>R. subfusca</i> <i>Vidalia volubilis [=Osmundaria volubilis]</i></p> | <p><i>Rodofíceas</i></p> | <p>57 58 59 60 60 60 60 60,61,62,63 60 60 60 60 60 64 60,65 66</p> | |
| | <p>2</p>  <p>3,5 - dissulfato de potássio do 2,6 - dibromo - 3,5 - dihidróxi fenil acetato de sódio</p> | <p><i>Halophtys incurvus</i></p> | <p><i>Rodofíceas</i></p> | <p>67</p> |

Tabela 1: (continuação)

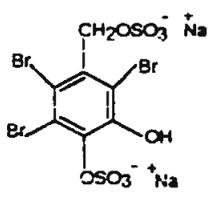
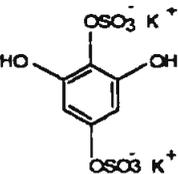
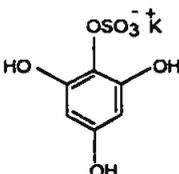
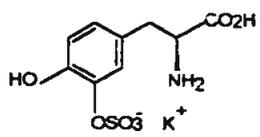
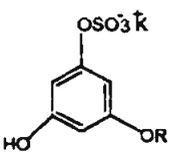
| Substância | Espécie | Classe | Ref. |
|--|---|------------------|---|
| <p>3</p>  <p>1', 4' dissulfato de sódio do 2,3,5 tribromo 1', 4' dihidrobenzole</p> | <i>Symphyclocladia latiuscula</i> | <i>Rodoficea</i> | 68 |
| <p>4</p>  <p>2, 5 - dissulfato de potássio do 1, 2, 3, 5 - tetraidrobenzeno</p> | <p><i>Ascophyllum nodosum</i></p> <p><i>Chorda filum</i></p> <p><i>Dictyota dichotoma</i></p> <p><i>Fucus distichus</i></p> <p><i>F. serratus</i></p> <p><i>F. vesiculosus</i></p> <p><i>Laminaria digitata</i></p> <p><i>L. saccharina</i></p> <p><i>Pelvetia caniculata</i></p> <p><i>Petalonia fascia</i></p> <p><i>Scytosiphon lomentaria</i></p> | <i>Feofíceas</i> | 69,70 70 70 70 70 70 70 70 70 70 70 |
| <p>5</p>  <p>2 - sulfato de potássio do 1, 2, 3, 5 - tetraidrobenzeno</p> | <p><i>Ascophyllum nodosum</i></p> <p><i>Chorda filum</i></p> <p><i>Dictyota dichotoma</i></p> <p><i>Fucus serratus</i></p> <p><i>F. vesiculosus</i></p> <p><i>Himanthalia elongata</i></p> <p><i>Laminaria digitata</i></p> <p><i>L. hiperborea</i></p> <p><i>L. saccharina</i></p> <p><i>Pelvetia caniculata</i></p> <p><i>Petalonia fascia</i></p> <p><i>Scytosiphon lomentaria</i></p> | <i>Feofíceas</i> | 70 70 70 70 70 70 70 70 70 70 70 |
| <p>6</p>  <p>3 - sulfato de potássio da L - 3, 4 - dihidroxifenilalanina</p> | <i>Ascophyllum nodosum</i> | <i>Feofíceas</i> | 71 |
| <p>7</p> <p>8</p>  <p>7. R=H 8. R=SO₃ K</p> <p>7. monossulfato de potássio do floroglucinol</p> <p>8.1,3-dissulfato de potássio do floroglucinol</p> | <i>Pleurophycus gardneri</i> | <i>Feofíceas</i> | 72 |

Tabela 1: (continuação)

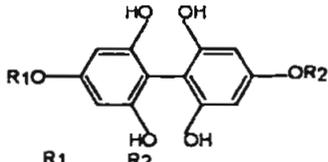
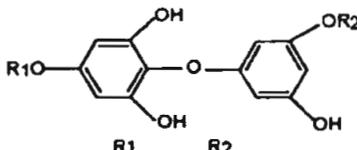
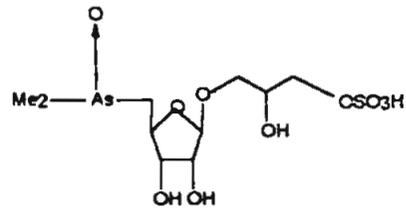
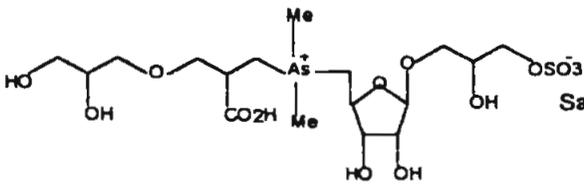
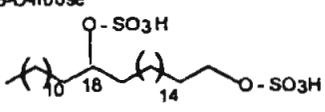
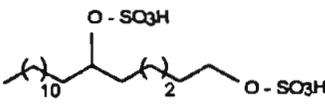
| | Substância | Espécie | Classe | Ref. |
|----------------|---|--|-----------|----------------|
| 9 10 |  <p>9. $\text{SO}_3^- \text{K}^+ \text{H}$ 10. $\text{SO}_3^- \text{K}^+ \text{SO}_3^- \text{K}^+$</p> <p>9,4-sulfato de potássio do 2,4,6,2',4',6'-hexaidroxibenzeno. 10,4,4'-dissulfato de potássio do 2,4,6,2',4',6'-hexaidroxibenzeno</p> | <i>Pleurophycus gardneri</i> | Feofíceas | 72 |
| 11 12 13 |  <p>11. $\text{H}^+ \text{SO}_3^- \text{K}^+$ 12. $\text{SO}_3^- \text{K}^+ \text{H}$ 13. $\text{SO}_3^- \text{K}^+ \text{SO}_3^- \text{K}^+$</p> <p>3'- sulfato de potássio do difloretol 4 - sulfato de potássio do difloretol 4,3'- dissulfato de potássio do difloretol</p> | <i>Pleurophycus gardneri</i> | Feofíceas | 72 |
| 14 |  <p>1-(3'- hidrogenossulfato-2'-hidroxi-propil-1'-oxi) - 5-(dimetil-arsanoxil) - β - D - ribose</p> | <i>Hizikia fusiforme</i> <i>Sargassum lacerifolium</i> <i>Sargassum thunbergii</i> | Feofíceas | 73 74 75 |
| 15 |  <p>1-(3'-hidrogenossulfato-2'-hidroxi-propil-1'-oxi) - 5-(dimetil-(2''-carboxi-5''-oxa-7'',8''-dihidro-hepta-1''-il) arsonil-8-D-ribose</p> | <i>Sargassum lacerifolium</i> | Feofíceas | 74 |
| 16 |  <p>8 - hidrogenodissulfato do 1, 18 - triacontanodiol</p> | <i>Fucus lacerifolium</i> <i>F. vesiculosus</i> <i>Pelvetia caniculata</i> | Feofíceas | 76 76 76 |
| 17 |  <p>1, 6 - hidrogeno - dissulfato do 1, 6 - octadecanodiol</p> | <i>Fucus serratus</i> <i>F. vesiculosus</i> <i>Pelvetia caniculata</i> | Feofíceas | 76 76 76 |

Tabela 1: (continuação)

| Substância | Espécie | Classe | Ref. |
|--|---|------------------|---------------------------|
| <p>18 1,8 - hidrogenodissulfato do 1,8 -eicos - 10 -eno- diol</p> | <p><i>Fucus serratus</i> <i>F. vesiculosus</i> <i>Pelvetia caniculata</i></p> | <p>Feofíceas</p> | <p>75 76 76</p> |
| <p>19. 1,18 - hidrogenodissulfato do 1,18 - triacontanodiol</p> | <p><i>Fucus serratus</i> <i>F. vesiculosus</i> <i>Pelvetia caniculata</i></p> | <p>Feofíceas</p> | <p>76 76 76</p> |
| <p>20 21 1 - palmitato, 2 - linoleato de 3 - O - 6' - sulfato de glicopiranosil propila 1 - palmitato, 2 - linoleato de 3 - O - 3' - sulfato de glicopiranosil propila</p> | <p><i>Fucus serratus</i> <i>F. vesiculosus</i> <i>Pelvetia caniculata</i></p> | <p>Feofíceas</p> | <p>77 77</p> |
| <p>22 1 - palmitato, 2 - linoleato de 3 - O - 6' - sulfato de galactopiranosil glicerol</p> | <p><i>Fucus serratus</i> <i>F. vesiculosus</i> <i>Pelvetia caniculata</i></p> | <p>Feofíceas</p> | <p>77 77 77</p> |
| <p>23 1 - palmitato, 2 - linoleato de 3 - O - [3' - (O - 3'', 8'' - dissulfato de glicopiranosil) - 6' - sulfato de galactopiranosil propila</p> | <p><i>Fucus serratus</i> <i>F. vesiculosus</i> <i>Pelvetia caniculata</i></p> | <p>Feofíceas</p> | <p>77 77 77</p> |

Tabela 1: (continuação)

| Substância | Espécie | Classe | Ref. |
|------------|--|-------------|------|
| | <i>Tydemania expeditionis</i> | Clorofíceas | 78 |
| 24 | 3,28 dissulfato de sódio do cicloartan 3 β,23,28 triol | | |
| 25 | 3,28 dissulfato de sódio do 23 oxocicloartanβ,28diol | | |
| 26 | 3,28 dissulfato de sódio do 23 oxo-cicloart 24en-3β,28 | | |

2.3 Substâncias halogenadas de algas

A vida teve origem nos oceanos; assim os organismos marinhos não só se adaptaram às altas concentrações de sais do ambiente, como passaram a incorporar halogênios a seus constituintes químicos. Estes organismos contêm enzimas, as haloperoxidases^{79.80}, que agregam cloro, bromo, ou iodo a praticamente todas as classes de substâncias, de hidrocarbonetos simples a sofisticados terpenos⁸¹.

Dentre as macroalgas, as rodofíceas são as que apresentam maior aptidão para sintetizar metabólitos secundários bromados; por exemplo, espécies de *Laurencia*, o gênero mais estudado, produzem terpenos bromados usados como marcadores taxonômicos³⁹ e espécies de *Polysiphonia* biossintetizam fenóis bromados²⁶, entre outros.

Os fenóis bromados englobam desde fenóis simples (C₆) a polímeros complexos^{37.82}. Sobre os primeiros existe farta bibliografia^{26.37.82}. O lanosol (éter metílico do álcool 2,3-dibromo-4,5-diidroxibenzílico) está entre os mais amplamente distribuídos dos bromofenóis e é encontrado tanto em micro quanto em macroalgas^{26. 82.83.84} sendo bastante documentado.

Tabela 2 : Oligofenóis de macroalgas marinhas

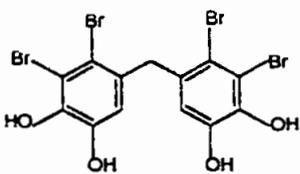
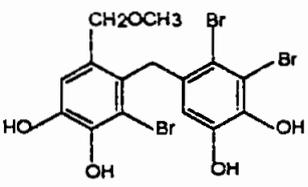
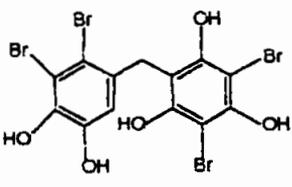
| | Substância | Espécie | Classe | Ref. |
|----|---|---|------------|----------------|
| 27 |  <p>2,2',3,3'-tetrabromo 4,4',5,5'-tetraidroxidifenil metano</p> | <i>Polysiphonia brodiaei</i> <i>P. nigrescens</i> <i>Rhodomela confervoides</i> | Rodofíceas | 85 86 86 |
| 28 |  <p>2, 2', 3, - tribromo 3,4, 4', 5 - tetrahidroxi - 6-metoxidifenilmetano</p> | <i>Rhodomela larix</i> | Rodofíceas | 87 |
| 29 |  <p>2, 3, 3', 5' - tetrabromo - 2', 4, 4', 5, 6' - pentaoidroxidifenilmetano</p> | <i>Rytiptlea tinctoria</i> | Rodofíceas | 88 |

Tabela 2: (continuação)

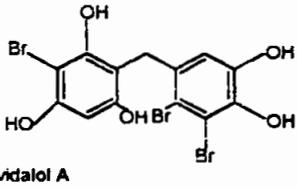
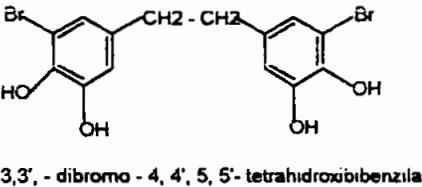
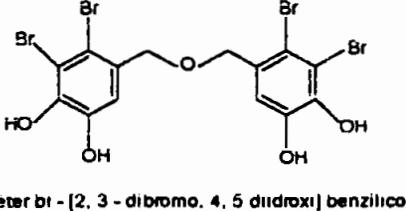
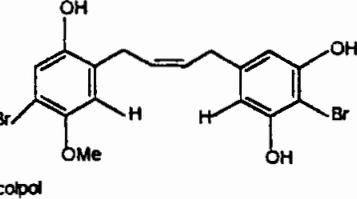
| Substância | Espécie | Classe | Ref. |
|------------|--|--|---------------------|
| 30 |  <p>vidalol A</p> | <i>Vidalia obtusiloba</i> (= <i>Osmundaria obtusiloba</i>) | <i>Rodofícea</i> 89 |
| 31 |  <p>3,3', - dibromo - 4, 4', 5, 5'- tetrahidroxibenzila</p> | <i>Polysiphonia urceolata</i> | <i>Rodofícea</i> 90 |
| 32 |  <p>eter bi - [2, 3 - dibromo, 4, 5 diidroxi] benzilico</p> | <i>Rhodomeia larix</i> | <i>Rodofícea</i> 91 |
| 33 |  <p>colpol</p> | <i>Colpomeria sinuosa</i> | <i>Rodofícea</i> 92 |

Tabela 2: (continuação)

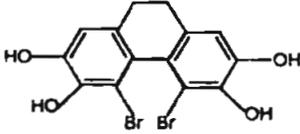
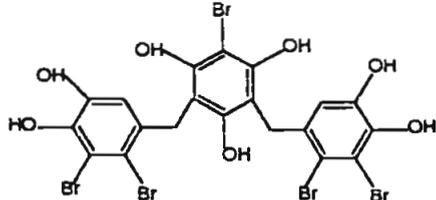
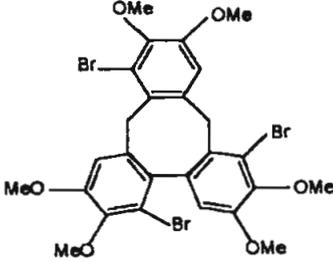
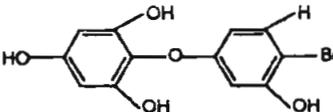
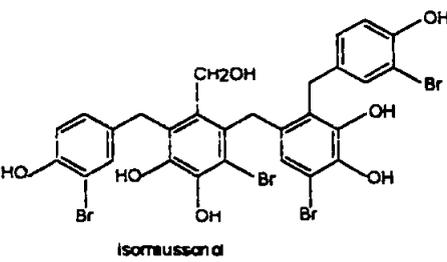
| Substância | Espécie | Classe | Ref. | |
|------------|---|--|------------|----|
| 34 |  <p>polysifendi</p> | <i>Polysiphonia ferulacea</i> | Rodofíceas | 93 |
| 35 |  <p>vidalol B</p> | <i>Vidalia obtusiloba</i> (= <i>Osmundaria obtusiloba</i>) | Rodofíceas | 89 |
| 36 |  <p>octobromoveratrileno</p> | <i>Halopytis</i> <i>pinastroides</i> | Rodofíceas | 94 |
| 37 |  <p>3 - bromo difforetol</p> | <i>Cystophora congesta</i> | Feofíceas | 95 |

Tabela 2: (continuação)

| Substância | Espécie | Classe | Ref. | |
|------------|---------------------------------|--|------------|----------|
| 38 | <p>bromo - trifloretol A1</p> | <i>Cystophora congesta</i> | Feoficea | 95 |
| 39 | <p>bromo - trifloretol A2</p> | <i>Cystophora congesta</i> | Feoficea | 95 |
| 40 | <p>avrainleol</p> | <i>Avrainvillea longicaulis</i> <i>A. nigricans</i> | Cloroficea | 96 97 |
| 41 | <p>5' - hidroxisoavrainleol</p> | <i>Avrainvillea nigricans</i> | Cloroficea | 97 |
| 42 | <p>rawsonol</p> | <i>Avrainvillea rawsonii</i> | Cloroficea | 98 |

Tabela 2: (continuação)

| | Substância | Espécie | Classe | Ref. |
|----|--|------------------------------|-------------|------|
| 43 |  <p>isorraussonol</p> | <i>Avrainvilles rawsonii</i> | Clorofíceas | 99 |

O conhecimento de que halogênios são constituintes de algas remonta aos anos 20; durante a 2ª Guerra Mundial, o bromo foi extraído, em escala industrial, da rodofíceas *Rhodomela larix*¹⁰⁰, rica em bromofenóis^{26.37.87}.

Os bromofenóis apresentam bioatividade: o lanosol é estimulador do crescimento de sementes¹⁰¹ e apresenta também, como outros bromofenóis simples, efeito algicida¹⁰², antiinflamatório¹⁰³ e antibiótico⁶⁰.

Entre os oligômeros, o vidalol A e o vidalol B apresentam atividade antiinflamatória⁸⁹; o raussonol e o isorraussonol são inibidores da biossíntese do colesterol^{98,99}; o colpol é citotóxico⁹² e o avrainvileol tem propriedades antifitofágicas⁹⁶.

Os oligômeros de estrutura baseada no floroglucinol (37,38 e 39) formam, com polímeros de mesma origem e alto peso molecular, os florotaninos, exudados pelas algas pardas para adesão algal ao substrato¹⁰⁴. Os florotaninos estão contidos em vesículas chamadas fisóides; apresentam atividades antibacteriana, antilarval, antialgal, antifitofágica e podem

quelar íons de metais pesados¹⁰⁵ o que torna as algas pardas indicadores de poluição¹⁰⁶. Esse material fenólico, após ser liberado pelas algas, vai constituir os compostos húmicos marinhos, dos quais o 2,5-dissulfato de potássio do 1,2,3,5-tetraidroxibenzeno (4) é considerado precursor^{69,70}.

Biossíntese de substâncias fenólicas

A origem biossintética da grande maioria das substâncias fenólicas é indicada pelo seu padrão de hidroxilação. Caso a biossíntese tenha ocorrido via ácido chiquímico, o precursor-chave é a fenilalanina ou a tirosina; os monofenóis resultantes são p-hidroxilados e os polifenóis, o-di ou 1,2,3 triidroxilados. Eles podem assemelhar-se ao catecol, ou à hidroquinona, ou ao pirogalol, dependendo do grau de hidroxilação^{37,42,107}.

Na biossíntese via acetato, os fenóis formam-se pela condensação cabeça-cauda de quatro unidades de acetato, ocorrendo, em adição à ciclização, reações de descarboxilação, redução e oxidação. As substâncias assim obtidas são meta-hidroxiladas e dependendo do número de hidroxilas presentes, repetem o padrão do resorcinol ou do floroglucinol^{37,42,107}.

A bromação ocorre depois da construção do anel aromático sendo mediada por enzimas, as bromoperoxidases, das quais se conhecem duas classes: as FeHeme - bromoperoxidases (Fe-BrPO) e as vanádio bromoperoxidases (V-BrPO), estas últimas mais abundantes do que as anteriores¹⁰⁸. As bromoperoxidases catalisam a oxidação do brometo por peróxido de hidrogênio, em um processo concomitante com a halogenação de substratos orgânicos adequados^{108,109,110}.

A condensação de anéis fenólicos biossintetizados por rotas iguais ou distintas dá origem aos oligofenóis; entretanto, são poucos os estudos sobre estas condensações ⁸⁵.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- a) realizar o estudo químico da rodofícea marinha bentônica *Vidalia obtusiloba* [= *Osmundaria obtusiloba* (C. Agardh) R.E.Norris)], visando o isolamento e identificação ou elucidação estrutural de metabólitos secundários e primários;
- b) situar estas substâncias com relação aos padrões quimiotaxonômicos já existentes.

4. A ALGA

4.1. Classificação de *Osmundaria*.

A alga *Osmundaria obtusiloba* (= *Vidalia obtusiloba*) objeto deste estudo, pertence a:

Divisão: Rodophyta;
Classe: Florideophyceae;
Ordem: Ceramiales;
Família: Rhodomelaceae;
Gênero: *Osmundaria*;
Espécie: *obtusiloba*.

4.2. Descrição do material botânico.

[*Osmundaria obtusiloba* (C.Agardh) R. E. Norris] (= *Vidalia obtusiloba* C. Agardh)

Plantas eretas com consistência cartilaginosa, cor marrom, tornando-se negras ao secarem, com 10-15 cm de altura e 3-4 mm de largura nos ramos principais. Apressório espesso, discóide, com cerca de 1 cm de diâmetro, de onde saem ramos em forma de fita. Fitas com ramificação alterno-irregular, com nervura mediana, margens lisas, ápices enrolados. Espessura na região apical dos ramos de cerca de 140 μm e na região mediana dos ramos de cerca de 220 μm . Em corte transversal, região cortical com uma camada de células pigmentadas e duas camadas de células medulares, pericentrais, em número de 8

nos ramos adultos, sendo as duas dorsais e as duas ventrais de tamanho menor que as laterais. Tetrásporangios em ramos curtos, curvados, situados nas margens dos ramos, próximo ao ápice ou situados em proliferações da nervura. A população analisada era formada somente por plantas tetráspóricas (Figuras 2 a 4, p. 21).

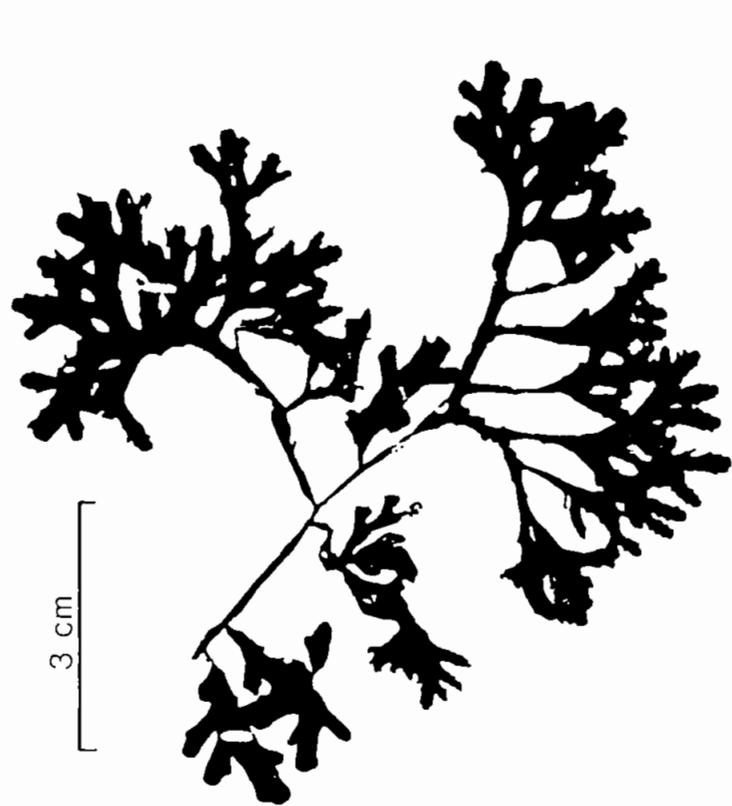
O gênero *Osmundaria* compreende várias espécies que ocorrem em regiões tropicais, subtropicais e temperadas-quente dos oceanos.

O material utilizado neste estudo foi coletado pela Dr^a Sílvia M.P.B. Guimarães, IBt- SMA, em 03 de setembro de 1994 e em 10 de junho de 1995, crescendo sobre o arenito da praia de Parati, município de Anchieta, Estado do Espírito Santo. As plantas formavam uma população grande e densa, em local batido, ficando expostas durante as marés baixas. Parte do material estudado foi herborizado de acordo com as técnicas usuais em ficologia e encontra-se depositado no Herbário Maria Eneida P.K. Fidalgo, do Instituto de Botânica (SP 317580 e SP 317581 respectivamente).

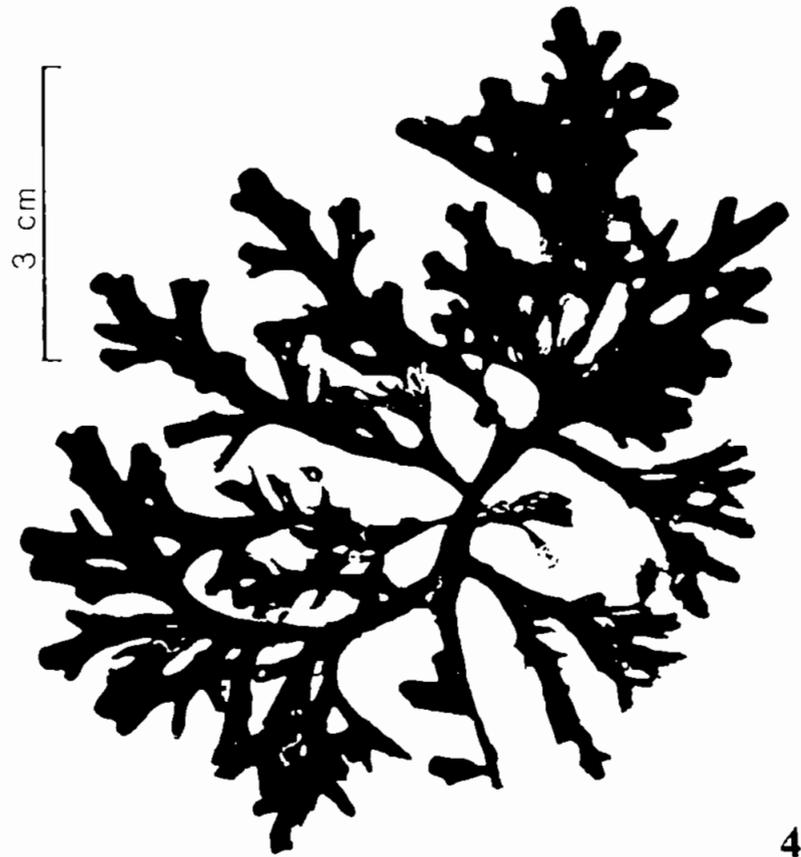
Esta espécie ocorre desde o litoral do Estado do Rio de Janeiro até o litoral do Estado do Ceará e tem sido referida na literatura brasileira como *Vidalia obtusiloba*¹¹¹. Recentemente, Norris transferiu as espécies de *Vidalia* para *Osmundaria*, que, de acordo com este autor, é o nome mais antigo, tendo prioridade¹¹². Desta maneira, as plantas brasileiras devem ser referidas como *Osmundaria obtusiloba* (C. Agardh) R.E.Norris; neste trabalho continua-se a denominá-la de *Vidalia* em virtude da literatura, até o momento, referir-se ‘a espécie com este nome.



2



3



4

Figuras 2 - 4 . Hábito de *Osmundaria obtusiloba* (= *Vidalia obtusiloba*).

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1- Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos

O material vegetal foi coletado em 03 de Setembro de 1994, em Parati (E. S.) pela pesquisadora da Seção de Ficologia do IBt- SMA, D. Silvia M. P. B. Guimarães que também realizou a identificação da planta.

Exemplares do espécimen vegetal coletado encontram-se depositados no herbário da referida Seção de Ficologia, sob o número SP 317880.

As plantas coletadas, após serem lavadas e secas a sombra, foram moídas, pesadas (278 g) e extraídas a frio, com metanol, até esgotamento (cerca de 1,5 L por extração).

O extrato metanólico obtido foi concentrado sob pressão reduzida até consistência pastosa (23,0 g): uma solução de MeOH/H₂O (9:1) deste extrato foi submetida a partições sucessivas com hexano, diclorometano e acetato de etila, dando origem às frações VH (Vidalia-hexano), VD (Vidalia-diclorometano), VAC (Vidalia- acetato de etila) e VM (Vidalia-metanol).

Quando o concentrado do extrato metanólico foi submetido à partição em hexano, houve formação do precipitado VP (Vidalia-precipitado), que foi separado, seco à temperatura ambiente e pesado.

O solvente das fases orgânicas obtidas no processo de partição, foi eliminado sob pressão reduzida obtendo-se:

5,4g da fase hexânica - VH;

3,2g da fase diclorometânica - VD;

2,3g da fase em acetato de etila - VAc;

7,0g da fase metanólica - VM e
4,3g de precipitado- VP.

5.2- Fracionamentos dos Extratos Obtidos.

A (Figura 5, p.26) mostra o esquema do fracionamento dos concentrados (VH,VD, VAc, VM, VP); neste esquema, foram indicadas apenas as frações investigadas. As demais não foram analisadas porque os respectivos espectros de RMN ^1H e/ou cromatogramas em CCDC não mostraram evidência das substâncias-alvo (ou seja, que revelassem com sulfato cérico¹¹³, fluoresceína¹¹⁴ e FeCl_3 ¹¹⁵ ou apresentaram-se em quantidades insuficientes para permitir seu estudo.

5.3- Fracionamento de VH (extrato hexânico)

O espectro de RMN ^1H de VH mostrou que este extrato era constituído predominantemente por substâncias de natureza graxa (Figura 6, p.118); após análise por CCDC de sílica, com fases móveis de diferentes forças de eluição e os reveladores vapores de iodo, sulfato cérico¹¹³, fluoresceína¹¹⁴, e irradiação no UV (254 e 356 nm) foi selecionada, para fracionar VH, a seqüência de operações descritas a seguir (Figura 7, p.27).

A quantidade de 1,31g de VH foi aplicada sobre coluna aberta de sílica, tendo sido empregada a técnica de eluição por gradiente de solventes, no caso, o diclorometano e o metanol. Foram coletadas uma fração de 40 mL e 112 de 10mL cada. Essas frações foram analisadas por

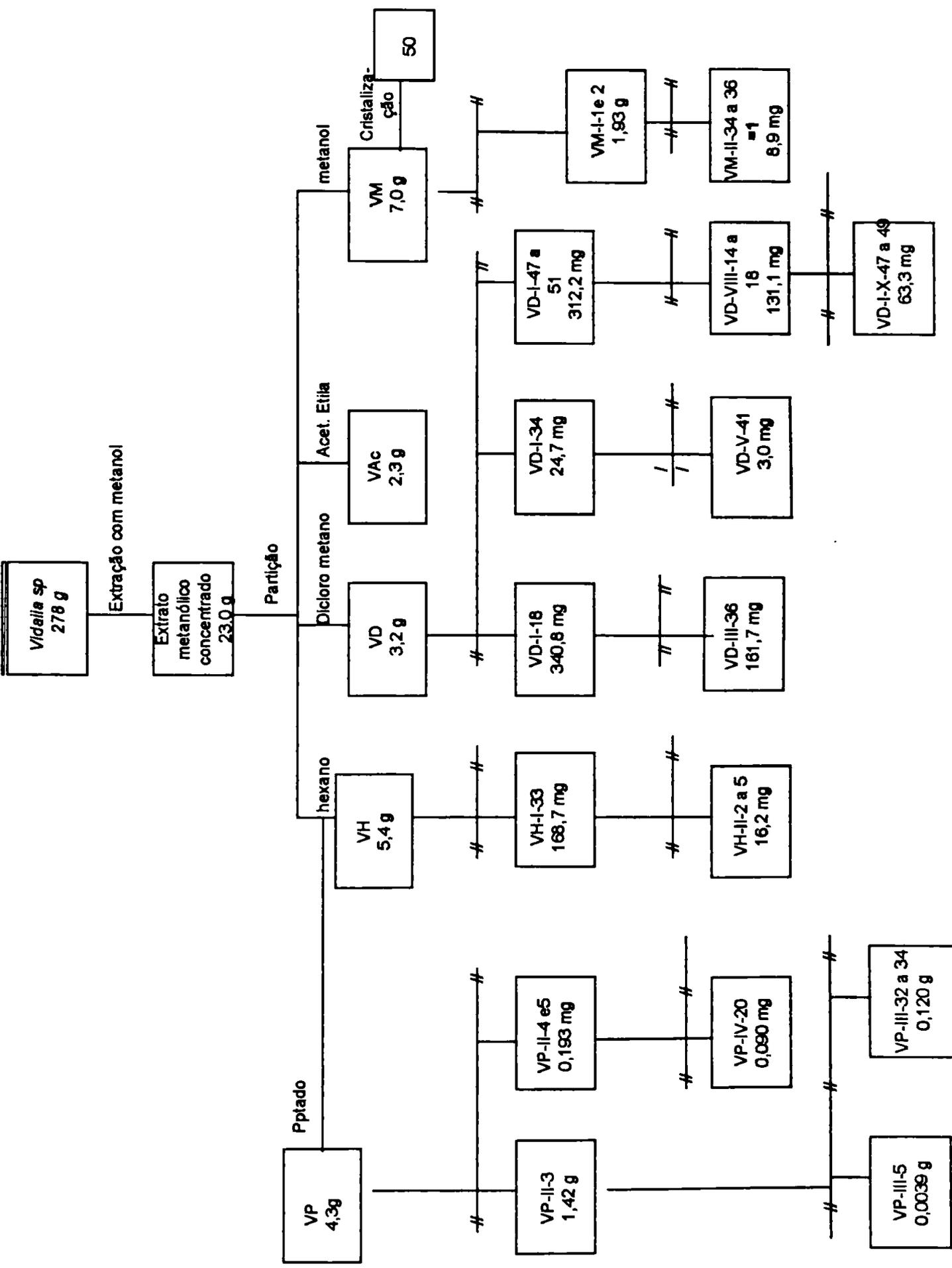


Figura 5. Esquema de fracionamento dos extratos VH, VD, VAc, VM e VP.

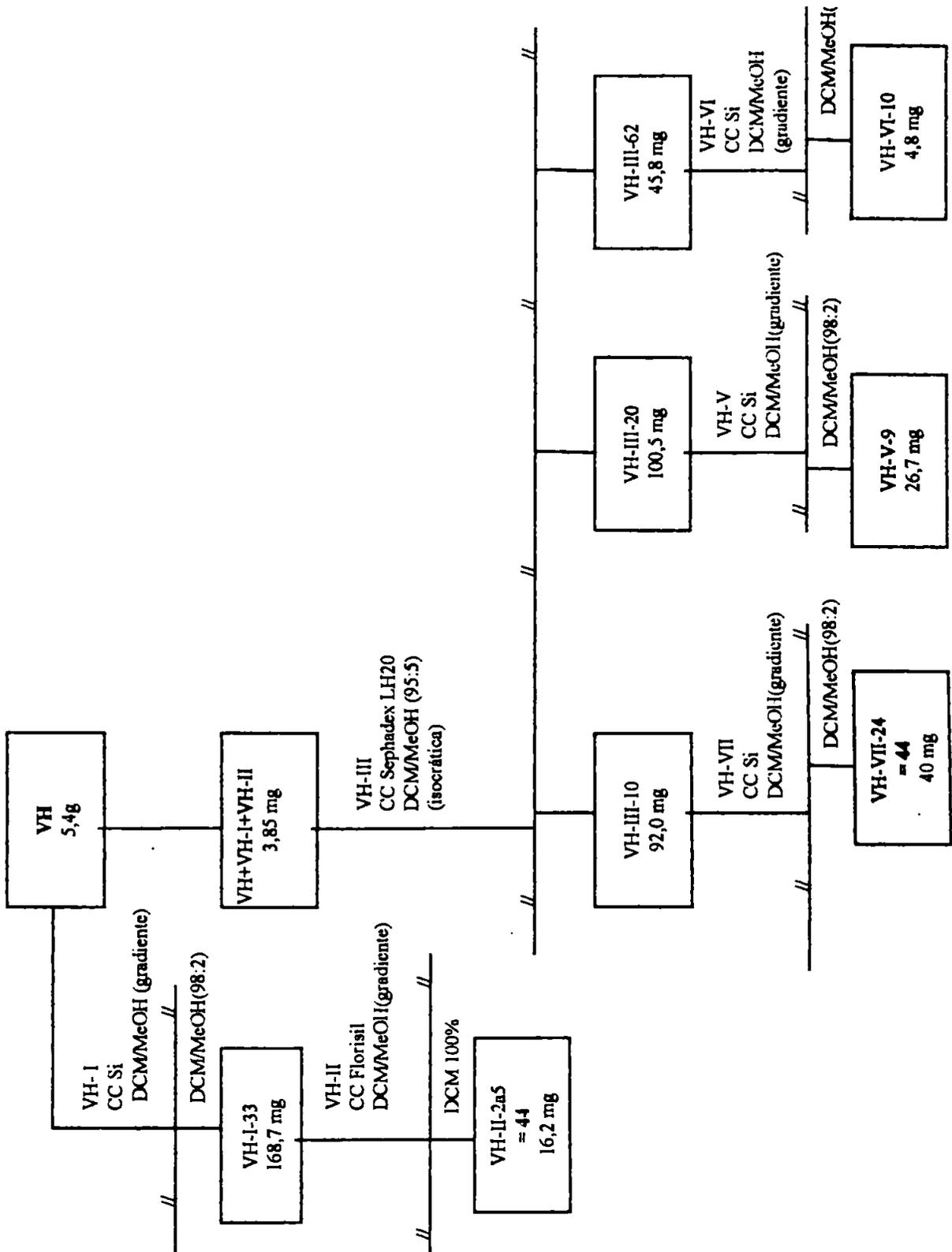


Figura 7. Esquema de fracionamento do extrato hexânico VH .

CCDC de sílica, usando-se os mesmos reveladores acima citados; somente a fração VH-I-33 (168,7 mg) eluída com DCM/MeOH (98:2) apresentou resultados promissores. As demais eram constituídas apenas por material graxo.

Os componentes da fração VH-I-33 foram separados em CC de Florisil, utilizando-se novamente a técnica de eluição por gradiente de solventes e o mesmo par de eluentes (DCM/MeOH). Foram recolhidas 50 frações de 15 mL cada.

As frações VH-II-2 a VH-II-5, submetidas a CCDC de sílica, mostraram ser idênticas, o que pode ser comprovado por espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C . Elas foram reunidas e concentradas sob pressão reduzida fornecendo 16,2 mg de material sólido cristalino, constituído por um único componente, o qual foi identificado como sendo o esteróide 24-metilenocolest-5-en-3- β -ol (44).

Com o intuito de obter maior quantidade da substância 44 e ampliar o estudo de VH, reiniciou-se a análise deste material. Como o interesse desta pesquisa recaía também sobre a possível existência de outros terpenóides, em *Vidalia*, fazia-se necessária uma análise mais detalhada da fase hexânica.

À porção remanescente do concentrado VH foram agregadas as frações não estudadas de VH-I e VH-II.

Este material foi submetido ao fracionamento cromatográfico detalhado na (Figura 7, p. 27) onde novamente estão indicadas somente as frações trabalhadas.

Constou este fracionamento de uma separação efetuada por CC de Sephadex LH-20, isocrática, sendo a fase móvel constituída por

DCM/MeOH (95:5). Foram recolhidas 1 fração de 40 mL e 103 de 4mL cada.

A análise por CCDC das frações obtidas indicou que estas eram formadas somente por material graxo, não havendo indícios da presença de terpenóides; apenas a fração VH-III-10 apresentou indicação da presença de esterol, quando tratada com sulfato cérico¹¹³.

Assim, porque se apresentavam em maior quantidade, foram selecionadas para posterior estudo, além de VH-III-10, as frações VH-III-20 e VH-III-62 que foram coletadas nos eluentes DCM/MeOH (95:5), DCM/MeOH (95:5) e DCM/MeOH (90:10).

5.3.1- Estudo de VH-III-10

O isolamento do esteróide contido em VH-III-10 (92,0 mg) decorreu de separação cromatográfica em CC de sílica, eluída com gradiente de DCM/MeOH. Foram colhidas 1 fração de 30 mL e 60 de 8 mL. O estudo por CCDC das frações eluídas mostrou que todas, exceto VH-VII-24 eram constituídas por material graxo. Na fração VH-VII-24 ficou evidenciada a presença de esteróide que, por comparação cromatográfica e posteriormente RMN ¹H e ¹³C mostrou ser o 24 metilenocolest-5-en-3β-ol (44), já isolado anteriormente.

5.3.2- Estudo de VH-III-20

A separação dos componentes da fração VH-III-20 foi realizada de modo semelhante ao descrito para a fração VH-III-10: o material foi submetido à CC de sílica usando-se gradiente de DCM/MeOH para a eluição. As 30 frações de 20 mL obtidas no fracionamento foram analisadas por CCDC e das que continham maior quantidade de material obtiveram-se espectros de RMN ^1H . Não havendo indícios da presença de outras substâncias além de material graxo, em nenhuma das frações, foi escolhida para posterior estudo VH-V-9 [DCM/MeOH-(98:2)], por conter maior quantidade de material.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C de VH-V-9 (26,7 mg) (Figuras 8 e 9, p.119 e 120) indicaram a presença de mistura de ácidos graxos; assim, após esterificação com diazometano, a fração VH-V-9 foi analisada em sistema CG-EM e seus componentes identificados por comparação com dados da literatura ¹¹⁶.

Nos espectro de massas obtidos, observou-se a presença de palmitato de metila, oleato de metila e estearato de metila (Figura 10, p.121), originados por esterificação dos ácidos palmítico, oleico e esteárico, respectivamente.

5.3.3. Estudo de VH-III-62

Para o fracionamento de VH-III-62 (45,8mg) foi empregado o mesmo tratamento cromatográfico que para as frações VH-III-10 e VH-III-20; as 30 frações obtidas (5mL cada) foram estudadas por CCDC de sílica, com diversas fases móveis. A ausência de terpenóides e a quantidade insuficiente de material apresentada pelas frações eluídas, restringiram este estudo à análise da fração VH-VI-10-[DCM:MeOH(95:5)] (4,8 mg).

A fração VH-VI-10, mistura de ácidos graxos e composto fenólico, (Figuras 11, 12 e 13 p.122, 123 e 124), foi metilada com diazometano e analisada em sistema CG-EM. Os espectros obtidos, aliados a dados da literatura, evidenciaram as presenças de ácido oleico e ácido mirístico além de um terceiro componente, o éter metílico do composto 2,3 dibromo-1-metoximetil-4,5-benzenodiol (α -O-metil-lanosol=46) que será visto, em detalhe, no estudo da fração VD-III-36.

5.4. Fracionamento de VD (fase diclorometânica)

A análise por CCDC, empregando-se como reveladores sulfato cérico¹¹³, cloreto férrico¹¹⁵ e irradiação no UV (254 e 356 nm) mostrou que o concentrado da fase VD era formado por substâncias fenólicas e de natureza graxa.

Visando o isolamento das substâncias fenólicas, VD foi submetido ao processo de fracionamento indicado na Figura 14 (p.33). Iniciou-se a separação dos componentes de VD em coluna aberta de gel de Sílica, empregando-se, como eluentes, o sistema de solventes DCM/MeOH (99:2), seguido do sistema DCM/AcOEt/MeOH, em proporções variando de 93:5:2 até 25:25:50.

Foram coletadas 110 frações de 100 mL cada. As frações cujas composições mostraram-se semelhantes por CCDC foram reunidas.

Foram selecionadas para estudo as frações VD-I-18, VD-I-34 e VD-I-47 a 51, eluídas respectivamente com DCM/MeOH (98:2), DCM/AcOEt/MeOH (88:10:2) e DCM/AcOEt/MeOH (47,5:47,5:5).

5.4.1- Estudo de VD-I-18

O estudo por CCDC da fração VD-I-18 indicou ser esta constituída predominantemente por substância fenólica, que foi isolada por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, usando-se como fase móvel

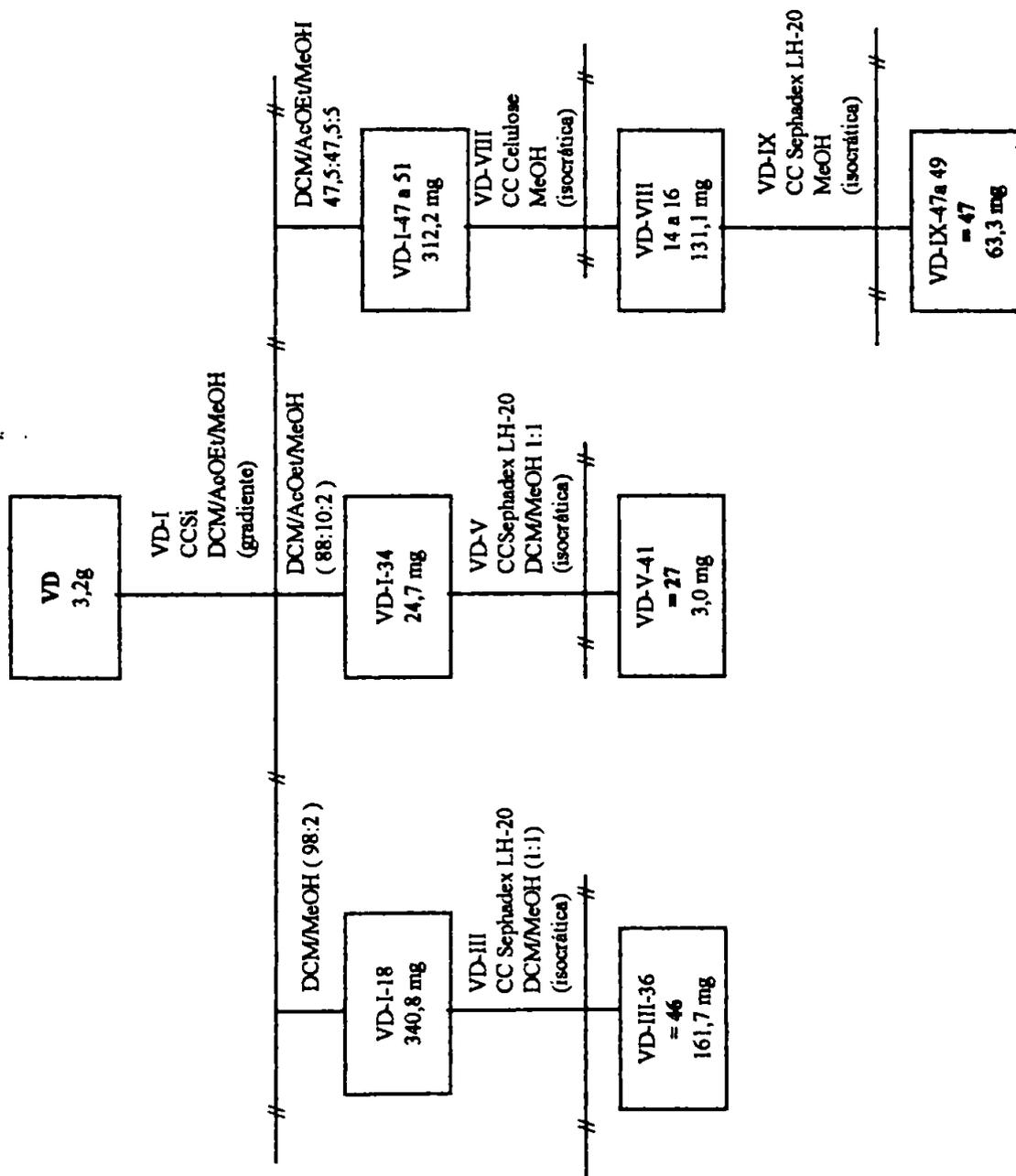


Figura 14. Esquema de fracionamento do extrato diclorometânico VD

o sistema de solventes DCM/MeOH (1:1). Foram recolhidas 42 frações de 4 mL cada; da subfração VD-III-36, após eliminação do solvente a pressão reduzida, foram obtidos 161,7 mg da substância, 46 o fenol bromado α -O metil lanosol .

5.4.2- Estudo de VD-I-34.

A fração VD-I-34 (24,7 mg) que continha, em mistura, uma substância fenólica, foi submetida a CC de Sephadex LH-20, utilizando-se como fase móvel o sistema de solventes DCM/MeOH (1:1). As frações obtidas, em número de 42, foram recolhidas em alíquotas de 4 mL. A fração VD-V-41 mostrou, por CCDC, conter uma única substância, o oligo-fenol bromado 27 (3,0 mg).

5.4.3- Estudo de VD-I- 47 a 51.

As frações VD-I-47 a 51 reunidas (313,2 mg) foram submetidas a fracionamento cromatográfico em coluna de celulose, sendo a fase móvel constituída por MeOH (100%). Foram coletadas alíquotas de 5 mL. As frações VD-VIII- 14 a 16 continham substância fenólica além de apresentarem semelhança quando submetidas a CCDC; por isso foram reunidas (131,1 mg) e submetidas a CC de Sephadex LH-20, usando-se como fase móvel o metanol, o que resultou na obtenção da substância fenólica pura 47, eluída nas frações VD-IX-47 a 49 (63,3 mg) .

5.5 Análise da Fase em Acetato de Etila

O concentrado da fase em acetato de etila era constituído principalmente por substâncias polares, como pode ser observado pelos sinais entre 3,0 e 4,0 δ , no espectro de RMN ^1H de VAc (Figura 15, p. 125). Seu estudo por CCDC de fase reversa e de celulose foi dificultado pela ausência de resposta aos reveladores usuais para cromatografia e entre estes estão: vapores de iodo, sulfato cérico¹¹³, fluoresceína¹¹⁴, ninidrina¹¹⁷ e irradiação no UV (254 e 356 nm).

O concentrado de VAc foi submetido à CC de gel de Sílica, usando-se, como eluente, MeOH 100 %; a análise das frações obtidas mostrou a presença de frações contendo pequenas quantidades de ácidos graxos, como a fração VAc-I-10 (Figura 16, p.126) e outras contendo misturas complexas que não foram analisadas.

5.6 Fracionamento da fase metanólica (VM)

Devido à solubilidade de VM e ao seu espectro de RMN ^1H , em H_2O , (Figura 17, p.127) optou-se por submetê-la a uma pré purificação em Amberlite-XAD-2, usando-se como fase móvel a seqüência de solventes sugerida por Piertrzyk¹¹⁸. As 38 frações originadas neste procedimento foram concentradas, liofilizadas e pesadas (Figura 18, p.37).

5.6.1. Estudo de VM-I-1 e VM-I-2

Estas duas frações eluídas em água, foram reunidas porque apresentaram perfis cromatográficos semelhantes em estudo realizado em fases estacionária de celulose (papel Whatmann No.1 e placas comparativas sendo utilizados como fases móveis os eluentes $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (95:5), $\text{Bu}/\text{Ac.Acet.}/\text{H}_2\text{O}$ (5:1:4) e $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ (68:32:8). Fluoresceína¹¹⁴, benzidina¹¹⁹ e ninidrina¹¹⁷ foram os reveladores empregados.

O material reunido, extremamente higroscópico e com peso aproximado de 3g, foi submetido a fracionamento por peso molecular em Sephadex G10-Fine.

Foram recolhidas uma fração de 10 mL e 45 de 3 mL que foram analisadas cromatograficamente empregando-se fases estacionárias e móveis e reveladores iguais aos descritos para os materiais de origem VM-I-1 e VM-I-2 (Figura 18, p.37).

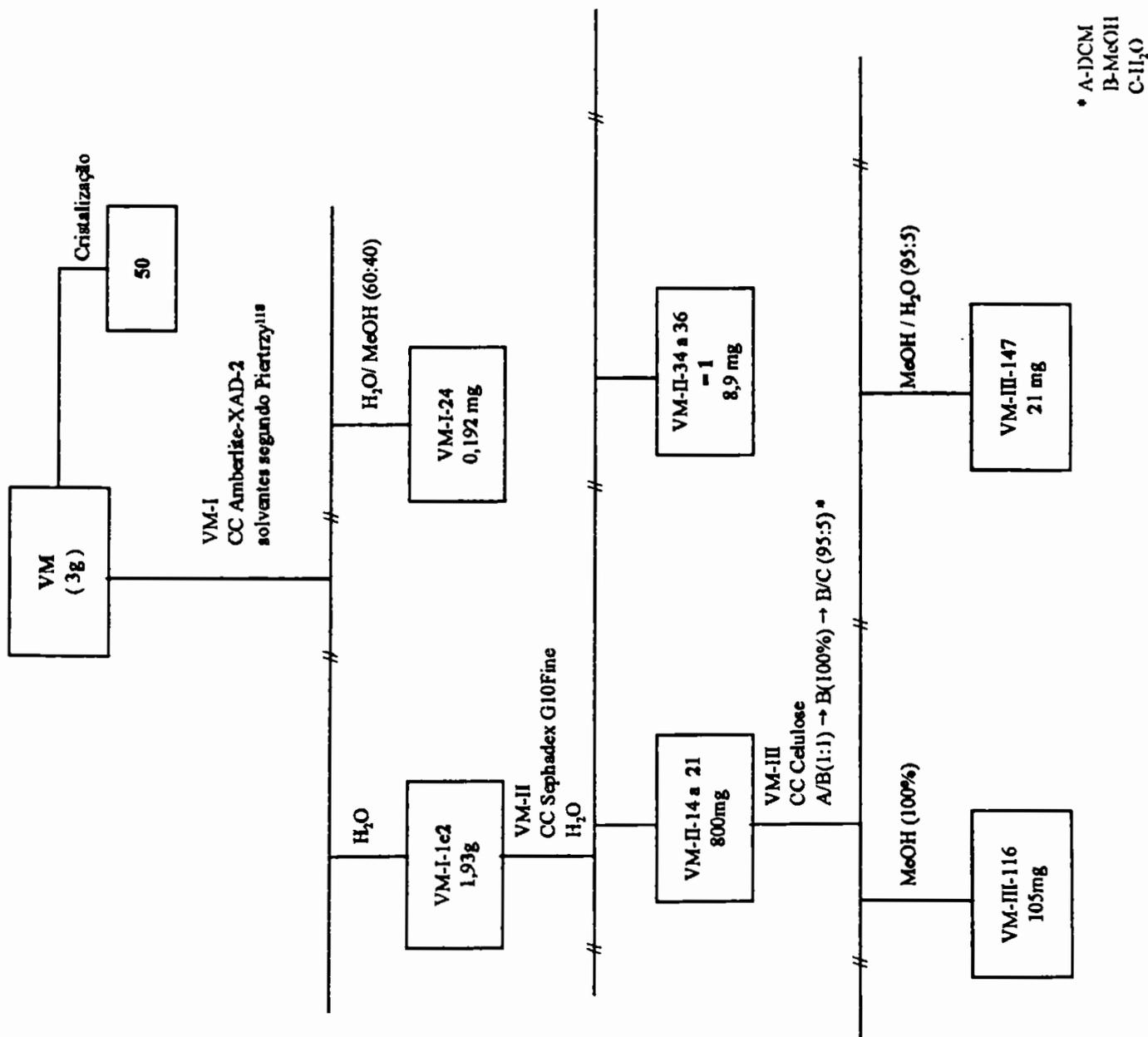


Figura 18. Esquema de fracionamento do concentrado da fase metanólica VM.

5.6.2. Estudo de VM-II-14 a VM-II-21

As frações VM-II-14 a VM-II-21, higroscópicas, mostraram-se equivalentes, sendo por isso reunidas (peso aproximado de 2,5g). Após testes preliminares em CCDC de celulose e em papel Whatmann no. 1, o material resultante dessa reunião foi submetido a CC de celulose eluída com MeOH/H₂O (95:5), (Figura 18, p.37).

Deste fracionamento resultaram 170 frações de 5 mL cada, cujas análises em CCDC de celulose e em diversas fases móveis combinadas ao uso de reveladores tais como ninidrina, fluoresceína e iodo, indicaram a presença de substâncias alifáticas bromadas, aminoácidos e aminas. Os espectros de RMN ¹H e ¹³C das frações VM-III-116 e VM-III-147 (Figuras 19,20,21 e 22, p.128, 129, 130 e 131) indicam a presença de aminoácidos .

5.6.3. Estudo de VM-II-36

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C de VM-II-36 levaram à constatação da presença de um único componente nessa fração: a substância 1 (1',4-dissulfato de potássio do álcool 2,3-dibromo-1',4,5-triidroxibenzílico).

5.6.4. Estudo de VM-I-24

A fração VM-I-24 (0,192 g), eluída com MeOH/H₂O (60:40), apresentou-se como material sólido, cujos espectros de RMN ¹H e ¹³C (Figuras 23 e 24, p.132 e 133) indicaram a presença de substâncias de interesse, as quais não foram ainda identificadas.

5.6.5. Cristalização da substância 50

Essa substância cristalizou do extrato bruto VM, sendo separada por filtração e enviada para a cristalografia. Entretanto a quantidade de material obtida foi insuficiente para análises espectrométricas.

5.7. Fracionamento de VP

Análises preliminares de VP por CCDC de sílica e de celulose, com diferentes fases móveis, apontaram o sistema celulose - MeOH/H₂O (95:5) como o de melhor resolução. Entretanto o fracionamento de VP, em coluna, nessas condições, resultou insatisfatório (Figura 25,p.41).

A subsequente tentativa de fracionamento de VP foi baseada em sua solubilidade em H₂O; foi utilizada, como fase estacionária, Amberlite XAD-2 e como fase móvel, a seqüência de eluentes proposta por Piertrzyk¹¹⁸ (Figura 25, p.41).

Optou-se por recolher o primeiro eluente, no caso — H₂O, em 10 alíquotas de 150 mL cada. Os demais eluentes foram coletados em fração única de 300 mL. Foram recolhidas, no total, 30 frações, que após terem sido concentradas a baixa pressão, foram liofilizadas, pesadas e analisadas por espectroscopia de RMN ¹H. As frações VP-II-3, VP-II-4 e VP-II-5, eluídas em H₂O, mostraram-se promissoras. As demais constituíam misturas muito complexas cujos componentes apresentavam-se não reativos frente aos reveladores normalmente usados em CCDC ou ainda em quantidades insuficientes para permitirem a continuidade de seus estudos.

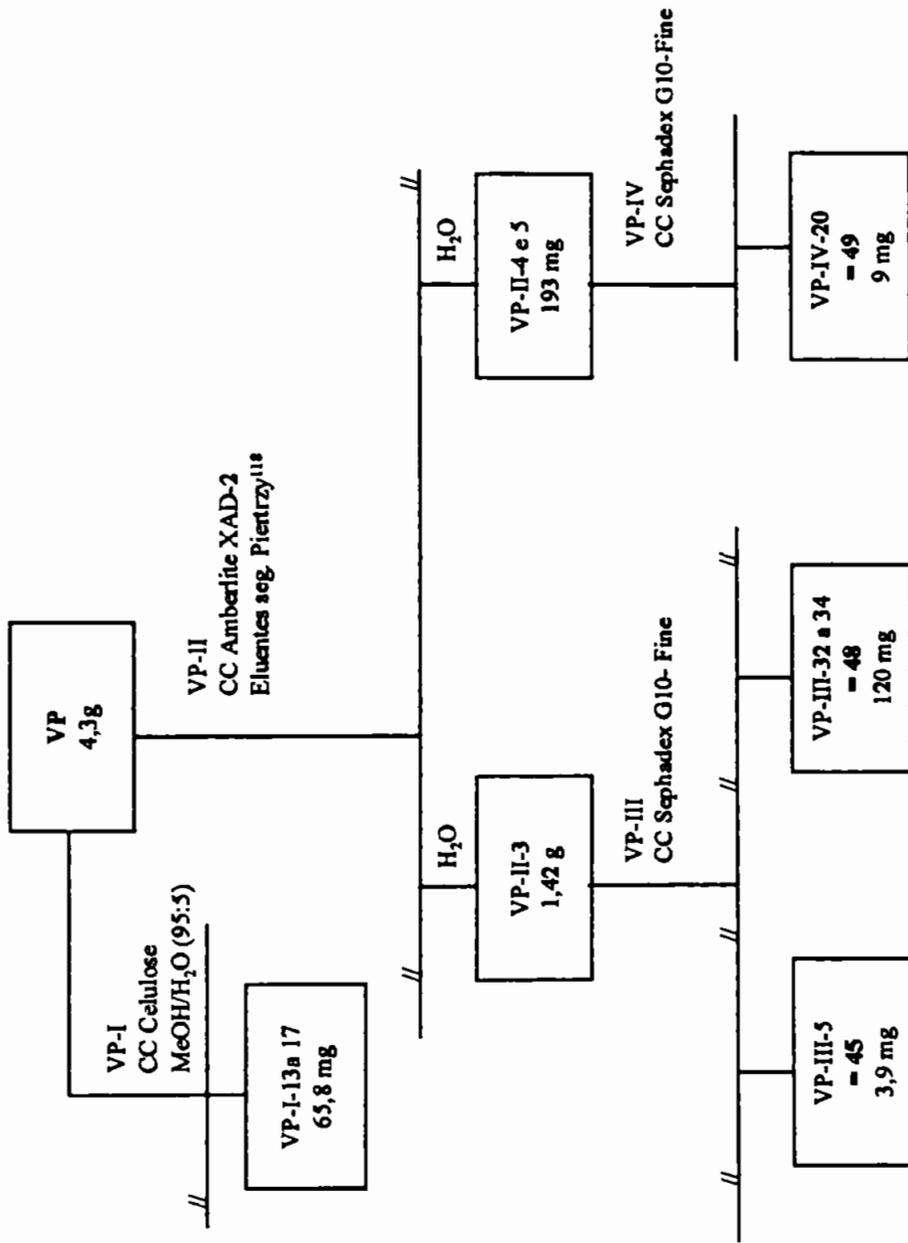


Figura 25. Esquema do fracionamento do precipitado VP

5.7.1. Estudo de VP-II-3.

Com o objetivo de separar seus componentes por peso molecular e devido a sua alta solubilidade em H₂O, o material VP-II-3 foi submetido à CC de Sephadex G10-Fine. Foram obtidas 37 subfrações de 3mL, que foram liofilizadas e pesadas. Entretanto, a análise destas subfrações por CCDC, mostrou-se inexecutável devido à insolubilidade destas em solventes orgânicos e à ausência de reatividade das mesmas ante os reveladores usuais para cromatografia (Figura 25, p.41).

Deste procedimento resultou o isolamento de duas substâncias: o glicérido contido na fração VP-III-5 (45) e o oligofenol bromado e sulfatado das frações VP-III-32 a 34 (48), o que foi constatado por espectros de RMN ¹H.

5.7.2. Estudo de VP-II-4 e 5.

As frações VP-II-4 e VP-II-5 mostraram-se iguais quando analisadas por RMN ¹H, sendo reunidas; para separar seus componentes, optou-se por cromatografia por peneiramento molecular, empregando-se Sephadex G10-Fine, como fase estacionária. Foram obtidas 33 subfrações de 5 mL cada, cujas análises espectroscópicas de RMN ¹H indicaram que as subfrações de VP-IV-18 a VP-IV-21 continham a mesma substância em mistura, sendo exceção VP-IV-20 (49) em que a substância apresentou-se pura (Figura 25, p.41).

5.8 Reestudo de *Vidalia*.

Com o objetivo de verificar a possível existência de outras substâncias de interesse (terpenóides e outros fenóis bromados) além da presença das já isoladas de *Vidalia* , iniciou-se o estudo de nova porção dessa alga.

O material vegetal foi coletado em 10 de junho de 1997, no litoral do Espírito Santo; depois de seco à temperatura ambiente, moído e pesado (640g), foi extraído a frio sucessivamente com hexano (VdH), diclorometano (VdD), metanol (VdM) e etanol/água (80:20) (VE).

As extrações foram realizadas a frio, com 3 alíquotas de 2L de cada solvente. Os extratos foram concentrados a pressão reduzida e os pesos obtidos estão indicados na Tabela 3 (p.45).

Os concentrados VdH e VdD, após adição de MeOH/H₂O (9:1) foram submetidas a partição com hexano, dando origem às fases VdH-hex, VdH-met , VdD-hex e VdD-met. As etapas e os componentes desses processos podem ser observados na Figura 26 (p. 44).

Os pesos das fases VdH-hex, VdH-met, VdD-hex e VdD-met, obtidos após eliminação do solvente sob pressão reduzida, estão discriminados na Tabela 3 (p.45).

O extrato metanólico VdM, após adição de metanol/água (5:1), foi submetido a partições sucessivas com hexano e diclorometano. Houve formação de precipitado, quando o hexano foi misturado ao concentrado metanólico. Os pesos das frações, obtidos após eliminação dos solventes à pressão reduzida, seguida de liofilização, estão na Tabela 3 e as etapas de todo o processo, esquematizadas na Figura 26 (p.44).

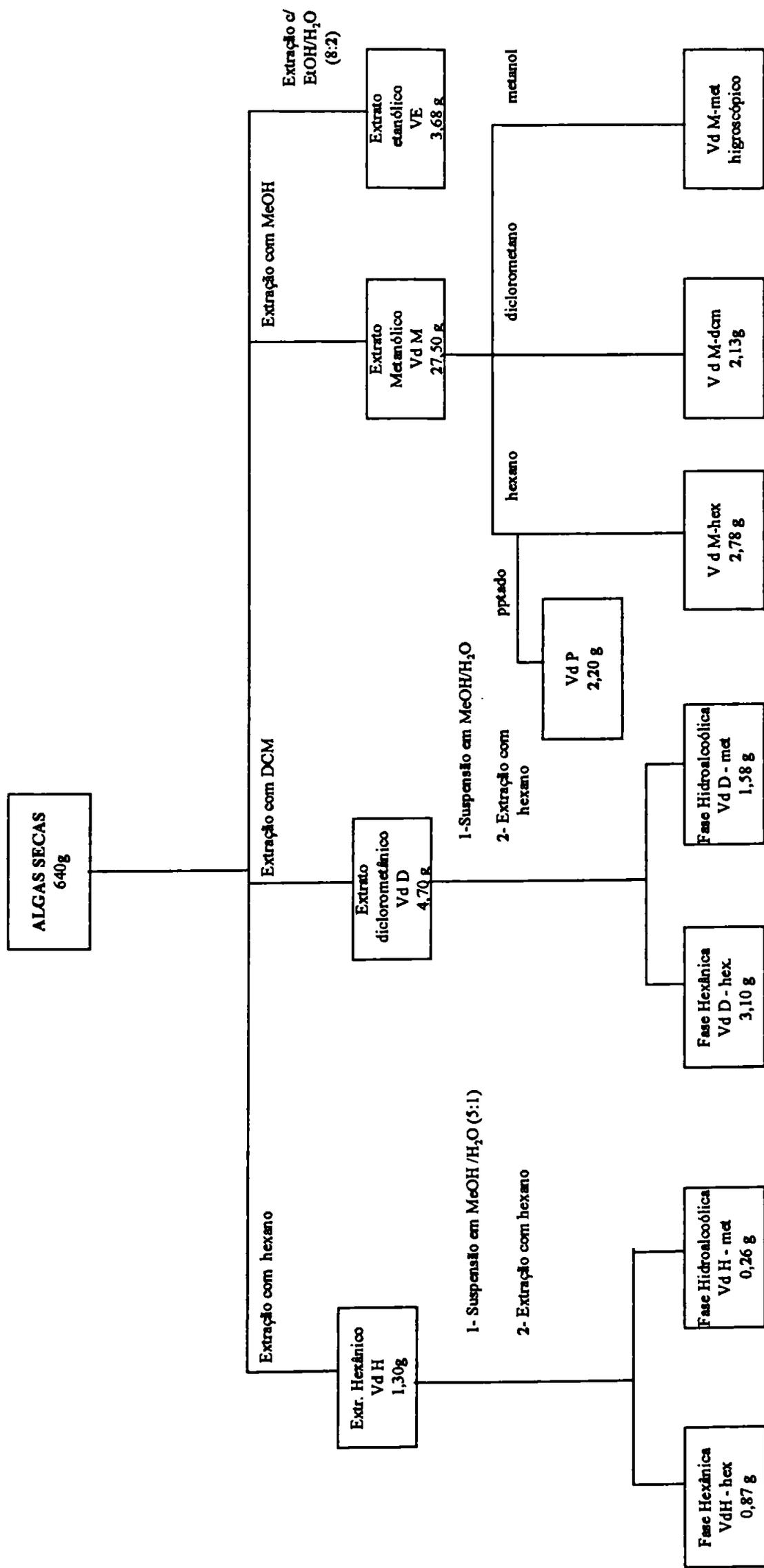


Figura 26 : Fluxograma da obtenção dos diferentes extratos de Vidalia e de suas subsequentes partições.

Tabela 3. Reestudo de *Vidalia*. Pesos dos concentrados dos extratos obtidos da alga e dos concentrados das fases provenientes das diversas partições efetuadas nestes extratos.

| Material | Peso (gramas) |
|---|----------------------|
| Algas secas | 640,00 |
| VdH (extrato hexânico) | 1,30 |
| VdD (extrato diclorometânico) | 4,70 |
| VdM (extrato metanólico) | 27,50 |
| VE (extrato etanólico) | 3,68 |
| VdH-hex (fase hexânica proveniente de VdH) | 0,87 |
| VdH-met (fase metanólica proveniente de VdH) | 0,26 |
| VdD-hex (fase hexânica proveniente de VdD) | 3,10 |
| VdD-met (fase metanólica proveniente de VdD) | 1,58 |
| VdM-hex (fase hexânica proveniente de VdM) | 2,78 |
| VdM-dcm (fase diclorometânica proveniente de VdM) | 2,13 |
| VdM-met (fase metanólica proveniente de VdM) | 18,50 (higroscópica) |

5.8.1. Estudo de VdH-hex.

O estudo por CCDC de sílica, com diversos solventes e os reveladores sulfato cérico, UV, iodo e fluoresceína não indicaram a presença de outras substâncias além de material graxo, motivo pelo qual não foi dada continuidade a análise de VdH-hex.

5.8.2. Estudo de VdH-met e VdD-hex.

A comparação por CCDC de sílica, usando-se como reveladores sulfato cérico, cloreto férrico, fluoresceína e UV (254 e 356 nm), entre as frações VdH-met e VdD-hex, mostrou que ambas eram semelhantes; não foi constatada a presença de terpenóides ou de fenóis bromados, nestes materiais.

5.8.3. Estudo de VdD-met.

A fase VdD-met foi submetida a testes cromatográficos preliminares e baseado nos resultados destes, efetuou-se o seu fracionamento por CC de Sephadex LH-20, usando-se MeOH (100%) como fase móvel. Foram recolhidas 49 frações de 5 mL ; a análise por CCDC dessas frações indicou a presença do mesmo esteróide nas frações VdD-I-7 a VdD-I-12, que foram reunidas.

Este esteróide (49 mg) foi purificado por CCDP de sílica no sistema de solventes DCM/MeOH (98:2); por comparação em CCDC de sílica com

o padrão constatou-se ser ele a substância 44 [24 metilenocolest-5-en-3- β -ol] (Figura 27, p.48).

5.8.4. Estudo de VdM-hex

O estudo de VdM-hex, por CCDC de sílica em diferentes fases móveis e com diversos reveladores indicou a semelhança deste extrato com VdD-met.

5.8.5. Estudo de VdM-dcm

A fração VdM-dcm foi submetida à CCDC de sílica, com diversas fases móveis de diferentes forças de eluição e os reveladores sulfato cérico, cloreto férrico, fluoresceína e irradiação no UV (254 e 356 nm), com resultados indicativos da presença de substâncias fenólicas.

O tratamento cromatográfico selecionado foi CC de sílica eluída sob pressão de nitrogênio, primeiramente no sistema DCM/MeOH (98:2) (14 frações) e em seguida, em DCM/AcOEt/MeOH (88:10:2), com aumentos gradativos na proporção de AcOEt e MeOH até DCM/AcOEt/MeOH (25:25:50).

Foram coletadas 44 frações de 50 mL, que foram analisadas por CCDC, nas condições preestabelecidas para o material íntegro VdM-dcm (Figura 28, p.49).

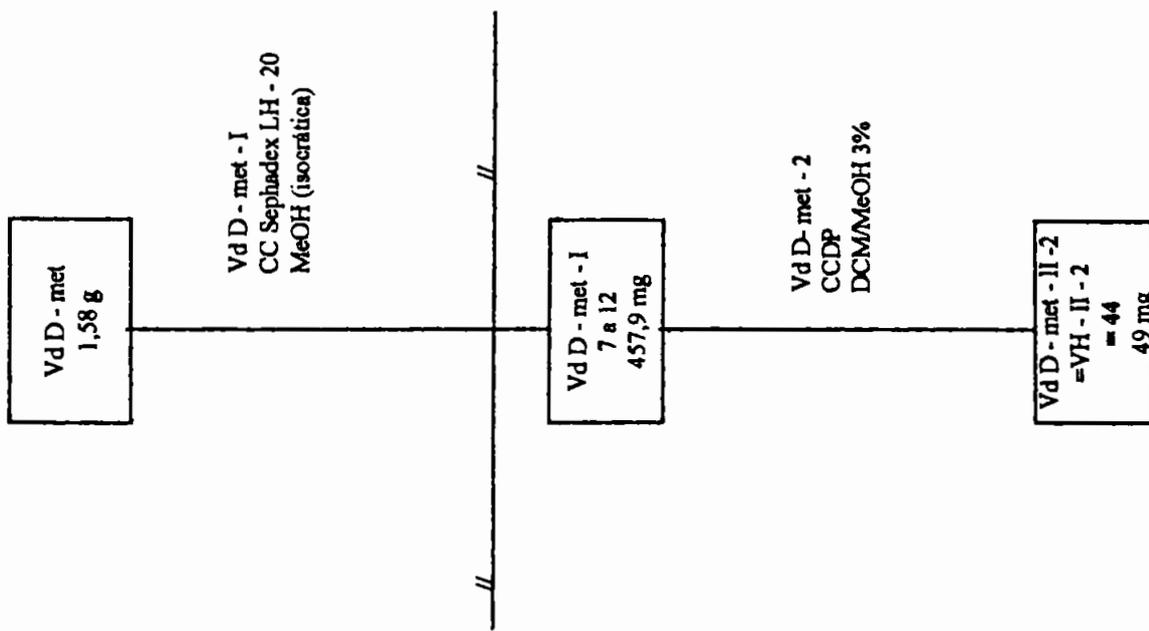
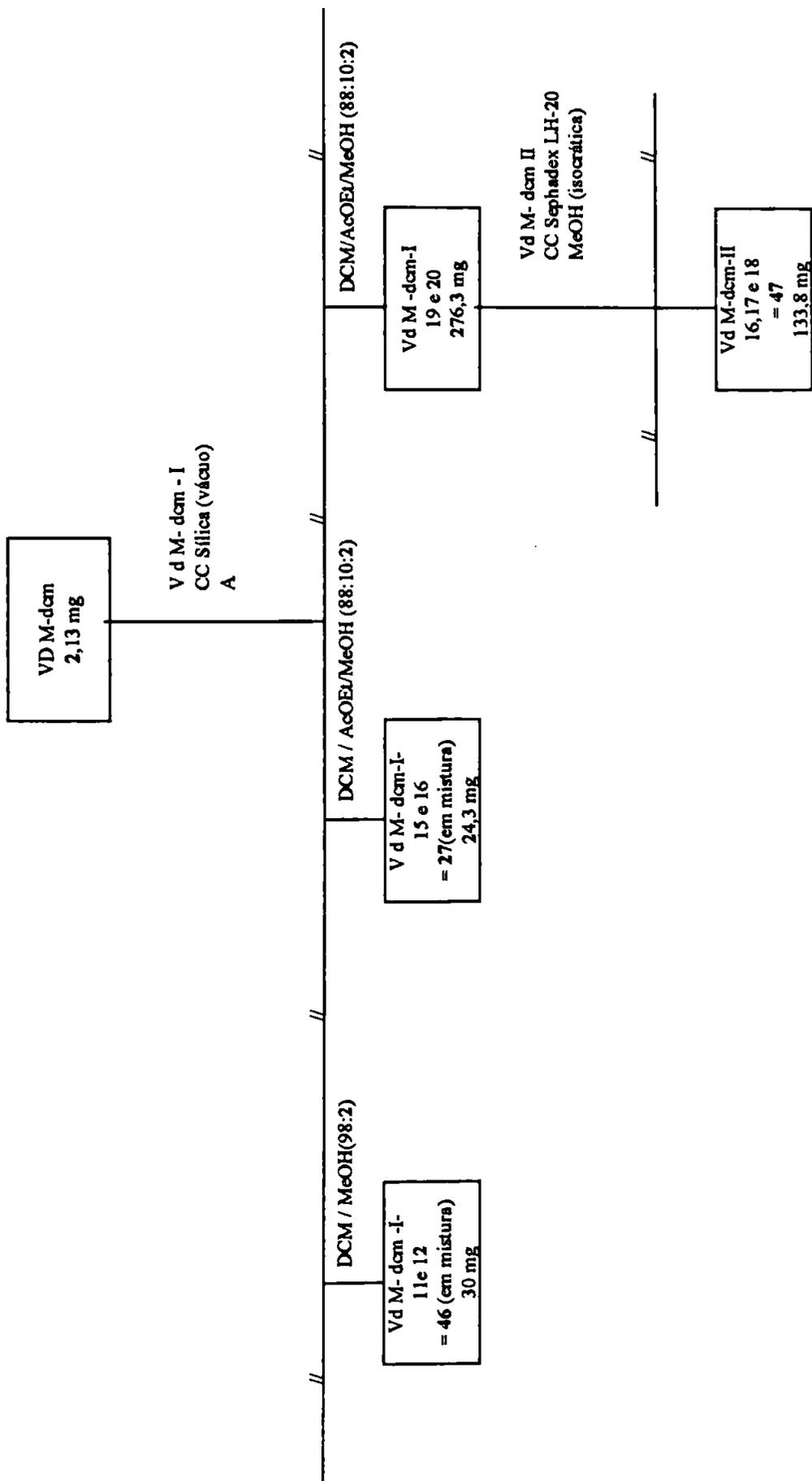


Figura 27 : Esquema do fracionamento cromatográfico de VdD - met.



A- DCM/MeOH (98:2) → DCM/AcOEt/MeOH(88:10:2) → DCM/AcOEt/MeOH (25:25:50)

Figura 28. Esquema do fracionamento de V d M - dcm

5.8.6. Análise de VdM-dcm-11 e 12.

As frações VdM-dcm-11 e 12, eluídas em DCM/MeOH (98:2), em CCDC de sílica, em fases móveis de diferentes forças de eluição, e usando-se cloreto férrico como revelador, mostrou entre outras, mancha com coloração característica de composto fenólico a qual por comparação com o padrão em CCDC de sílica, apresentou identidade com a substância **46**, α -metil lanosol (**46**) (Figura 28, p.49).

5.8.7. Análise de VdM-dcm-I-15 e 16

Na análise por CCDC de sílica, e por comparação com substâncias já isoladas, identificou-se entre as que formavam as frações VdM-dcm-I-15 e 16, a substância **27**, (Figura 28,p.49).

5.8.8. Análise de VdM-dcm-I-19 e 20.

Após testes cromatográficos preliminares em CCDC de sílica, as frações VdM-dcm-I-19 e 20 (276,3 mg) foram reunidas por apresentarem perfis semelhantes; a seguir, foram submetidas a CC de Sephadex LH-20, usando-se metanol 100%, como fase móvel (Figura 28). Foram recolhidas 40 frações de 4 mL; as frações VdM-dcm-II-16 a 18 continham 133,8 mg da mesma substância pura, cujos espectros de RMN ^1H e ^{13}C indicaram ser **47**.

5.8.9. Estudo da fração VdP

Com base nos resultados obtidos para o precipitado VP trabalhado anteriormente, o estudo do material VdP foi feito em CC, usando-se como fase estacionária, Amberlite XAD-2 e como fase móvel a seqüência de solventes indicada por Piertrzyk¹¹⁸.

Foram obtidas 40 frações, que após terem sido concentradas a baixa pressão, foram liofilizadas, pesadas e analisadas por espectroscopia de RMN ¹H .

As primeiras 18 frações foram eluídas com H₂O; VdP-I-8a18 continham a substância 48, em mistura.

As demais apresentaram-se em quantidades insuficientes para permitir estudos posteriores.

5.9. Material e Equipamentos utilizados

O material vegetal foi moído em moinho de facas, tipo Wiley.

Foram utilizados para extração, partição por solventes e técnicas cromatográficas, solventes de grau P. A . (Merck, Grupo Química ou Vetec) ou grau técnico (B. Herzog), estes após destilação fracionada.

Nas separações cromatográficas foram utilizados:

- sílica do tipo 60G e/ou 60GF₂₅₄ (5 - 40 μm , Merck) em camadas de 0,25 mm de espessura para CCDA.

- sílica do tipo 60PF₂₅₄ (5 - 40 μm , Merck) em camadas de 1,0 mm de espessura para CCDP.

- sílica do tipo 60, partículas de 63 - 200 μm (Merck), celulose CC-31 (Whatman), partículas de 15 - 40 μm , Florisil (Merck), Sephadex G-10, partículas de 40 - 120 μm (Sigma), Sephadex LH-20, partículas de 25 - 100 μm (Sigma), e Amberlite XAD-2 (Aldrich), partículas de 100 - 250 μm , para cromatografia em coluna.

- gel de sílica do tipo 60, partículas de 40 - 63 μm (Merck) para cromatografia em coluna tipo " flash ".

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram registrados em espectrômetro Bruker AC-200 (200 e 50 MHz) [IQ-USP], DPX-300 (300 e 75 MHz) [IQ-USP] e Bruker DRX-(500 e 125 MHz) [IQ-USP]. Foram utilizados como padrões de referência interna os sinais residuais dos solventes: δ_{H} 7,24 e δ_{C} 77,0 para CDCl₃ , δ_{H} 3,30 e δ_{C} 49,0 para CD₃OD, δ_{H} 2,0 e δ_{C} 29,8 e 206,0 para (CD₃)₂ CO e δ_{H} 4,6 para D₂O . Os solventes deuterados empregados foram os das marcas Merck ou Aldrich.

Os espectros de massas foram obtidos em: espectrômetro INCOS 50 Finnigan-Mat (quadrupolo) operando com impacto eletrônico (IE) a 70 eV, utilizado acoplado ao cromatógrafo 3400 Varian (coluna: crosslinked methyl silicone gum, 25 m, 0,2 mm, 0,33 film thickness) para análises por CG/EM; HP-5988 A (quadrupolo) para análises por inserção direta e - espectrômetro Micromass Plataform II (quadrupolo), para análises feitas pelo método de ionização por "eletrospray".

Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer FT 1750, tendo sido as amostras preparadas sob a forma de discos prensados de KBr.

Os dados de difração de raios - X foram obtidos pela pós graduanda Cristina Cunha Carvalho e pelo Prof. Dr. Julio Zukerman-Schpector, tendo sido a amostra cristalizada em MeOH; foi utilizado o difratrômetro automático ENRAF-NONIUS CAD-4 com irradiação $M\alpha$ [$\lambda(k\alpha)=0,71073 \text{ \AA}$], com cristal monocromatizador de grafite, à temperatura ambiente.

As análises feitas por emissão atômica foram realizadas em espectrômetro de emissão de atômica Spectroflame Modula-Spectro Co, pela Prof.a Dr.a Elisabeth de Oliveira.

As microanálises elementares foram realizadas no Laboratório de Microanálises Elementares do IQ-USP; as análises de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram efetuados no aparelho Elemental Analyzer 2400 - Perkin Elmer e as de enxofre e bromo foram feitas pelo método de titulação de Schoniger.

Estas análises foram repetidas no QTI-Quantitative Technologies Inc., em New Jersey, USA.

5.10. Dados físicos das substâncias isoladas.

- 44

PF - 145⁰ C

RMN ¹³C (200 MHz, CDCl₃) - Tabela 4, p.60

- 45

RMN ¹³C (200 MHz, D₂O) - Tabela 5, p.63

- 46

PF - 130⁰ C

I.V. (KBr) cm⁻¹ - 3427, 1589 e 860

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃/DMSO) - Tabela 7, p.66

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃/DMSO) - Tabela 8, p.67

- 27

PF- 126⁰ C

I.V. (KBr) cm⁻¹- 3401, 1621, 1578, 870.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD) - Tabela 7, p.66

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃/CD₃OD) - Tabela 8, p.67

- 1

I.V. (KBr) cm⁻¹ - 3336, 1634, 1569, 1247, 1055, 878, 821,634 e 589

RMN ¹H (200 MHz, D₂O) - Tabela 7, p.66

RMN ¹³C (50 MHz, D₂O) - Tabela 8, p.67

- 47

I.V. (KBr) cm^{-1} - 3500, 1242, 1210, 1048, 835, 630 e 561

RMN ^1H (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) - Tabela 7, p.66

RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) - Tabela 8, p.67

- 48

I.V. (KBr) cm^{-1} - 3479, 1450, 1256, 1196, 1051, 874, 656 e 577.

RMN ^1H (200 MHz, D_2O) - Tabela 7, p.66

RMN ^{13}C (50 MHz, D_2O) - Tabela 8, p.67

- 49

I.V. (KBr) cm^{-1} - 3434, 1469, 1274, 1230, 1063, 852, 643 e 589.

RMN ^1H (200 MHz, D_2O) - Tabela 7, p.66

RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O) (em mistura) - Tabela 8, p.67

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

6. IDENTIFICAÇÃO OU DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Vidalia obtusiloba*

6.1. Substâncias de *Vidalia*.

O estudo químico da alga *Vidalia obtusiloba* resultou no isolamento das seguintes substâncias: um esteróide (44), um glicerídeo glicosilado (45), um monofenol bromado (46), um monofenol bromado e sulfatado (1), dois oligofenóis bromados (27 e 47), dois oligofenóis bromados e sulfatados (48 e 49) e um glicosídeo aminado (50), estando suas respectivas estruturas representadas na Figura 29.

As substâncias 47, 48, 49 e 50 estão sendo descritas pela primeira vez. A substância 1 foi das primeiras isoladas de algas; na literatura constavam apenas os dados relativos a espectroscopia de RMN ^1H e de IV^{62,64}. A eles foram acrescentados os de RMN ^{13}C e de massas.

Foram, também, identificados como ésteres e em mistura, os ácidos palmítico, oleico, esteárico e mirístico.

Foram constatadas, também, as presenças de alcanos simples, aminoácidos, amins e açúcares, nos extratos dessa alga.

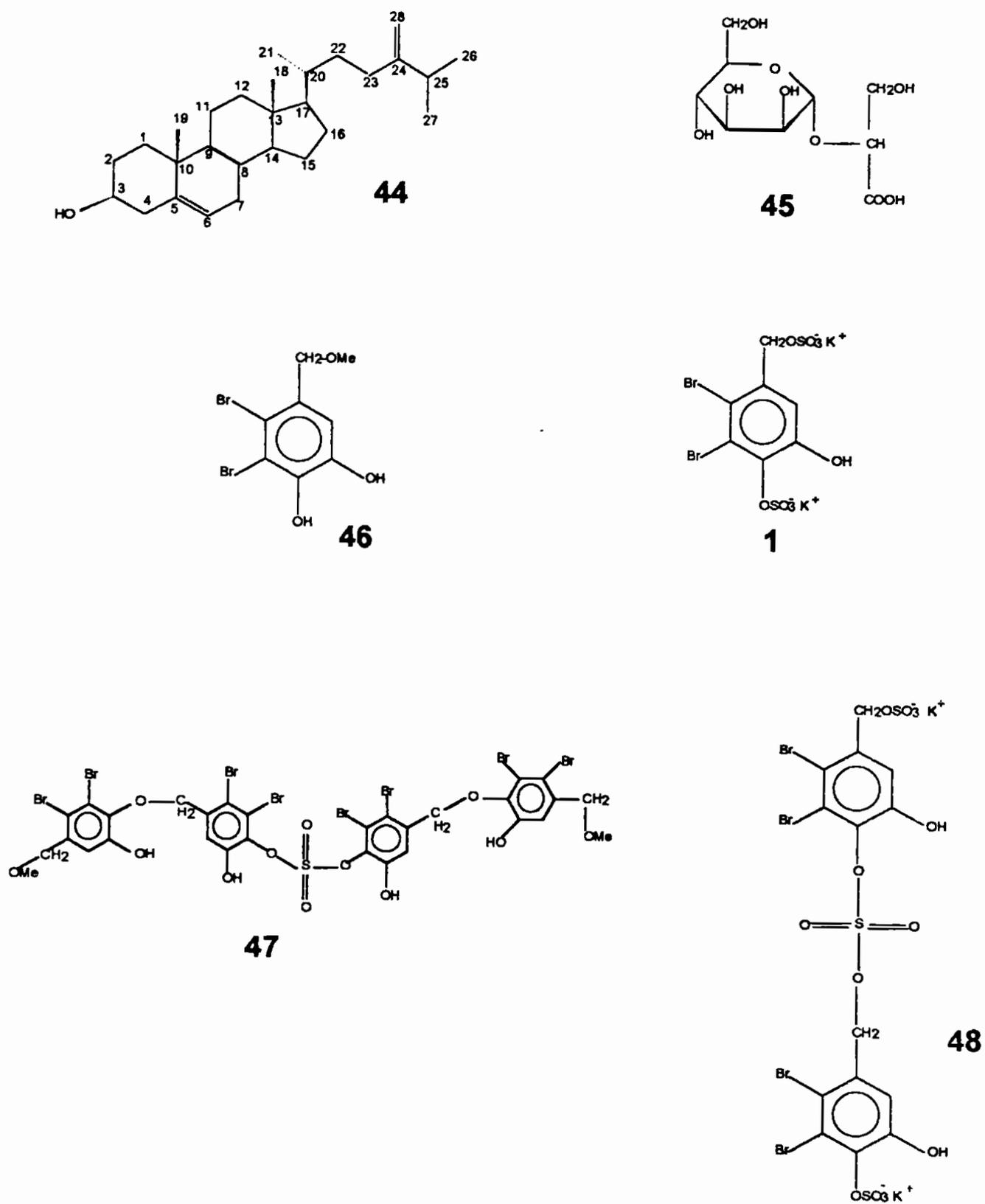
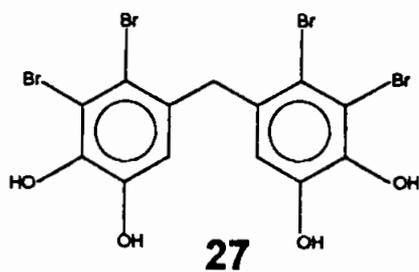
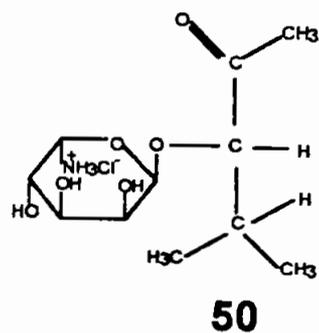
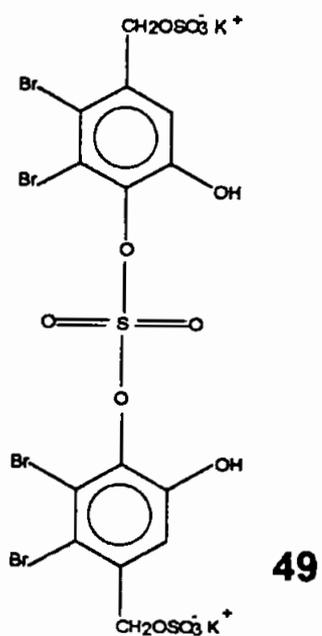


Figura 29: Substâncias isoladas de *Vidalia obtusiloba*



**Figura 29: Substâncias isoladas de *Vidalia obtusiloba*
(continuação)**

6.2-Identificação de 44

A identificação do 24-metilenocolest-5-en-3- β -ol (44) foi feita com base nos espectros de RMN e por comparação com dados da literatura^{121, 122}, relativos a substâncias análogas (Figura 30, p.134). Embora diversos artigos relatem a presença desse esteróide em algas^{123,124,125} e poléns¹²⁶, os únicos dados físicos encontrados na literatura são PF¹²⁶ e relativos a cromatografia a gás¹²⁷.

No espectro de RMN ¹H (Figura 31, p.135), a existência de múltiplos sinais entre 0,6 e 2,5 δ , indicou a presença de um esqueleto esteroidal em 44; dentre esses sinais, os relativos aos prótons metílicos de C-18, C-19, C-21, C-26 e C-27 foram identificados por confronto com os dados publicados para derivado análogo de colesterol¹²². São eles: singletos em 0,63 δ e 1,0, que foram atribuídos aos prótons metílicos de C-18 e C-19 e os dubletos em 0,80 δ , 0,90 δ e 1,02 δ , correlacionados aos grupos metílicos de C-21, C-26 e C-27.

Esse espectro mostrou, também, a existência de ressonância de prótons olefínicos, relativos a duas ligações duplas: dubleto em 5,29 δ (H-6) e singletos em 4,66 δ e 4,60 δ (2H-28). O multipletto situado em 3,51 δ foi atribuído ao próton metínico de C-3.

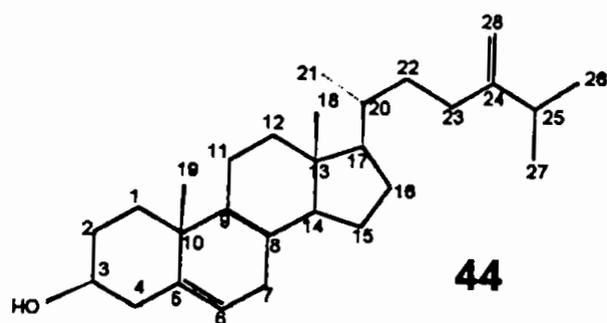
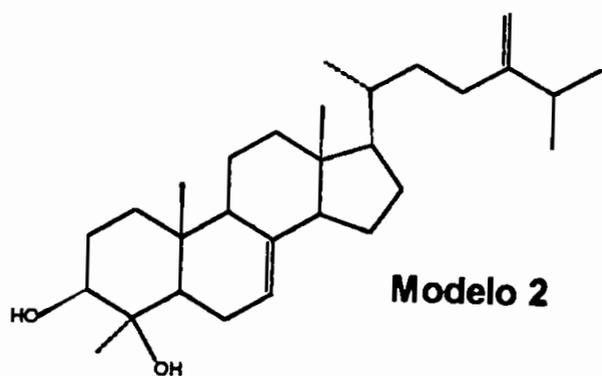
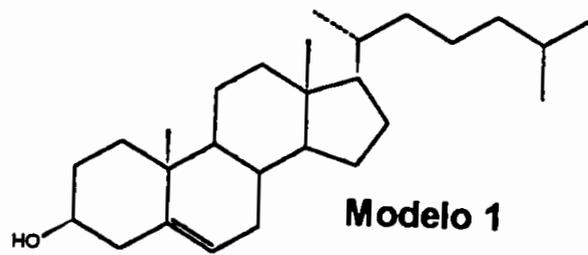
Os espectros de RMN ¹³C (PND e DEPT 135⁰) (Figuras 32 e 33, p.136 e 137) mostraram a presença de 28 átomos de carbono na molécula (Tabela 4, p.60); os sinais de carbono em 105,9 δ e 156,8 δ indicaram a presença de ligação dupla terminal e os sinais de carbono olefínico em 121,7 δ e 140,7 δ correspondem aos de uma ligação dupla endocíclica.

Os valores obtidos no espectro de RMN ^{13}C permitiram definir a configuração do C-3 como sendo β , pois para a forma α , os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos C-1, C-2, C-3 e C-5 apresentariam diferenças significativas¹²⁸.

Tabela 4- Dados de RMN ^{13}C (50MHz) de 44 e dos modelos 1 e 2 (todos em CDCl_3).

| C | δ_c | | | C | δ_c | | |
|----|------------|-------|-------|----|------------|--------|--------|
| | 44 | Mod.1 | Mod.2 | | 44 | Mod. 1 | Mod. 2 |
| 1 | 37,2 | 37,3 | 37,0 | 16 | 28,2 | 28,2 | 27,9 |
| 2 | 31,6 | 31,6 | 31,0 | 17 | 56,0 | 56,2 | 55,9 |
| 3 | 71,8 | 71,7 | 75,9 | 18 | 11,8 | 11,9 | 11,8 |
| 4 | 42,2 | 42,3 | 73,5 | 19 | 19,4 | 19,5 | 14,3 |
| 5 | 140,7 | 140,8 | 48,3 | 20 | 36,2 | 35,8 | 36,2 |
| 6 | 121,7 | 121,6 | 26,8 | 21 | 18,7 | 18,7 | 18,8 |
| 7 | 31,9 | 31,9 | 117,7 | 22 | 34,7 | 36,2 | 34,6 |
| 8 | 35,7 | 35,8 | 138,9 | 23 | 30,9 | 23,8 | 29,7 |
| 9 | 50,1 | 50,2 | 50,9 | 24 | 156,8 | 39,5 | 156,8 |
| 10 | 36,4 | 36,5 | 36,0 | 25 | 33,7 | 28,0 | 33,8 |
| 11 | 21,0 | 21,1 | 20,9 | 26 | 21,9* | 22,8 | 22,0 |
| 12 | 39,7 | 39,8 | 39,4 | 27 | 21,8* | 22,6 | 22,1 |
| 13 | 42,3 | 42,3 | 43,4 | 28 | 105,9 | | 105,9 |
| 14 | 56,7 | 56,8 | 54,9 | 30 | | | 25,5 |
| 15 | 24,2 | 24,3 | 22,9 | | | | |

* valores que podem estar trocados.



6.3. Identificação do digeneasídeo (45)

A substância 45 foi identificada como sendo o ácido [α -D-manopiranosil (1 \rightarrow 2')] glicérico (digeneasídeo), presente em diversas espécies de Rhodophyta.

A caracterização do digeneasídeo (45) foi feita comparando-se os dados fornecidos pelos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , com os existentes na literatura^{36,129,130}.

O espectro de RMN ^1H confirmou a existência de açúcar, na molécula, através da presença de multipletes entre 3,3 e 4,0 δ ; o pico relativo à ressonância do próton anomérico foi encoberto pelo pico do solvente (Figura 34, p.138).

O espectro de RMN ^{13}C mostrou 9 picos: um sinal em 178,1 δ , indicando a presença de ácido; um sinal em 99,6 δ , atribuído ao carbono anomérico do açúcar e sinais em 71,4, 71,1, 67,9, 74,0 e 62,1 foram atribuídos aos demais carbonos do açúcar (Figuras 35 e 36, p.139 e140). No caso da manose, é possível distinguir os componentes do par anomérico α - β através das absorções de C-3 e de C-5, que no anômero α aparecem mais protegidos (1,5 a 3,0 ppm) do que o anômero β ¹³¹ (Tabela 5, p. 63).

Os sinais em 79,0 δ e 64,0 δ , foram atribuídos respectivamente a C'-2 e C'-3.

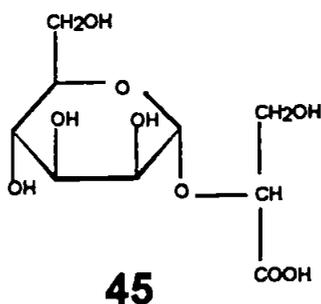


Tabela 5. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (δ) do digeneasídeo, (50MHz, D_2O) α -D-manose e β -D-manose.

| C | δ | | |
|----|----------|-----------------|----------------|
| | 45 | α -D-man | β -D-man |
| 1 | 99,6 | 94,9 | 94,5 |
| 2 | 71,4 | 71,7 | 72,1 |
| 3 | 71,1 | 71,2 | 74,0 |
| 4 | 67,9 | 67,9 | 67,7 |
| 5 | 74,0 | 73,3 | 77,0 |
| 6 | 62,1 | 62,0 | 62,0 |
| 1' | 178,1 | | |
| 2' | 79,0 | | |
| 3' | 64,0 | | |

6.4. Identificação de 46

A substância 46 foi obtida na forma de cristais incolores, agulhas de $PF=130^{\circ}C$, da fração VD-III-36 (Figura 14, p.33).

Do seu espectro de IV (KBr) foi possível inferir a presença de grupos hidroxílico (3427 cm^{-1} largo) e de anel aromático (1589 e 860 cm^{-1}) (Figura 37, p.141).

O espectro de massas (CG-EM) indicou que esta substância é um composto dibromado, pois $[M]^+$ apresentou picos em 310, 312 e 314, de intensidades 1:2:1 (Figura 38, p.142). A micro análise elementar forneceu as porcentagens de 30,32%, 2,56% e 51,17% para o carbono, hidrogênio e bromo, respectivamente; as porcentagens calculadas para estes mesmos elementos foram 30,76 e 2,54 e 51,24. Estes dados em conjunto indicaram a fórmula $C_8H_8O_3Br_2$ para 46. (Tabela 6, p.65).

O espectro de RMN 1H mostrou um sinal único para próton aromático em $7,0\delta$ (s, 1H), um grupo metilenobenzílico em $4,4\delta$ (s, 2H) e um grupo metoxílico em $3,4\delta$ (s, 3H) (Figura 39, p.143 e Tabela 7, p.66).

Os espectros de ^{13}C (PND e DEPT 135°) indicaram a presença de: um anel pentassubstituído com absorções em $144,2$, $142,9$, $130,0$, $114,8$, $114,0$ e $113,0\delta$; de um grupo metoxílico em $57,9\delta$ e de um grupo metoximetile - nobenzílico em $74,5$ (Figuras 40 e 41, p.144 e 145; Tabela 8, p.67). O espectro de RMN ^{13}C (- DEPT 135°) confirmou que o sinal em $74,5$ é relativo a um grupo metilênico (Figura 41, p.145) e o HMQC estabeleceu a correlação entre o sinal em $114,0\delta$ e o em $7,0\delta$, no espectro de RMN 1H (Figura 42, p.146).

Tabela 6. Dados de microanálise elemental: porcentagens observadas e/ou calculadas dos elementos nas substâncias : 46, 27, 1, 47, 48 e 49.

| | | 46 | | 27 | | 1 | | 47 | | 48 | | 49 | |
|-------|-------------------|--|--|--|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| | Obs. | Calc. | Obs. | Cal. | Obs. | Calc. | Obs. | Calc. | Obs. | Calc. | Obs. | Calc. | Obs. |
| C | 30,32 | 30,76 | 28,62 | 28,48 | - | 15,73 | 24,32 | 26,77 | 17,29 | 18,79 | 16,47 | 18,79 | 18,79 |
| H | 2,56 | 2,56 | 2,43 | 1,47 | - | 0,75 | 2,17 | 1,64 | 1,54 | 0,90 | 1,64 | 0,90 | 0,90 |
| O | - | 15,38 | - | 11,68 | - | 26,95 | 14,32 | 17,84 | - | 25,05 | - | 25,05 | 25,05 |
| Br | 51,17 | 51,24 | - | 58,36 | - | 29,93 | 41,34 | 47,58 | 31,73 | 35,76 | 27,91 | 35,76 | 35,76 |
| S | - | - | - | - | - | 11,97 | 3,98 | 4,75 | 10,50 | 10,73 | 10,07 | 10,73 | 10,73 |
| K | - | - | - | - | - | 14,67 | - | - | 12,80 | 8,74 | 9,42 | 8,74 | 8,74 |
| <hr/> | | | | | | | | | | | | | |
| | | 46 | | 27 | | 1 | | 47 | | 48 | | 49 | |
| | $C_8H_8O_3Br_2$ | $C_{13}H_8O_4Br_4$ | $C_7H_4O_9Br_2S_2K_2$ | $C_{30}H_{22}O_{15}Br_8S_2$ | $C_{14}H_8O_{14}Br_4S_3K_2$ | $C_{14}H_8O_{14}Br_4S_3K_2$ | | | | | | | $C_{14}H_8O_{14}Br_4S_3K_2$ |
| M^+ | =310,312,314(obs) | M^+ =547,56(pico médio obs.) | M^+ =532,4;534,5e | M^+ =1325,3783 | M^+ =890,5;892,4; | M^+ =896,8 | | | | | | | (pico observado) |
| M^+ | =311,88194(calc) | M^+ =547,71144 (valor calc para $^{79}Br_2^{81}Br_2$) | M^+ =533,96422 (valor calc para $^{79}Br^{81}Br$) | M^+ =893,77454 (valor calc para $^{79}Br_4^{81}Br_4$) | M^+ =893,77454 (valor calculado para $^{79}Br_2^{81}Br_2$) | M^+ =893,77454 (valor calculado para $^{79}Br_2^{81}Br_2$) | | | | | | | M^+ =893,77454 (valor calc. para $^{79}Br_2^{81}Br_2$) |

Tabela 7- Dados de RMN ¹H das substâncias 46, 46 metilada, 1, 27, 47, 48 e 49 (δ).

| H | 46 | | 46 metilada | | 1 | | 48 | | 49 | |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | CDCl ₃ (DMSO) | CDCl ₃ (DMSO) | CDCl ₃ (MeOH) | CDCl ₃ (MeOH) | D ₂ O | CD ₃ OD(CDCl ₃) | D ₂ O | D ₂ O | D ₂ O | D ₂ O |
| 1 | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | |
| 6 | 7,0(s,1H) | 7,0 (s,2H) | 6,4(s,1H) | 6,4(s,1H) | 7,0(s,1H) | 6,9(s,1H) | 7,0(s,1H) | 7,0(s,1H) | 7,0(s,1H) | 7,0(s,1H) |
| 1' | 4,4(s,2H) | 4,4 (s,2H) | 4,0(s,2H) | 4,0(s,2H) | 4,9(s,1H) | 4,4(s,2H) | 4,9(s,1H) | 4,9(s,1H) | 5,0(s,2H) | 5,0(s,2H) |
| C ₁ -Ome | 3,4(s,3H) | 3,4 (s,3H) | | | | 3,3(s,3H) | | | | |
| C ₅ - Ome | | 3,84(s,3H)* | | | | | | | | |
| C ₆ - Ome | | 3,89(s,3H)* | | | | | | | | |
| 1" | | | | | | | | | | |
| 2" | | | | | | | | | | |
| 3" | | | | | | | | | | |
| 4" | | | | | | | | | | |
| 5" | | | | | | | | | | |
| 6" | | | | | | | | | | |
| 1''' | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | 7,2(s,1H) | 7,2(s,1H) |
| | | | | | | | | | 5,1(s,2H) | 4,7(s,2H) |

*estes valores podem estar trocados

Tabela 8. Dados de RMN ^{13}C das substâncias: 46, 46 metilada, 27, 1, 47, 48 e 49 (δ)

| C | 46 | | 46 metilado | | 1 | | 47 | | 48 | | 49 | |
|----------------------|------------------------|--------|-----------------|------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | CDCl_3 (77,0) | (DMSO) | CDCl_3 | CDCl_3 (MeOH) | D_2O | $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ | D_2O | D_2O | D_2O | D_2O | D_2O | D_2O |
| 1 | 130,0 | | 135,2 | 131,6 | 135,3 | 128,8 | 135,7 | 136,4 | | | | |
| 2 | 114,0 | | 114,8 | 115,9 | 115,9 | 115,9 | 118,4 | 116,6 | | | | |
| 3 | 113,0 | | 121,6 | 112,9 | 122,9 | 122,9 | 123,2 | 123,6 | | | | |
| 4 | 142,9 | | 146,6 | 142,3 | 138,7 | 144,4 | 140,7 | 139,4 | | | | |
| 5 | 144,2 | | 152,6 | 144,2 | 149,7 | 149,9 | 151,7 | 150,7 | | | | |
| 6 | 114,8(CH) | | 111,2(CH) | 116,0(CH) | 118,2(CH) | 111,9(CH) | 116,0(CH) | 118,9(CH) | | | | |
| 1' | 74,5 | | 74,7 | 44,0 | 71,1 | 73,8 | 72,0 | 71,7 | | | | |
| $\text{C}_{1'}$ -OMe | 57,9 | | 56,2 | | | 56,5 | | | | | | |
| C_5 -Ome | | | 60,5* | | | | | | | | | |
| C_6 -OMe | | | 60,6* | | | | | | | | | |
| 1'' | | | | | | 134,2 | 136,6 | | | | | |
| 2'' | | | | | | 113,6 | 114,6 | | | | | |
| 3'' | | | | | | 121,6 | 124,0 | | | | | |
| 4'' | | | | | | 138,3 | 138,6 | | | | | |
| 5'' | | | | | | 149,5 | 150,3 | | | | | |
| 6'' | | | | | | 116,6(CH) | 116,9(CH) | | | | | |
| 1''' | | | | | | 70,6 | 71,5 | | | | | |

* estes valores podem estar trocados.

O espectro de RMN bidimensional (HMBC) mostrou as correlações a longa distância (3 e 2 ligações) entre o próton aromático (7,0 δ) e os carbonos benzílico (74,5 δ), bromado (114,0 δ) e hidroxilados (142,9 e 144,2 δ). Os prótons benzílicos correlacionam com os carbonos a 114,0 e 114,8 δ (Figura 43, p.147 e Tabela 9, p.68).

Tabela 9. Correlações ^{13}C — ^1H a longa distância, observadas no espectro HMBC de 46 (CDCl_3 e DMSO).

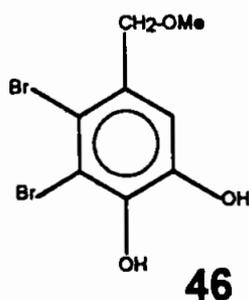
| ^{13}C (δ) | ^1H (δ) |
|------------------------------|---------------------------|
| 74,5 (C-1') | 7,0 (H-6) |
| 114,0 (C-2) | 7,0 (H-6), 4,4 (H-1') |
| 142,9 (C-4) | 7,0 (H-6) |
| 114,2 (C-5) | 7,0 (H-6) |
| 114,8 (C-6) | 4,4 (H-1') |

O éster dimetílico de 46, obtido por metilação com diazometano, exibiu em seu espectro de RMN ^1H , picos devidos a grupos metoxila em 3,49 δ , 3,84 δ e 3,89 δ , a grupo metoximetilenobenzílico, em 4,49 δ e a próton aromático em 7,08 δ (Figura 44, p.148); no espectro de RMN ^{13}C , os sinais relativos aos 10 carbonos foram observados em 152,6, 146,6, 135,2, 121,6, 114,8 e 111,2 δ (aromáticos); 74,7 δ (grupo metoximetilenobenzílico) e 60,5, 60,6 e 56,2 δ (grupos metoxílicos) (Figura 45, p.149).

O espectro de massas apresentou pico $[\text{M}]^+$ em 338, 340 e 342, com intensidades 1:2:1 (Figura 46, p.150).

Essas informações reunidas levam a propor para **46** a estrutura do α -metil-lanosol, cujos dados espectrais atribuídos estão mostrados nas Tabelas 7 e 8 (p.66 e 67).

O levantamento bibliográfico sobre a substância **46** indicou que ela é frequente em algas²⁶, porém seus dados espectrais só foram relatados recentemente¹⁰¹. Também são comuns em rodofíceas derivados e oligômeros de **46**, cuja característica principal é a presença de um anel aromático pentassubstituído - o 2,3 - dibromo, 4,5 - diidroxibezeno, cuja regioquímica já foi estabelecida^{87,89}.



α metil lanosol

6.5. Identificação de 27

A substância **27** foi isolada como sólido de cor branca (3mg), na fração VD-V-41 (Figura 14, p.33).

O espectro de I.V. (KBr) mostrou a presença de grupos hidroxílicos em 3401 cm^{-1} e de anel aromático em 1621 , 1578 e 870 cm^{-1} (Figura 47, p.151); o de massas apresentou picos com feição característica de presença de 4 átomos de bromo, na molécula, e $[M]^+$ em $m/z - 547,68$ [para o pico isotópico $^{79}\text{Br}_2$ e $^{81}\text{Br}_2$ (calculado = $547,7112$)] (Figura 48, p.152). A microanálise elementar forneceu os valores de 28,62% e 2,43% para o carbono e hidrogênio, respectivamente (Tabela 6, p.65). Esses dados reunidos são condizentes com a fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{O}_4\text{Br}_4$.

O espectro de RMN ^1H apresentou 2 bandas com intensidades equivalentes: um singleto $6,4\ \delta$, devido a próton aromático, e outro singleto em $4,0\ \delta$, atribuível a grupo metilenobisbenzílico (Figura 49, p.153 e Tabela 7, p.66). A reunião de frações adjacentes forneceu uma quantidade adicional de substância necessária para a realização dos espectros de RMN ^{13}C .

A análise dos dados de RMN ^{13}C PND e DEPT 135° mostrou a presença de 7 picos: 6 situados na região de aromáticos, sendo 5 deles substituídos, e um de carbono metilênico (Figuras 50 e 51, p.154 e 155 ; Tabela 8, p.67). A comparação com dados da literatura⁸⁷, identificou **27** como o 2,2', 3,3',-tetrabromo-4,4',5,5'tetrahidroxidifenilmetano (Tabela 10, p.71).

Tabela 10 . Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 27 (CDCl_3) e do 2,2', 3,3'- tetrabromo- 4,4', 5,5'- tetraidroxidifenilmetano (CD_3SOCD_3).

| Substância 27 | | 2,2',3,3'-tetrabromo 4,4',5,5'- tetraidroxidifenilmetano ⁸⁷ | | |
|---------------|--|--|--|---------------------|
| C/H | δ_{H} | δ_{C} | δ_{H} | δ_{C} |
| 1 | | 131,6 | | 130,5 |
| 2 | | 115,9 | | 115,0 |
| 3 | | 112,9 | | 113,3 |
| 4 | | 142,3 | | 143,1 |
| 5 | | 144,2 | | 145,1 |
| 6 | 6,46(2H _s ,H _{aromático}) | 116,0 | 6,45(2H _s ,H _{aromático}) | 115,7 |
| 7 | 4,0(2H _s , -CH ₂ -) | 44,0 | 3,95(2H _s , -CH ₂ -) | 45,1* |

* valor obtido a partir do derivado tetrametilado.

As atribuições feitas aos carbonos foram confirmadas através de correlações obtidas dos espectros COSY ^1H - ^{13}C e HMBC (Figuras 52 e 53, p.156 e 157; Tabela 11, p.71).

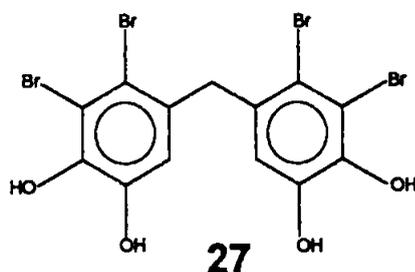
Tabela 11. Correlações a longa distância observadas no espectro HMBC (CDCl_3) da substância 27.

| δ_{C} | δ_{H} |
|-------------------------|----------------------|
| 44,0 (C-7) | 6,4 (H-6) |
| 116,0/115,9 (C-2 e C-6) | 4,0 (H-7), 6,4 (H-6) |
| 131,6 (C-1) | 6,4 (H-6) |
| 144,2 (C-4) | 6,4 (H-6) |
| 142,3 (C-5) | 6,4 (H-6)* |

*pouco intenso

As informações fornecidas pelas correlações observadas no espectro de HMBC mostraram-se coerentes com a colocação do C-3 (112,90 δ) em posição **para** ao H aromático e os carbonos portando as hidroxilas (C-4 144, 2 δ e C-5 146,3 δ) em posição **meta** e **para** ao grupo metilênico. Ao grupo metileno coube a posição **orto** em relação ao H aromático.

Em função da existência do singlete relativo a 2 prótons aromáticos e do $[M]^+$ é necessário que a molécula apresente 2 anéis aromáticos simétricos; o que satisfaz a todos os requisitos e está em concordância com os dados da literatura para a substância **27**, que já foi isolado anteriormente de algas vermelhas⁸⁷.



2,2',3,3'-tetrabromo-4,4'-5,5' tetrahydroxidifenil metano.

6.6. Identificação de 1

A substância 1 foi obtida na fração VM-II-36 (8,9 mg) como um sólido bege rosado, solúvel em água e pouco sensível à oxidação do ar. As principais absorções apresentadas pelo seu espectro de I.V. (KBr) foram: 3336 cm^{-1} (larga) devido à hidroxila; 1634 , 1569 e 878 cm^{-1} devidas a anel aromático e 1247 , 1055 , 821 , 634 e 589 cm^{-1} - atribuídas a ânions de éster de sulfato^{132,133}. (Figura 54, p.158). Do estudo comparativo entre este espectro e o do 1',4-dissulfato de potássio do álcool 2,3-dibromo-5-hidroxibenzílico (KBr), apresentado na literatura⁶² (Figura 55, p.158) inferiu-se a identidade entre essas duas substâncias.

O espectro de massas (eletrospray) apresentou quatro grupos de picos, cada um deles indicando a presença de 2 átomos de bromo na molécula (Figura 56, p.159); são eles:

$m/z = 494,5$, $496,5$ e $498,5$ - possivelmente devido ao íon $[M-K]^+$.

$m/z = 532,4$, $534,5$ e $536,5$ - provavelmente é o pico molecular M' .

$m/z = 554,3$, $556,5$ e $558,4$ - que pode ser atribuído ao íon $[M+Na-H]^+$

$m/z = 570,4$, $572,4$ e $574,3$ - que pode ser relacionado ao íon $[M+K-H]^+$

Os dados de RMN ^1H (Figura 57, p.160; Tabela 12, p.74) são compatíveis com os apresentados para o 1',4-dissulfato de potássio de 2,3-dibromo-1',4,5- triidroxibenzila⁶⁴.

Os dados de RMN ^{13}C para esta substância não foram encontrados na literatura, sendo aqui descritos pela primeira vez (Figura 58, p.161; Tabela 12, p.74).

Tabela 12. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 1 (D_2O)

| C/H | δ_{H} | δ_{C} |
|-----|---------------------|---------------------|
| 1 | | 135,3 |
| 2 | | 115,9 |
| 3 | | 122,9 |
| 4 | | 138,7 |
| 5 | | 149,7 |
| 6 | 7,0(δ ,1H) | 118,1 |
| 7 | 4,9(δ ,2H) | 71,1 |

O padrão de substituição do anel aromático pentassubstituído de 1 mostra também a presença do grupo 2,3-dibromo-4,5-diidroxibenzila; é portanto, análogo ao do α -O-metil-lanosol, deste diferindo apenas pela substituição da hidroxila ligada ao C-4, por um grupo sulfato (Tabela 8, p.67). Por isso, as atribuições dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono foram feitas com base nos dados do α -O-metil-lanosol, aos quais foram aplicados os seguintes fatores de correção para introdução de grupo sulfato¹³⁴ (Tabela 13, p.75).

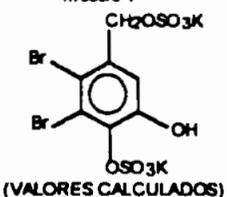
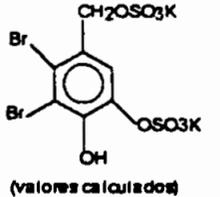
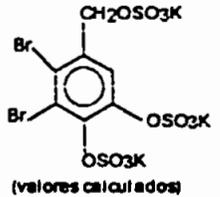
Tabela 13. Fatores de correção para substituição de grupos -OH por -OSO₃K, em anel aromático.

| Posição | OH →OSO₃K |
|----------------|-----------------------------|
| Ipsó | -2,8 |
| Orto | +7,8 |
| Meta | +1,6 |
| Para | +7,4 |

Os resultados dos cálculos relativos a esta análise, reunidos na Tabela 14, (p.76) mostram que os dados obtidos enquadram-se melhor na estrutura do 1',4 dissulfato de lanosol (modelo 1) do que nas estruturas dos outros dois modelos. Deve-se levar em consideração que os solventes utilizados para o α -O-metil-lanosol e para 1 são diferentes e também que o anel é altamente substituído, fato que prejudica este tipo de análise; o maior desvio entre os valores calculados para o modelo 1 é de 2,3 ppm (Tabela 14, p76), o que foi considerado aceitável.

Fica, assim, proposta a estrutura de 1 como sendo a do 1',4 dissulfato do lanosol.

Tabela 14 . Comparação entre os valores observados para a substância 1, no espectro de RMN ¹³C e os calculados para os modelos 1, 2, e 3 (δ).

| Substância 1 (valores observados) | modelo 1 | | modelo 2 | | modelo 3 | | |
|---|---|------------------|--|------------------|---|------------------|------|
| |  | $\Delta\delta_a$ |  | $\Delta\delta_b$ |  | $\Delta\delta_c$ | |
| C-1 | 135,3 | 137,4 | 2,1 | 131,6 | -3,7 | 139,0 | -3,7 |
| C-2 | 115,9 | 115,6 | -0,3 | 121,4 | 5,5 | 123,0 | 7,1 |
| C-3 | 122,9 | 120,8 | -2,1 | 114,6 | -8,3 | 122,4 | -0,5 |
| C-4 | 138,7 | 139,5 | 0,7 | 150,7 | 12,0 | 147,9 | 9,2 |
| C-5 | 149,7 | 152,0 | 2,3 | 141,4 | -8,3 | 149,2 | -0,5 |
| C-6 | 118,1 | 116,4 | -1,7 | 122,6 | 4,5 | 124,2 | 6,1 |

$\Delta\delta_a$ = diferença entre os valores observados para a substância 1 e os respectivos valores calculados para o modelo 1 (grupos sulfato em C₄ e C₁).

$\Delta\delta_b$ = diferenças entre os valores observados para a substância 1 e os respectivos valores calculados para o modelo 2 (grupo sulfato em C₅ e C₁).

$\Delta\delta_c$ = diferenças entre os valores observados para a substância 1 e os respectivos valores calculados para o modelo 3 (grupo sulfato em C₄ e C₅).

6.7. Determinação da estrutura da substância 47

A substância 47 foi isolada como sólido incolor das frações VD-IX-47 a 49 (63,3 mg) e sua microanálise elementar forneceu a seguinte composição porcentual: C:24,32 %, H:2,17 %, O:14,32 %, Br:41,34 % e S:3,8 %. Não foram detectadas, por microanálise e/ou absorção atômica, as presenças de Cl e N e nem as dos seguintes elementos: Na, K, Ca, Mg, Al, Fe, Cu, Pb, As, Cd, Ni, Co, Mn, V, Zn, Cr, S, Se, Hg, Sb, Si e Sn.

O espectro de IV (KBr) de 47 (Figura 59, p.162) apresentou banda de absorção em cerca de 3500 cm^{-1} (larga), devida às hidroxilas e um grupo de bandas em 1242 e 1210, 1048, 835, 630 e 561 cm^{-1} que pode ser atribuído a éster de sulfato orgânico^{132,133}.

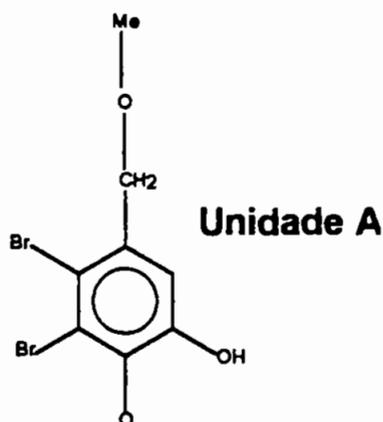
A substância 47 é parcialmente solúvel em metanol e acetona, insolúvel em água e oxida-se facilmente em presença de luz. A insolubilidade de 47 em água e o resultado negativo da pesquisa de cátions metálicos, os quais ocorrem normalmente nos ésteres de sulfato marinhos, indicaram que 47 não é iônica.

O espectro de RMN ^1H mostrou cinco singletos de proporções 1:1:2:2:3, situados respectivamente em: 7,1 e 6,9 δ (prótons aromáticos); 5,1 e 4,4 δ (grupos metilenobenzílicos) e 3,3 δ (grupo metoxílico) (Figura 61, p.164 e Tabela 7, p.66).

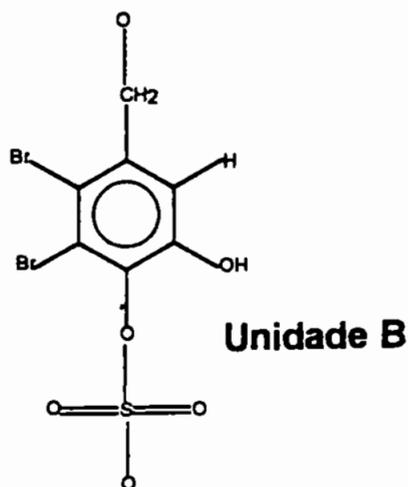
O espectro de RMN ^{13}C PND apresentou 15 sinais (12 dos quais relativos a carbonos aromáticos) (Figura 62, p.165 e Tabela 8, p.67), os quais, com o auxílio das informações obtidas nos espectros de RMN ^{13}C -DEPT 135, HMQC e HMBC (Figuras 63, 64 e 65; p.166, 167 e 168)

foram reunidos em dois conjuntos de ressonâncias, cada um deles tendo como núcleo um anel aromático pentassubstituído (Tabela 15, p.80).

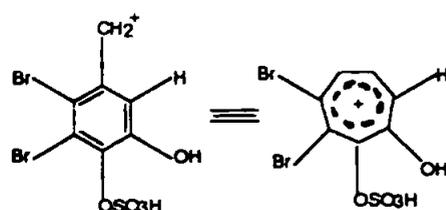
O primeiro desses conjuntos foi formado tendo por base as correlações existentes entre um grupo dibromo-diidroxibenzílico, um metoxílico e outro metilenobenzílico (Tabelas 15 e 16, p.80), que foram ordenados, resultando na formação da unidade A, com a feição característica do α -metil lanosol (46) (Tabela 9, p.68).



Das correlações existentes entre as ressonâncias que formavam o segundo conjunto de sinais, emergiu outra unidade aromática, também do tipo 2,3-dibromo-4,5-diidroxibenzílica, porém apresentando os valores dos deslocamentos químicos de ¹H e ¹³C, semelhantes aos da substância 1, ou seja, do lanosol sulfatado, em que as hidroxilas ligadas aos C-1' e C-4 são substituídas por grupos sulfato (Tabela 8, p.67).



Nos espectros de massas feitos por injeção direta e eletrospray não se observam os sinais de M^- , no entretanto, em ambos, constata-se a presença de sinais em $M^- - 360$, contendo dois átomos de bromo, que poderiam ser resultantes do íon $C_7H_3Br_2O_5S$, formado na quebra da molécula oligomérica (Figura 60; p. 163).



A análise desses dados sugeriu a possibilidade de simetria na molécula de 47, o que permitiria propor para esta substância, a fórmula estrutural $C_{30}H_{22}O_{15}Br_8S_2$ e a seguinte estrutura:

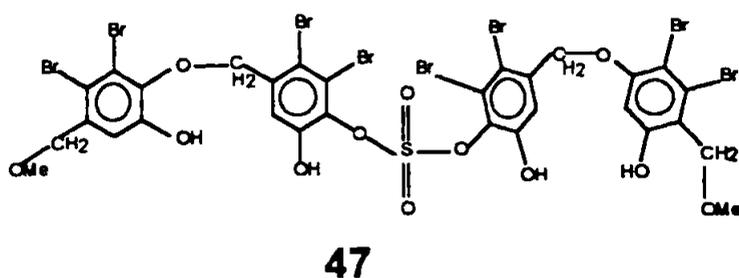


Tabela 15. Dados de RMN ^1H e ^{13}C , reunidos segundo as correlações observadas nos espectros HMQC e HMBC da substância 47 [75 MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$] (δ).

| C/H | Unidade A | | Unidade B | |
|-----|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | δ_{H} | δ_{C} | δ_{H} | δ_{C} |
| 1 | | 128,8 | | 134,2 |
| 2 | | 115,9 | | 113,6 |
| 3 | | 112,9 | | 121,6 |
| 4 | | 144,4 | | 138,3 |
| 5 | | 144,9 | | 149,5 |
| 6 | 6,9 | 111,9 (CH) | 7,1 | 116,6 (CH) |
| 1' | 4,4 | 73,8 | 5,1 | 70,6 |
| 2' | 3,3 | 56,5 | | |

Tabela 16. Correlações ^{13}C - ^1H a longa distância observadas no espectro HMBC de 47 [75 MHz, $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$].

| δ_{H} | S_{C} |
|---------------------|--------------------------------|
| 3,30 | 73,8 |
| 4,4 | 56,5; 111,9 (CH); 115,9; 128,8 |
| 5,1 | 113,6; 116,6 (CH); 134,2 |
| 6,9 | 115,9; 144,4; 144,9 |
| 7,1 | 113,9; 138,3; 149,5; 121,6 |

A análise elementar dessas substâncias sulfatadas mais polares não estão reproduzindo adequadamente os valores calculados (Tabela 6, p. 65).

6.8. Determinação da estrutura da substância 48

A substância 48 foi obtida pura (125,8 mg) das frações VP-III-32,33 e 34, é solúvel em água e oxida-se lentamente ao ar. A microanálise elementar forneceu as seguintes percentagens: C-17,29%; H-1,54%; Br-31,73%; S-10,50% e K-12,8%; no espectro de massas, obtido por eletrospray, o conjunto de picos equivalentes ao provável pico "quase molecular" de substâncias halogenadas, foi observado em $m/z = 888,5$, $890,5$, $892,4$, $894,5$ e $896,5$ (Figura 66, p.169). A partir destes dados e com o auxílio do espectro de RMN ^{13}C , que apresentou 14 sinais relativos a átomos de carbono, foram recalculadas as percentagens dos elementos : C-18,79 ; H-0,90 ; Br-35,76 ; S-10,73 e K-8,74 e deduzida a formula molecular de 48 : $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{O}_{14}\text{Br}_4\text{S}_3\text{K}_2$ ($m/z_{\text{calc}} = 893,77$).

O espectro de I.V. (KBr) apresentou bandas em: 3479 cm^{-1} ; 1450 cm^{-1} ; em 1256 , 1196 , 1051 , 874 , 656 e 577 cm^{-1} , sendo a primeira delas relativa às hidroxilas, a segunda a aromáticos e o conjunto das subsequentes, a grupos sulfatos (Figura 67, p. 170).

O espectro de RMN ^1H mostrou quatro singletos: dois na região de aromáticos - em $7,2$ e $7,0\ \delta$ - e os outros dois em $4,9$ e $4,7\ \delta$, cujas intensidades apresentaram-se na proporções 1:1:2:2 (Figura 68, p.171).

Os espectros de RMN ^{13}C PND e DEPT, mostraram 14 ressonâncias, das quais 12 estavam na região de aromáticos; mostraram, também, que as duas ressonâncias restantes eram relativas a 2 grupos metilenobenzílicos (Figuras 69, p.172 e 70, p.173).

A comparação dos valores dos deslocamentos químicos relativos aos 12 carbonos aromáticos de 48 com os obtidos para os carbonos aromáticos

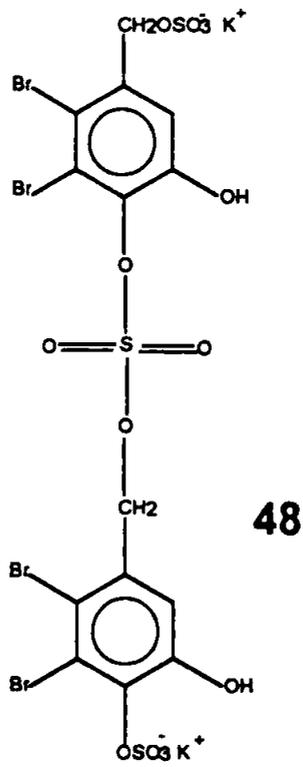
da substância 1 (Tabela 8, p.67) fez emergirem 2 conjuntos de 6 valores (cada conjunto relativo a um anel aromático), muito semelhantes entre si e aos valores de 1; também neste caso os núcleos aromáticos enquadram-se no padrão apresentado pelo grupo 2,3-dibromo-4,5-diidroxibenzílico, sulfatado no C-4.

Uma análise mais detalhada do espectro de massas de 48 mostra fragmentos com perdas correspondentes a $[M - K + H]^+$ ($m/z=854,5$) e $[M - K - SO_3 + H]^+$ ($m/z = 774,3$) (Figura 66 p.169). O sinal mais intenso a 638,8 corresponde a perda de $2K^+$, SO_3 e SO_4 gerando íons benzílicos muito estáveis, todos eles mantendo os quatro átomos de bromo.

O espectro de RMN 1H obtido após a hidrólise ácida da substância 48, contida, em mistura, na fração VP-I-71, apresentou, na região de aromáticos, uma única ressonância em 7,0 δ , sugerindo que os dois anéis aromáticos que formavam 48, após a hidrólise, tornaram-se iguais (Figuras 71 , p.174 e 72, p.175).

O espectro de RMN 1H do material hidrolisado e metilado com diazometano apresentou, para o componente quantitativamente predominante, o conjunto de ressonâncias 7,0 , 4,5 , 3,9 , e 3,8 δ compatíveis com as ressonâncias apresentadas pelo lanosol totalmente metilado (Figura 73, p.176).

Estes fatos confirmam que na molécula da substância 48 existem dois grupos 2,3-dibromo-4,5-diidroxibenzílicos, dispostos de modo não simétrico; levando-se em consideração que a molécula possui 3 átomos de enxofre, e dois de potássio, portanto 2 grupos — OSO_3K^+ , e que a fórmula molecular é $C_{14}H_8O_{14}S_3K_2$, pode-se propor para 48, a seguinte estrutura:



vidalol C

6.9.Determinação de estrutura da substância 49

A substância 49 foi isolada como sólido amorfo marrom (9 mg) na fração VP-IV-20. É solúvel em água, insolúvel em solventes orgânicos e oxida-se rapidamente ao ar, sendo a mais instável das substâncias bromadas isoladas de *Vidalia*, neste trabalho.

O espectro de I.V. (KBr) apresentou banda larga em 3434 cm^{-1} devida à hidroxila; em 1469 cm^{-1} - atribuível a anel aromático e em 1274 , 1230 , 1063 , 852 , 643 e 589 cm^{-1} que podem ser atribuídas ao grupo sulfato. (Figura 74, p.177).

A substância 49, submetida à microanálise elementar e à espectrometria de emissão atômica, forneceu as seguintes percentagens : C-16,47 ; H-2,34 ; Br-27,91 ; S-10,07 e K-9,42 % (Tabela 6, p.65).

No espectro de massas, obtido através da técnica de eletrospray, foi observado pico em $m/z = 896,8$, (Figura 75, p.178) que poderia ser o pico quase-molecular $[M + H]^+$. Tomando-se este valor como base, os valores recalculados das percentagens dos elementos formadores da substância 49 são: C-18,79; H-0,90; O-25,05; Br-35,76; S-10,17 e K-8,74 %, sua fórmula estrutural é $C_{14}H_8O_{14}Br_4S_3K_2$, com massa calculada (para $^{79}Br_2$ $^{81}Br_2$) de 893,77 um.

A substância 49, isolada em pequena quantidade, na fração VP-IV-20, foi obtida, em mistura, também nas frações VP-IV-18, 19 e 21 e nas frações VP-I-13 a 17.

Os valores dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio existentes em 49, foram obtidos do espectro de RMN 1H da fração VP-IV-

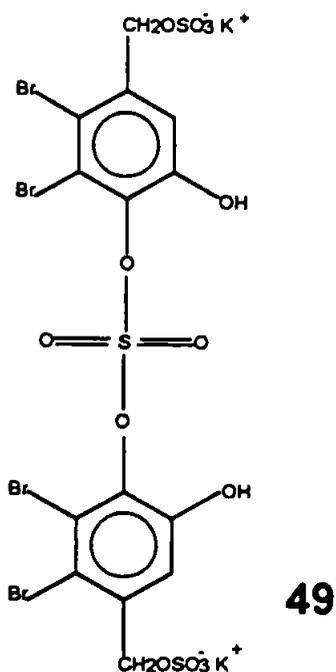
20 (Figura 76, p.179); esses valores, correspondentes a dois singletos de proporções 1:2; são, respectivamente 7,0 e 4,9 δ (Tabela 7, p.66). Os mesmos valores são observados para **49** em mistura, no espectro de RMN ^1H da fração VP-I-13 (Figura 77, p.180).

Os sinais relativos aos carbonos de **49** podem ser identificados pela análise de espectros onde a substância encontra-se em mistura e os deslocamentos químicos relativos a esses carbonos são: 150,4 , 139,4 , 136,4 , 123,6 , 118,9 , 116,6 e 71,7 δ (Figura 78, p.181 Tabela 8, p.67). Da análise dos espectros de RMN ^{13}C DEPT 135 $^\circ$ (Figura 79, p.182) das misturas, pode-se concluir que: a) os 6 sinais entre 150,4 e 116,6 δ são relativos a um anel aromático pentassubstituído; b) que o único carbono aromático não substituído apresentou deslocamento químico em 118,9 δ e c) que o sinal em 71,7 δ corresponde a um grupo metilênico.

Também na substância **49** os valores dos deslocamentos relativos aos carbonos do anel aromático pentassubstituído mostraram a feição característica do padrão 2,3-dibromo-4,5-diidroxibenzílico, apresentado pelo lanosol; as diferenças entre os valores observados para estas duas substâncias são ocasionadas pela substituição de um grupo -OH por um -OSO₃K, no C-4, como discutido anteriormente (Tabela 13, p.75).

Observa-se que os valores dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono de **49** são muito próximos aos dos obtidos para **1**, o que leva à conclusão de que os núcleos aromáticos de ambos são iguais. Entretanto, o espectro de massas de **49**, comparado ao de **1**, sugere que **49** seja um dímero de **1**, formado por duas unidades iguais, colocadas simetricamente. Há ainda que se levar em consideração as presenças de 2 íons K e de 3 átomos de enxôfre, na molécula de **49**.

Obedecendo a estes requisitos, pode-se propor para **49** a estrutura:



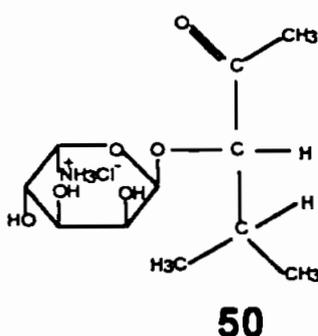
vidalol D

Apesar das semelhanças entre os espectros de RMN ¹H e ¹³C de **1** e **49**, estas duas substâncias foram isoladas em frações bem distintas, (Figura 5, p.26) e **49** é mais instável do que **1**, oxidando-se muito mais rapidamente do que **1**, sendo que por este motivo, falharam as tentativas de cristalização de **49**.

5.10. Substância 50

O glicosídeo aminado **50** cristalizou do extrato metanólico VM, (Figura 18, p.37) razão pela qual não foi possível obter suas análises espectroscópicas; sua estrutura foi estabelecida por cristalografia de raios X e o eletroferograma da fração VM indicou a presença de íon cloreto.

O ácido gulorônico - derivado da gulose - e o ácido manurônico formam os alginatos, que são os polissacarídeos mais abundantes das algas pardas¹³⁵. Não existem referências sobre a presença da gulose, em algas vermelhas.



Os dados relativos `a estrutura da substância **50** foram fornecidos pela pós graduanda Cristina Cunha Carvalho e pelo Prof. Dr. Júlio Zukerman - Schpector [IQ-USP].

7. CORRELAÇÕES QUIMIOSSISTEMÁTICAS EM *VIDALIA OBTUSILOBA*

No presente trabalho, foram realizados o estudo e o reestudo dos extratos polares e apolares de *Vidalia obtusiloba* (= *Osmundaria obtusiloba*), tendo sido isoladas as mesmas substâncias em ambos os procedimentos. A natureza dessas substâncias concorda com os dados existentes na literatura, tanto relativos à família Rhodomelaceae, quanto ao gênero *Vidalia*^{14,26,37} (= *Osmundaria*).

As primeiras notícias sobre isolamento e caracterização química de metabólitos de *Vidalia* datam de 1944¹³⁶ e de 1950⁶⁶, quando foram isoladas de *Vidalia volubilis* o digeneasídeo e uma substância fenólica bromada e sulfatada, que seria, provavelmente, o 1', 4-dissulfato de potássio do 2,3-dibromo-1',4,5-triidroxibenzila. Posteriormente, ainda de *V. volubilis*, foram isolados o sal 4-dimetilsulfonato de 2-metoxibutanoato, o ácido metilaspártico e a betaína 2-amino-5-trimetilamonio-pentanoato¹³⁷, de *V. spiralis* foi isolado o 3,4-dibromo-5-metileno-ciclopent-3-en-1,2-diol¹³⁸, de *V. obtusiloba*, foram isolados o vidalol A (30) e o vidalol B (35)⁸⁹; e detectados os ácidos cáinico e domóico¹³⁹.

Neste trabalho, foram isolados fenóis bromados idênticos ou análogos aos extraídos de outros membros de Rhodophyta, como *Odonthalia*, *Polysiphonia*, *Rhodomela*^{26,37}. Estas substâncias formam um grupo homogêneo que teria como precursor a tirosina, e rota de biossíntese comum e consistente^{26, 43}.

No presente estudo de *V. obtusiloba*, apesar de terem sido analisadas duas amostras distintas da alga, coletadas em anos subsequentes, o vidalol A e vidalol B não foram detectados. Esse resultado poderia indicar a presença de " raças químicas ", fenômeno atribuído a diferenças ambientais¹⁴⁰.

Fenóis bromados, que são metabólitos de padrões simplificados, podem ocorrer como principais produtos do metabolismo secundário, em membros de taxons altamente evoluídos (Figura 1, p.4) porque dentre os avanços (mutações) a perda da capacidade de sintetizar é presumivelmente mais comum do que o ganho ou alteração de um sistema enzimático¹⁴¹. Foi observado que, nas algas vermelhas, famílias que biossintetizam fenóis bromados não produzem terpenos e reciprocamente.

Muitos foram os estudos e discussões sobre a possível participação, na taxonomia química, dos carboidratos de diferentes pesos moleculares, que são acumulados durante a fotossíntese^{34,36,129,142,143}. A análise comparativa da considerável quantidade de dados, sobre esses metabólitos, existentes na literatura, mostrou que a ocorrência de certos metabólitos não é casual, mas acontece dentro de padrões característicos^{142,143,144}, inclusive quando estão ligados a glicerídeos, como nos floridosídeos e digeneasídeo.

O digeneasídeo foi considerado marcador quimiosistemático de Ceramiales, até que ficasse estabelecido que algumas famílias, dentro dessa Ordem, biossintetizam como principal produto de fotossíntese, um ou mais floridosídeos, e não o digeneasídeo³⁶.

Entretanto, ao observarmos a Ordem Ceramiales, é possível notar a simultaneidade da ocorrência das biossínteses de terpenos e floridosídeos ou de fenóis e digeneasídeo. A Tabela 17, p.91 mostra este padrão de

ocorrências e nela aparecem somente os resultados de análises realizadas por métodos mais precisos.

Tabela 17 . Ocorrência de terpenos, fenóis, floridosídeos e digeneasídeo, em Ceramiales.

| Gênero | Fenóis | Terpenos | Digeneasídeo | Floridosídeos | Ref. |
|--|--------|----------|--------------|---------------|---------------|
| <i>Ceramium rubrum</i> | x | | x | | 145,146 |
| <i>Chondria</i> | | x | | x | 36,147 |
| <i>Halopytis pinastroides</i> | x | | x | | 94,136 |
| <i>Laurencia poteaui</i> | | x | | x | 16,36 |
| <i>L. intricata</i> | | x | | x | 24,36 |
| <i>L. majuscula</i> | | x | | x | 18,20,36 |
| <i>L. obtusa</i> | | x | | x | 20,21,36 |
| <i>L. tenera</i> | | x | | x | 22,36 |
| <i>Odonthalia flocosa</i> | x | | x | | 26,30 |
| <i>Osmundea pinnatifida</i> (= <i>Laurencia pinnatifida</i>) | | x | | x | 36,148 |
| <i>Polysiphonia lanosa</i> | x | | x | | 61,142 |
| <i>P. nigrescens</i> | x | | x | | 26,149 |
| <i>Rhodomela confervoides</i> | x | | x | | 26,30 |
| <i>R. larix</i> | x | | x | | 26,150 |
| <i>Vidalia obtusiloba</i> (= <i>Osmundaria obtusiloba</i>) | x | | x | | Este trabalho |
| <i>V. volubilis</i> (= <i>O. volubilis</i>) | x | | x | | 136 |

Na verdade, este padrão também ocorre fora de *Ceramiales*, como no *Plocamium cartilagineum*^{151,152}.

Com relação à presença do esteroide 24-metileno-colest-5-en-3 β -01, em *Vidalia*, há completa coerência com os fatos observados nas outras algas vermelhas. O padrão dos esteróides nas rodofíceas é relativamente simples: os mais frequentemente encontrados são os C-27, com forte predominância do colesterol, seguidos pelos C-28, dentre os quais o mais comum é o 24-metilenocolesterol; os esteróides C-26 e C-29 aparecem raramente^{123,124,125}.

Em Ceramiales, a presença do colesterol é quase absoluta, sendo poucas as exceções — demosterol, campesterol e 24 - metilenocolesterol^{153,154,155}. Por serem largamente distribuídos, esses esteróides não têm valor sistemático.

Nenhuma referência foi encontrada, na literatura, a respeito de substância análoga ou igual à 50; a gulose, presente apenas nos alginatos, encontrados nas regiões intercelulares e nas paredes das células das Feofíceas, não é citada em Rodofíceas e Clorofíceas.

Do exposto, pode-se concluir que as substâncias isoladas de *V. obtusiloba* (= *O. obtusiloba*) estão em concordância com os achados químicos anteriores e comprovam sua classificação; também se enquadram no padrão quimiosistemático (Tabela 17, p.91), que correlaciona os metabólitos primários floridosídeos e digeneasídeo com os metabólitos secundários terpenos e fenóis bromados, aqui apresentado pela primeira vez.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hoeck , C. van den, Mann, D.G. e Jahns, H.M. (1997) *Algae. An introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, 627 p.
2. Lee, E. (1989) *Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, 2^a ed., 645 p.
3. Ragan, M. A. (1995) Are red algae plants ? *Bot. J. Linn. Soc.* **118**, 81-105.
4. Grime, J. P. (1977) Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *Am. Nat.* **111**, 1169-1194.
5. Hay, M. E. (1981) The functional morphology of turf forming seaweeds: persistence in stressful marine habitats. *Ecology* **62**, 739-750.
6. Littler, M. M. e Littler, D.S. (1983) Evolutionary strategies in a tropical barrier reef system : functional- form groups of marine macroalgae. *J. Phicol.* **19**, 229-237.

7. Padilla, D. K. (1985) Structural resistance of algae to herbivores. A biomechanical approach. *Mar. Biol.* **90**, 103-109.
8. Gaines, S. D. , Lubchenco, J. (1982) A unified approach to marine plant- herbivore interactions. II. Biogeography. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **13**, 111-138.
9. Hay, M. E. (1984) Predictable spatial escapes from herbivore: how do these affect the evolution of herbivore resistance in tropical marine communities? *Oecologia* **64**, 396-407.
10. Steinberg, P. D. (1985) Feeding preferences of *Tegula funebris* and chemical defenses of marine brown algae. *Ecol. Mon.* **55** (3), 333-349.
11. Schupp, P.J. e Paul, V.J. (1994) Calcium carbonate and secondary metabolites in tropical seaweeds: variable effects on herbivores fishes. *Ecology* **75** (4), 1172-1185.
12. Hay, M.E. e Fenical, W. (1988) Marine plant-herbivore interactions: the ecology of chemical defense. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **19**, 111-145.
13. Hay, M. E. e Kappel, Q. E. (1994) Synergisms in plant defenses against herbivores: interactions of chemistry, calcification and plant quality. *Ecology* **75** (6), 1714-1726.

14. Faulkner, D.J. (1977) Interesting aspects of marine natural products chemistry. *Tetrahedron* **11**, 1421-1443.
15. Faulkner, D.J. (1984) Marine natural products: metabolites of marine algae and herbivorous marine molluscs. *Nat. Prod. Rep.* **1**, 251-280.
16. Faulkner, D.J. (1986) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **3**, 6-33.
17. Faulkner, D.J. (1987) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **4**, 539-576.
18. Faulkner, D.J. (1990) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **7**, 269-309.
19. Faulkner, D.J. (1991) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **8**, 103-147.
20. Faulkner, D.J. (1992) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **9**, 323-364.
21. Faulkner, D.J. (1993) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **10**, 497-539.

22. Faulkner, D.J. (1994) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **11**, 355-394.
23. Faulkner, D.J. (1995) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **12**, 223-269.
24. Faulkner, D.J. (1996) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **13**, 75-125.
25. Faulkner, D.J. (1998) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **15**, 259-302.
26. Fenical, W. (1975) Halogenation in the Rodophita, a review. *J. Phycol.* **11**, 245-259.
27. Meeks, J.C. (1974) Chlorophylls. P. 161-205. Em *Algal Physiology and Biochemistry*. Botanical Monographs. Vol. X. Stewart, W. D. P. (ed.). University of California Press, Berkeley.
28. Goodwin, T. W. (1974) Carotenoids and Biliproteins. P. 176-205. Em *Algal Physiology and Biochemistry*. Botanical Monographs. Vol. X. Stewart, W. D. P. (ed.). University of California Press, Berkeley.

29. Teixeira, V. L. (1990) *O uso de diterpenos como marcadores taxonômicos e filogenéticos de algas*. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Instituto de Química. São Paulo, 339p.
30. Craigie, J. S. (1974). Storage Products. P. 206-235. Em *Algal Physiology and Biochemistry*. Botanical Monographs. Vol. X. Stewart, W. D. P. (ed.) . University of California Press, Berkeley.
31. Mackie, W. e Preston, R. D. (1974). Cell wall and intercellular region polysaccharides. P. 40-84. Em *Algal Physiology and Biochemistry*. Botanical Monographs, vol. X. Stewart, W. D. P. (ed.). University of California Press, Berkeley.
32. Percival, E. (1979) The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structures, biosynthesis and function. *Br. Phycol. J.* **14**, 103-117.
33. Impellizzeri, G. , Mangiafico, S. , Oriente, G. , Piattelli, M. , Sciuto, S. , Fattorusso, E. , Magno, S. , Santacroce, C. e Sica, D. (1975) Amino acids and low-molecular-weight carbohydrates of some marine red algae. *Phytochemistry* **14**, 1549-1557.

34. Kremer, B.P. (1978) Patterns of photoassimilatory products in Pacific Rhodophyceae. *Can. J. Bot.* **56**, 1655-1659.
35. Kirst, G. O. (1980) Low mw carbohydrates and ions Rodophyceae: quantitative measurement of floridoside and digeneaside. *Phytochemistry* **19**, 1107-1110.
36. Barrow, K. D. , Karsten, U. , King, R. J. e West, J. A. (1995) Floridoside in the genus *Laurencia* (Rhodomelaceae-Ceramiales) – a chemosystematic study. *Phycologia* **34** (4), 279-283.
37. Higa, T. (1981) Phenolic Substances. P. 93-145 In *Marine natural products . Chemical and biological perspectives*. Scheuer, P. J. (ed.) vol. IV, Academic Press, New York.
38. Fenical, W. e Norris, J. N. (1975). Chemotaxomy in marine algae: chemical separation of some *Laurencia* species (Rhodophyta) from the Gulf of California. *J. Phycol.* **11**, 101-108.
39. Masuda, M., Abe, T. Suzuki, T. e Suzuki, M. (1996). Morphological and chemotaxonomic studies on *Laurencia Composita* and *L. Okamurae* (Ceramiales, Rhodophyta). *Phycologia* **35** (6), 550-562.

40. Masuda, M., Abe, T. e Sato, S. (1997) Diversity of halogenated secondary metabolites in the red alga *Laurencia nipponica* (Rhodomelaceae, Ceramiales). *J. Phycol.* **33**, 196-208.
41. Fujii, M. T. (1998) *Estudos morfológicos, quimiotaxonômicos e citogenéticos em quatro espécies selecionadas de Laurencia (Ceramiales, Rhodophyta) do litoral brasileiro*. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências. Rio Claro, 173p.
42. Neish, A. C. (1964). Major pathways of biosynthesis of phenols. P. 295-357. Em *Biochemistry of phenolic compounds*. Harbone, J. B. (ed.). Academic Press, New York.
43. Manley, S. L. e Chapman, D. J. (1978) Formation of 3-bromo-4-hydroxybenzaldehyde from L-tyrosine in cell-free homogenates of *Odonthalia floccosa* (Rhodophyceae) : a proposed biosynthetic pathway for brominated phenols. *F E B S Lett.* **93** (1), 97-101.
44. Stumm, W. e Morgan, J. J. (1981) *Aquatic chemistry – An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. John Wiley & Sons (ed.), Pasadena, 780 p.
45. Margalef, R. (1977) *Ecologia*. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, 951 p.

46. Kanno, N. , Sato, M. (1990) Enzymatic synthesis of a sulfate-containing nucleotide, inosine-5'-phosphosulfate, in several marine macroalgae. *Biochem. Intern.* **21**, 519-528.
47. Kanno, N. , Sato, M. e Sato, Y. (1990) Purification and properties of adenosine-5'-phosphosulfate kinase from the marine red macroalga *Porphyra yezoensis* Ueda. *Bot. Mar.* **33**, 369-374.
48. Kornprobst, J. M. , Sallenave, C. e Barnathan, G. (1998) Sulfated compounds from marine organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* **119 B** (1), 1-51.
49. Rennenberg, H. (1984) The fate of excess sulfur in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**, 121-153.
50. Usov, A. I. (1992) Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. *Foods Hydrocolloids* **6**, 9-23.
51. Mc Lachlan, J. (1985) Macroalgae (seaweeds): industrial resources and their utilization. *Plant and Soil* **89**, 137-157.
52. Oliveira, E. C. (1997) Algas marinhas: um recurso ainda pouco explotado pelo Brasil. *Panorama da Aquicultura*, maio/junho, 24-26.

53. Oliveira, E. C. (1997) Macroalgas marinhas de valor comercial: técnicas de cultivo. *Panorama da Aquicultura*, julho/agosto, 42-44.
54. Pataukart, M. S., Oehninger, S. , Barnett, T., Williams, R. L. e Clark, G. F. (1993) A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *J. Biol. Chem.* **29**, 21770-21776.
55. Neushul, M. (1990) Antiviral carbohydrates from marine red algae. *Hydrobiologia* **204/205**, 99-104.
56. Franz, G. (1989) Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts. *Planta Med.* **55**, 493-497.
57. Fries, L. (1973). Growth stimulating effects of the bromofenol, lanosol, on red algae in axenic culture. *Experientia* **29**, 1436-1437.
58. Augier, J. e Mastgali, P. (1956) Sur un composé phénolique bromé extrait de l'algue rouge *Halopitys incurvus*. *Comptes rendus*, **242**, 190-191.

59. Kurata, K. , Amiya, T. e Yabe, K. (1973) Studies on the constituents of a red marine alga, *Odonthalia corymbifera*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **39** (9), 973-978.
60. Glombitza, K. W. , Stoffelen, H., Murawski, U. , Bielaczec, J. e Egge, H. (1974) Antibiotics from algae. 9. Bromo-phenols from Rhodomelaceae. *Planta Med.* **25**, 107-113.
61. Augier, J. e Hoffmann, G. (1952) Sucre et brome dans le *Polysiphonia fastigata* (Roth) Grev. *Bull. Soc. Bot. Fr.* **99**, 80-82.
62. Hodgkin, J. H. , Craigie, J. S. , e Mc Innes, A. G. (1966) The occurrence of 2,3-dibromobenzyl alcohol 4,5-disulfate, dipotassium salt, in *Polysiphonia lanosa*. *Can. J. Chem.* **44**, 74-78.
63. Glombitza, K. W. e Stoffelen, H. (1972). 2,3-Dibrom-5-hydroxybenzyl - 1' , 4 - disulfat (dikalium - salz) aus Rhodomelaceen. *Planta med.* **22**, 391-395.
64. Weinstein, B., Rold, T. L. , Harrel, C. E. , Burns, M. W. e Waaland, J. R. (1975) Reexamination of the bromophenols in the red alga *Rhodomela larix*. *Phytochemistry* **14**, 2667-2670.

65. Kurata, K. e Amyia, T. (1975) Chemical studies on constituents of marine algae. II-Constituents of the red marine alga, *Rhodomela subfusca*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **41** (6), 657-659.
66. Augier, J. e Henry, M. H. (1950) Au sujet du brome dans les Rhodophycées. *Bull. Soc. Bot. Fr.* **97**, 29-30.
67. Nanteuil, G. e Mastagli, P. (1981) A bromophenol in the red alga *Halopitys incurvus*. *Phytochemistry* **20** (7), 1750-1751.
68. Kurata, K. e Amiya, T. 1980. Disodium 2,3,6-tribromo-5-hydroxybenzyl 1',4-disulfate, a new bromophenol from 1,4-disulfate, a new bromophenol from the red alga, *Symphyclocladia latiuscula*. *Chem. Lett.* 279-280.
69. Jensen, A. e Ragan, M. (1978) 1,2,3,5-Tetrahydroxy-benzene 2,5-disulfate ester : the "phenolic precursor in gelbstoff-forming exudates precursor in gelbstoff-forming exudates from the marine brown alga *Ascophyllum nodosum* (L.) Lejol. *Tetrahedron Lett.* **9**, 847-850.
70. Ragan, M. A. e Jensen, A. (1979) Widespread distribution of sulfated polyphenols in brown algae. *Phytochemistry* **18**, 261-262.

71. Laycock, M. V. e Ragan, M. A. (1984) L-3,4-Dihydroxyphenylalanine-3-sulfate from the brown alga, *Ascophylum nodosum*. *J. Nat. Prod.* **47** (6), 1033-1035.
72. Glombitza, K. W. e Knoss, W. (1992) Sulfated phlorotannis from the brown alga *Pleurophyucus gardneri*. *Phytochemistry* **31** (1), 279-281.
73. Edmonds, J. S. , Morita, M. e Shibata, W. (1987) Isolation and identification of arsenic-containing ribofuranosides and inorganic arsenic from japanese edible seaweed *Hizikia fusiforme*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 577-580.
74. Francesconi, K. A. , Edmonds, J. S. , Stick, R. V. , Skelton, B. W. e White , A. H. (1991) Arsenic-containing ribosides from the brown alga *Sargassum lacerifolium*: x-ray molecular structure of 2-amino-3-[5'-deoxy-5'-(dimethylarsinoyl)-riboseoxy] propane-1-sulphonic acid. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2707-2716.
75. Shibata, Y. e Morita, M. (1988). A novel trimethylated arseno-sugar isolated from the brown alga *Sargassum thunbergii*. *Agric. Biol. Chem.* **52** (4), 1087-1089.

76. Liem, P. Q. e Laur, M. H. (1976) Les alcools alifatiques sulfatés: nouveaux lipides polaires isolés des diverses fucacées. *Biochimie* **58**, 1381-1396.
77. Liem, P. Q. e Laur, M. H. (1976) Structures, teneurs et compositions des esters sulfuriques, sulfoniques, phosphoriques des glycosyldiglycérides des trois fucacées. *Biochimie* **58**, 1367-1380.
78. Govindam, M. , Abbas , S. A. , Schmitz, F. J. , Lee, R. H. , Papkoff, J. S. e Slate, D. L. (1994) New cicloartenol sulfates from the alga *Tydemania expeditionis*: inhibitors of the protein tyrosine kinase p 60. *J. Nat. Prod.* **57**, 74-78.
79. Vilter, H. , Glombitza, K. W. e Grave, A. (1983) Peroxidases from Phaeophyceae. I. Extraction and detection of the peroxidases. *Bot. Mar.* **26** (7), 331-339.
80. Everett, R.R. , Kanofsky, J. R. e Butler, A. (1990) Mechanistic investigations of the novel non-heme vanadium bromoperoxidases. *J. Biol. Chem.* **265** (9), 4908-4914.
81. Gribble, G. W. (1992) Naturally occurring organohalogen compounds. A survey. *J. Nat. Prod.* **55** (10), 1353-1395.

82. Gribble, G. W. (1996) Naturally occurring organohalogen compounds – A comprehensive survey. P. 1 - 383. Em “*Progress in the chemistry of organic natural products*”. Vol. LXVIII. Herz, W. , Grisebach, H. e Kirby, G. W. (eds.). Springer, New York.
83. Pedersén, M. e Da Silva, E. J. (1973) Simple brominated phenols in the bluegreen alga *Calotrix brevissima* West. *Planta* **115**, 83-86.
84. Pedersén, M. e Fries, L. (1975) Bromophenols in *Fucus vesiculosus*. *F. Pflanzenphysiol.* **74**, 272-274.
85. Lundgren, L. , Olsson, K. e Theander, O. (1979). Synthesis of some bromophenols present in red alga. *Acta Chem. Scand.* **B 33**, 105-108.
86. Pedersen, M. (1978). Bromochlorophenols and a brominated diphenylmethane in red algae. *Phytochemistry* 291-293.
87. Kurata, K. e Amiya, T. (1977) Two new bromophenols from the red alga, *Rhodomela larix*. *Chem. Lett.* 1435-1438.
88. Chevolot-Magueur, A. A. Cave, A. e Riche, C. (1976) Composés bromés de *Rytiphlea tinctoria* (Rhodophyceae). *Phytochemistry* **15**, 767-771.

89. Wiemer, D. F. , Idler, D. D. e Fenical, W. (1991) Vidalols A e B, new anti-inflammatory bromophenols from the Caribbean marine red alga *Vidalia obtusiloba*. *Experientia* **47**, 851-853.
90. Kurata, K. , Amyia, T. e Nakano, N. (1976) 3,3'-Dibromo-4,4',5,5'-tetrahydroxybenzyl, a new bromophenol from the red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Chem. Lett.* 821-822.
91. Suzuki, M. , Kowata, N. e Kurosawa, E. (1980) Bromo-phenols from the red alga *Rhodomela larix*. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **53**, 2099-2100.
92. Green, D. e Kashmann, Y. (1993) Colpol, a new cytotoxic C₆-C₄-C₆ metabolite from the alga *Colpomenia sinuosa*. *J. Nat. Prod.* **56** (7), 1201-1202.
93. Aknin, M. , Samb, A. , Mirailles, J. , Costantino, V. , Fattorusso, E. e Mangoni, A. (1992) Polysiphenol, a new brominated 9,10-dehydrophenanthrene from the senegalese red alga *Polysiphonia ferulacea* *Tetrahedron Lett.* **33** (4), 555-558.
94. Combaut, G. , Chantraine, J. N. , Teste, J. e Glombitza, K. W. (1978) Phenols bromés des algues rouges: cyclotribromoveratrylene, nouveau dérivé obtenu au cours de

l'extraction de *Halopytis pinastroides*. *Phytochemistry* **17**, 1791-1792.

95. Kock, M. e Gregson, R. P. (1984) Brominated phlorethols and nonhalogenated phlorotannins from the brown alga *Cytophora Congesta*. *Phytochemistry* **23**, 2633-2637.
96. Sun, H. H. , Paul, V. J. e Fenical, W. (1983) Avrainvilleol, a brominated diphenyl-methane derivate with feeding deterrent properties from the tropical green alga. *Avrainvillea longicaulis*. *Phytochemistry* **22** (3), 743-745.
97. Colon, M. , Guevara P. e Gerwick, W. H. (1987) 5'-hydroxyiso-avrainvilleol, a new diphenylmethane derivate from the tropical green alga *Avrainvillea nigricans*. *J. Nat. Prod.* **50**, 368.
98. Carte, B. K. , Troupe, N. , Chan, J. A. , Westley J. W. e Faulkner, J. (1989) Rawsonol, na inhibitor of H M G- CoA reductase from the tropical green alga *Avrainvillea rawsoni*. *Phytochemistry* **28** (11), 2917-2919.
99. Chen, J. L. e Gerwick, W. H. (1994) Isorawsonol and related IMP dehydrogenase inhibitors from the tropical green alga *Avrainvillea rawsoni*. *J. Nat. Prod.* **57** (7), 947-952.

101. Kubo, I., Ochi, M., Shibata, K., Hanke, F. J., Nakatsu, T. e Tan, K. S. (1990). Effect of a marine algal constituent on the growth of lettuce and rice seedlings. *J. Nat. Prod* **53** (1), 50 - 56.
102. McLachlan, J. e Craigie, J. S. (1966). Antialgal activity of some simple phenols. *J. Phycol.* **2**, 133-135.
103. Niang, L. L. e Hung, X. (1984). Studies on the biologically active compound of the algae from the Yellow Sea. *Hydrobiologia* **116/117**, 168-169.
104. Vreeland, V. (1998). Polyphenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels. *J. Phycol.* **34**, 1-8.
105. Ragan, M. A. (1985) The high molecular weight polyphloroglucinols of the marine alga *Fucus vesiculosus* L.-degradative analysis. *Can. J. Chem.* **63**, 294-303.
106. Bryan, G. W. e Hummerstone, L.G. (1973) Brown seaweed as an indicator of heavy metals in estuaries in South-West England. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* **53**, 705-720.
107. Mann, J. (1996) *Secondary Metabolism*. Oxford University Press, Oxford, 375 p.

108. Buttler, A . e Walker, J.V. (1993) Marine Haloperoxidases. *Chem. Rev.* **93**, 1937 - 1944.
109. Everett, R. R. , Kanofsky, J. R. e Buttler, A . (1990) Mechanistic investigations of the novel non-heme vanadium bromoperoxidases. *J. Biol. Chem.* **265** (9), 4908 - 4914.
110. Krenn, B. E. , Plat, H. e Wever, R. (1987) The bromoperoxidase from the red alga *Ceramium rubrum* also contains vanadium as a prosthetic group. *Biochim. Biophys. Acta* **912**, 287-291.
111. Oliveira Filho, E. C. (1977) *Algas marinhas bentônicas do Brasil*. Tese de livre docência. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências .São Paulo, 407 p.
112. Norris, R. E. (1991) The structure, reproduction and taxonomy of *Vidalia* and *Osmundaria* (Rhodophyta, Rhodomelaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* **106**, 1- 40.
113. Sulfato cérico-ácido sulfúrico: para esteróides e terpenos. *Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography*.(1971) Ítem 57, p.18. E. Merck, Darmstadt.

114. Fluoresceína- peróxido de hidrogênio: para substâncias não aromáticas contendo bromo. *Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography*. (1971) Ítem 140, p.44. E. Merk, Darmstadt.
115. Cloreto de ferro (III): para fenóis. *Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography*. (1971) Ítem 166 , p. 52. E. Merck, Darmstadt.
116. Silva, D. H. S. , Lopes, N. P. e Kato, M. J. (1997) Fatty acids from myristicaceous seeds of myristic acid-rich-species. *An. Assoc. Bras. Quim.* **46** (3), 232-235.
117. Ninidrina : para amino ácidos, aminas e açúcares aaminados. *Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography*. (1971). Ítem 207, p.64 E. Merck, Darmstadt.
118. Pietrzyk, D. J. (1989) Organic Polymeric Stationary Phases. P. 223-276. Em *High Performace Liquid Chromatography*. Vol. **98**. Brown, P. R. e Hartwick, R. A (eds.) Wiley-Interscience Publication, New York.
119. Gordon, H. T. , Thornburg, W. e Werum, L. N. (1956) Rapid paper chromatography of carbohydrates and related compounds. *Anal. Chem.* **28**, 849 - 855.

120. Weintein, B. , Rold, T. L. , Harrel, C. E., Burns, M. W. e Waaland, J. R. (1975) Reexamination of the bromophenols in the red alga *Rhodomela larix*. *Phytochemistry* **14**, 2667 - 2670.
121. Espectro de RMN ^{13}C do colesterol (1978). Carbon - 13 NMR. Sadtler Research Laboratories, Inc. 4439.
122. Della Greca, M. , Monaco, P. e Previtera, L. (1991). New oxygenated sterols from the weed *Eichhornia crassipes* Solms. *Tetrahedron* **47** (34), 7129 - 7134.
123. Tsuda, K. Akagi, S. , Kishida, Y. , Hayatsu, R. e Sakai, K. (1958). Untersuchungen uber steroide. IX. Die sterine aus meeres - algen. *Pharm. Bull.* **6**, 724 - 727.
124. Gibbons, G. F., Goad, L. J. e Goodwin, T. W.(1967) The sterols of some marine red algae. *Phytochemistry* **6**, 677 - 683.
125. Alcaide, A., Barbier, M. e Potier, P. (1969) Nouveaux resultats sur les sterols des algues rouges. *Phytochemistry* **8**, 2301 - 2303.
126. Barbier, M., Hugel, M. F. e Lederer, E. (1960) Isolement du 24-méthylène-cholesterol a partir du pollen de différents plantes. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **42** (1), 91 -97.

127. Barbier, M. (1970) Chemistry and biochemistry of pollens. *Progr. Phytochem.* **2**, 1 - 29.
128. Eggert, H. , VanAntwerp, C. L. , Bhacca, N. S. e Djerassi, C. (1976) Carbon - 13 nuclear magnetic resonance spectra of hydroxy steroids. *J. Org. Chem.* **41** (1) , 71 -78.
129. Karsten, U., Bock, C. e West, J. A . (1995) ^{13}C - NMR spectroscopy as a tool to study organic osmolytes in the mangrove red algal genera *Bostrychia* and *Stictosiphonia* (*Ceramiales*). *Phycol. Res.* **43**, 241 - 247.
130. Karsten, V. Barrow, K. D. , Mostaert, A .S. , King, R. J. e West, J. A . (1994) ^{13}C and ^1H - NMR studies on digeneaside in the red alga *Caloglossa leprieurii* - a re-evaluation of its osmotic significance. *Plant Physiol. Biochem.* **32**, 669 - 676.
131. Agrawal, P. K. (1992) NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* **31** (10), 3307-3330.
132. Chihara, G. (1958) Characteristic infrared absorption band of organic sulfate esters. *Chem. Pharm. Bull.* **6** (1), 114.

133. Chihara, G. (1960) Medical and biochemical application of infrared spectroscopy. V - Infrared absorption spectra of organic sulfate esters. *Chem. Pharm. Bull.* **8** (11), 988 - 994.
134. Ragan, M. A . (1978) Phenol sulfate esters: ultraviolet, infrared, ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopic investigation. *Br. Phycol. J.* **14**, 103 - 117.
135. Percival, E. (1979) The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function. *Br. Phycol. J.* **14**, 103 - 117.
136. Lamure ,J. (1944) Les constituants glucidiques de *Vidalia volubilis* et de *Halopytis pinastroides*. *Comptes rendues* **218**, 246 - 247.
- 137 Patti, A , Morrone, R. (1992) Biosynthetic relationship between sulfonium and N-methylated compounds in the red alga *Vidalia volubilis*. *J. Nat. Prod.* **55** (1), 53 - 57.
138. Kazlauskas, R., Murphy, P. e Wells, R. (1982) A brominated metabolite from the red alga *Vidalia spiralis*. *Aust. J. Chem.* **35**, 219 - 220.

139. Sato, M. , Nakano, T. , Takeuchi, M., Kanno, N., Nagahisa, E. e Sato, Y. (1996) Distribution of neuroexcitatory amino acids in marine algae. *Phytochemistry* **42** (6), 1595 - 1597.
140. Suzuki, M., Mizuno, Y. e Masuda, M. (1996) Neoisoprelaufucin, a halogenated C15 non terpenoid compound from *Laurencia nipponica*. *Phytochemistry* **43** (1), 121 - 124.
141. Lukner, M. (1984) *Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals* 2ª edição. Springer Verlag. New York, 576 p.
142. Kremer, B. P. (1980) Taxonomic implications of alga photoassimilate patterns. *Br. Phycol. J.* **15**, 399 - 409.
143. Craigie, J. S., McLachlan, J. e Tocher, R. D. (1968) Some neutral constituents of the Rhodophyceae with special reference to the occurrence of the floridosides. *Can. J. Bot.* **46**, 605 - 611.
- 144.. Karsten, U. , Bock, C. e West, J. A ., (1995) Low molecular weight carbohydrate patterns in geographically different isolates of the enlittoral red alga *Bostrychia tenuissima* from Australia. *Bot. Acta* **108**, 321- 326.

145. Bouveng, H., Lindberg, B. e Wickberg, B. (1955) Low-molecular carbohydrates in algae. IX. Structure of the glyceric acid mannoside from red algae. *Acta Chem. Scan.* **9** (5), 807-809.
146. Pedersen, M., Saenger, P. e Fries, L. (1974) Simple bromophenols in red algae. *Phytochemistry* **13**, 2273 - 2279.
147. Fenical, W. e Sims, J.J. (1974) Cycloeudesmol, an antibiotic cyclopropane containing sesquiterpene from the marine alga, *Chondria oppositoclada* Dawson. *Tetraedron Lett.* **3**, 1137 - 1140.
148. Rahman, A ., U., Ahmad, V. U., Bano, S., Abbas, S. A ., Alvi, K. A ., ALI, M.S., Lu, H. S. M. e Clardy, J. (1988) Pinnatazane, a bridged cyclic ether seaquiterpene from *Laurencia pinnatifida* (= *Osmundea pinnatifida*). *Phytochemistry*, **27** (12), 3879 - 3880.
149. Majak, W. Craigie, J. S. e McLachlan, J. (1965) Photosynthesis in algae. I. Accumulation products in the Rhodophyceae. *Can. J. Bot.* **44**, 541-549.
150. Whyte, J. N. C. (1970) Extraction procedure for plants: extracts from the red alga *Rhodomela larix*. *Phytochemistry* **9**, 1159-1161.

151. Abreu, P. M., Galindro, J. M. , Relva, A . M. e Ramos, A . M. (1997) Non - terpenoid compounds from *Plocamium cartilagineum*. *Phytochemistry* **48**, (8), 1601 - 1603.
152. Mynderse, J. S. (1974) Polyhalogenated monoterpenes from the red alga *Plocamium cartilagineum*. *Tetrahedron* **31**, 1963.
153. Babu, M. J., Trivedi, G. K. e Mathur, H.H. (1989) Diketosteroid from marine alga *Hypnea musciformis*. *Phytochemistry* **28** (11) 3237 -3239
154. Fattorusso, E., Magno,S., Santacroce, C. e Sica, D. (1975) Sterols of some red algae. *Phytochemistry* **14**, 1579 - 1582.
155. Patterson, G. W. The distribution of sterols in algae (1971) *Lipids* **6**, 120 - 127.

ESPECTROS

**BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo**

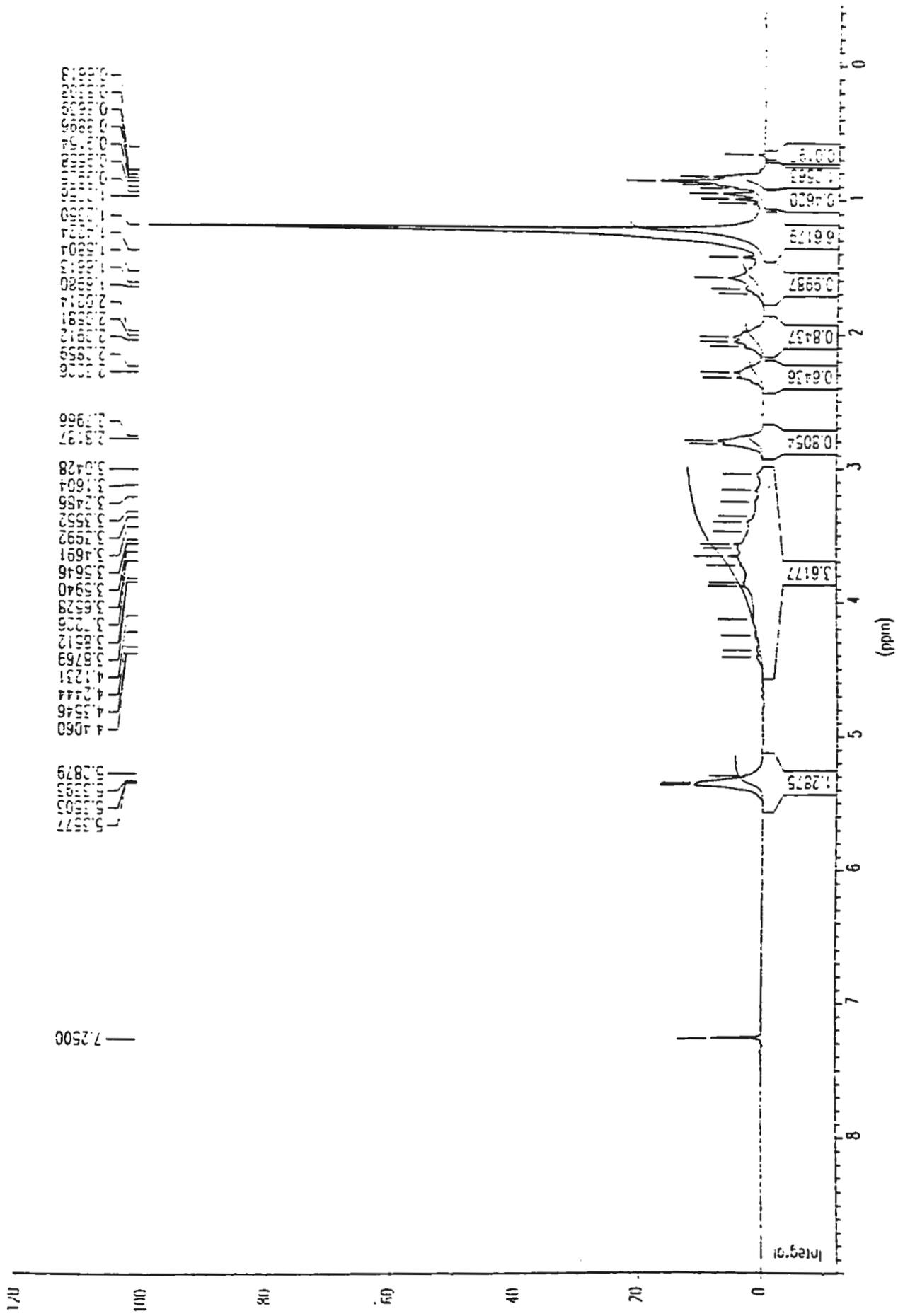


Figura 6. Espectro de RMN ¹H do extrato VH (200 MHz, CDCl₃).

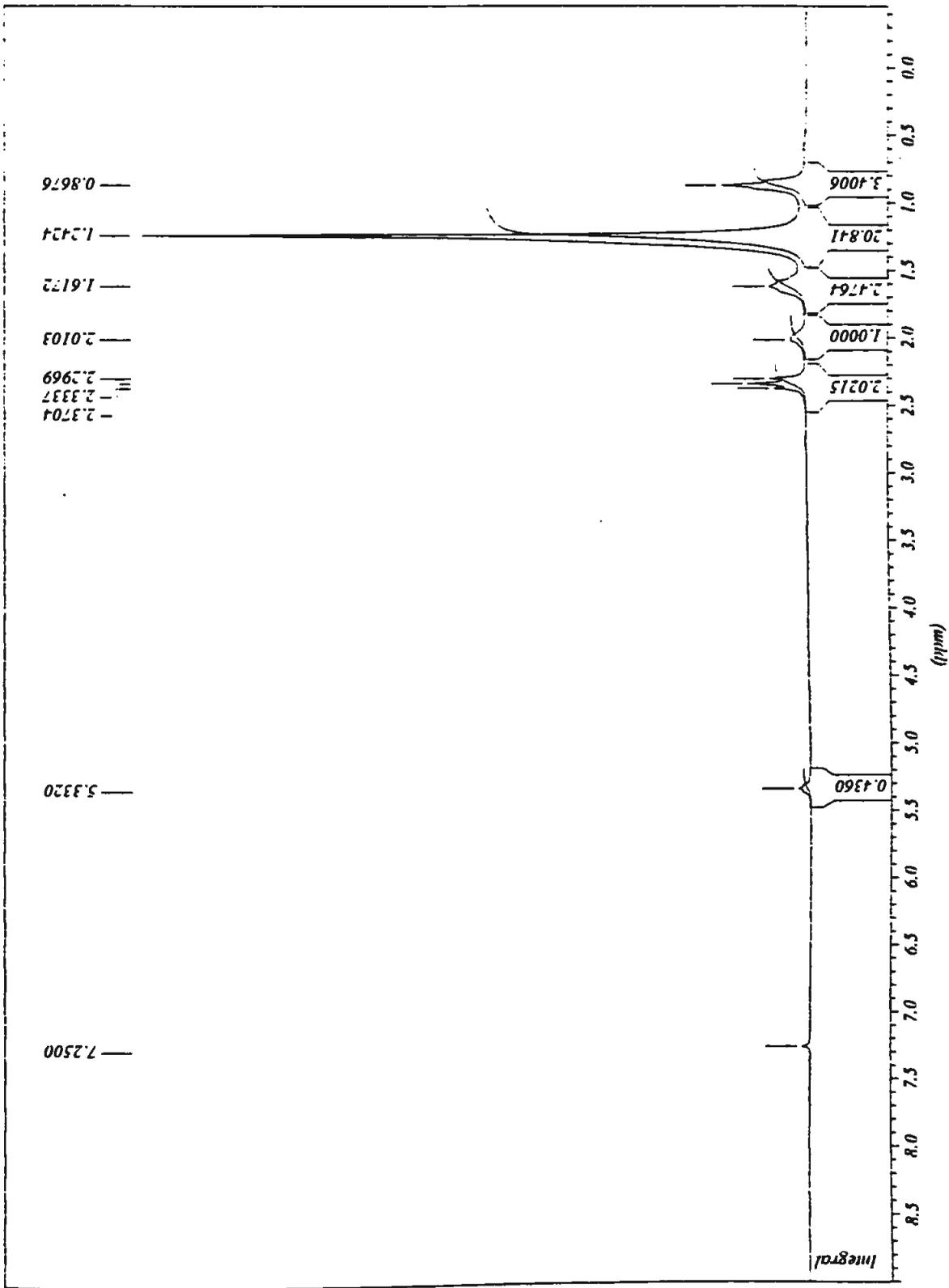


Figura 8. Espectro de RMN ^1H da fração VH-V-9 (200 MHz, CDCl_3).

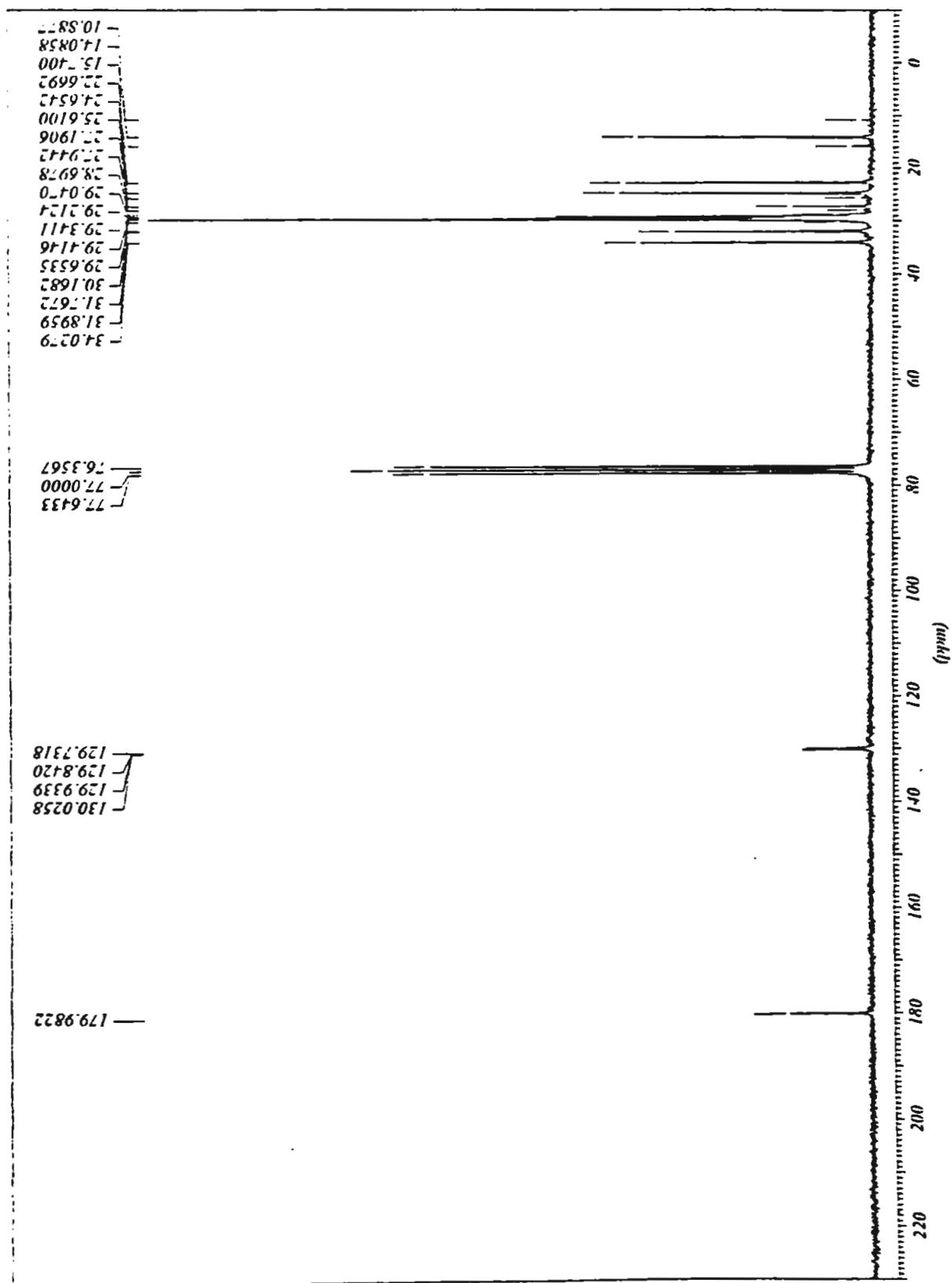
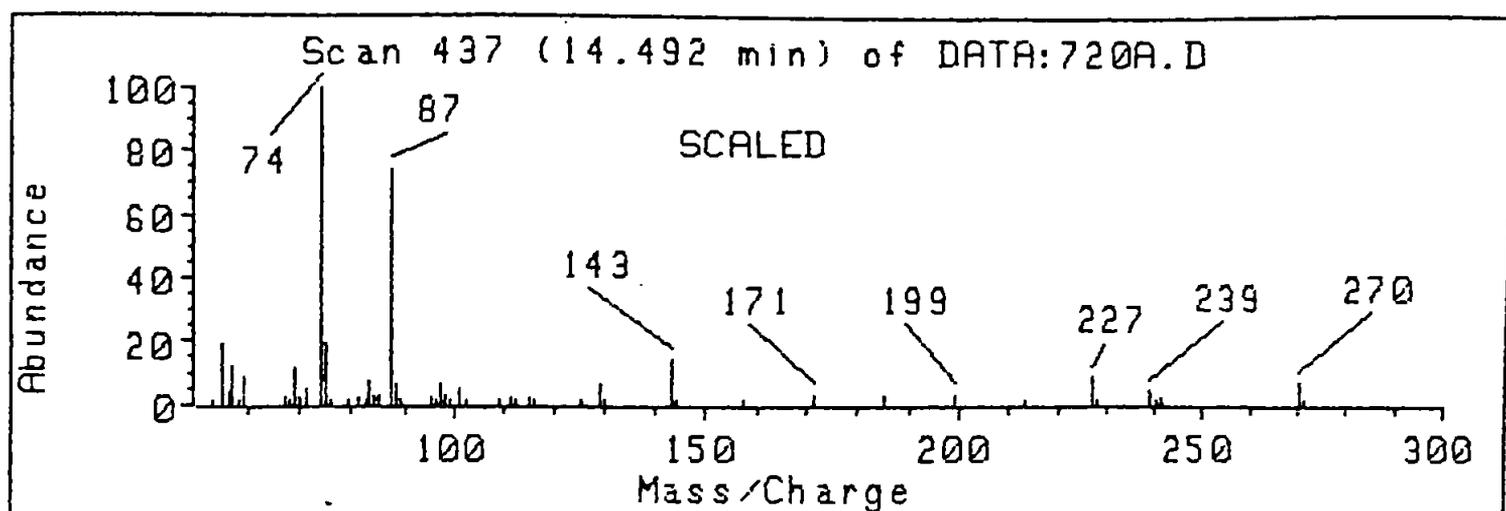
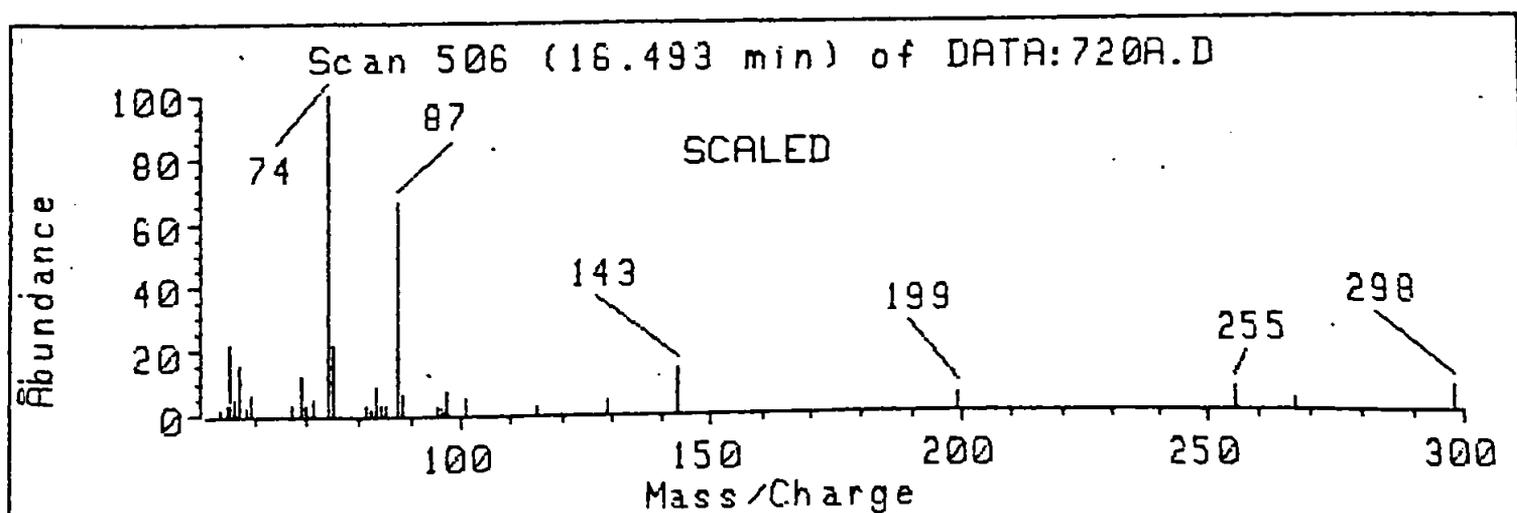
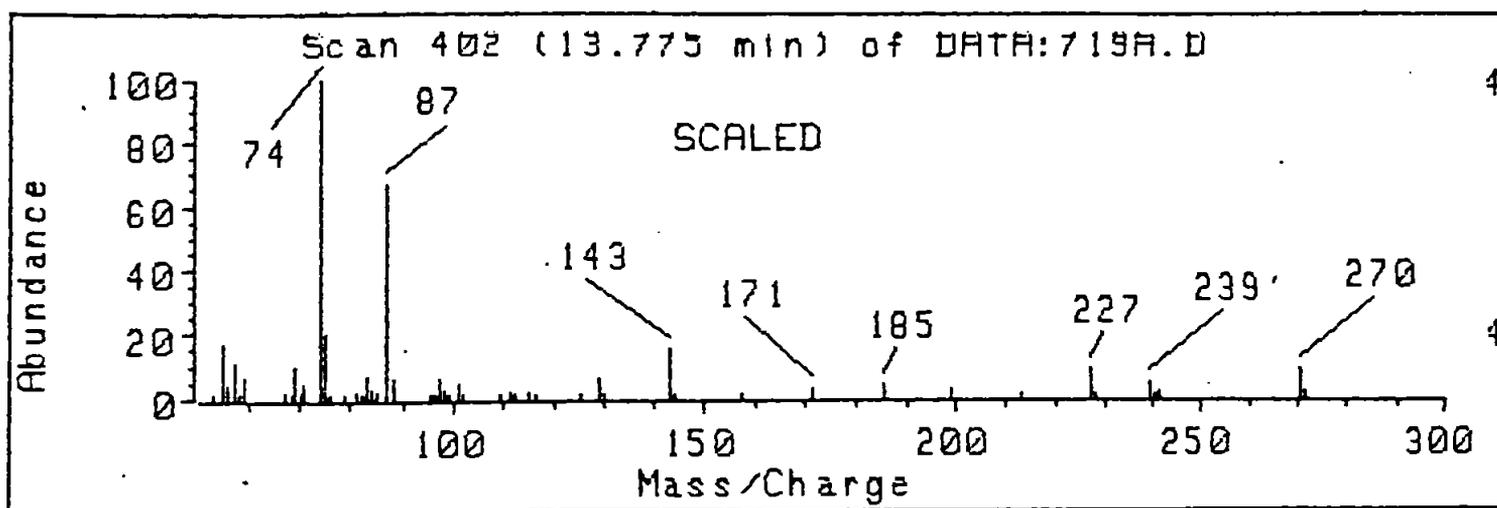


Figura 9. Espectro de RMN ^{13}C (PND) de VH-V-9 (50 MHz, CDCl_3).



Scan 437 (14.492 min) of DATA:720A.D
 VH-V-9



Scan 506 (16.493 min) of DATA:720A.D
 VH-V-9

Figura 10. Espectro de massas (CG-EM) da fração VH-V-9, metilada.

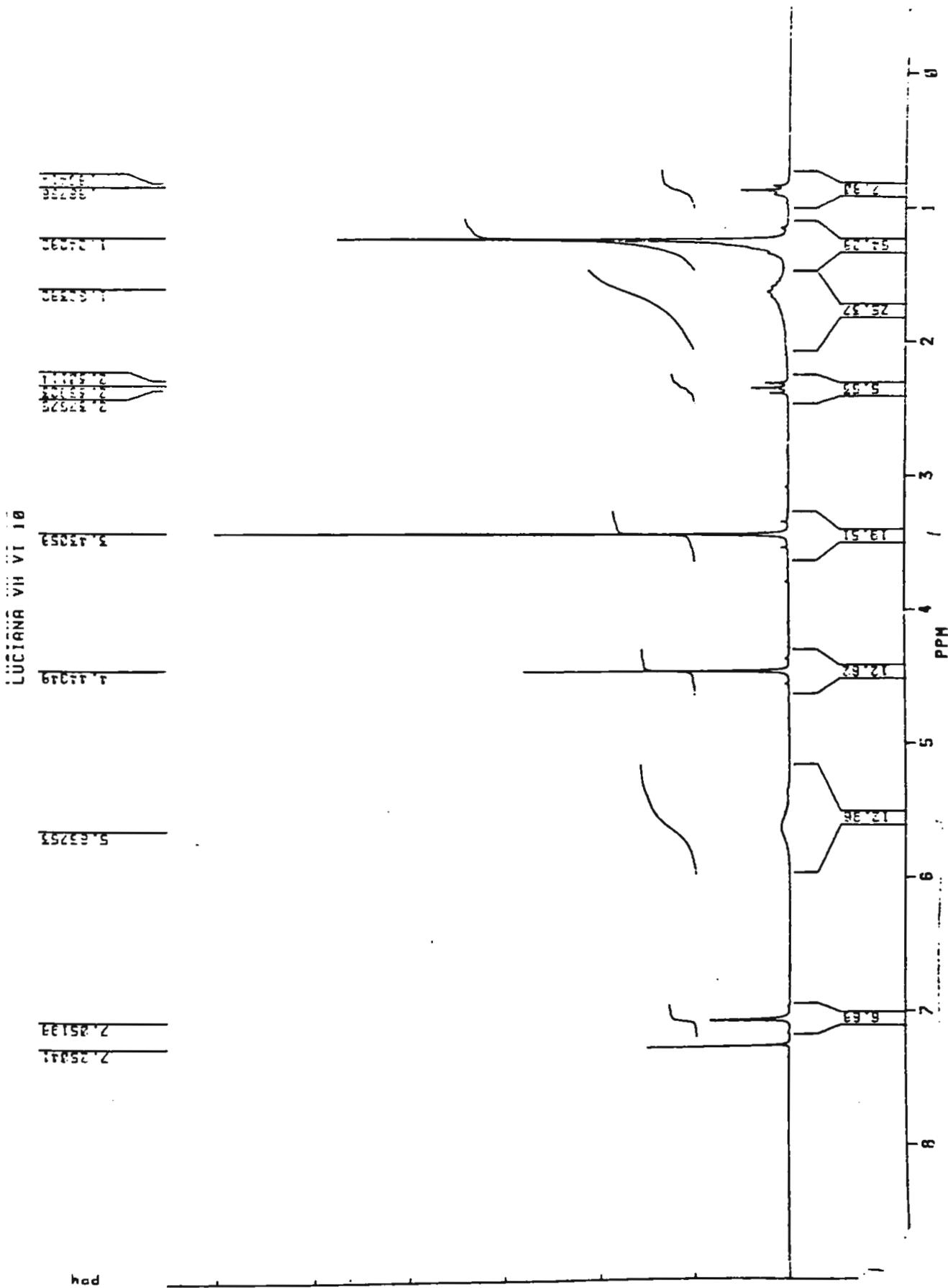


Figura 11. Espectro de RMN ^1H da fração VH-VI-10 (200 MHz, CDCl_3).

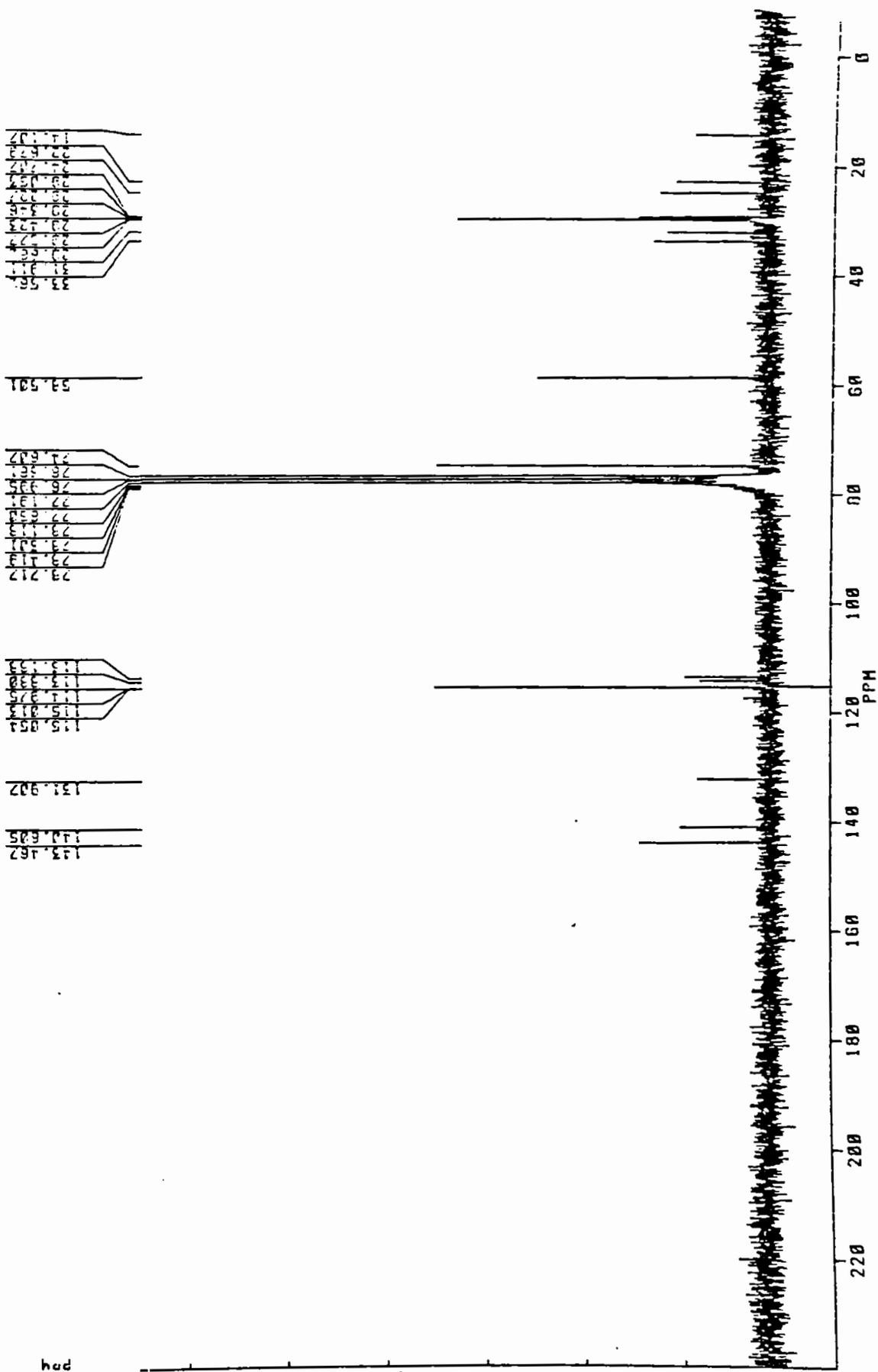
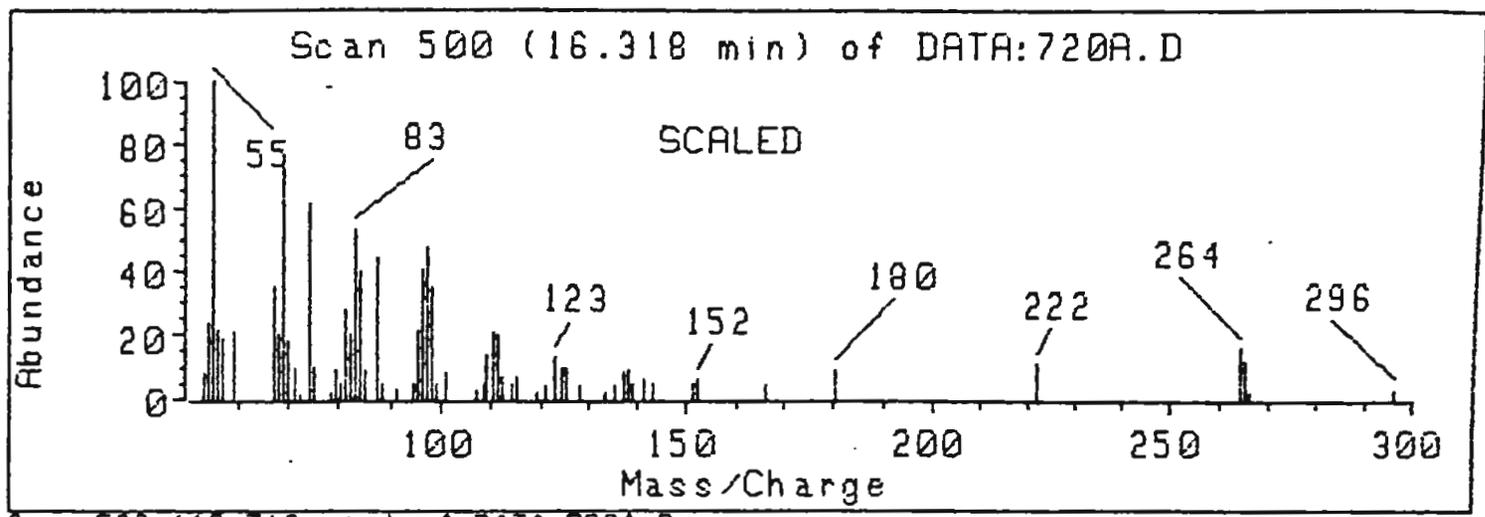
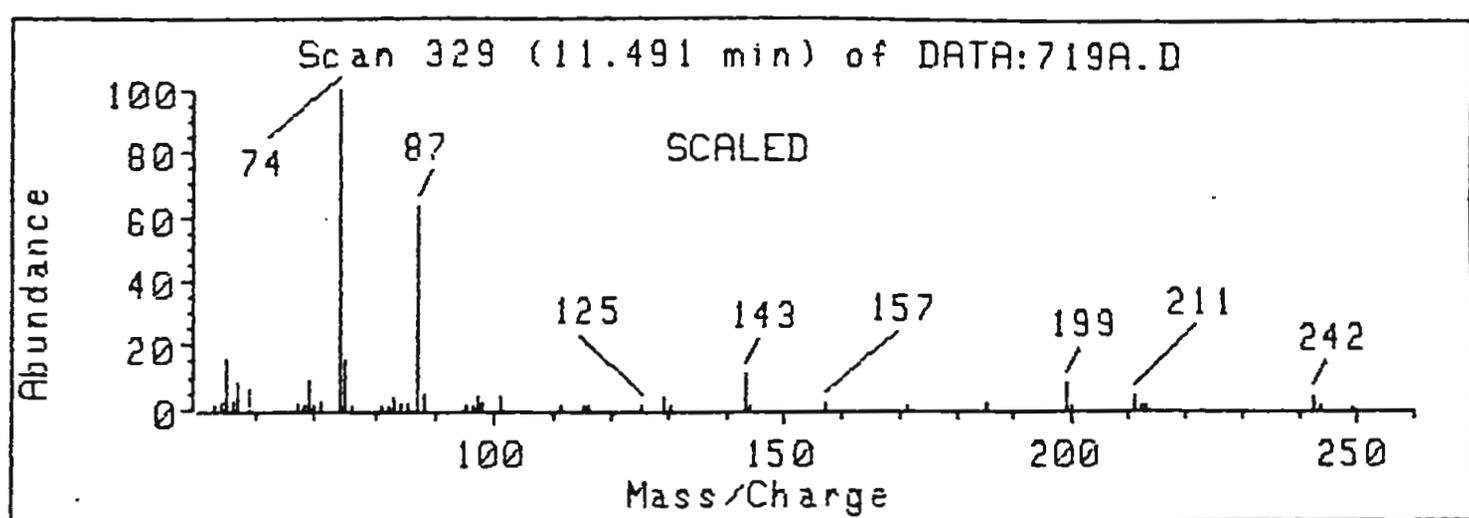


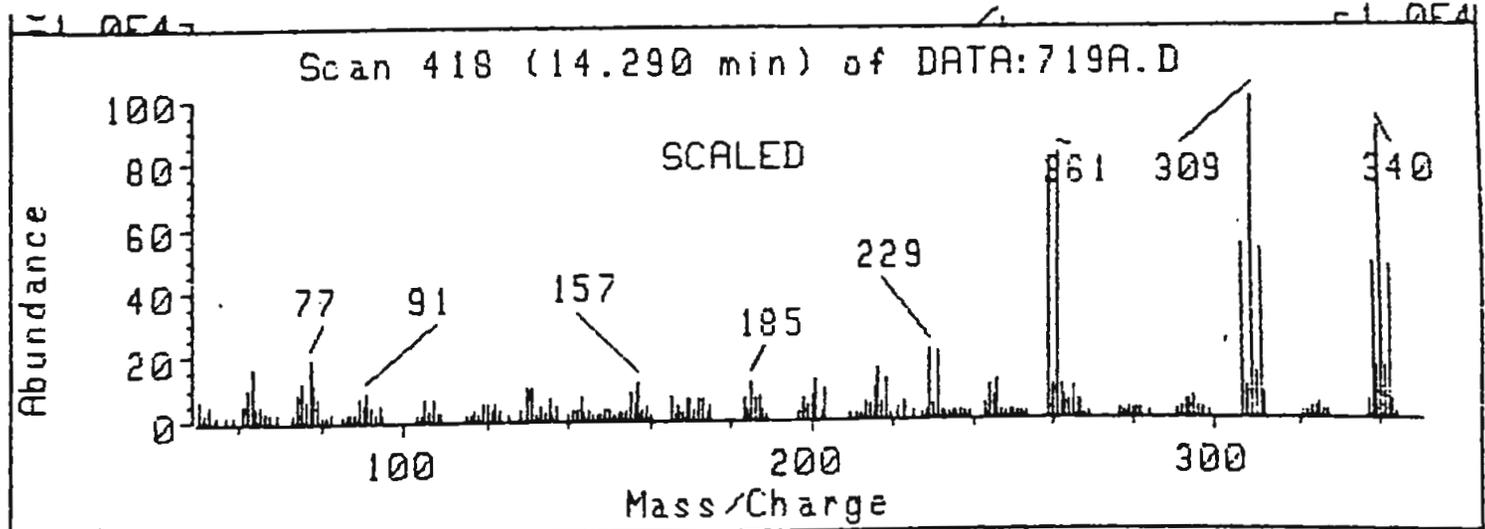
Figura 12. Espectro RMN ^{13}C (PND) da fração VH-VI-10 (50 MHz, CDCl_3).



Scan 500 (16.318 min) of DATA:720A.D



Scan 329 (11.491 min) of DATA:719A.D
VH-VI



Scan 418 (14.290 min) of DATA:719A.D
VH-VI

Figura 13. Espectro de massas (CG-EM) da fração VH-VI-10, metilada.

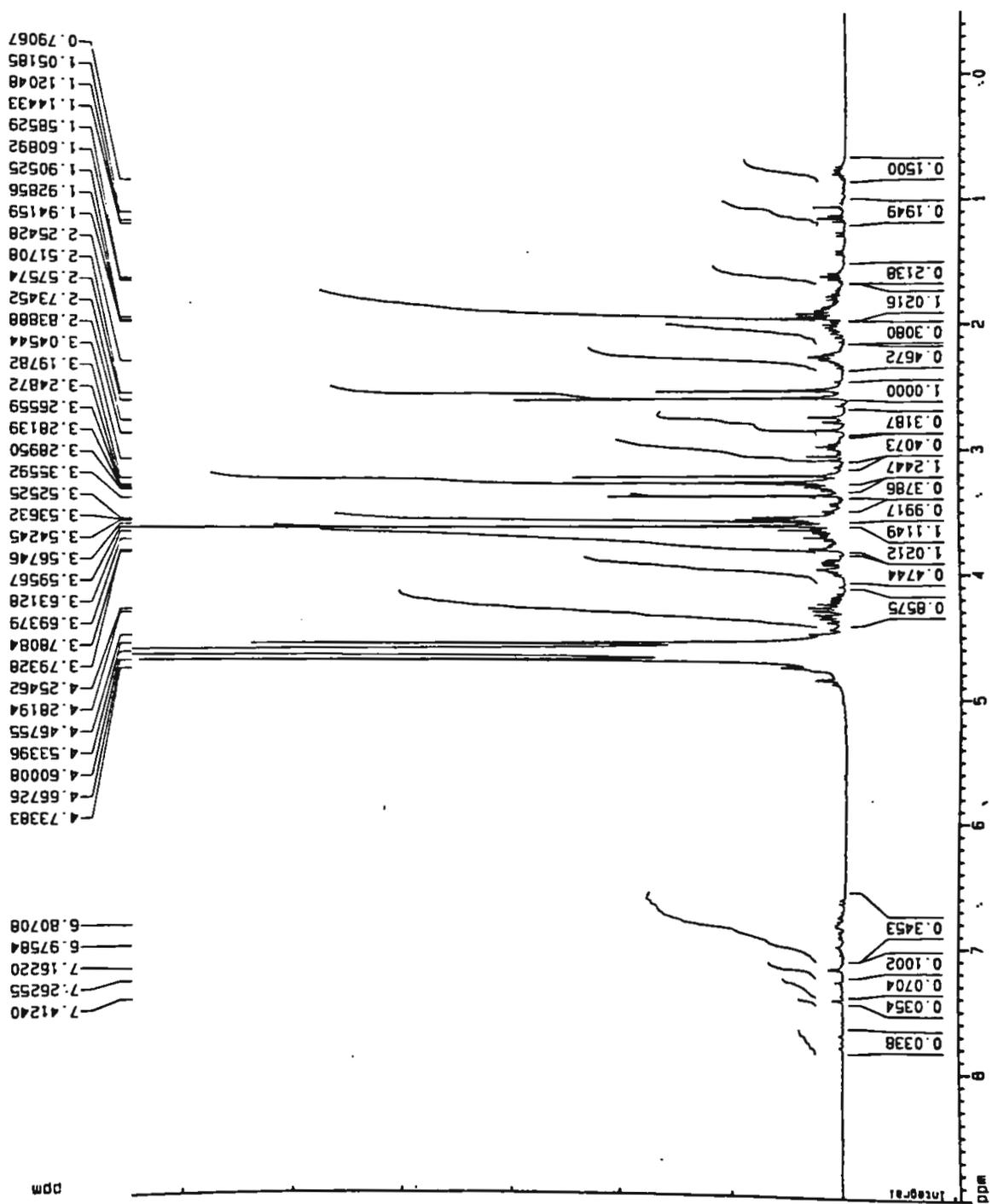


Figura 15. Espectro de RMN ¹H de VAc (300 MHz, CDCl₃).

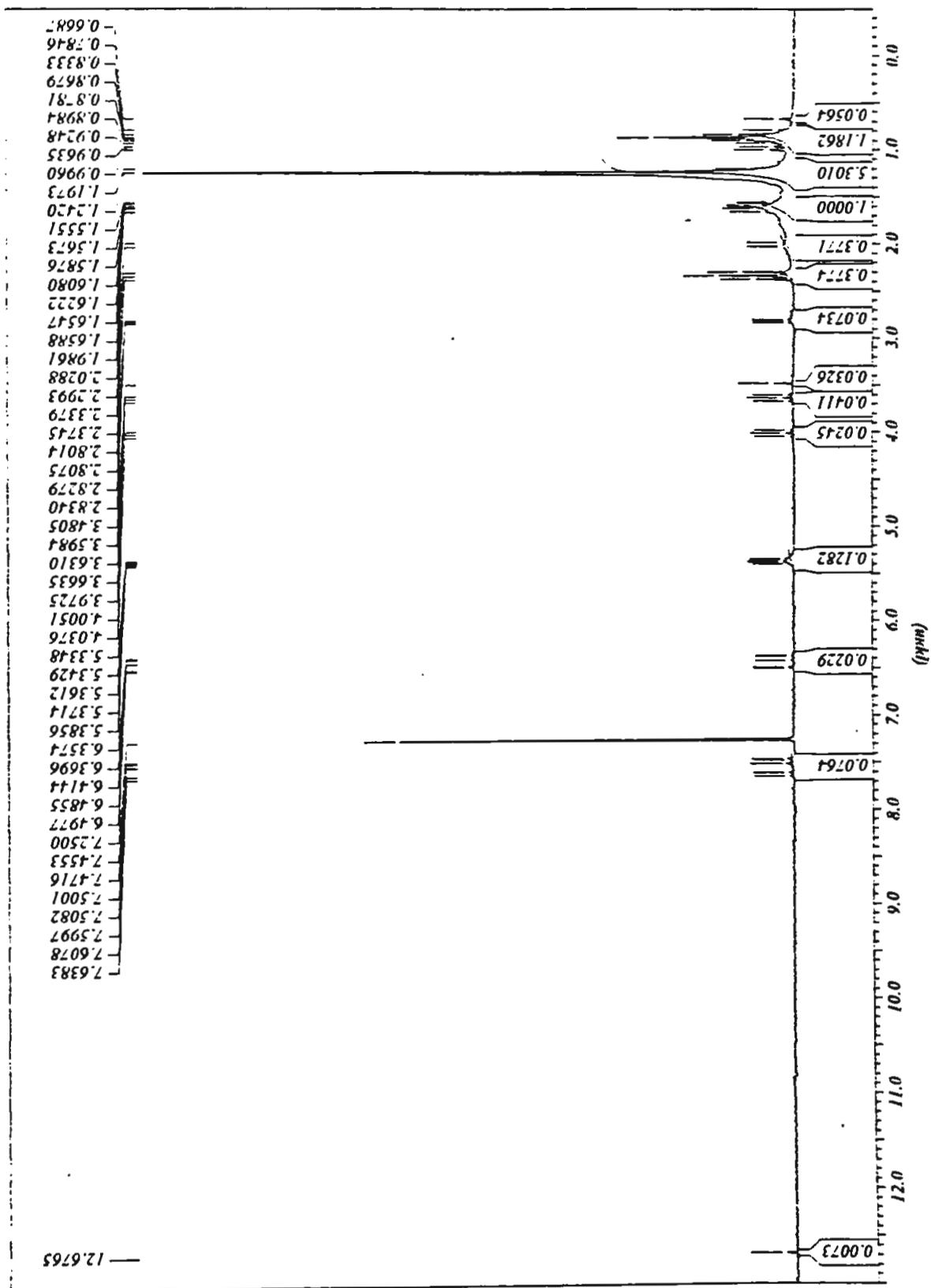


Figura 16. Espectro de RMN ¹H da fração VAc-I-10 (300 MHz, CDCl₃).

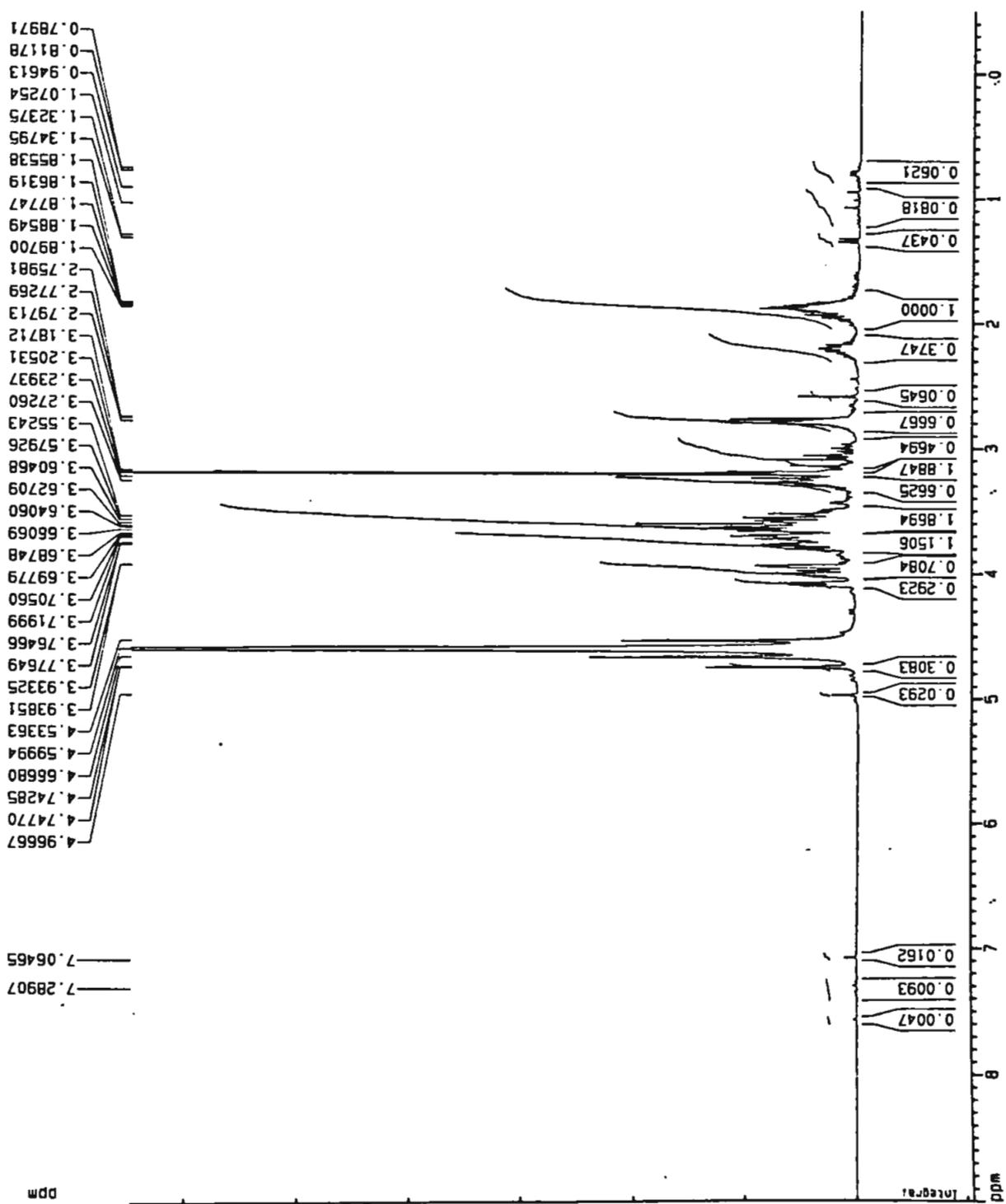


Figura. 17. Espectro de RMN ¹H de VM (300 MHz, D₂O).

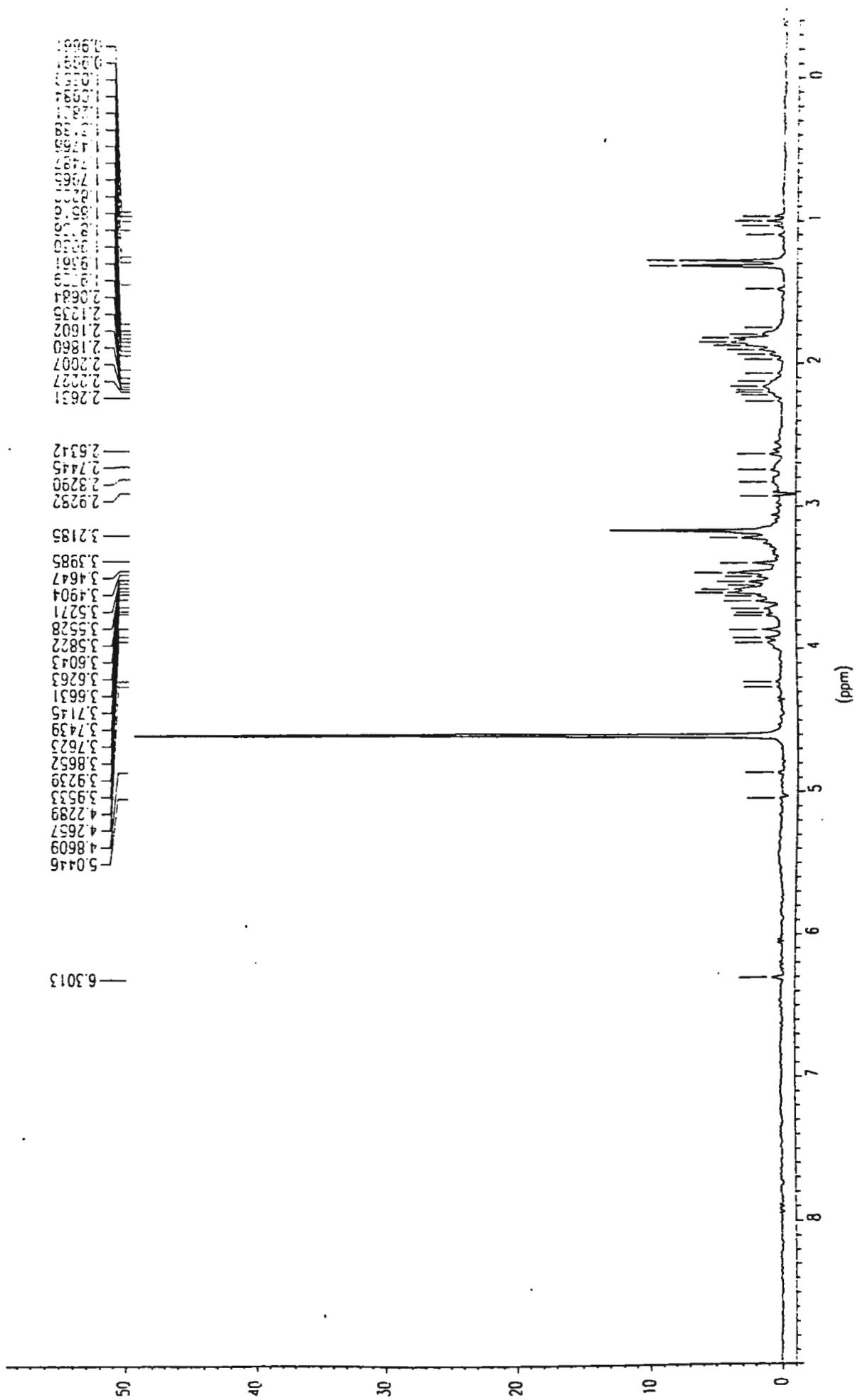


Figura 19. Espectro de RMN ¹H da fração VM-III-116 (200 MHz, D₂O).

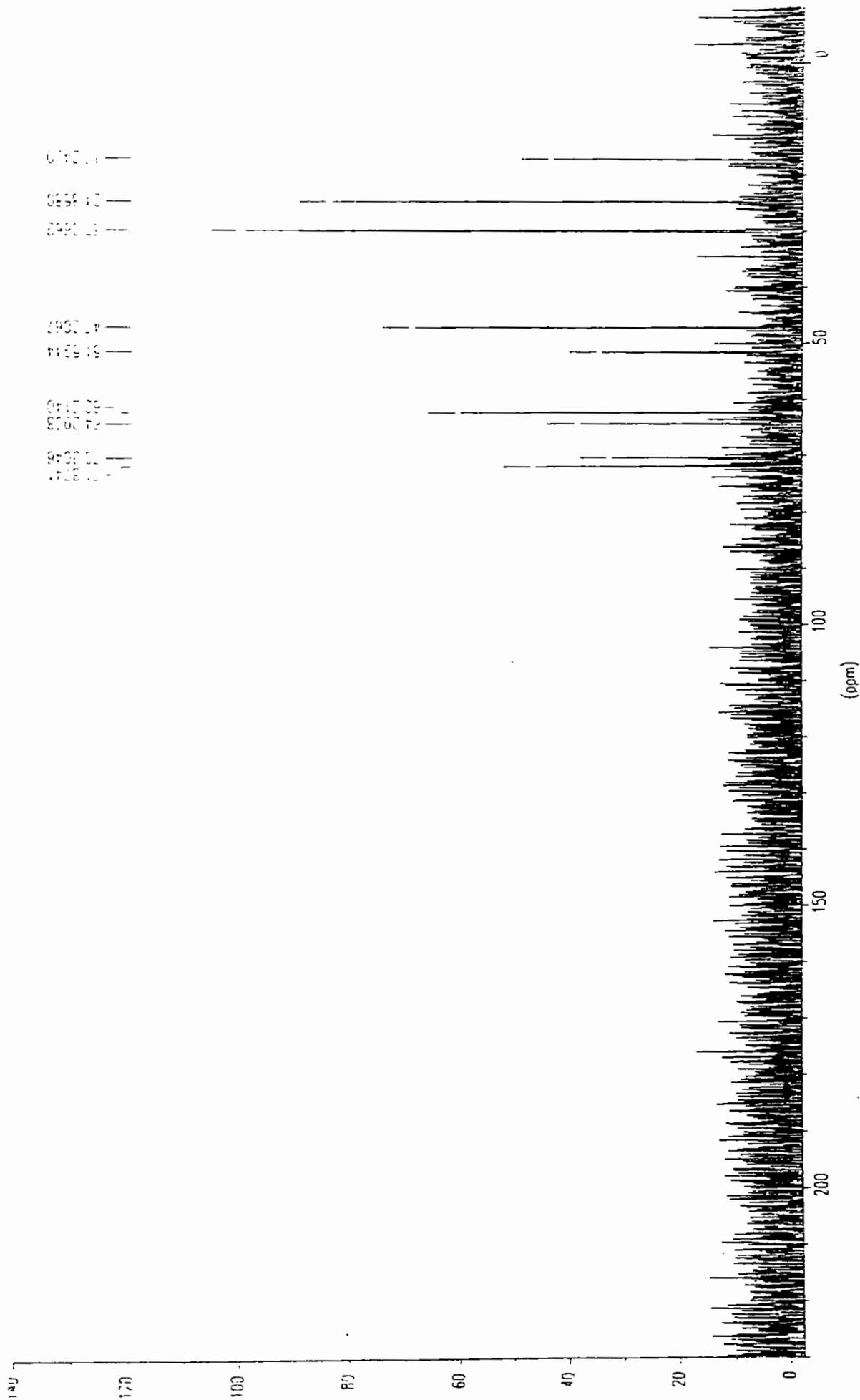


Figura 20. Espectro de RMN ¹³C (PND) da fração VM-III-116 (50 MHz, D₂O).

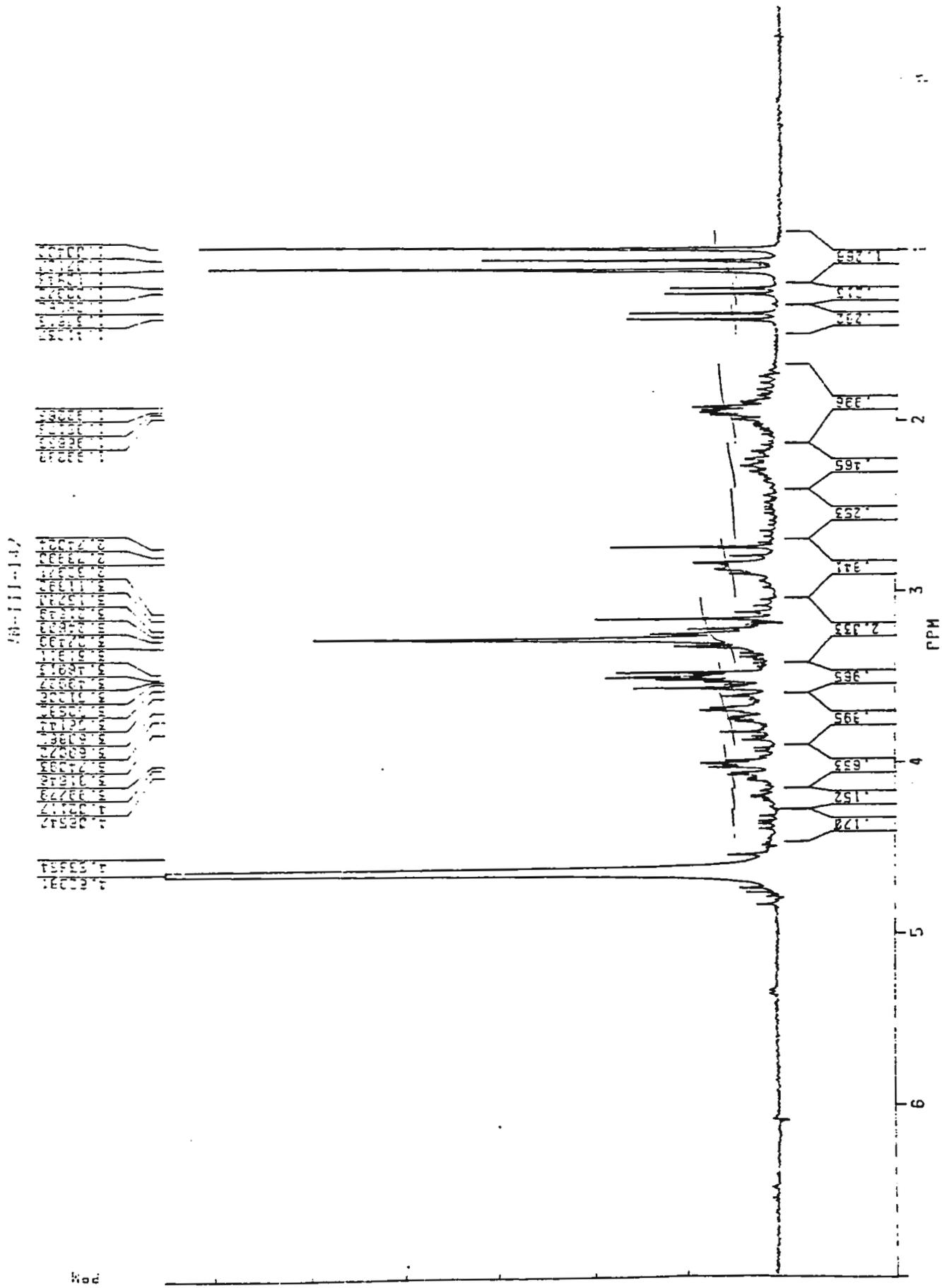


Figura 21. Espectro de RMN ^1H da fração VM-III-147 (200 MHz, D_2O).

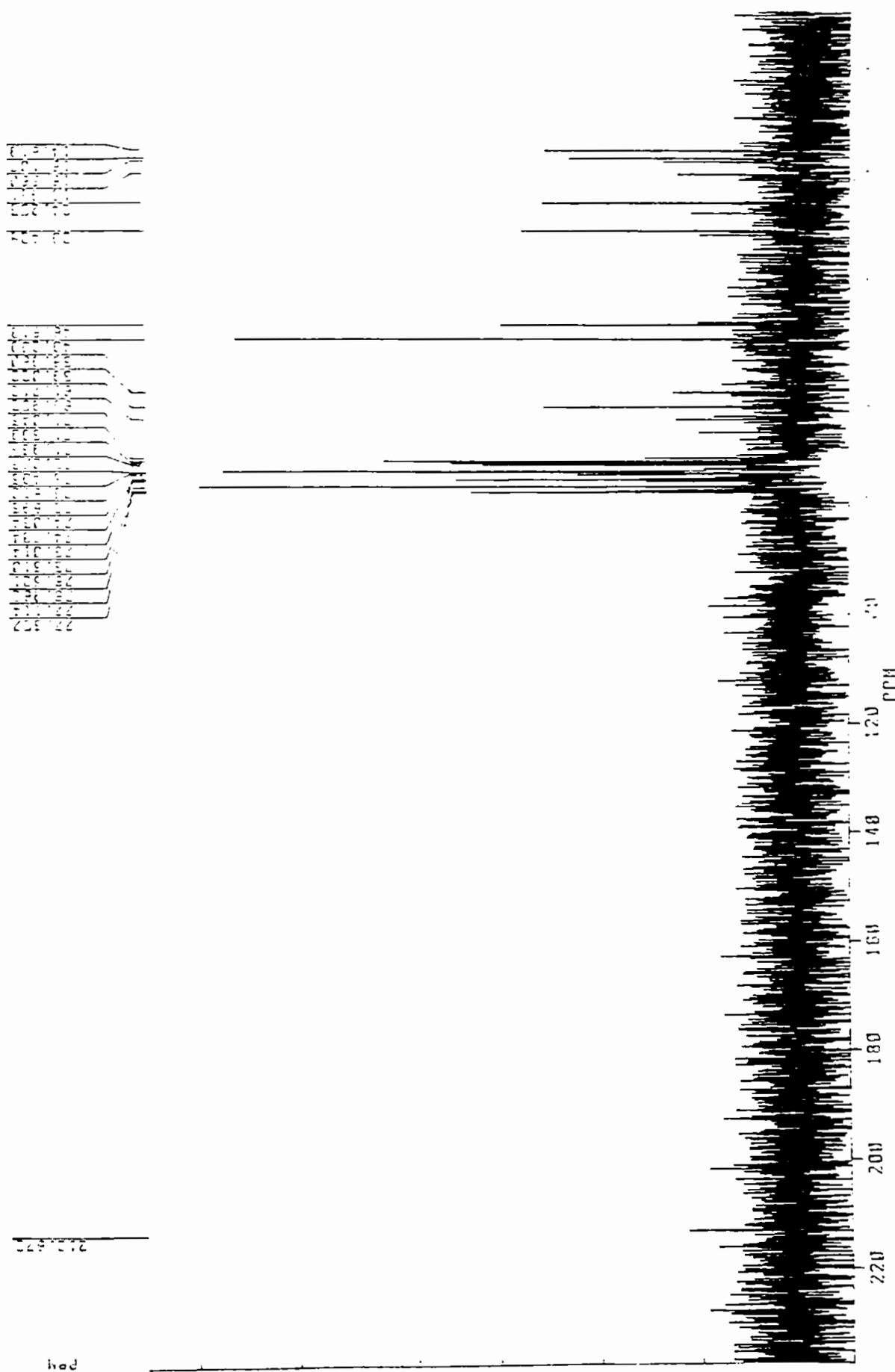


Figura 22. Espectro de RMN ^{13}C (PND) da fração VM-III-147 (50 MHz, D_2O).

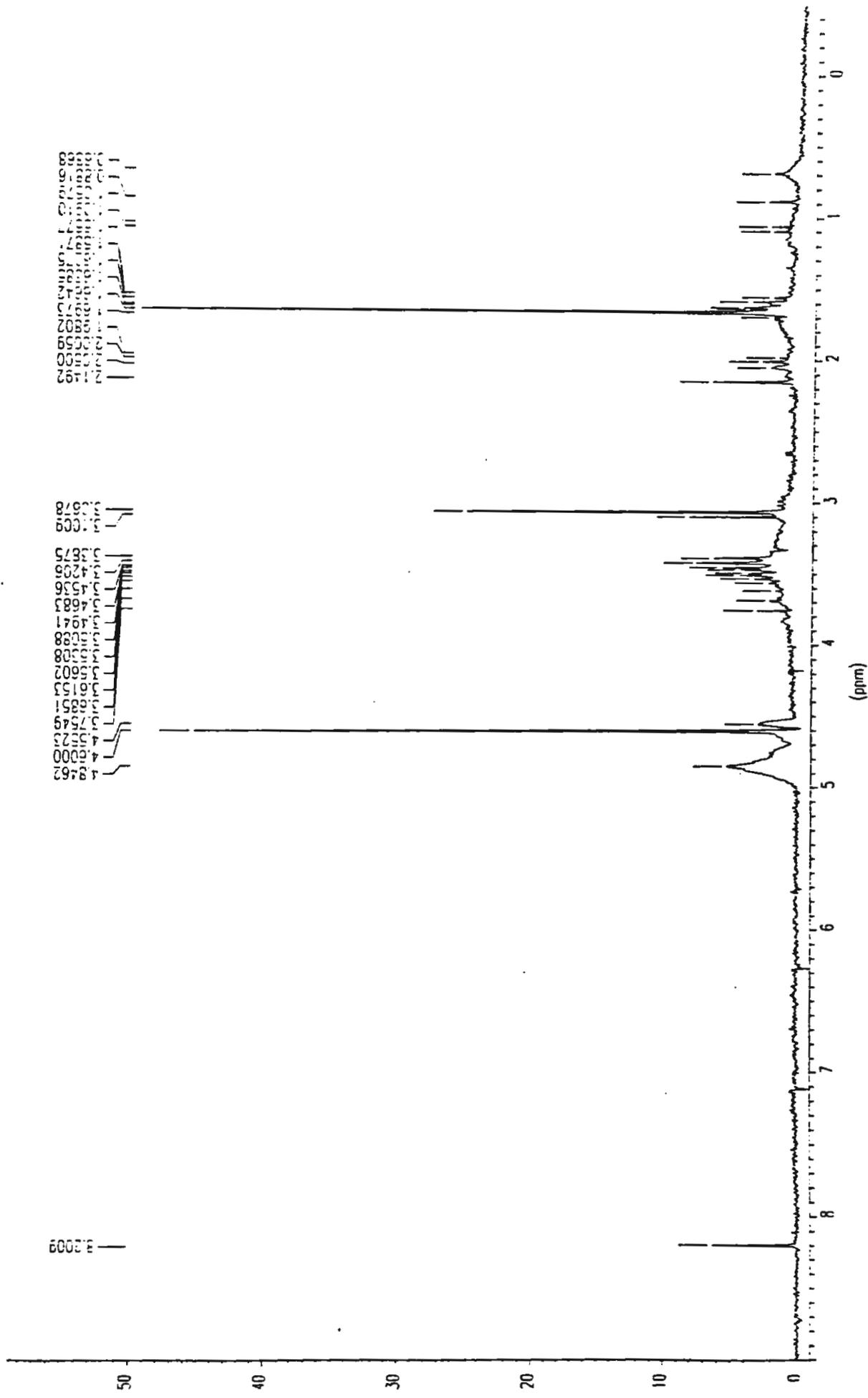


Figura 23. Espectro de RMN ¹H da fração VM-I-24 (200 MHz, D₂O)

Luciana VM-I-24 (35 horas)

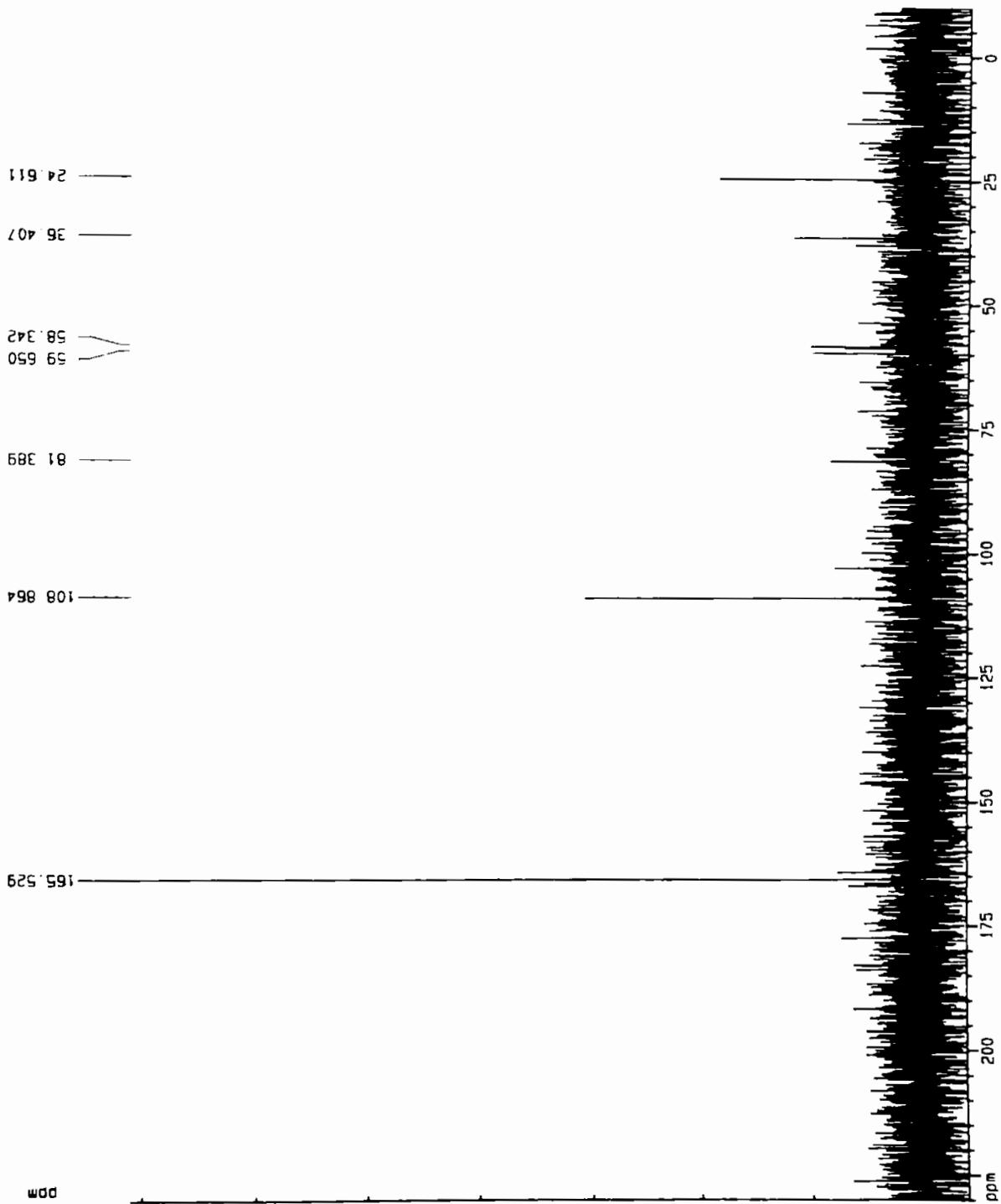
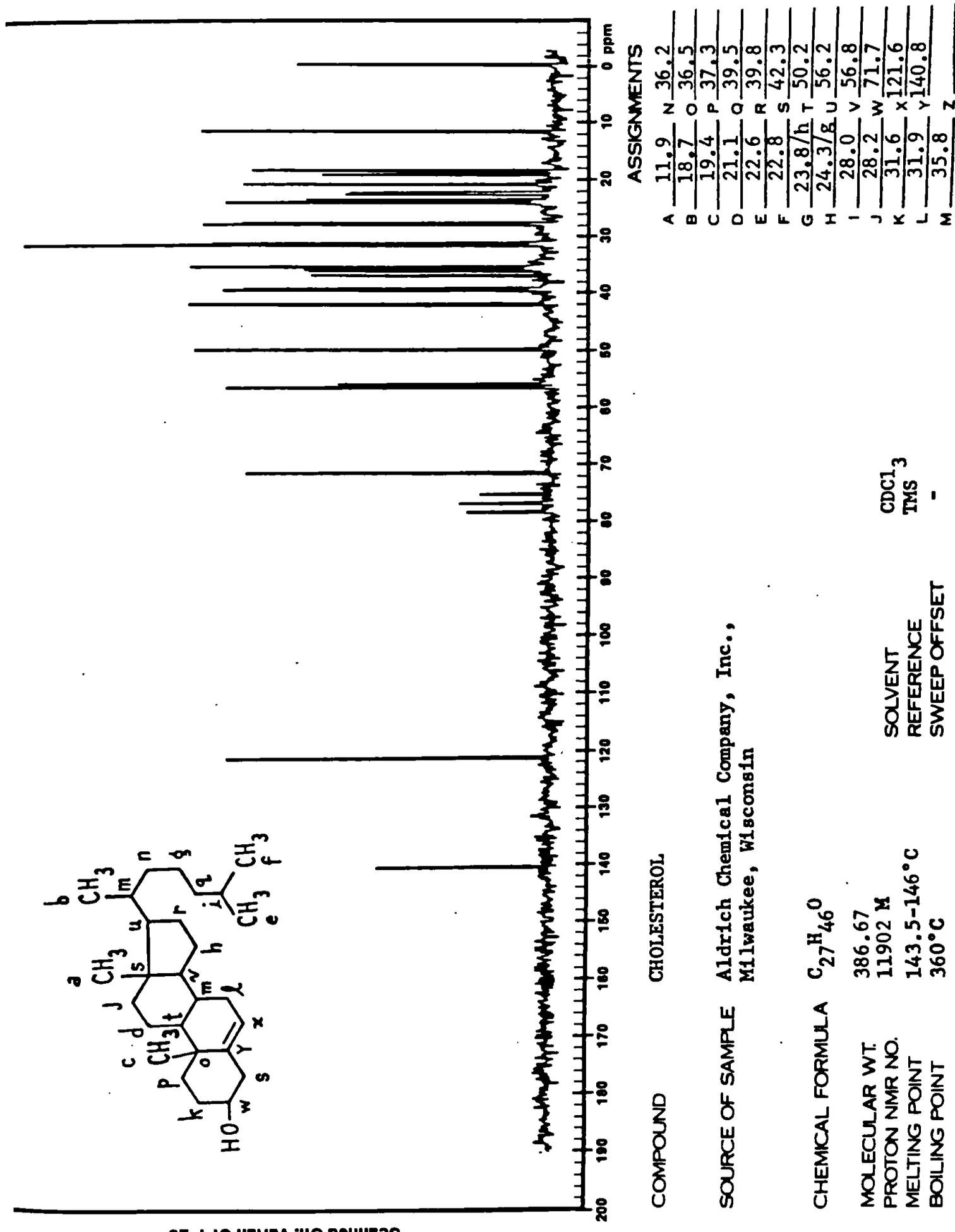


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C (PND) da fração VM-I-24 (50 MHz, D_2O).



COMPOUND CHOLESTEROL

SOURCE OF SAMPLE Aldrich Chemical Company, Inc.,
Milwaukee, Wisconsin

CHEMICAL FORMULA $C_{27}H_{46}O$

MOLECULAR WT. 386.67

PROTON NMR NO. 11902 M

MELTING POINT 143.5-146 °C

BOILING POINT 360 °C

SOLVENT $CDCl_3$

REFERENCE TMS

SWEEP OFFSET -

Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C (PND) do colesterol. Padrão Sadter. ($CDCl_3$).

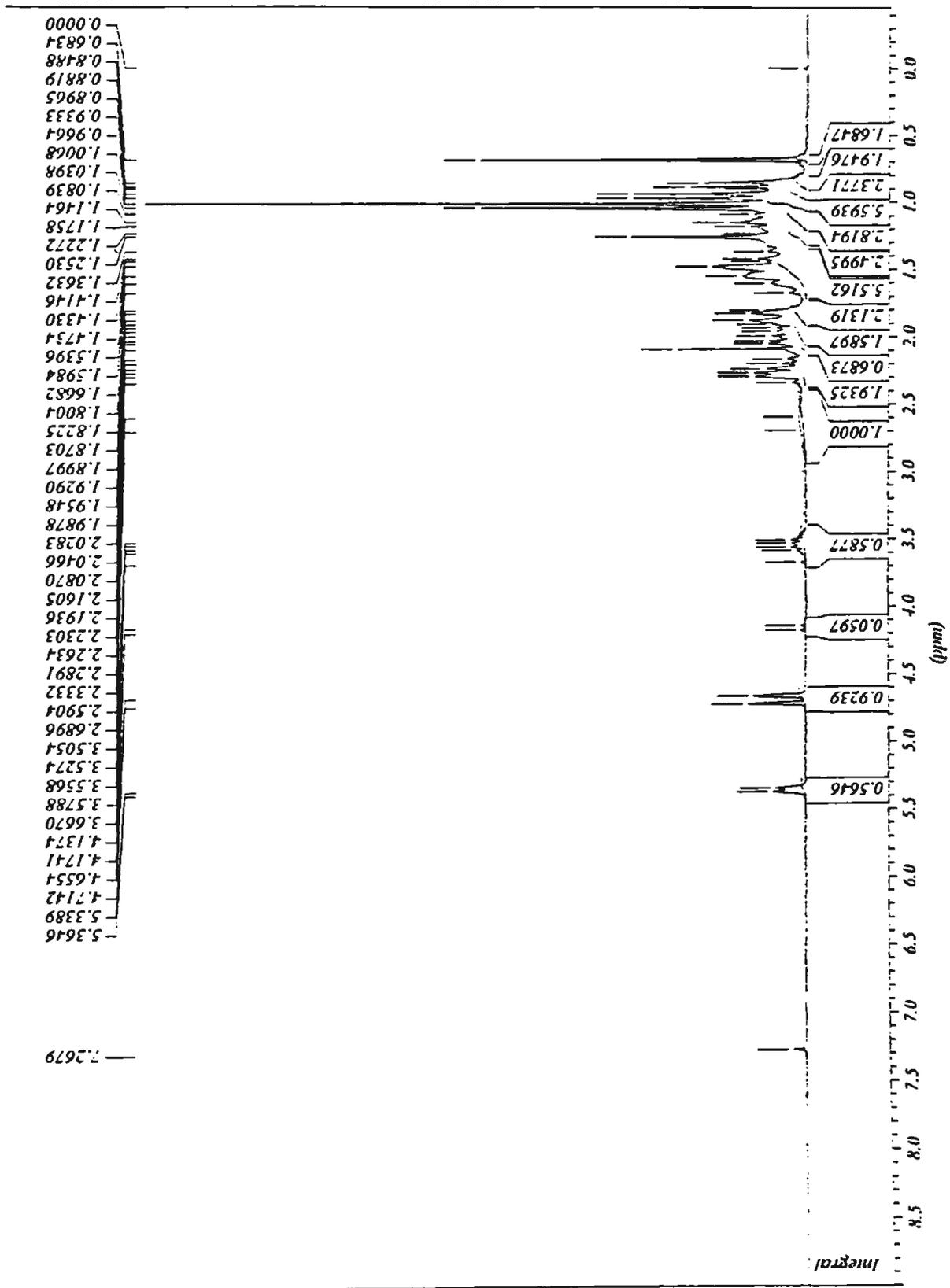


Figura 31. Espectro de RMN ^1H de 44 (200 MHz, CDCl_3).

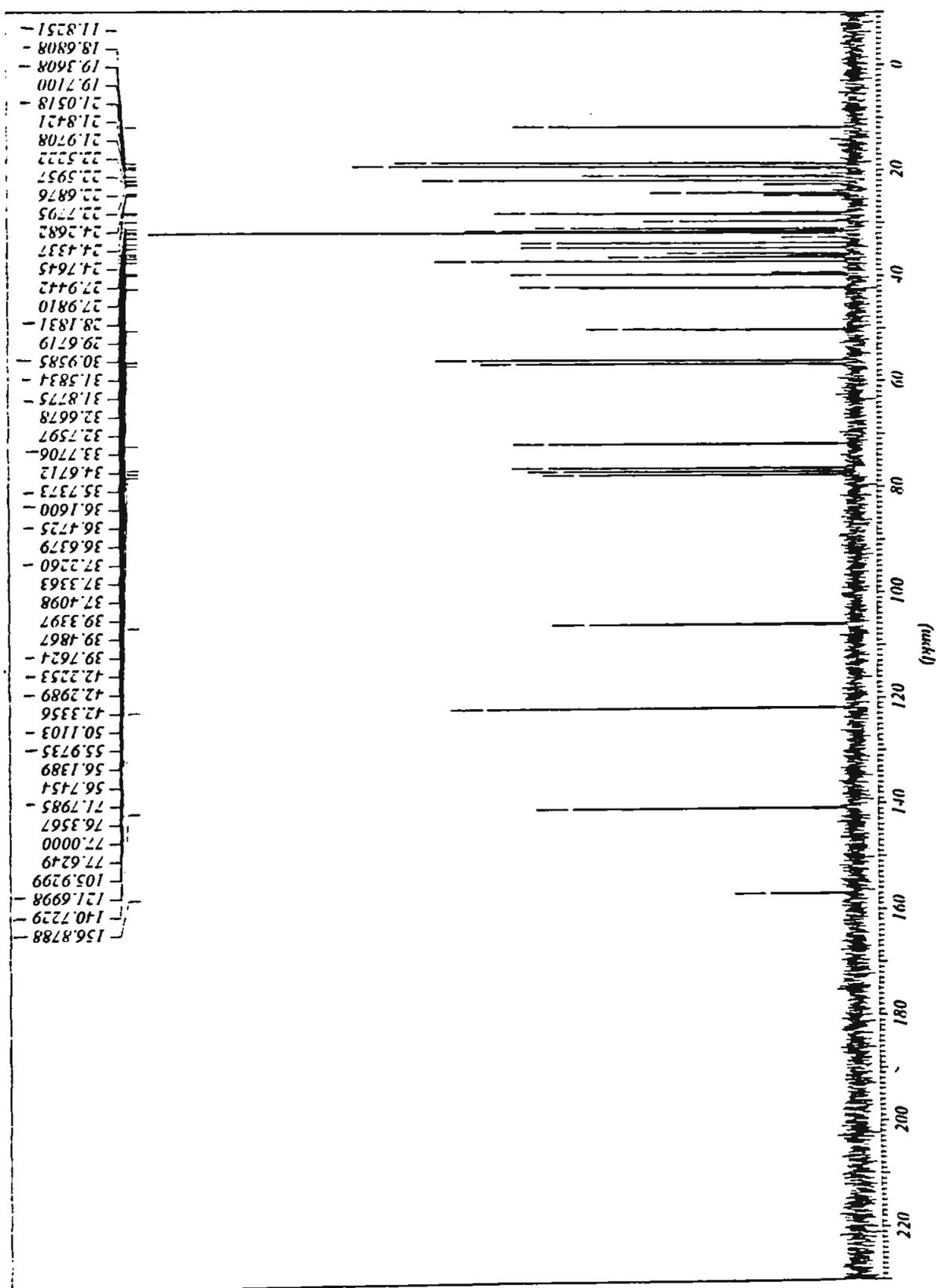


Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C (PND) de 44 (50 MHz, CDCl_3).

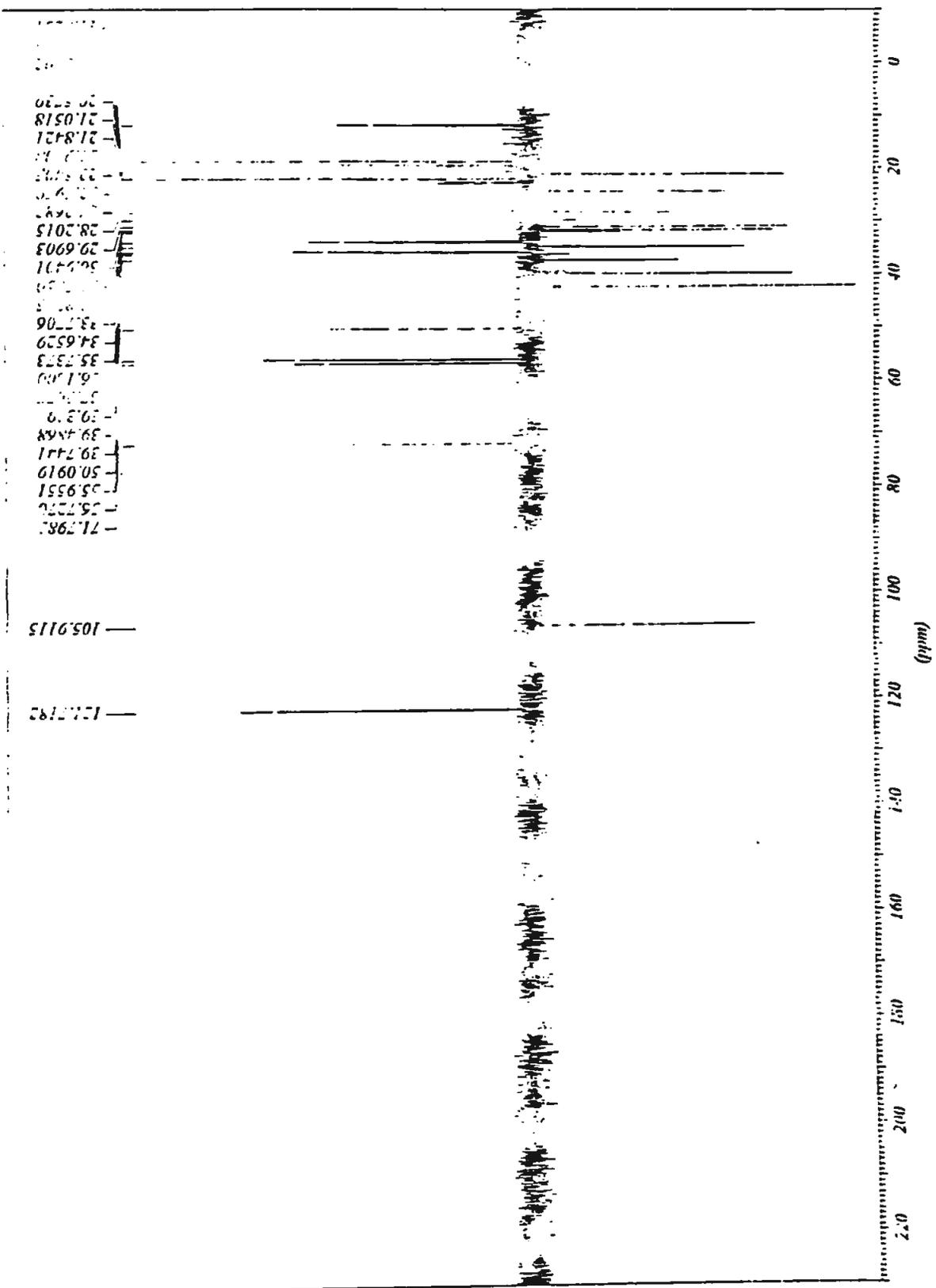


Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135°) de 44 (50 MHz, CDCl_3).

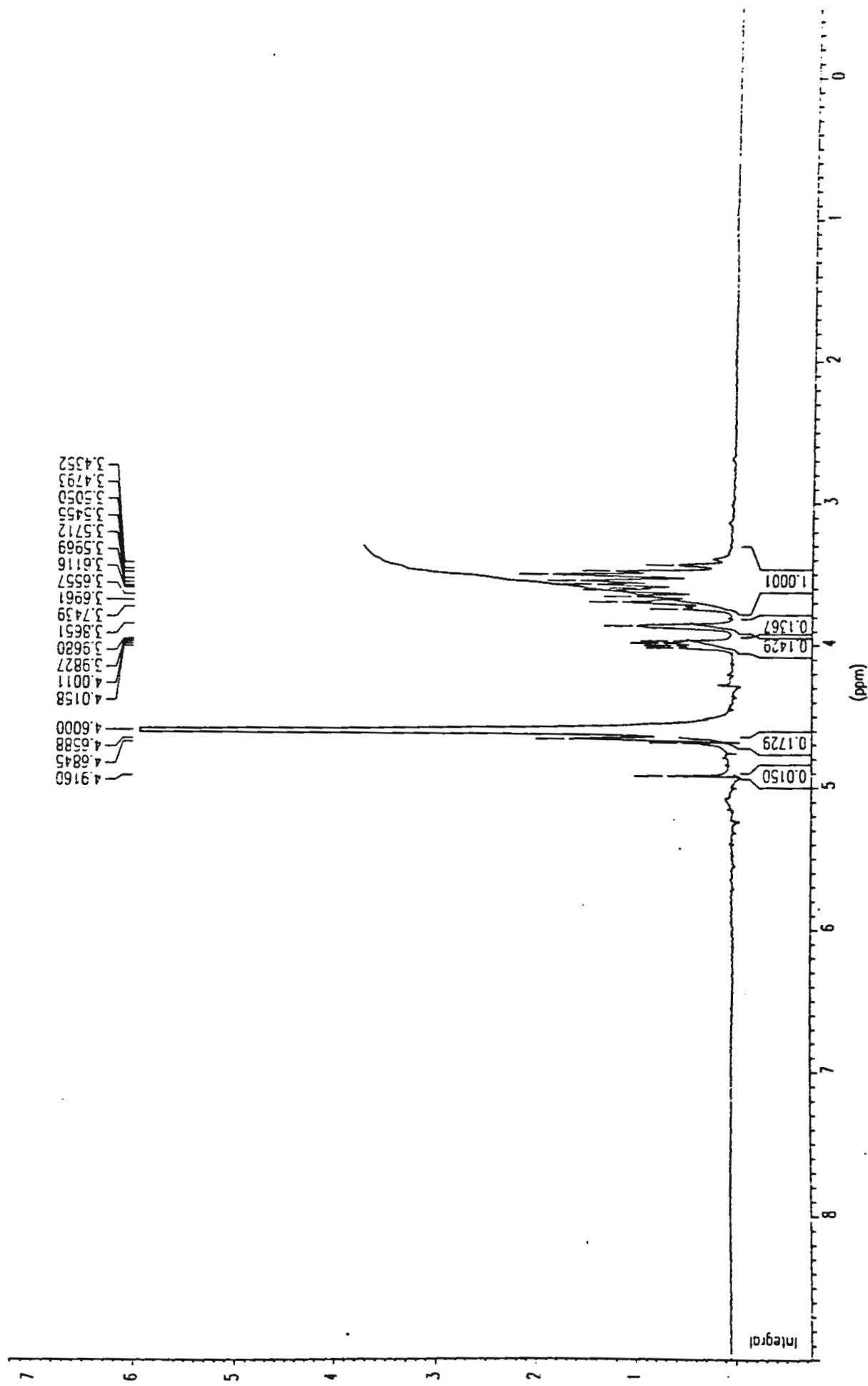


Figura 34. Espectro de RMN ^1H de **45** (200 MHz, D_2O).

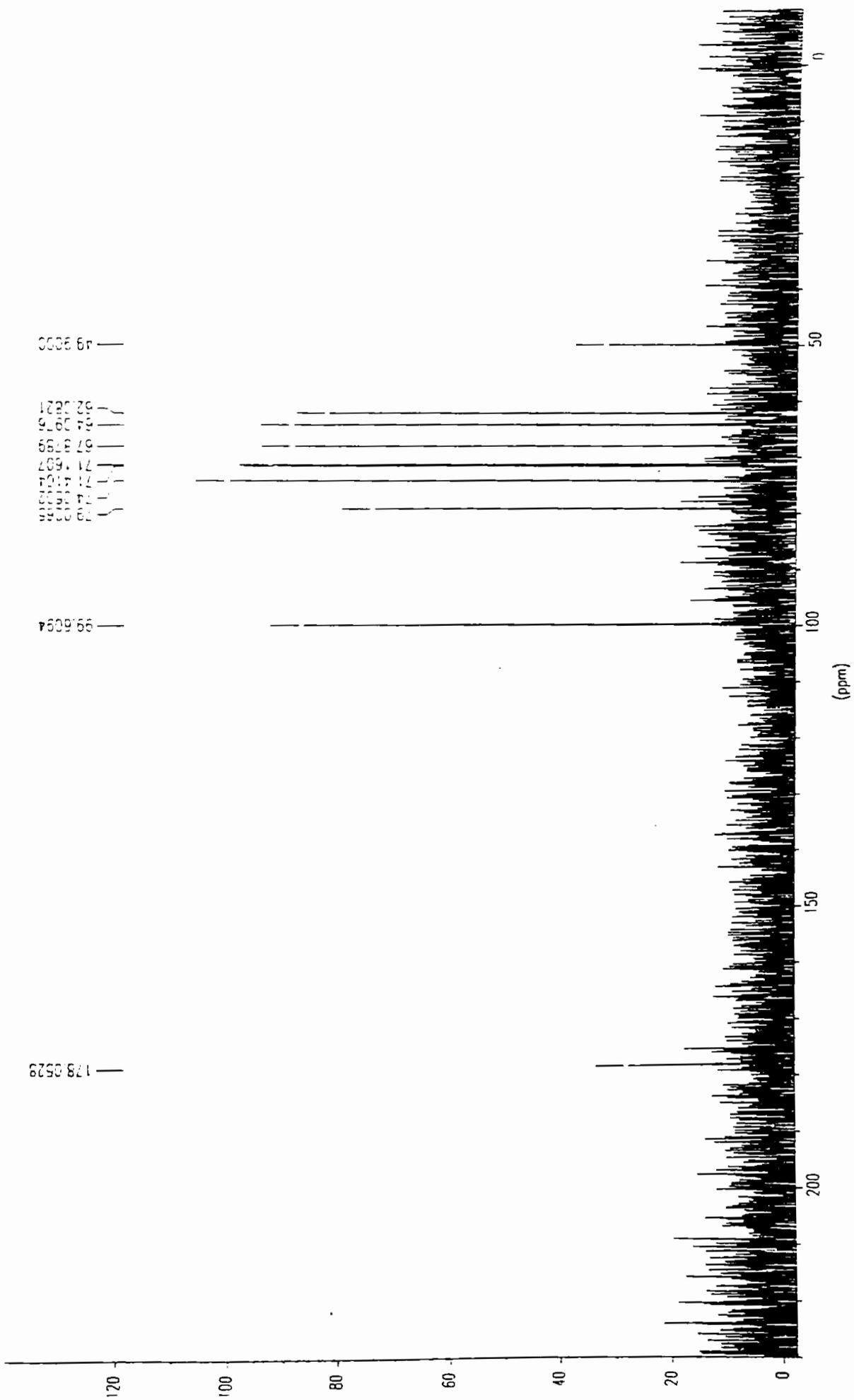


Figura 35. Espectro de RMN ^{13}C (PND) de 45 (50MHz, D_2O).

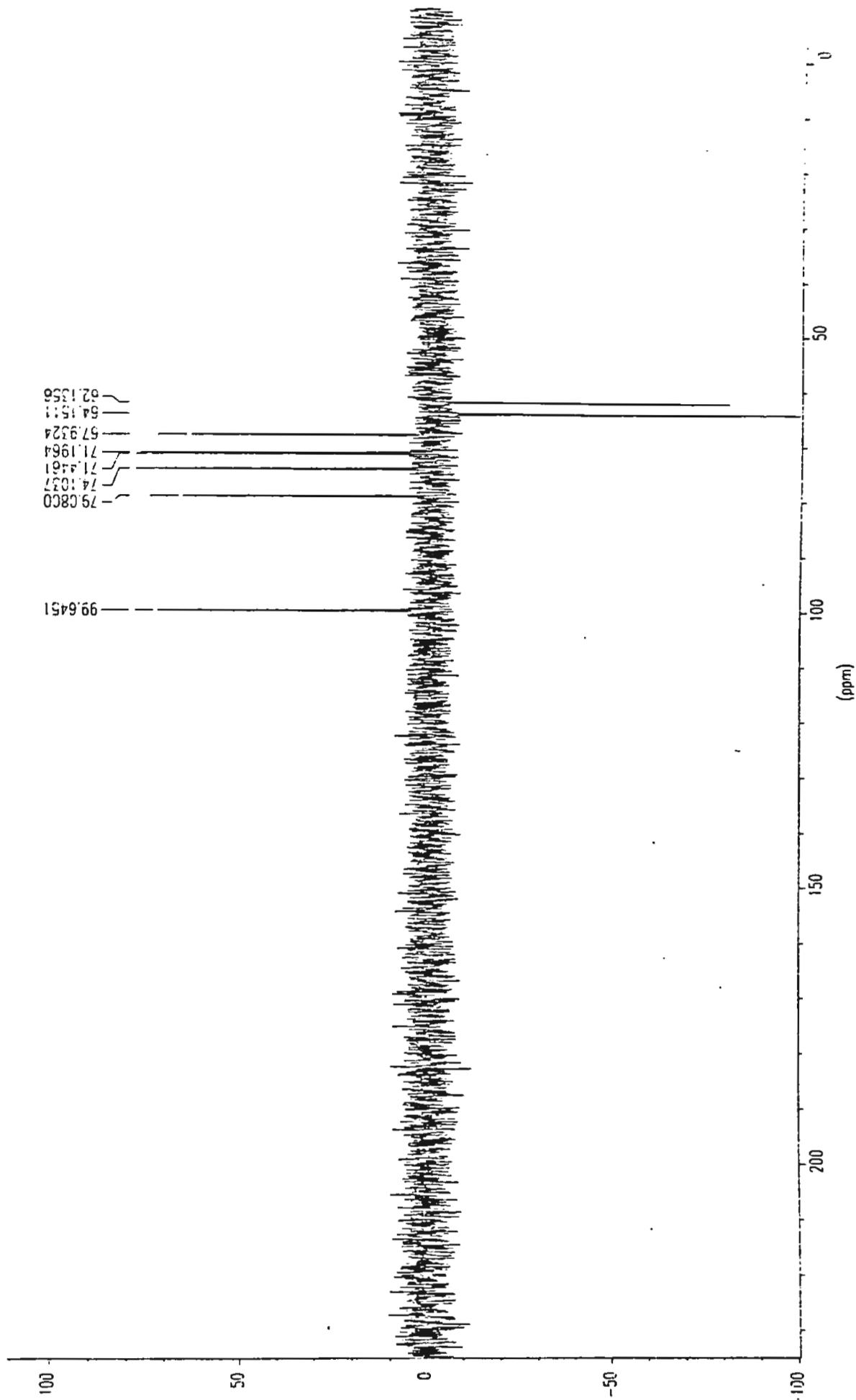


Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135 $^{\circ}$) de 45 (50 MHz, D $_2$ O).

VO - III - 36

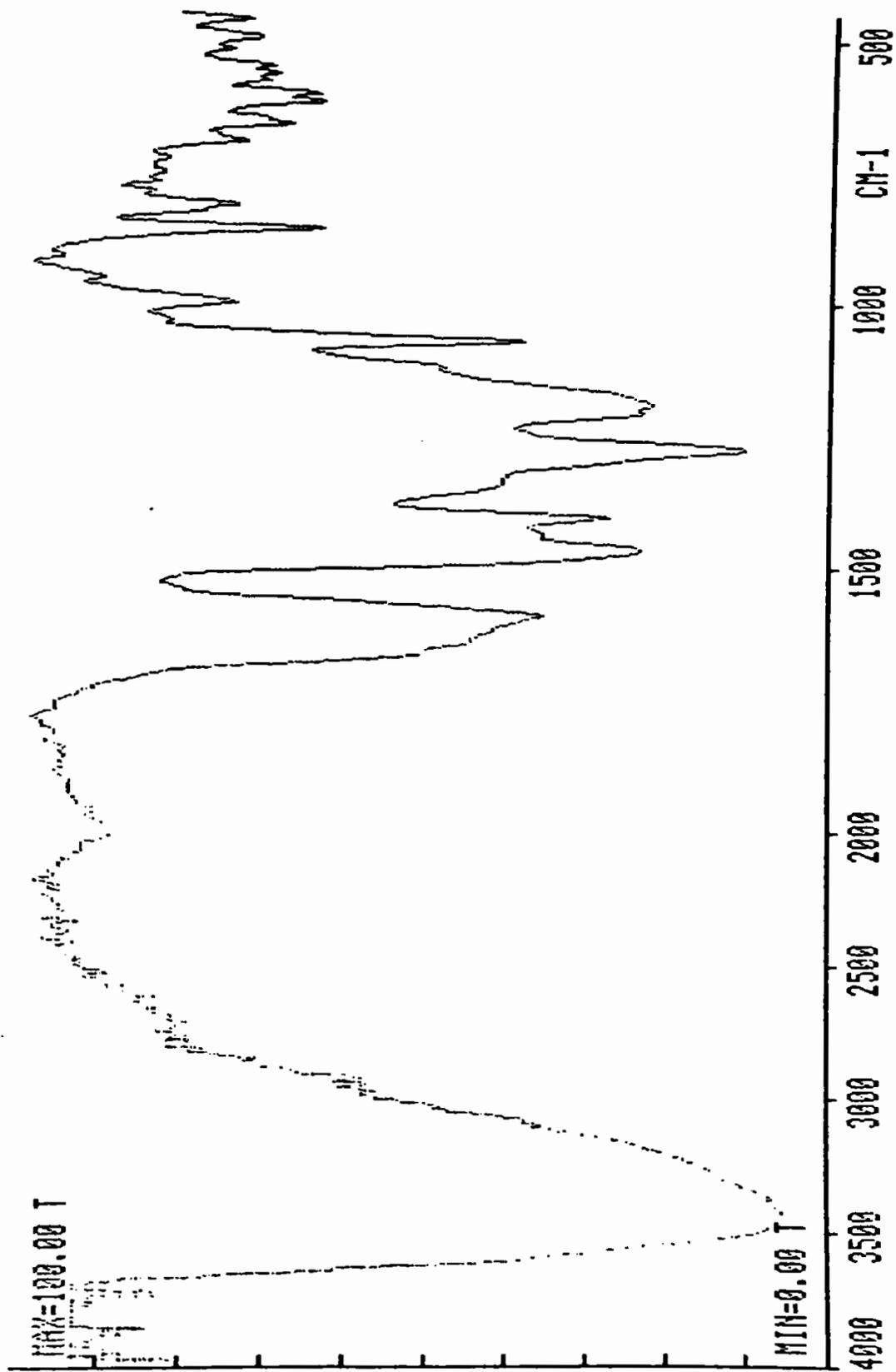
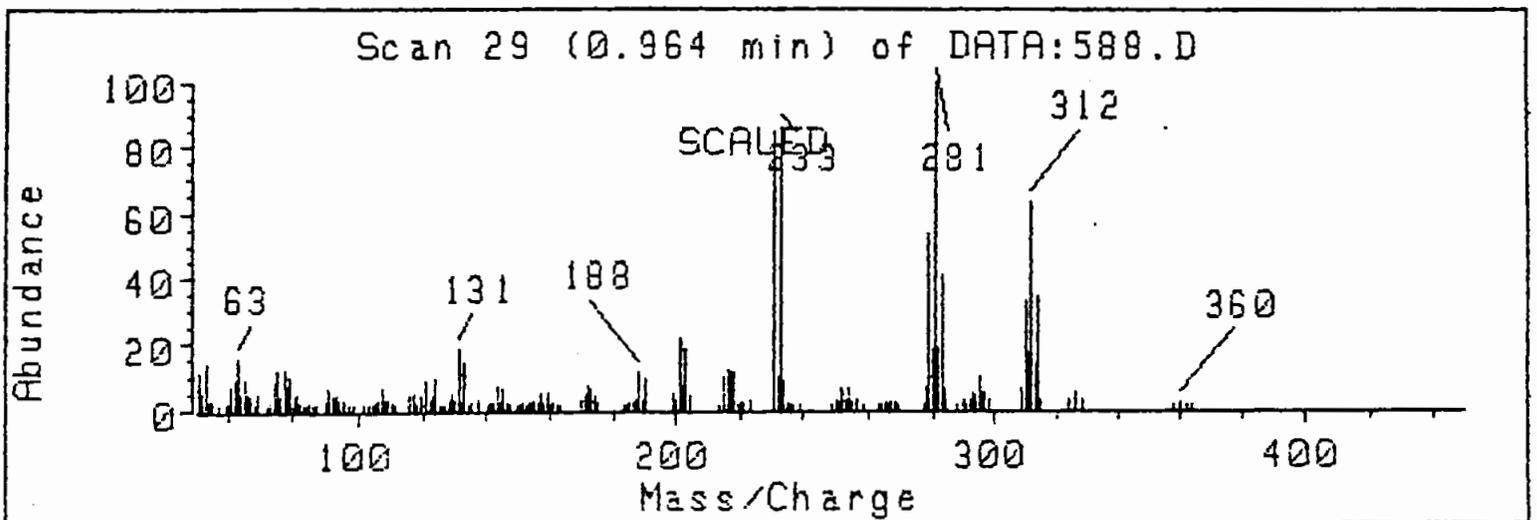
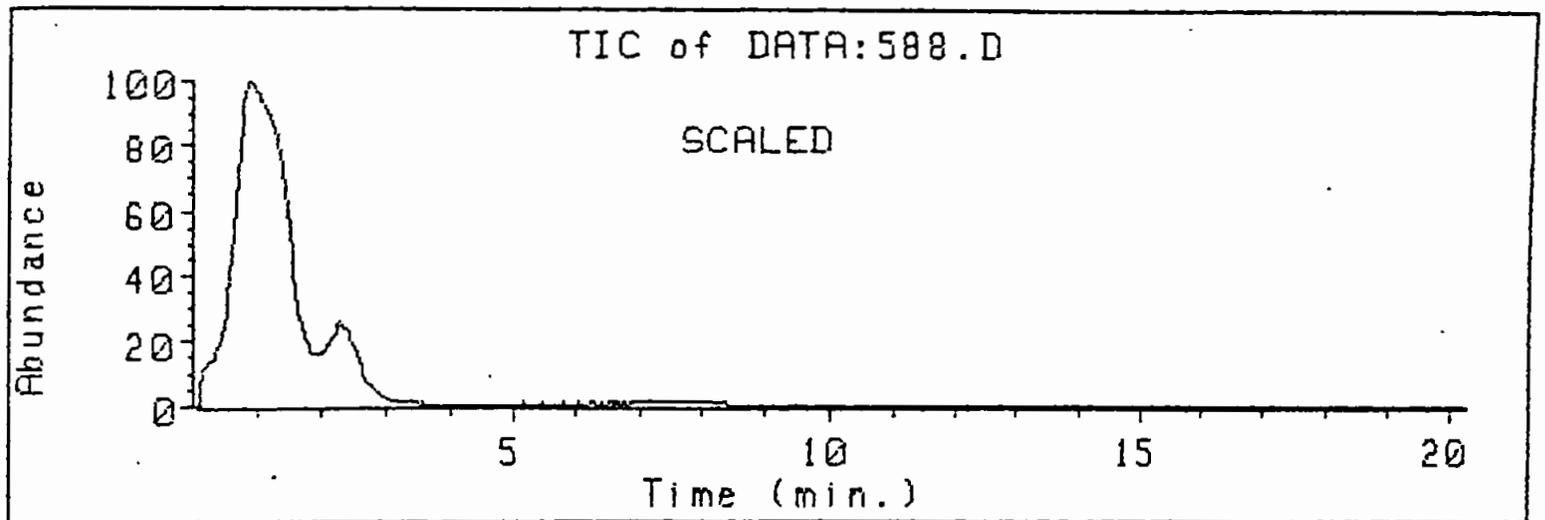


Figura 37. Espectro de I.V. (KBr) de 46.



Scan 29 (0.964 min) of DATA:588.D
VDIII-36

Figura 38. Espectro de massas (CG-EM) de 46.

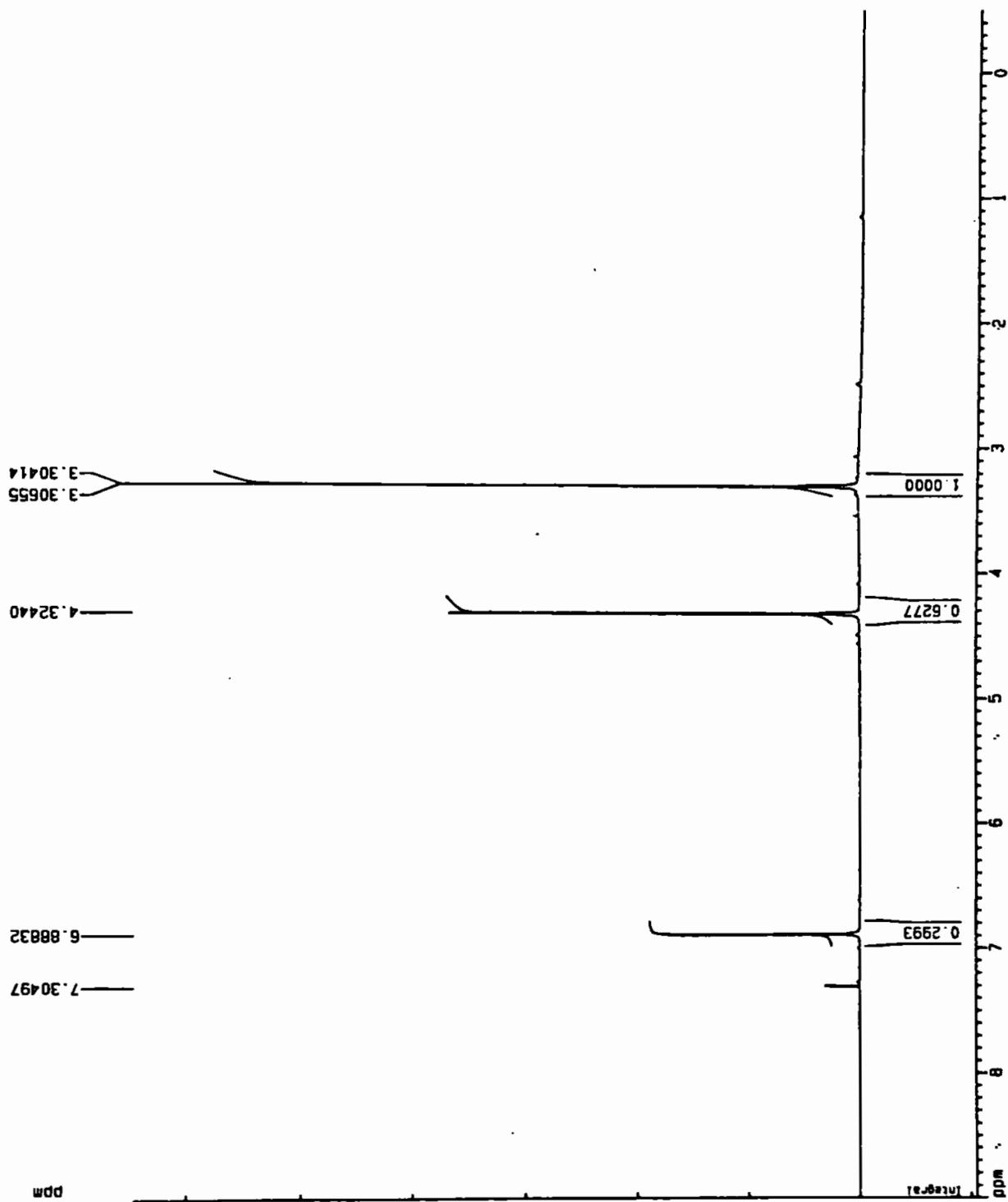
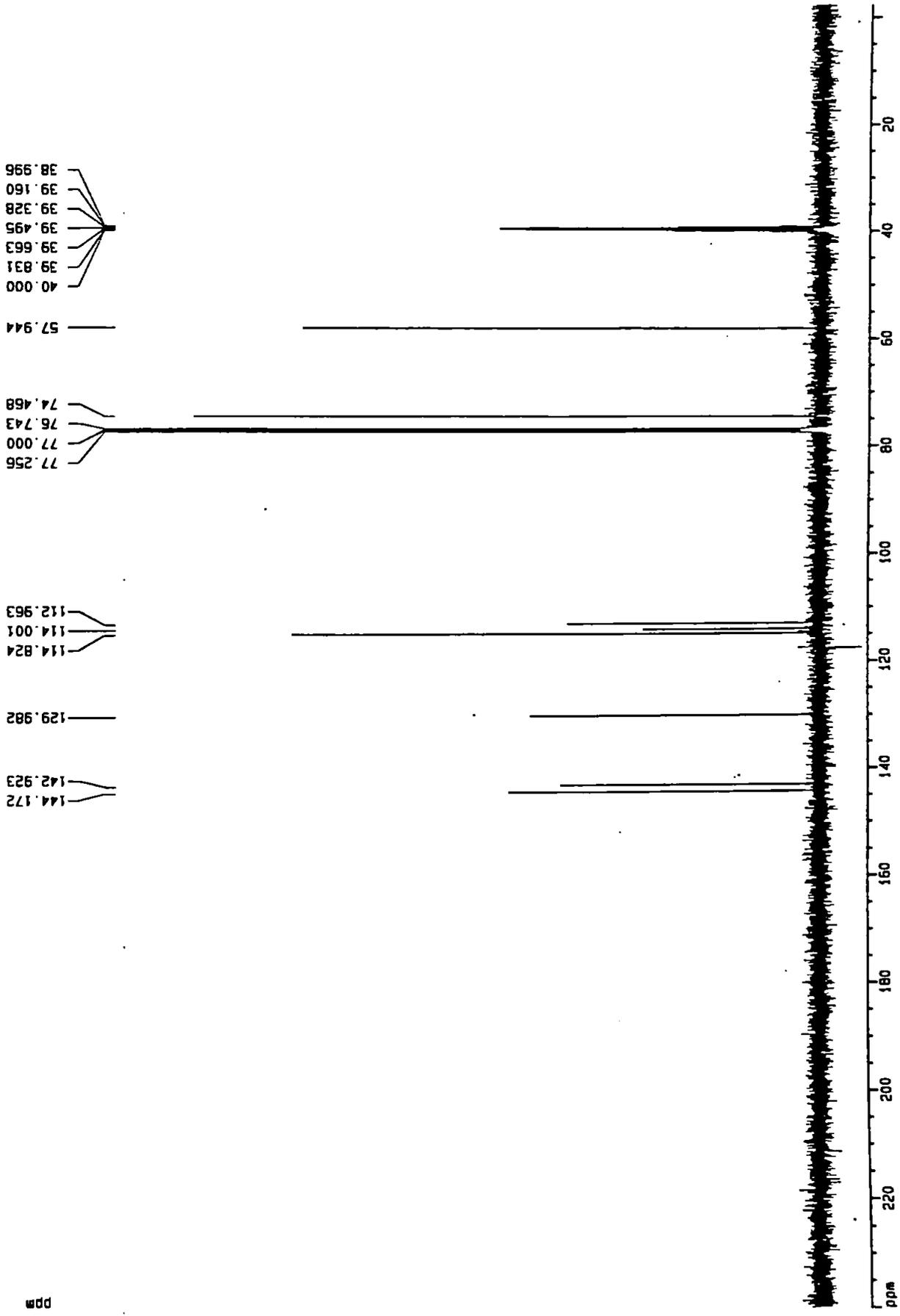


Figura 39. Espectro de RMN ¹H de 46 (200 MHz, CDCl₃/DMSO).

Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C (PND) de 46 (50 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$).

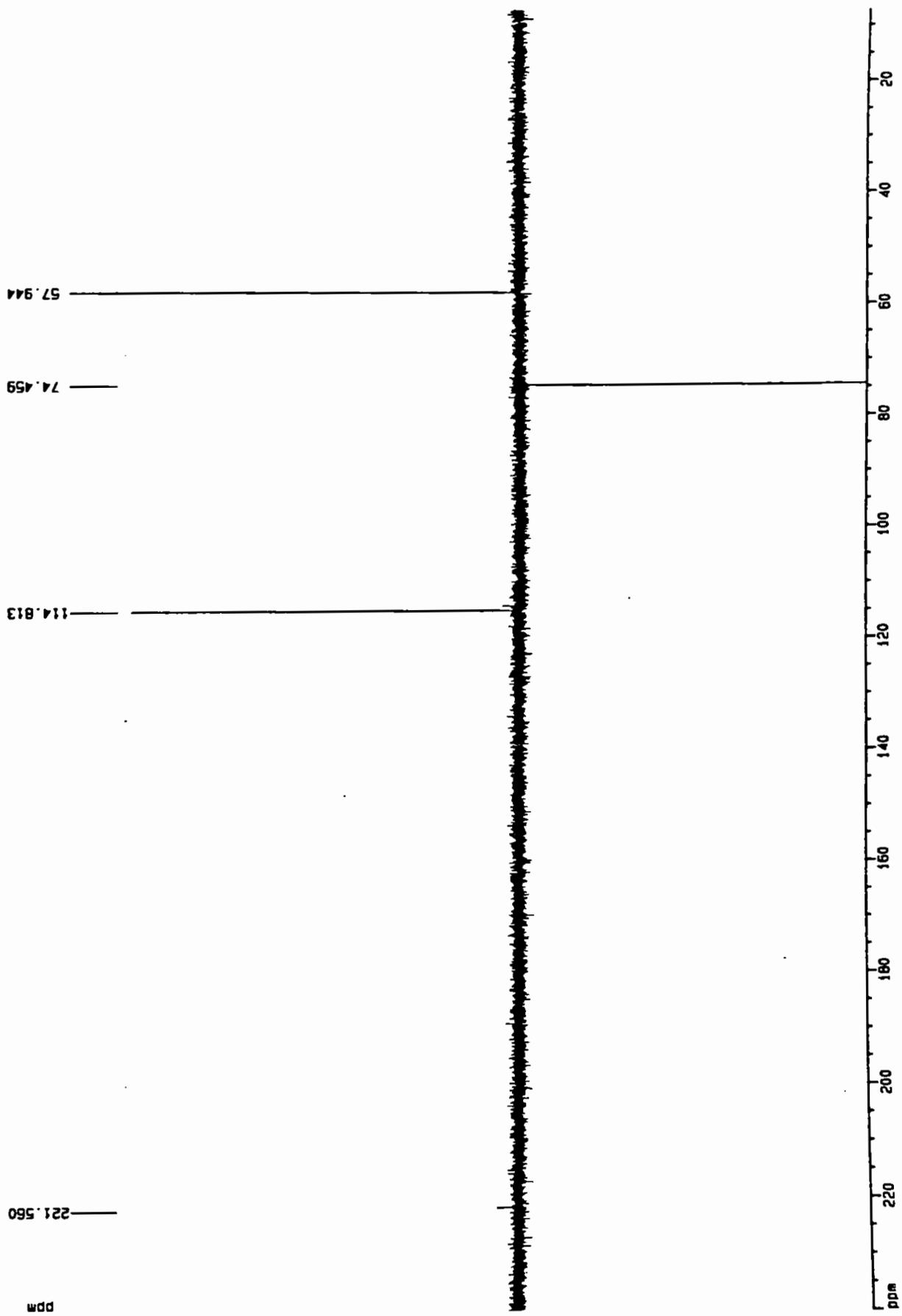


Figura 41. Espectro de RMN ¹³C (DEPT 135°) de **46** (50 MHz, CDCl₃/DMSO).

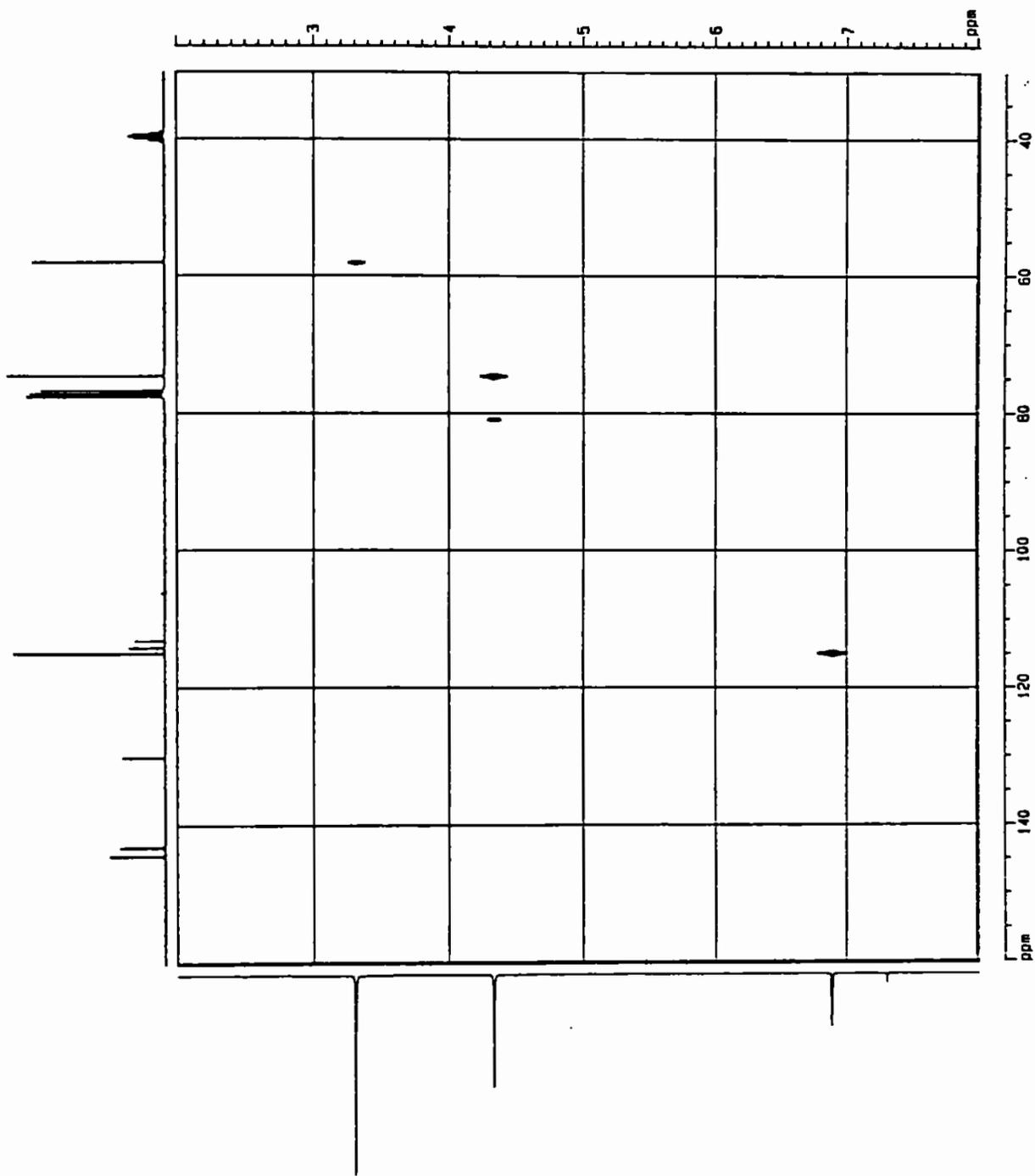


Figura 42. Espectro de RMN HMQC (correlação ^1H — ^{13}C) de 46 (300/75 MHz, CDCl_3 , DMSO).

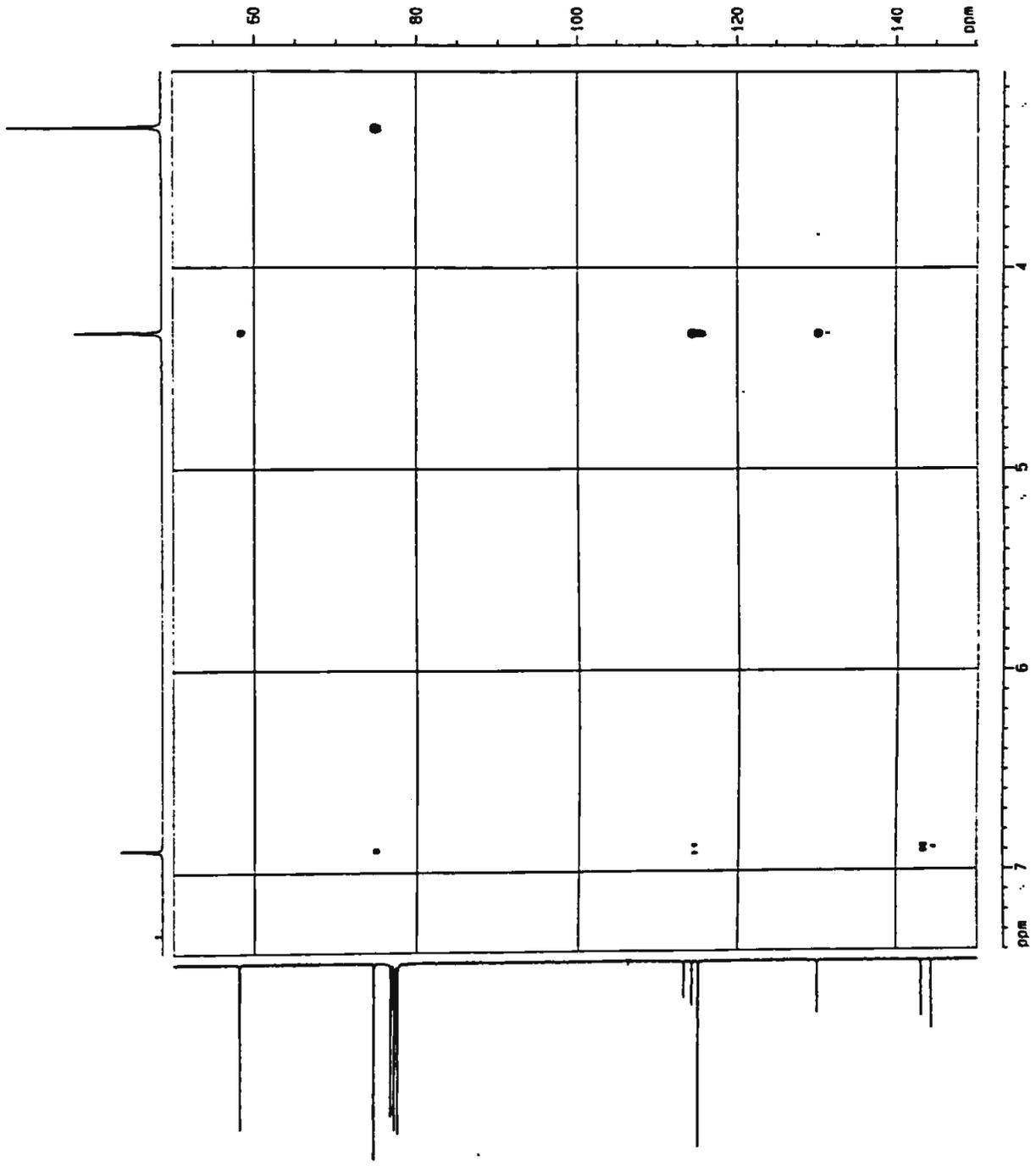


Figura 43. Espectro de RMN HMBC (correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) de **46** (300/75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$).

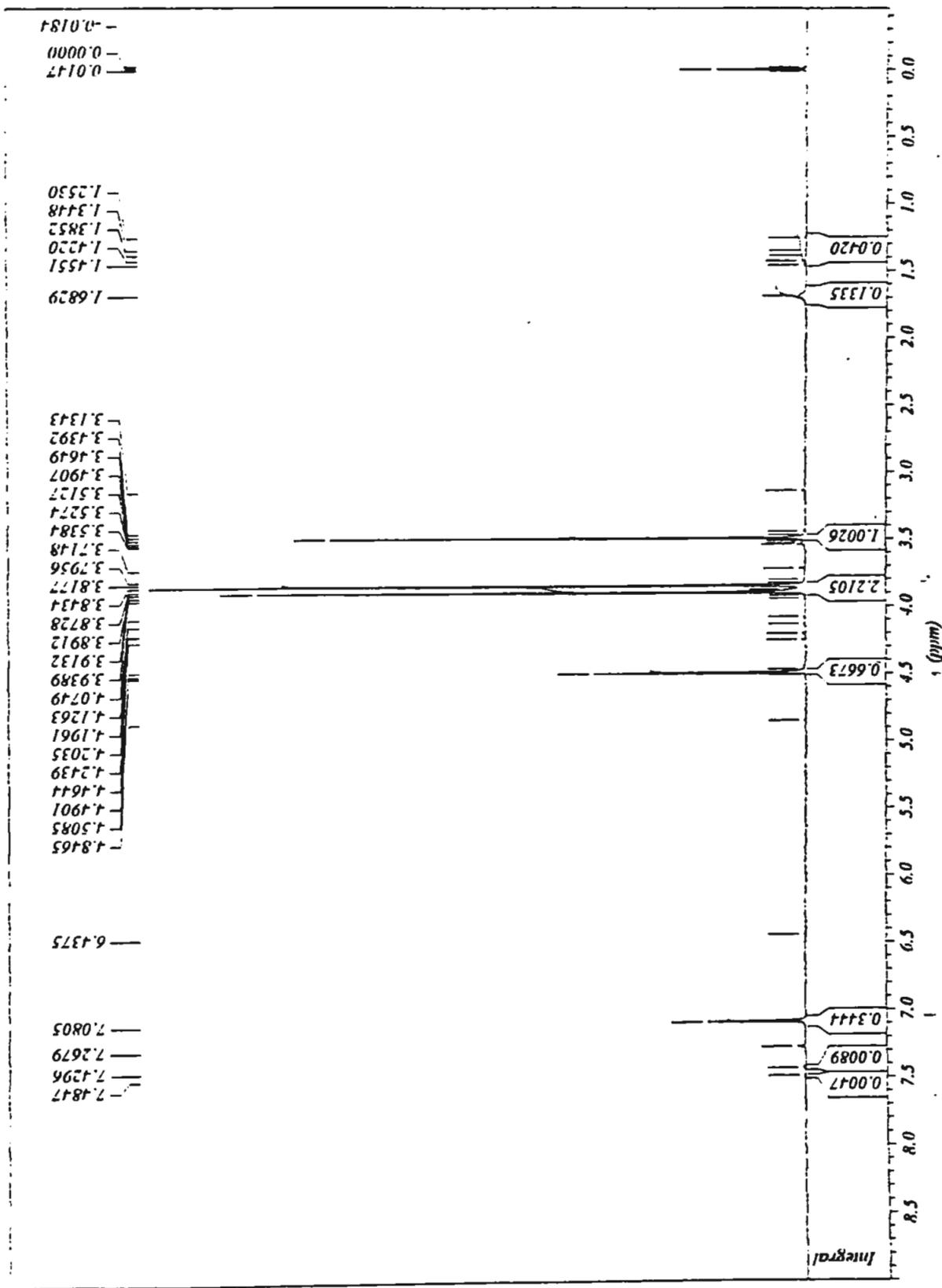


Figura 44. Espectro de RMN ¹H de 46 metilado (200 MHz, CDCl₃).

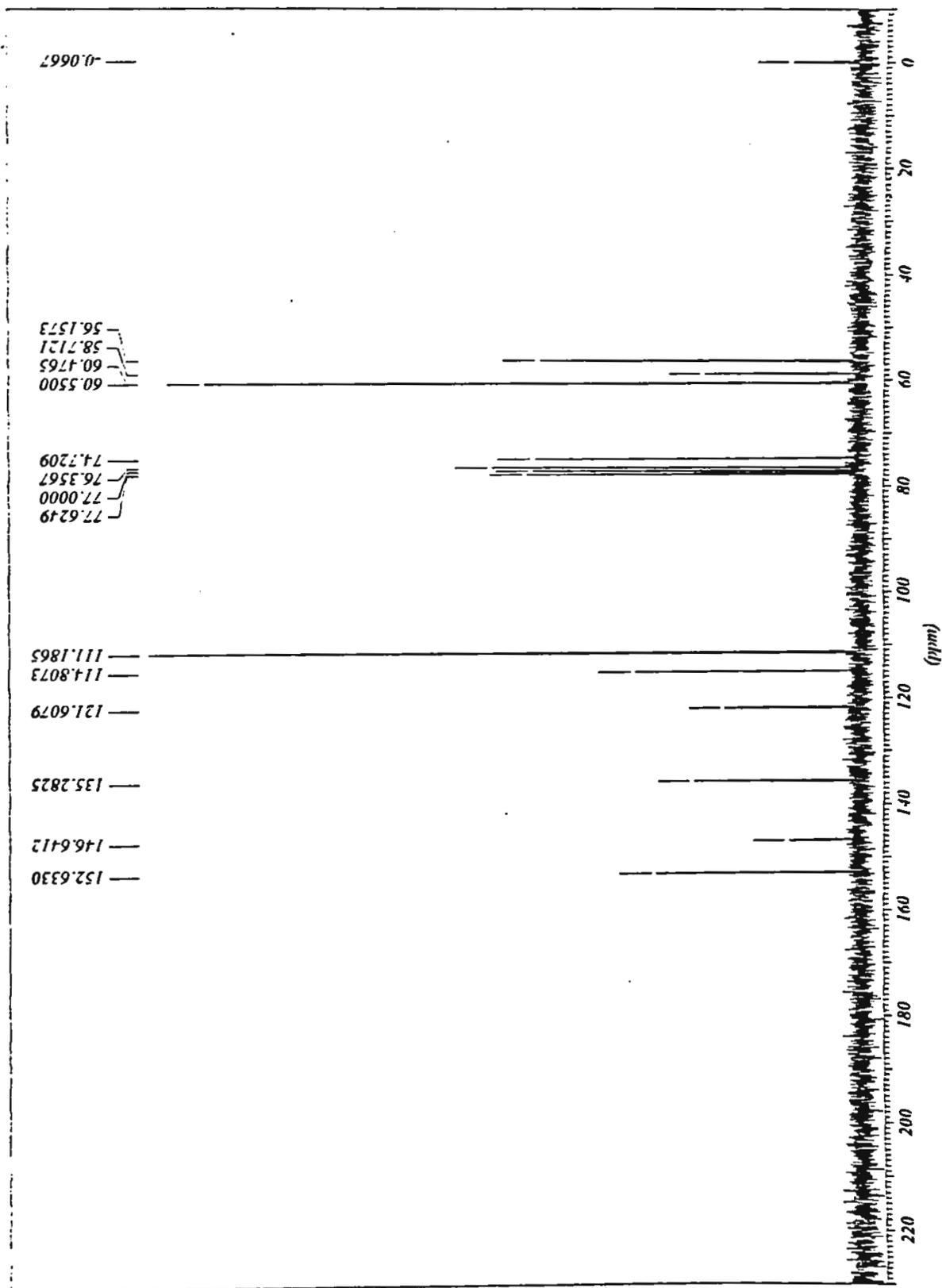


Figura 45. Espectro de RMN ¹³C (PND) de 46 metilado (200 MHz, CDCl₃).

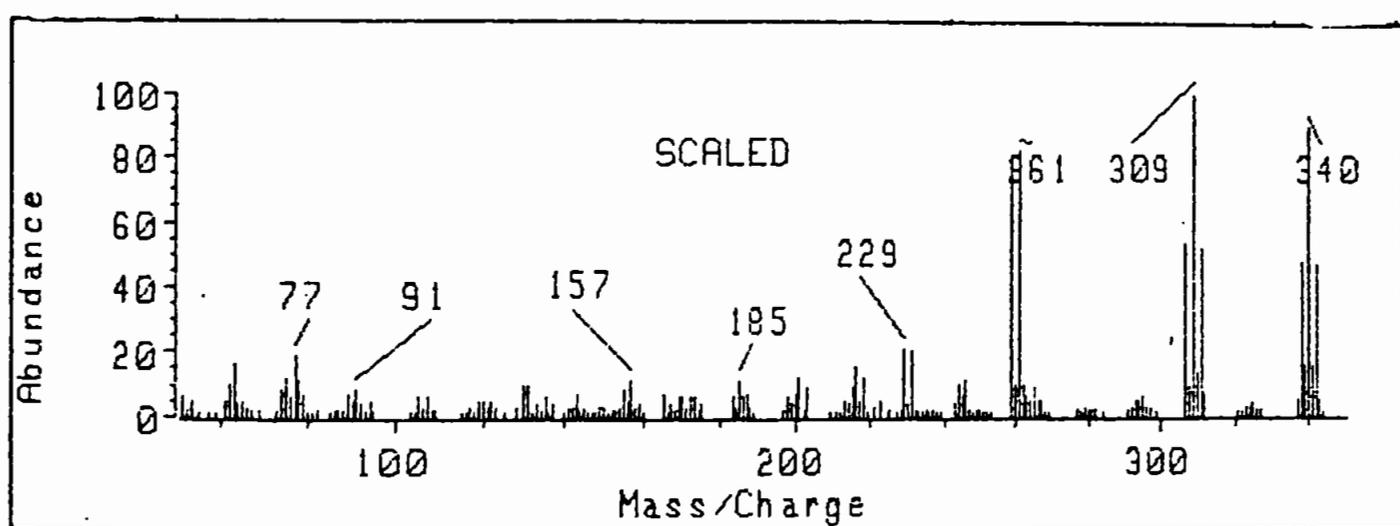


Figura 46. Espectro de massas (CG - EM) de 46 metilado.

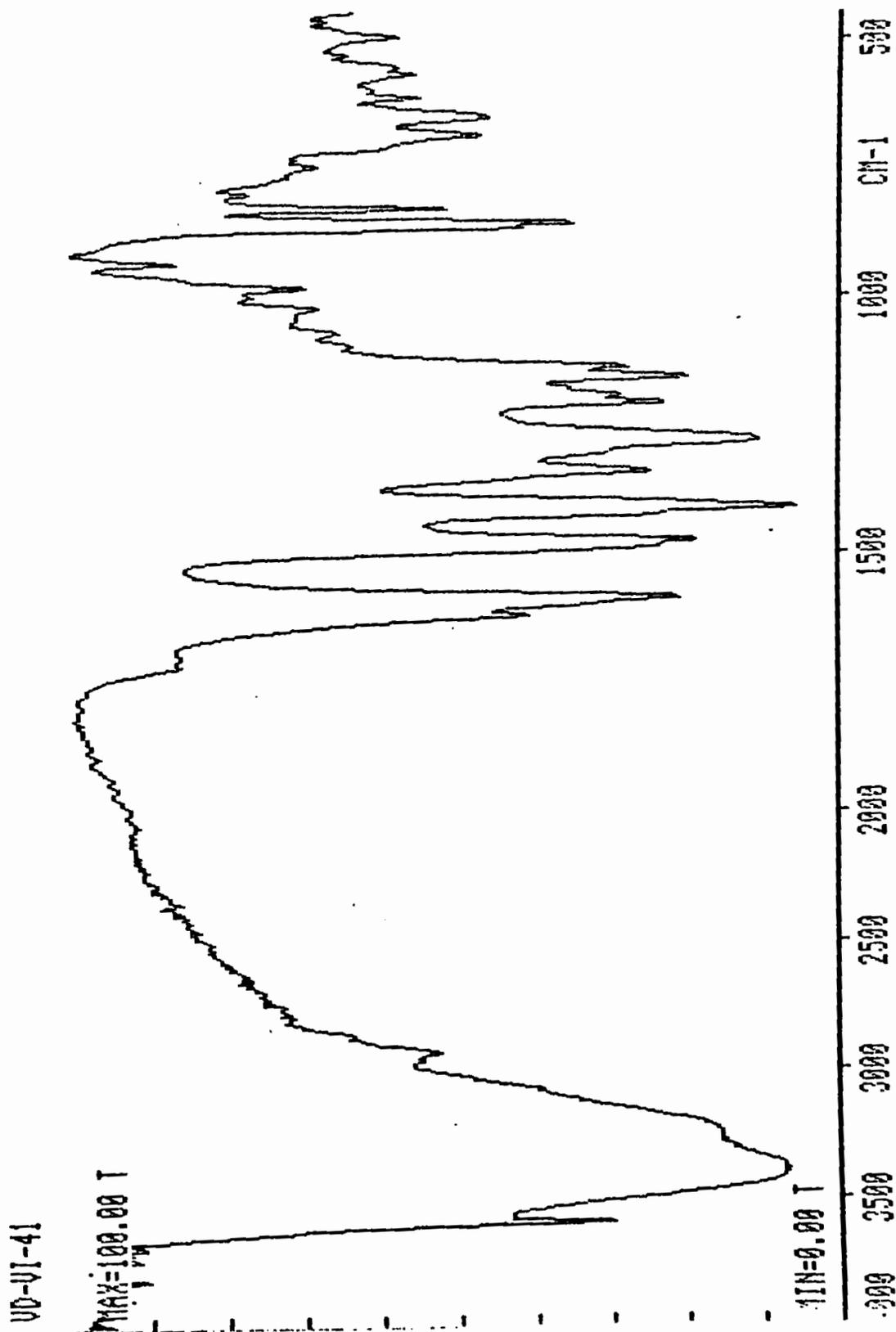


Figura 47. Espectro de I. V. (KBr) de 27.

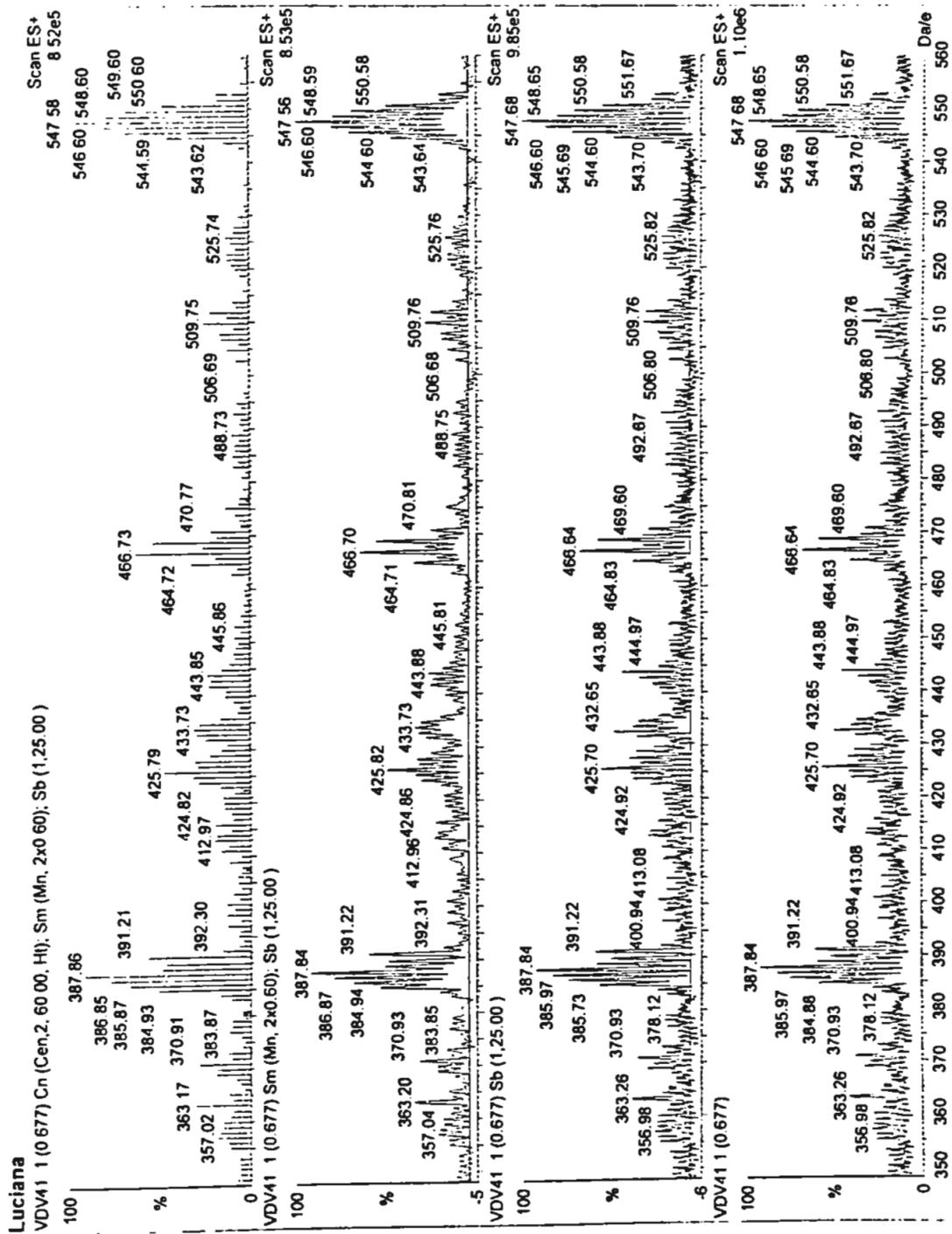


Figura 48. Espectro de massas (eletrospray) de 27.

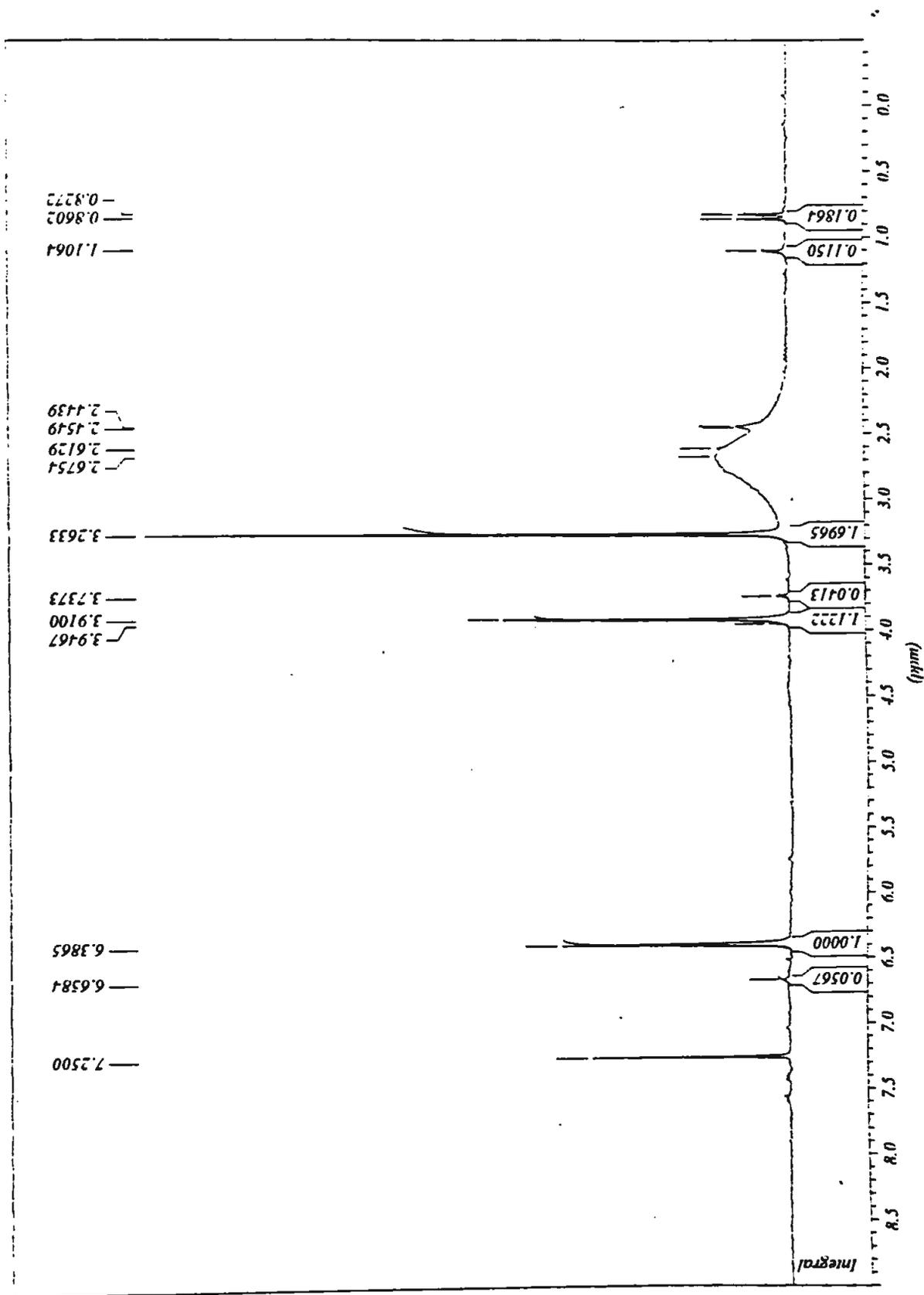


Figura 49. Espectro de RMN ¹H de 27 (200 MHz, CDCl₃/CD₃OCl).

Luciana VD-V-41 (4h 55min)

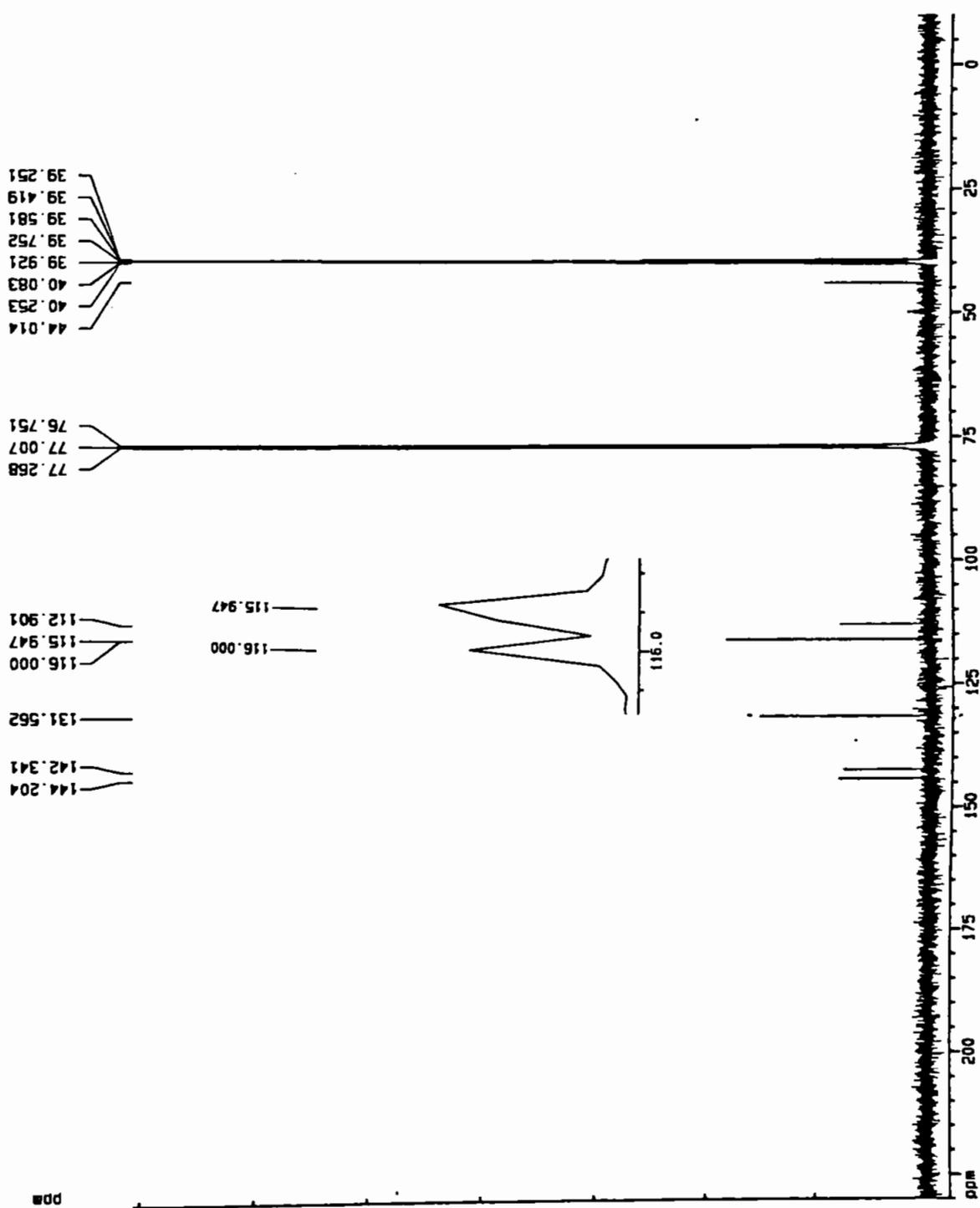


Figura 50. Espectro de RMN ^{13}C (PND) de **27** (50 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$).

Nota da BCQ: No impresso, está faltando a página 155.

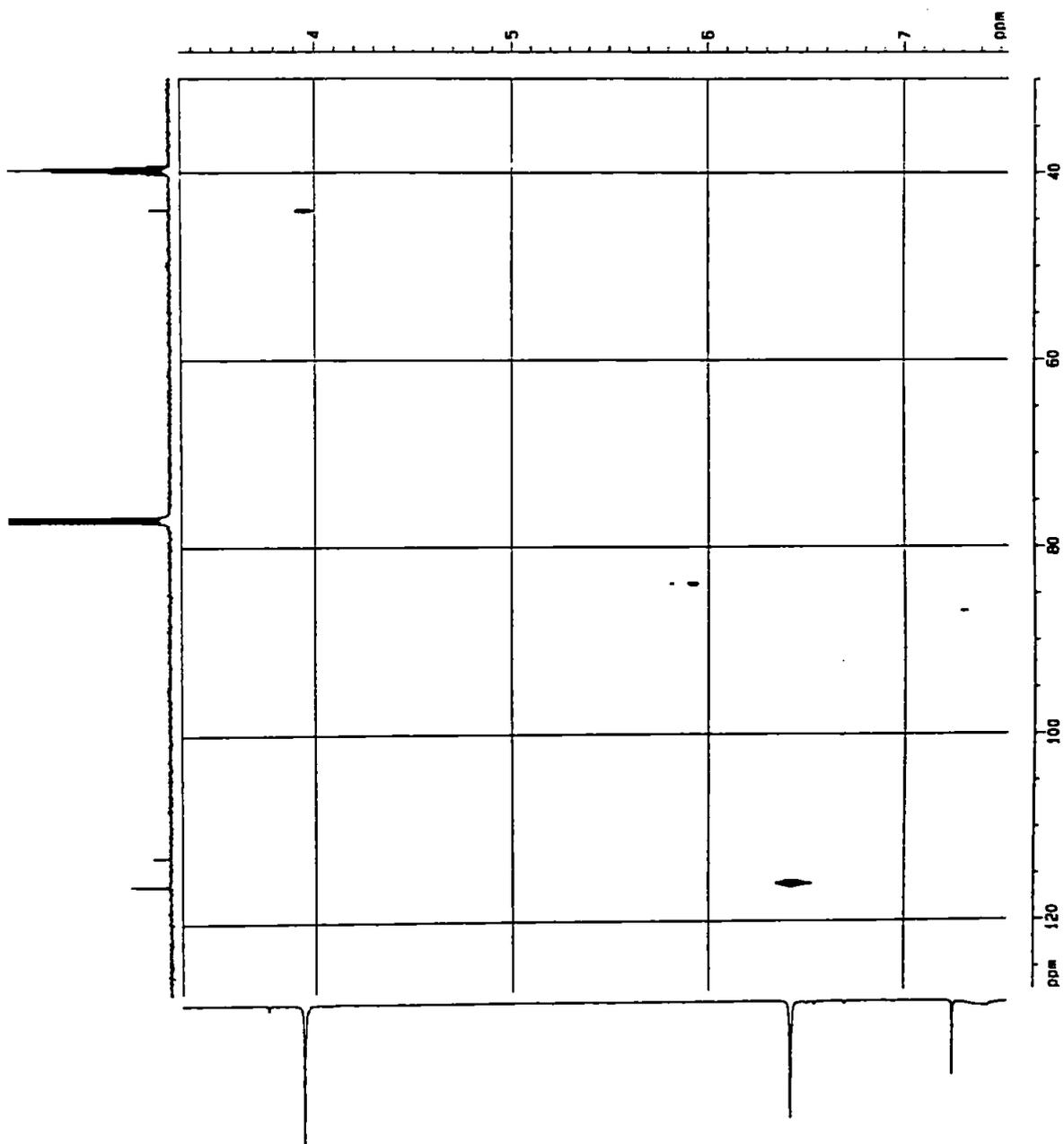


Figura 52. Espectro de RMN COSY ^1H — ^{13}C de 27 (500/125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$).

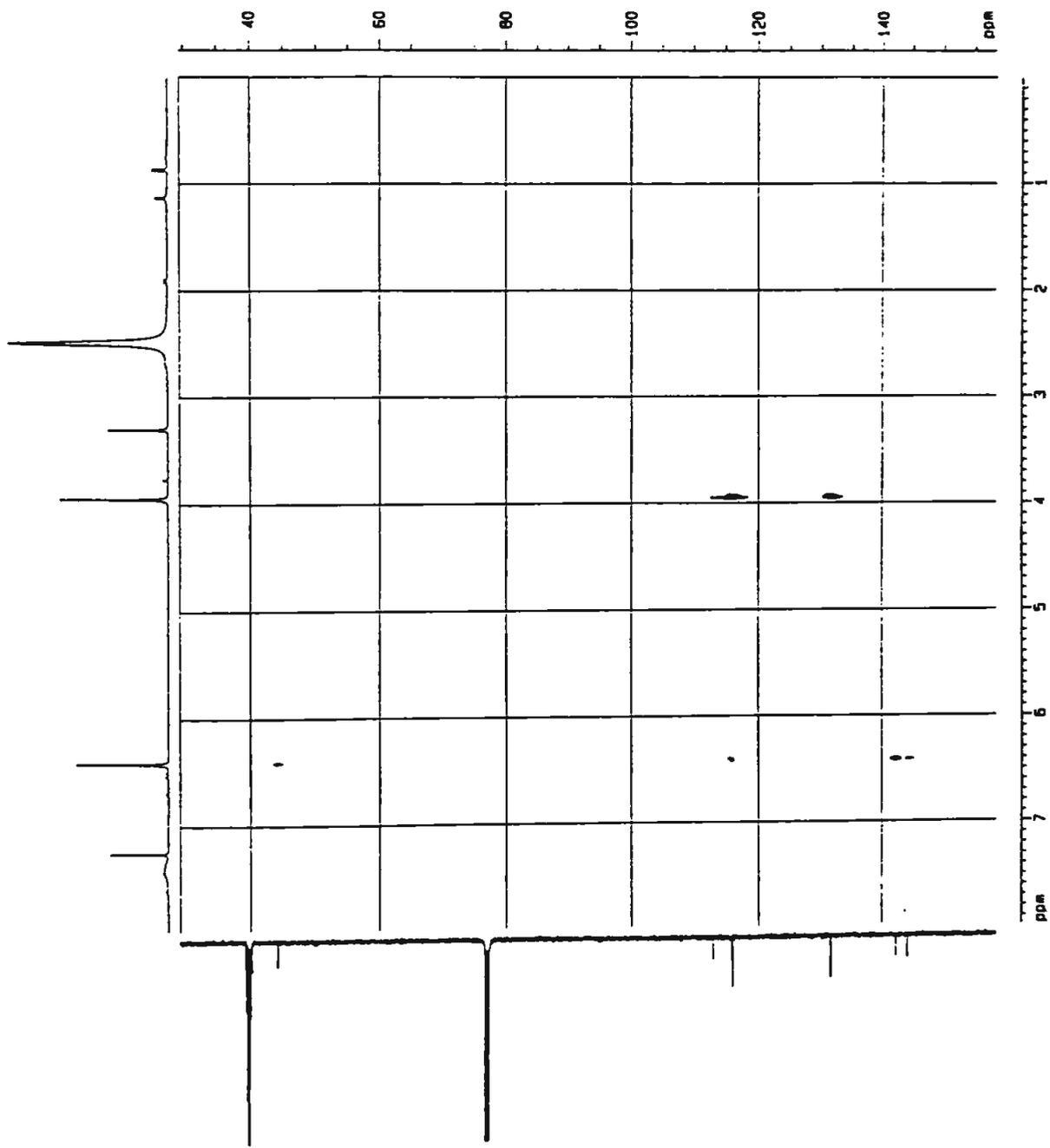


Figura 53. Espectro de RMN HMBC (correlação ^1H — ^{13}C) de **27** (500/125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$).

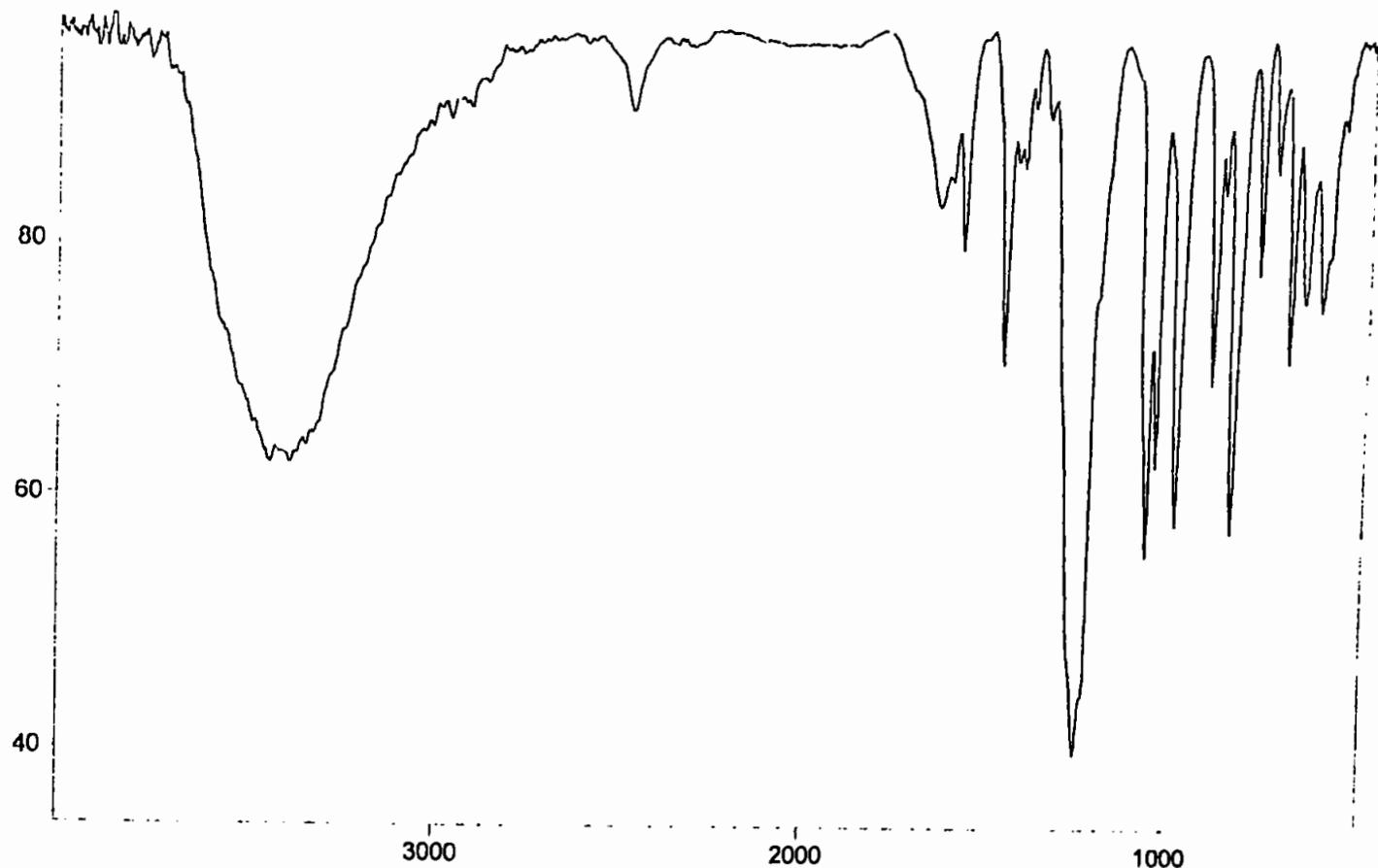


Figura 54. Espectro de I. V. (KBr) de 1.

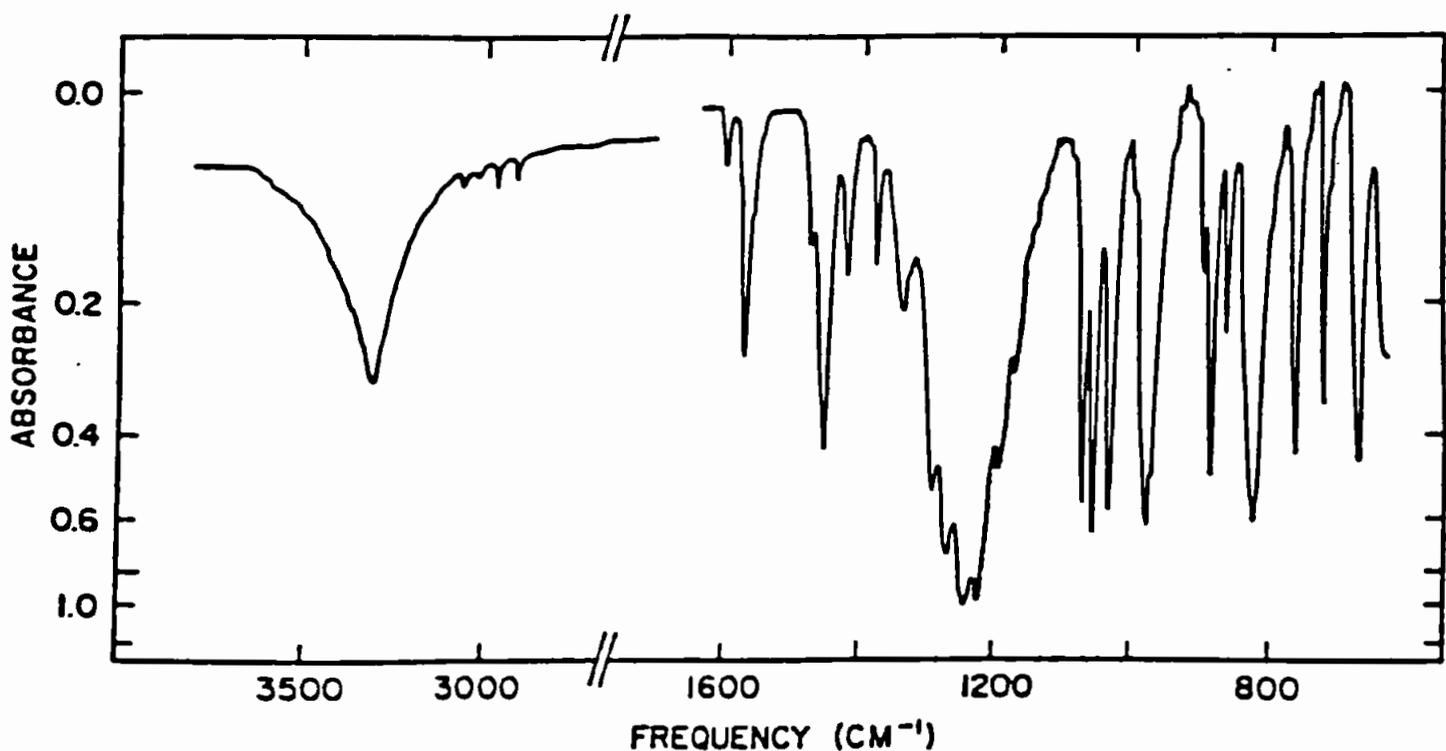


Figura 55. Espectro de I.V. (KBr) do 1'-4-dissulfato de potássio do álcool 2,3-dibromo-1',4,5-triidroxibenzílico (KBr), apresentado na literatura ⁶².

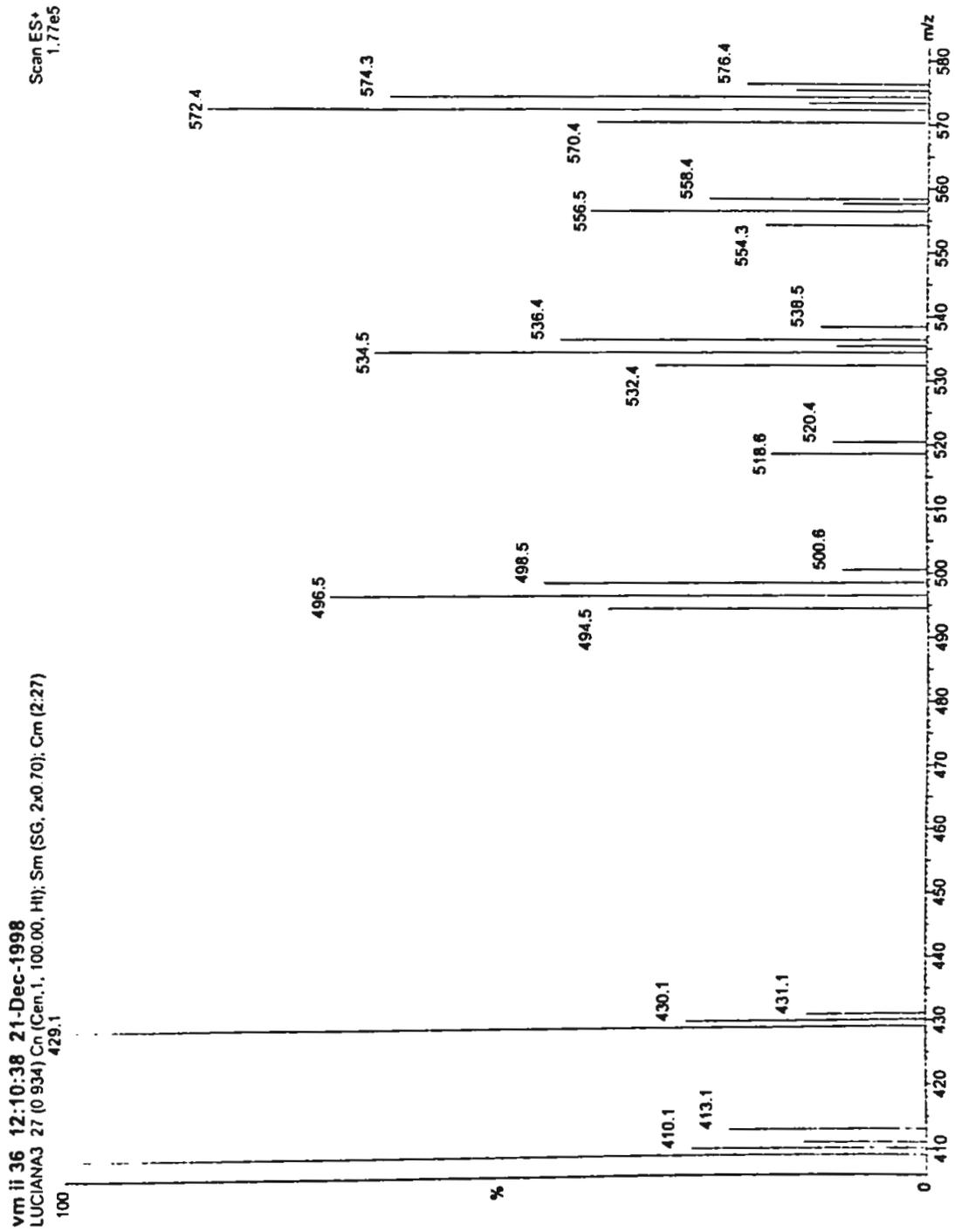


Figura 56. Espectro de massas (eletrospray) de 1.

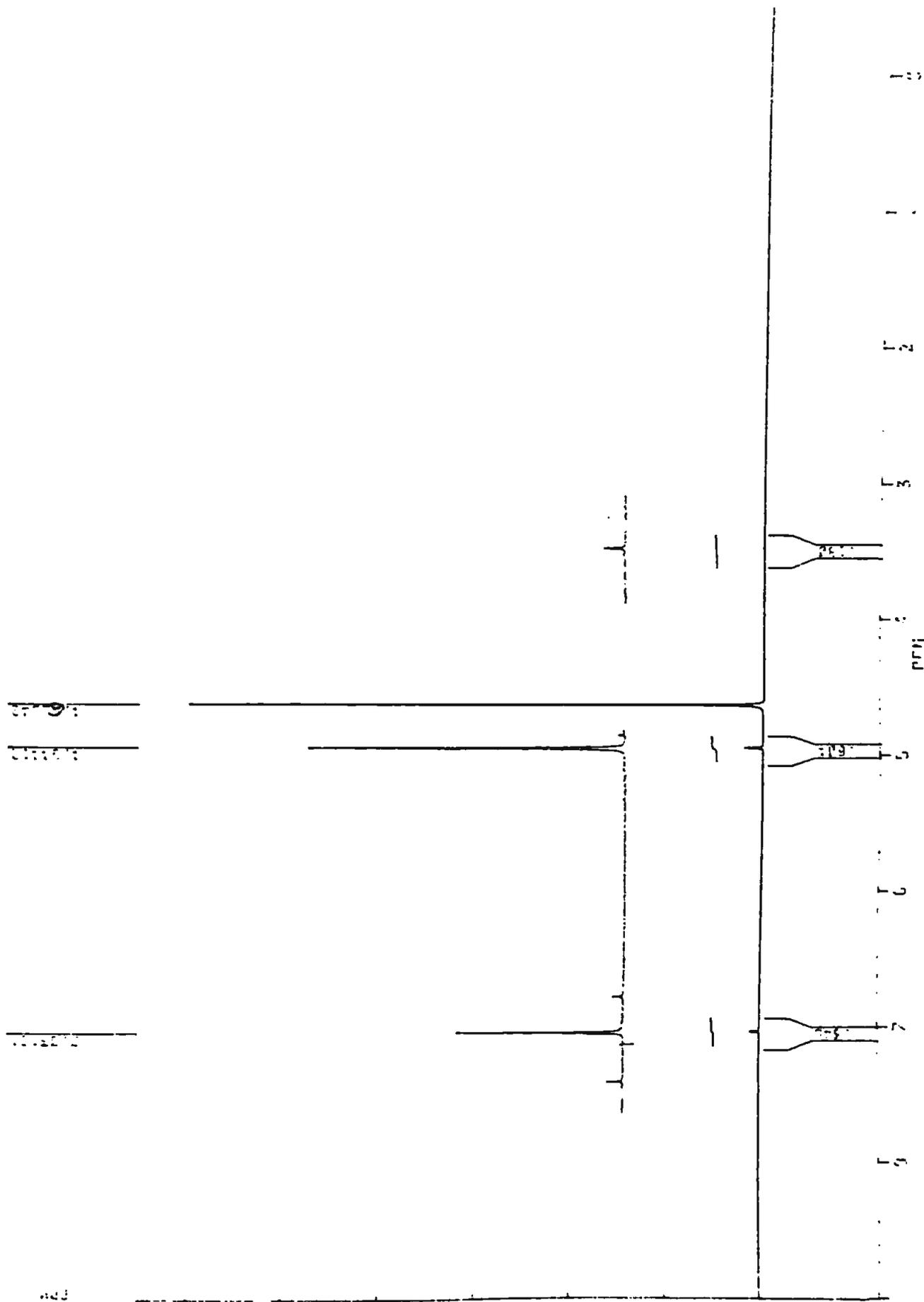


Figura 57. Espectro de RMN ^1H de 1 (200 MHz, D_2O).

0014016.VI 11 58

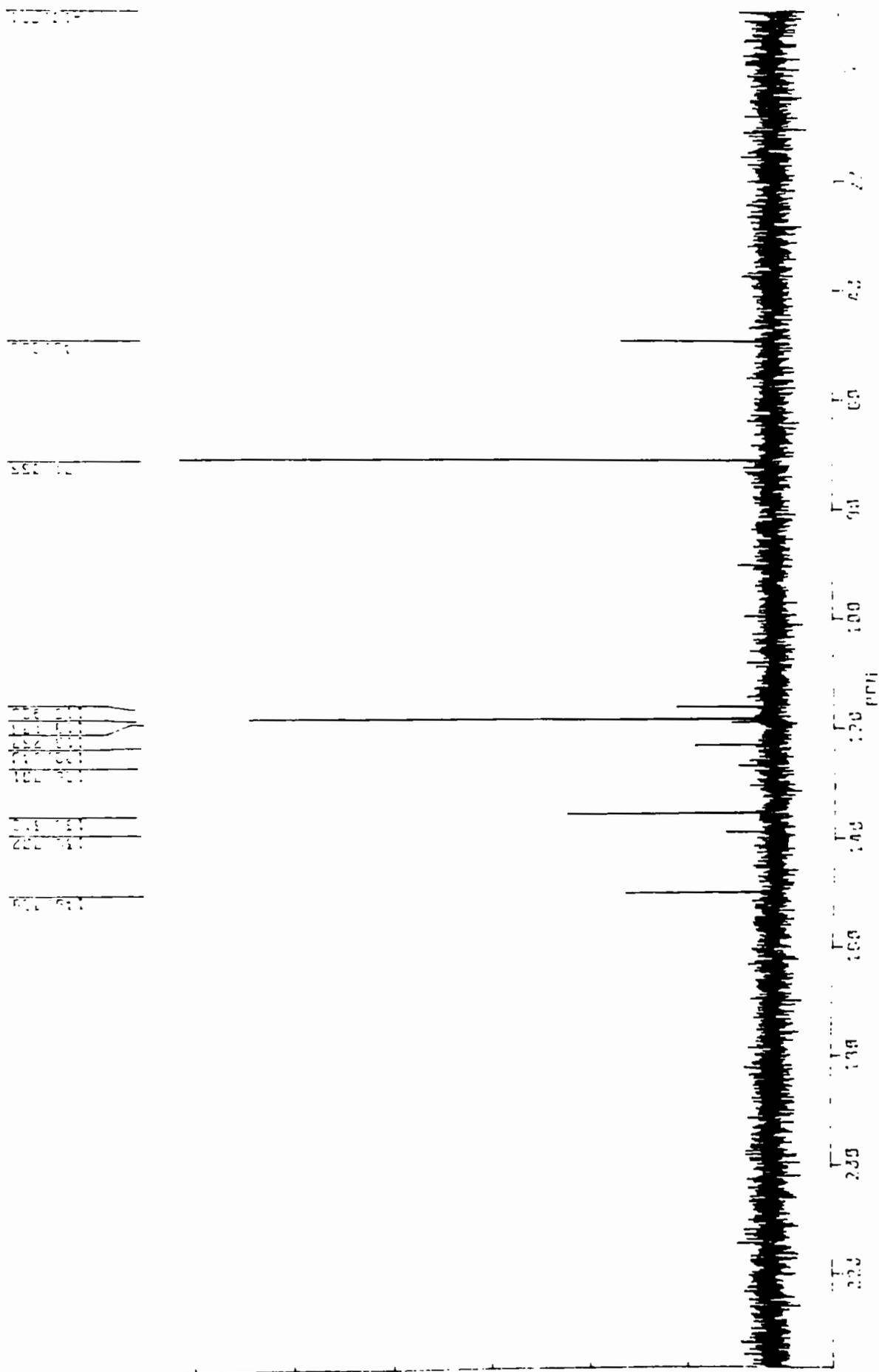


Figura 58. Espectro de RMN ^{13}C (PND) de **1** (50 MHz, D_2O).

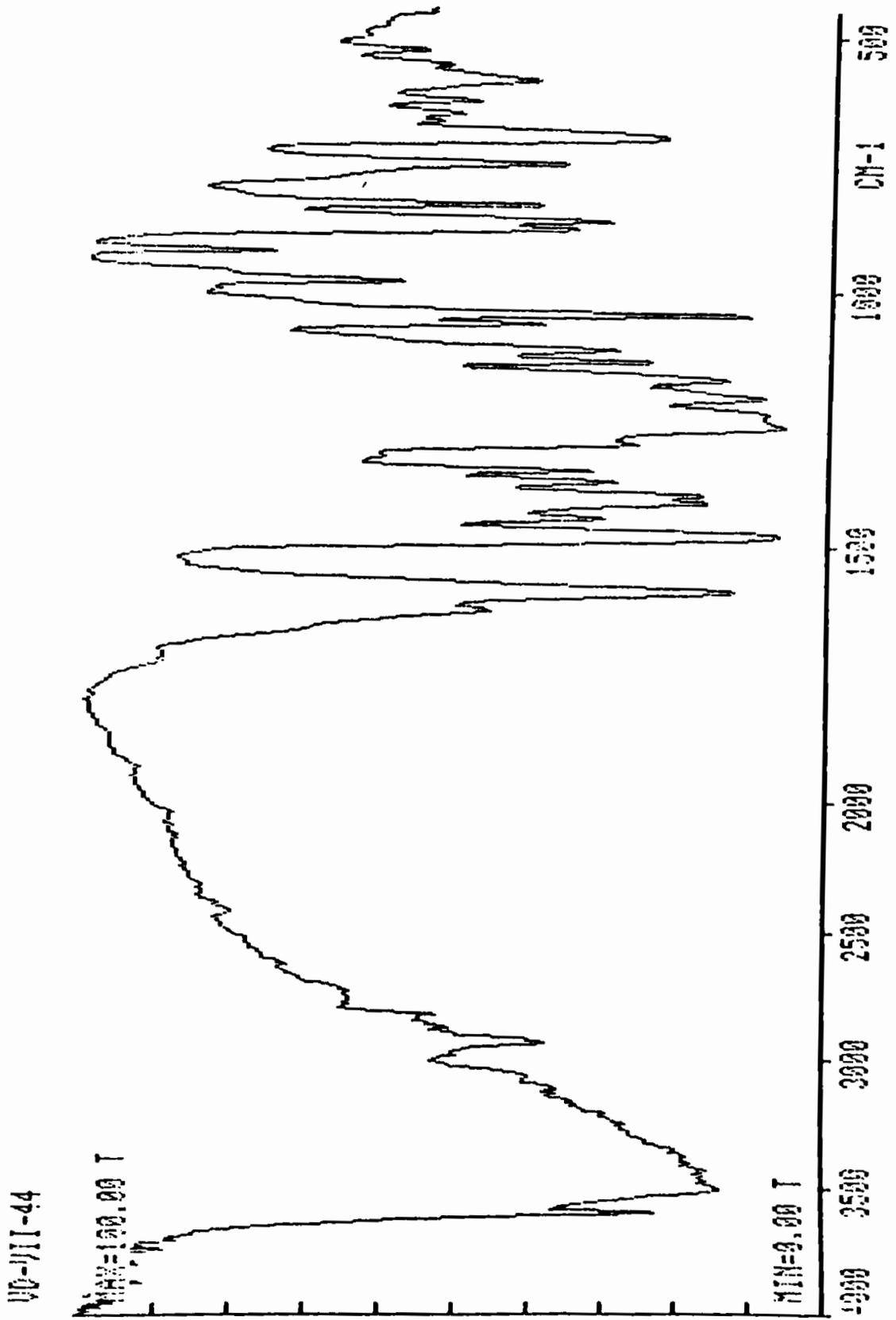


Figura 59. Espectro de I.V. (KBr) de 47.

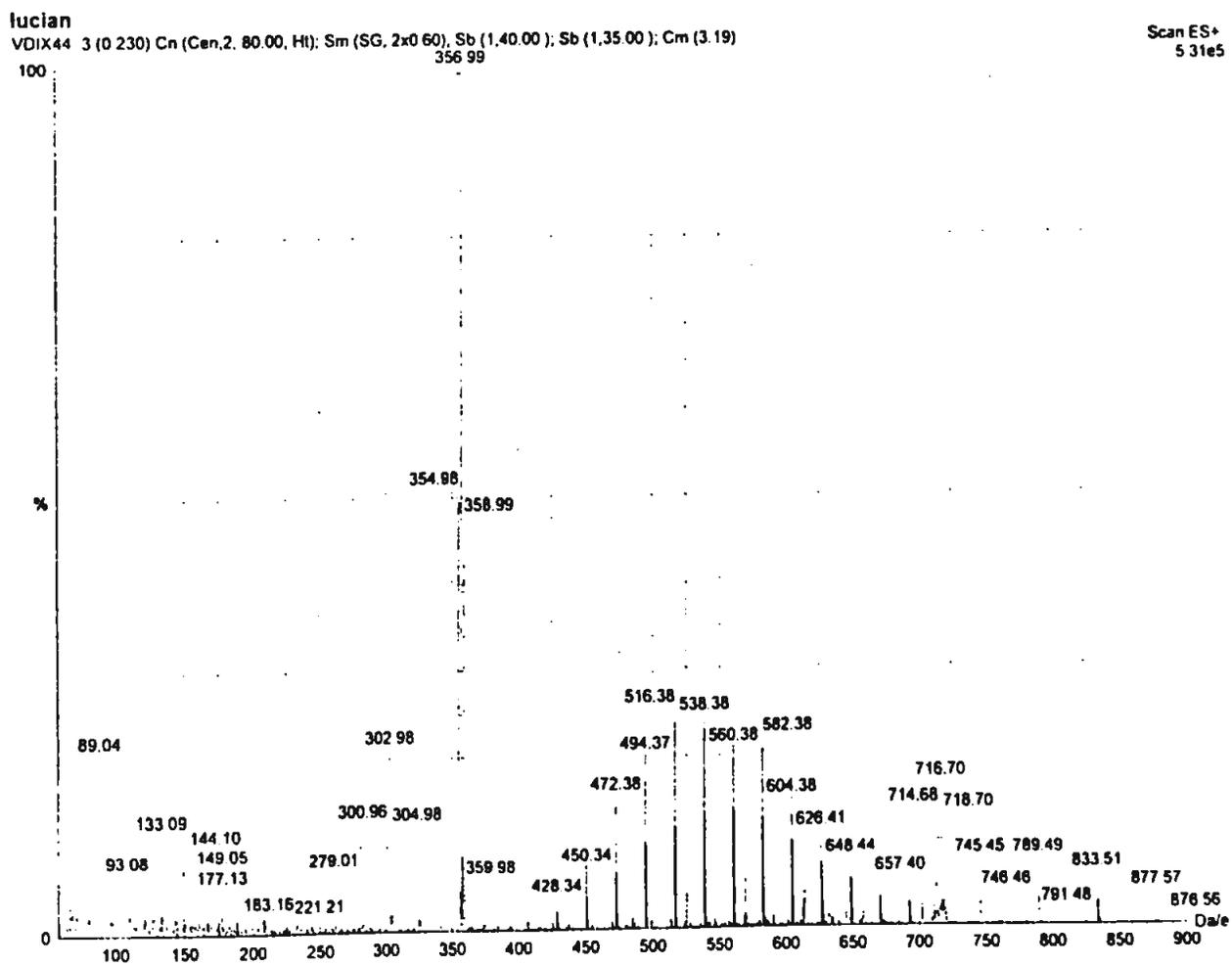
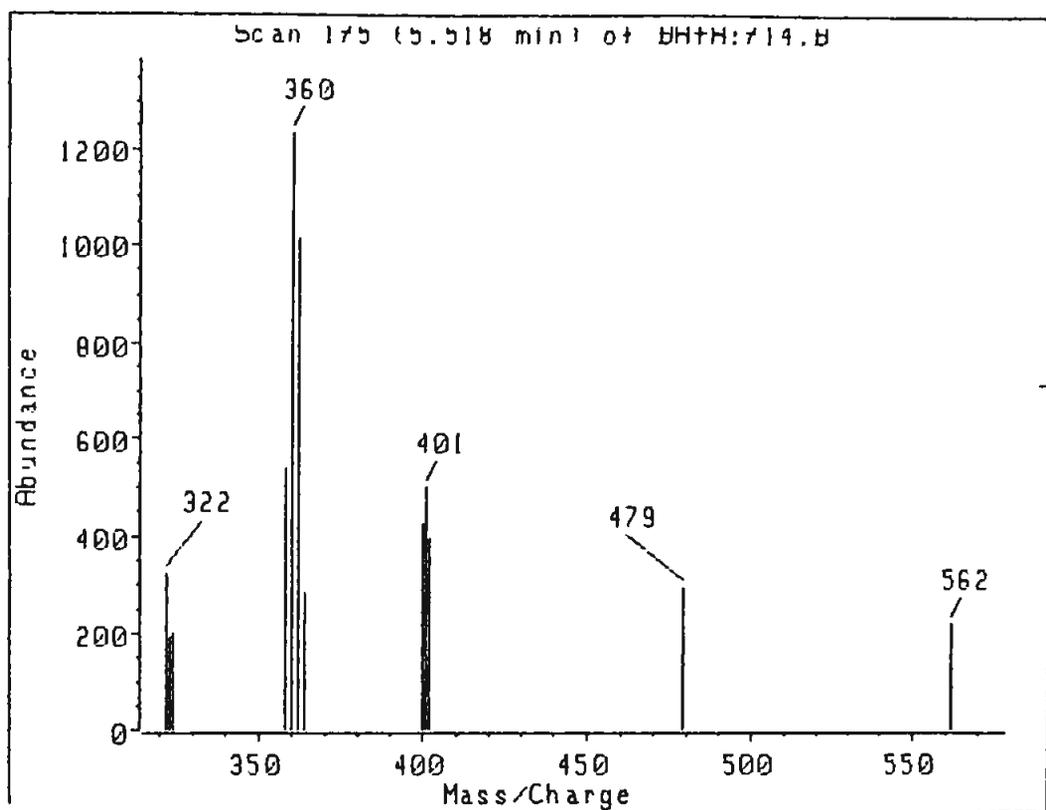


Figura 60. Espectro de massas (I.D. e electropray) de 47.

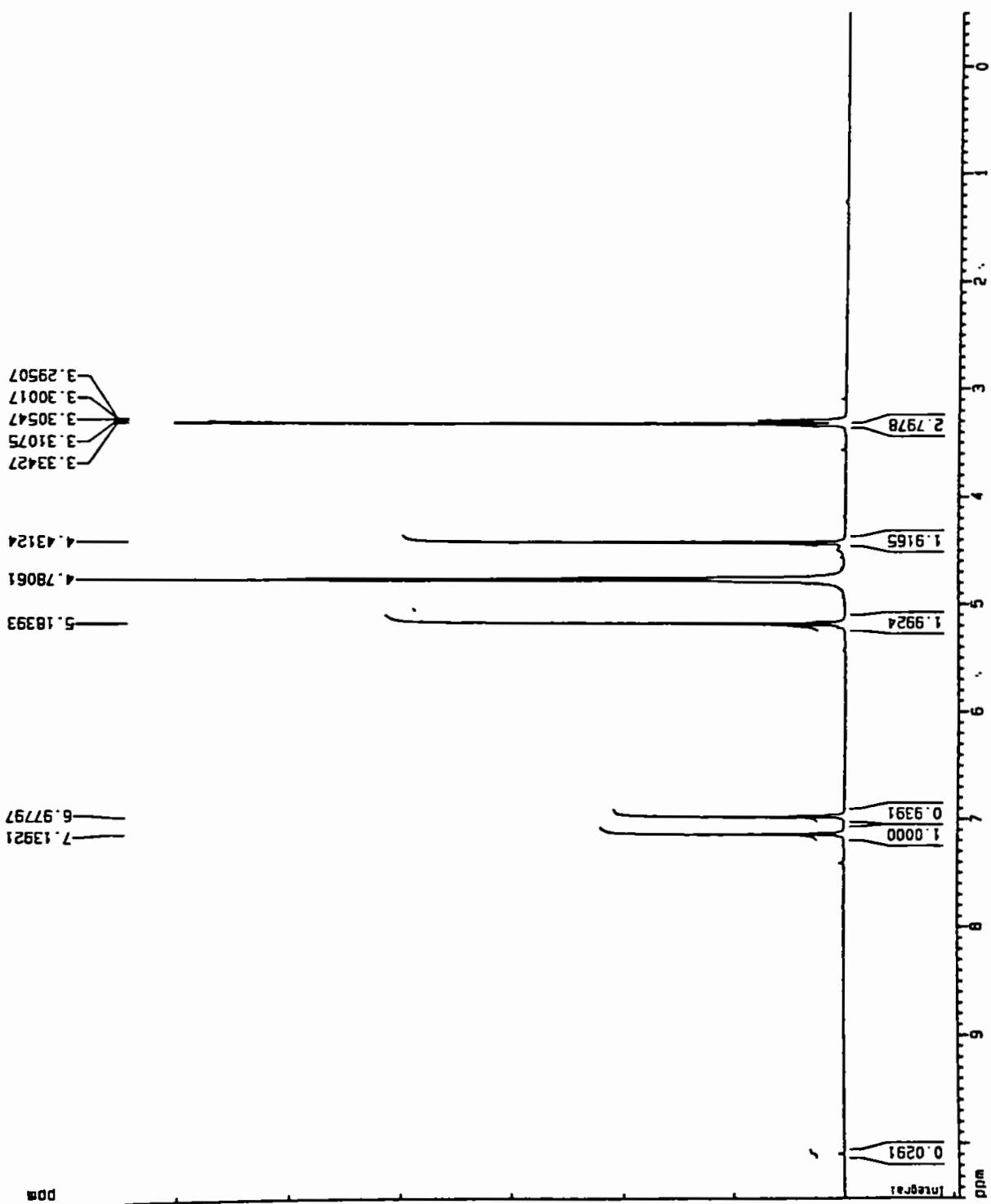


Figura 61. Espectros de RMN ^1H de **47** (300MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$)

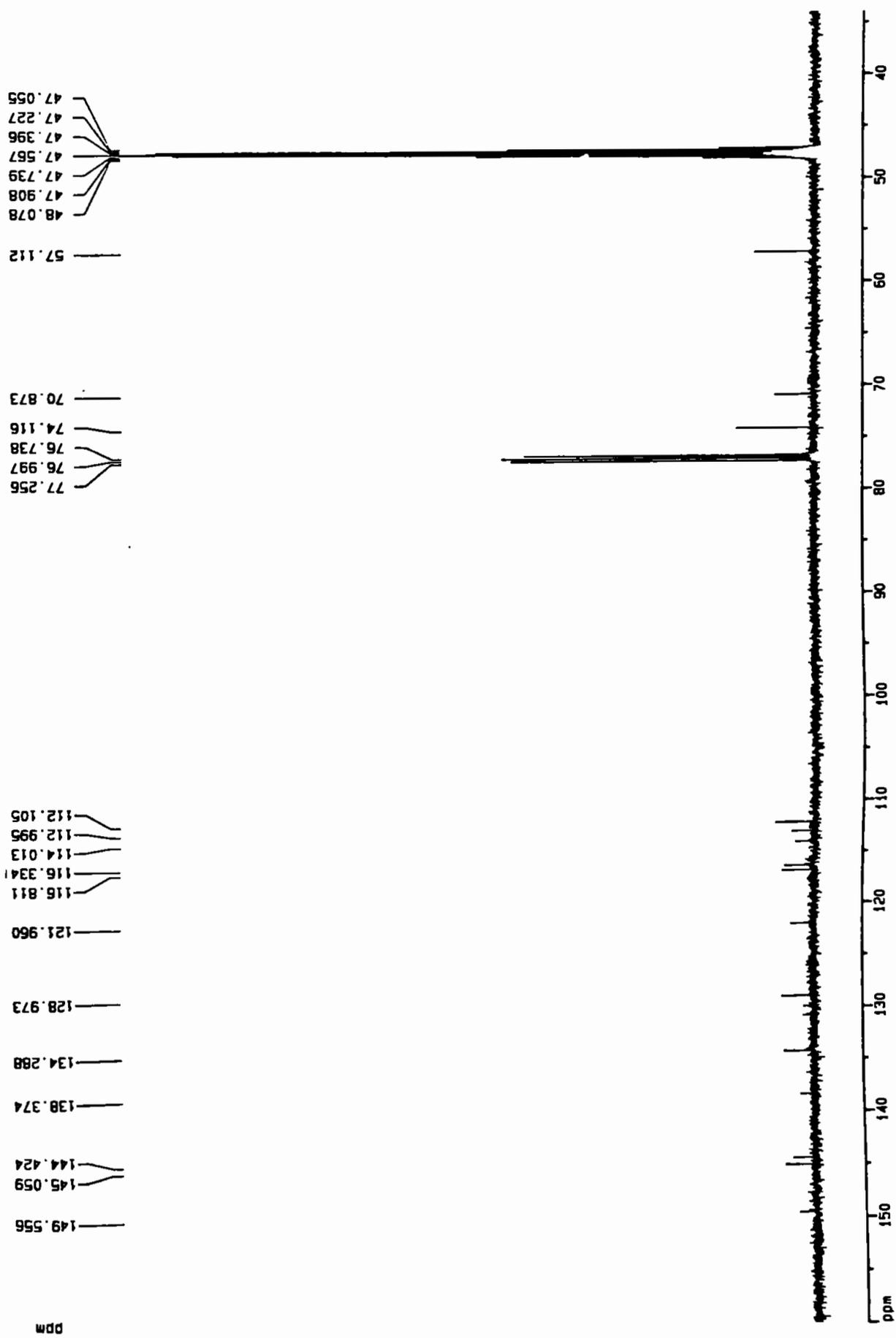


Figura 62. Espectro de RMN ^{13}C (PND) de **47** (75MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$)

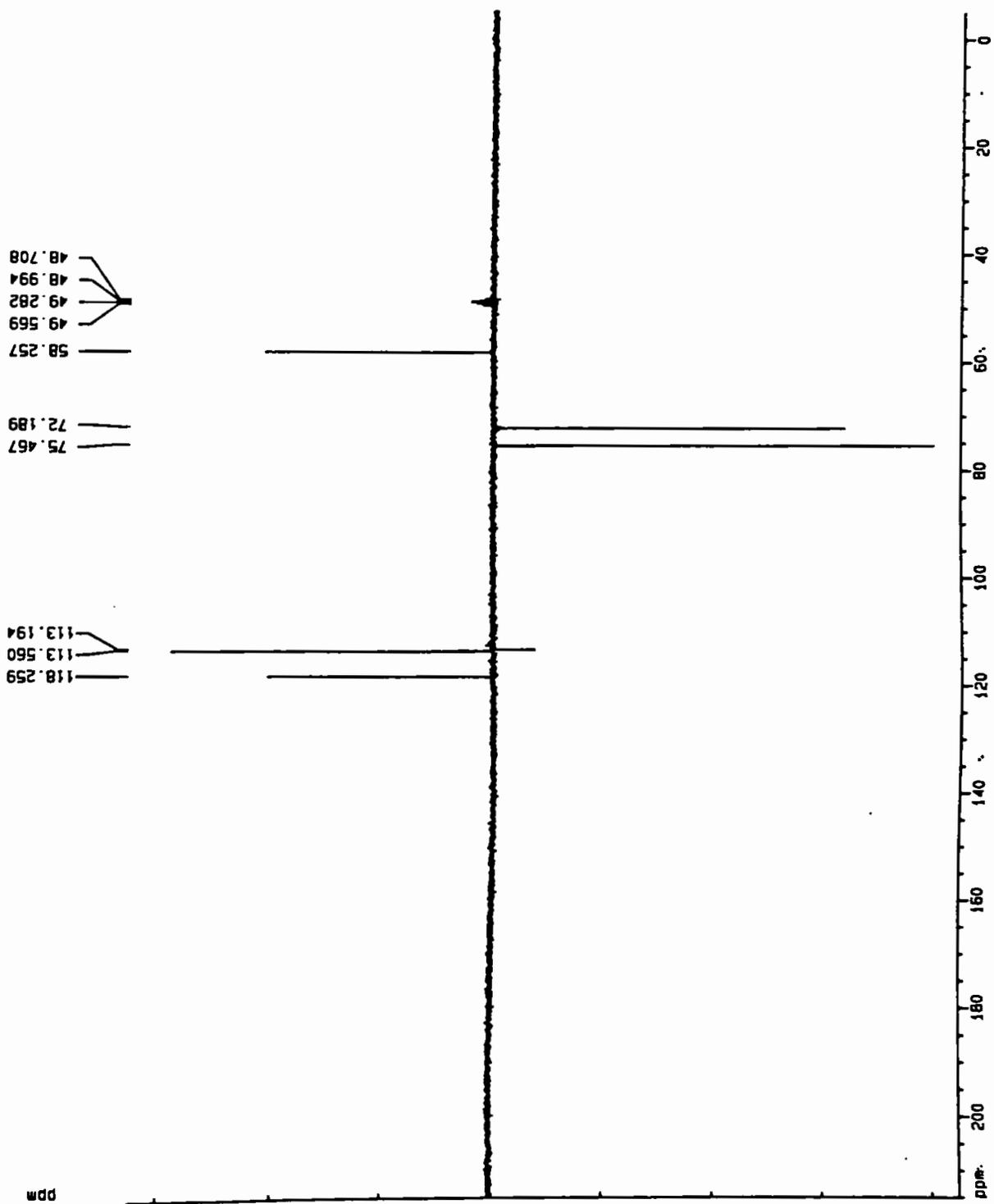


Figura 63. Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135°) de **47** (75MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$).

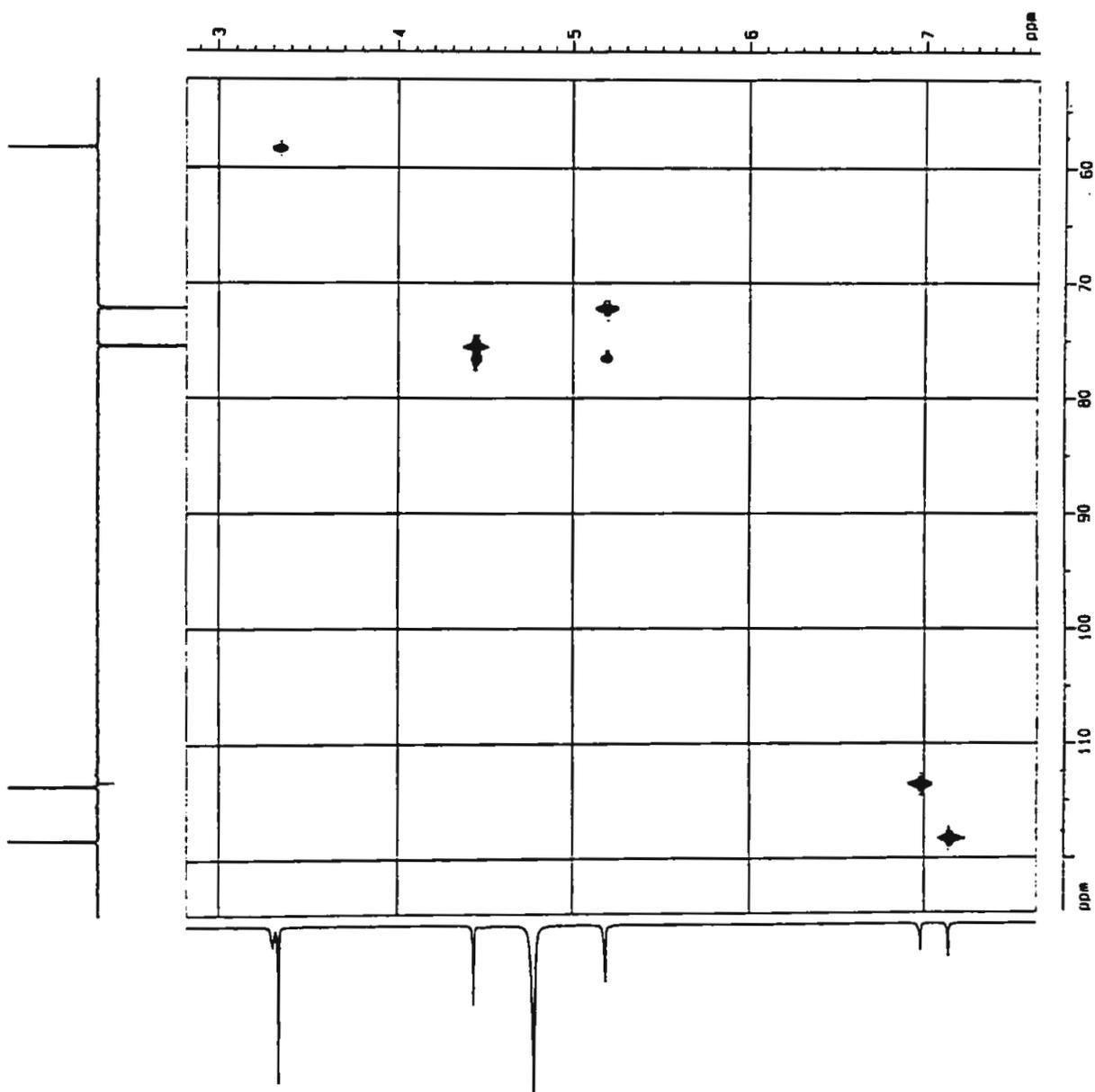


Figura 64. Espectro de RMN HMQC (correlação $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) de **47** (500/125 MHz, CD_3OD).

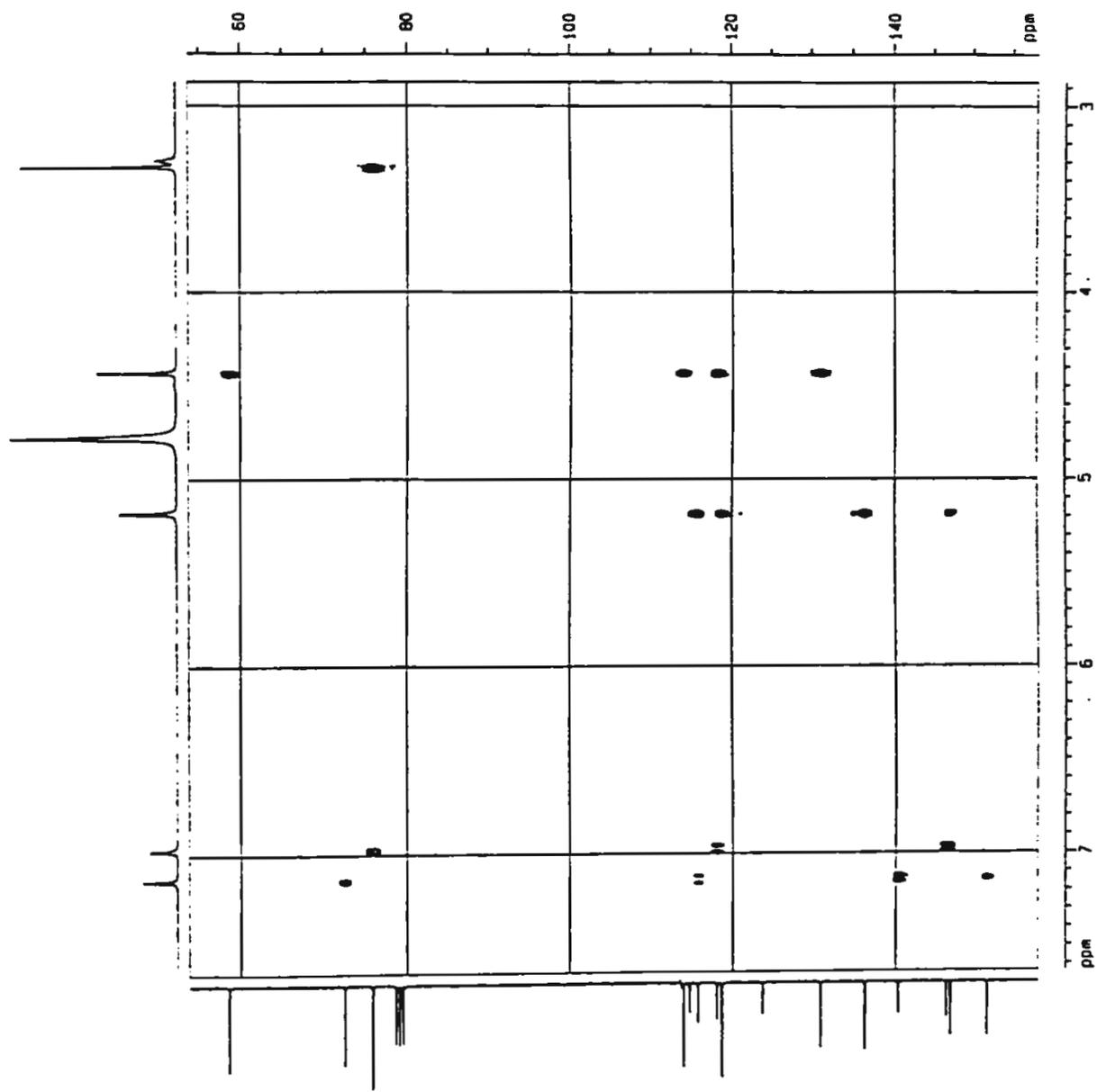


Figura 65. Espectro de RMN HMBC (correlação ^1H — ^{13}C) de 47 (500/125 MHz, CD_3OD)

19-Nov-1996, 16:14:36
Scan E.S.-
7.05e5

VP III 33. 100ng/ul in 1:1 water : acetonitrile.
USP05 17 (1.470) Sm (SG, 2x0.60); Sb (2,10.00); Cm (9:19)

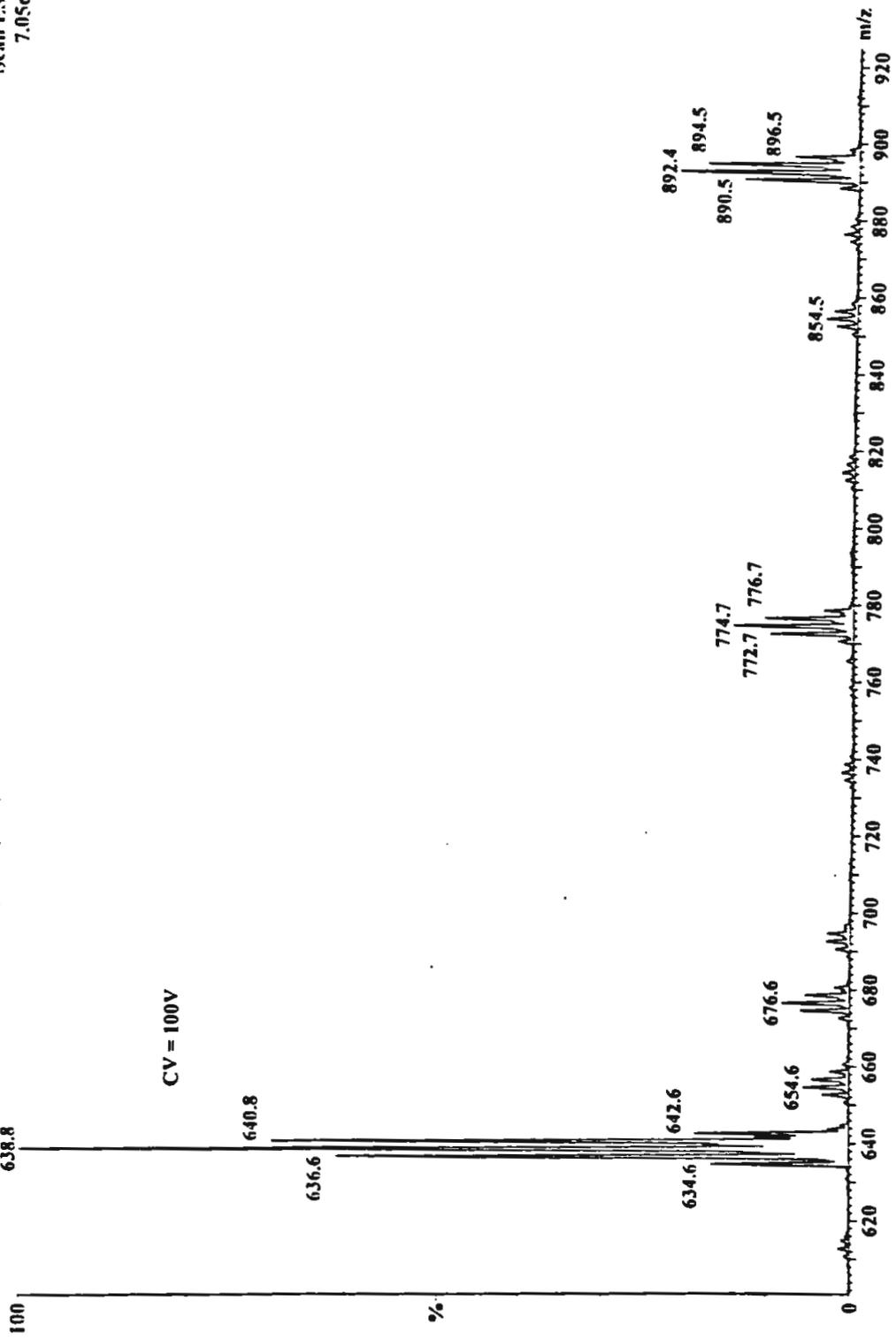


Figura 66. Espectro de massas (eletrospray) de 48.

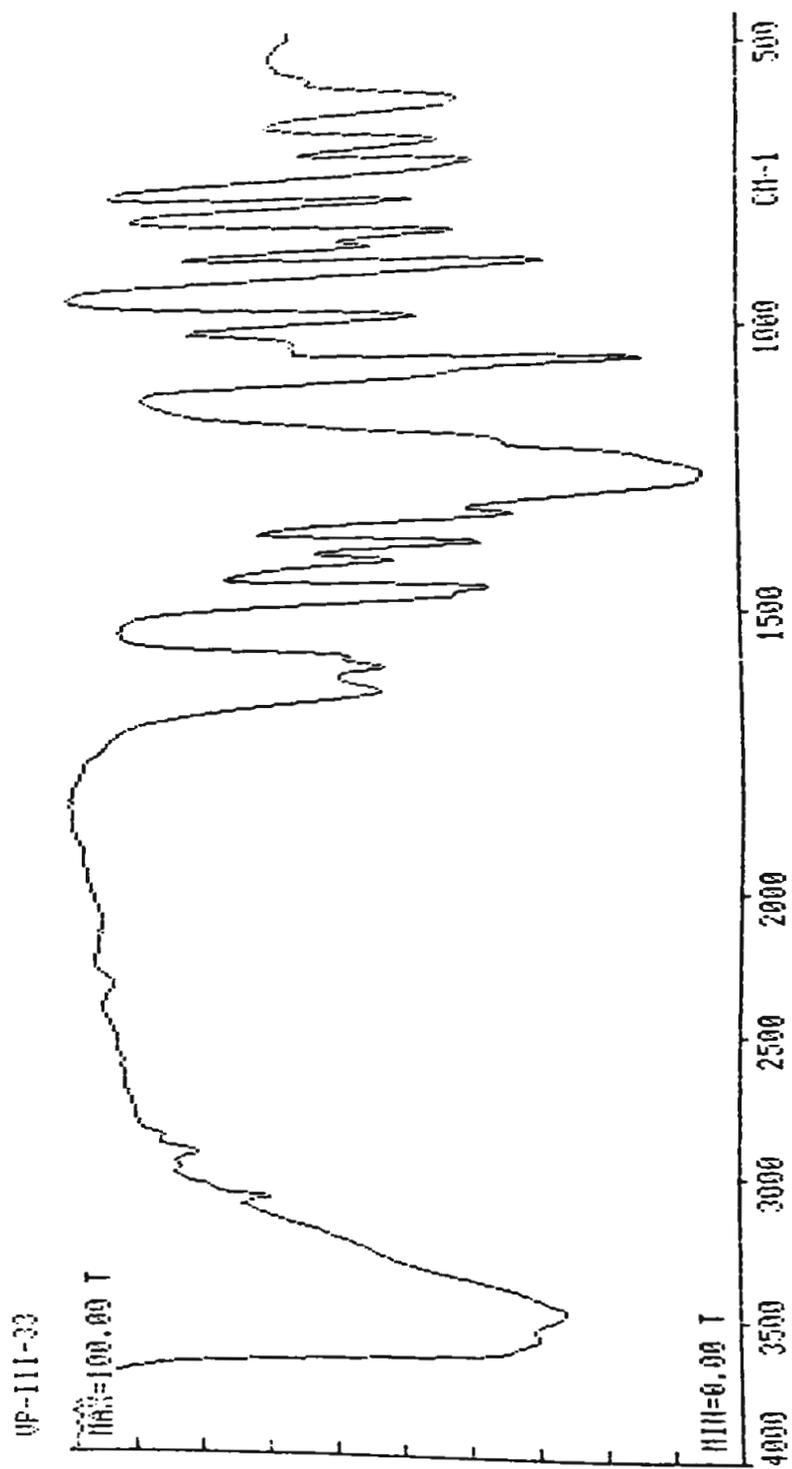


Figura 67. Espectro de I.V.(KBr) de 48.

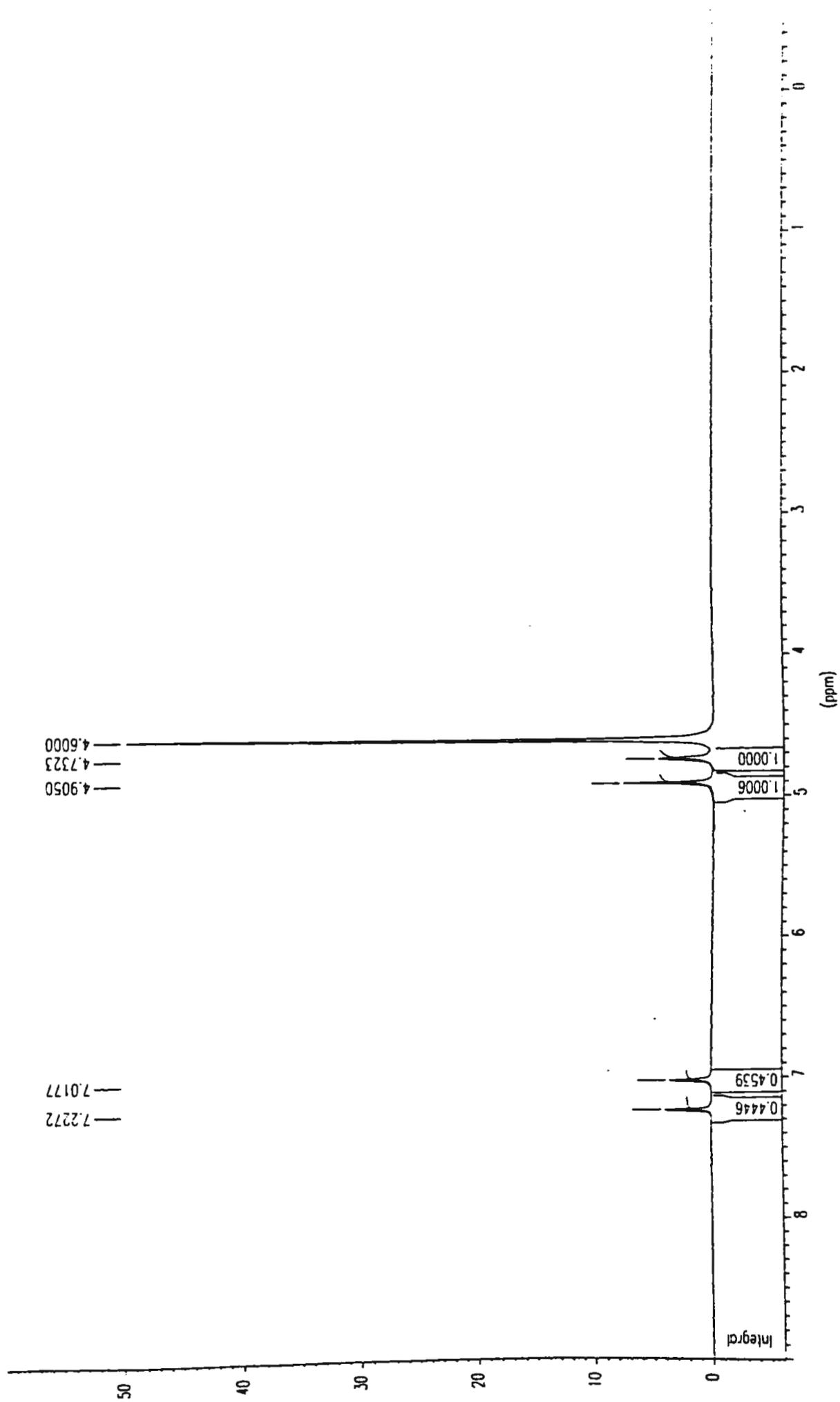


Figura 68. Espectro de RMN ^1H de **48** (200 MHz, D_2O)

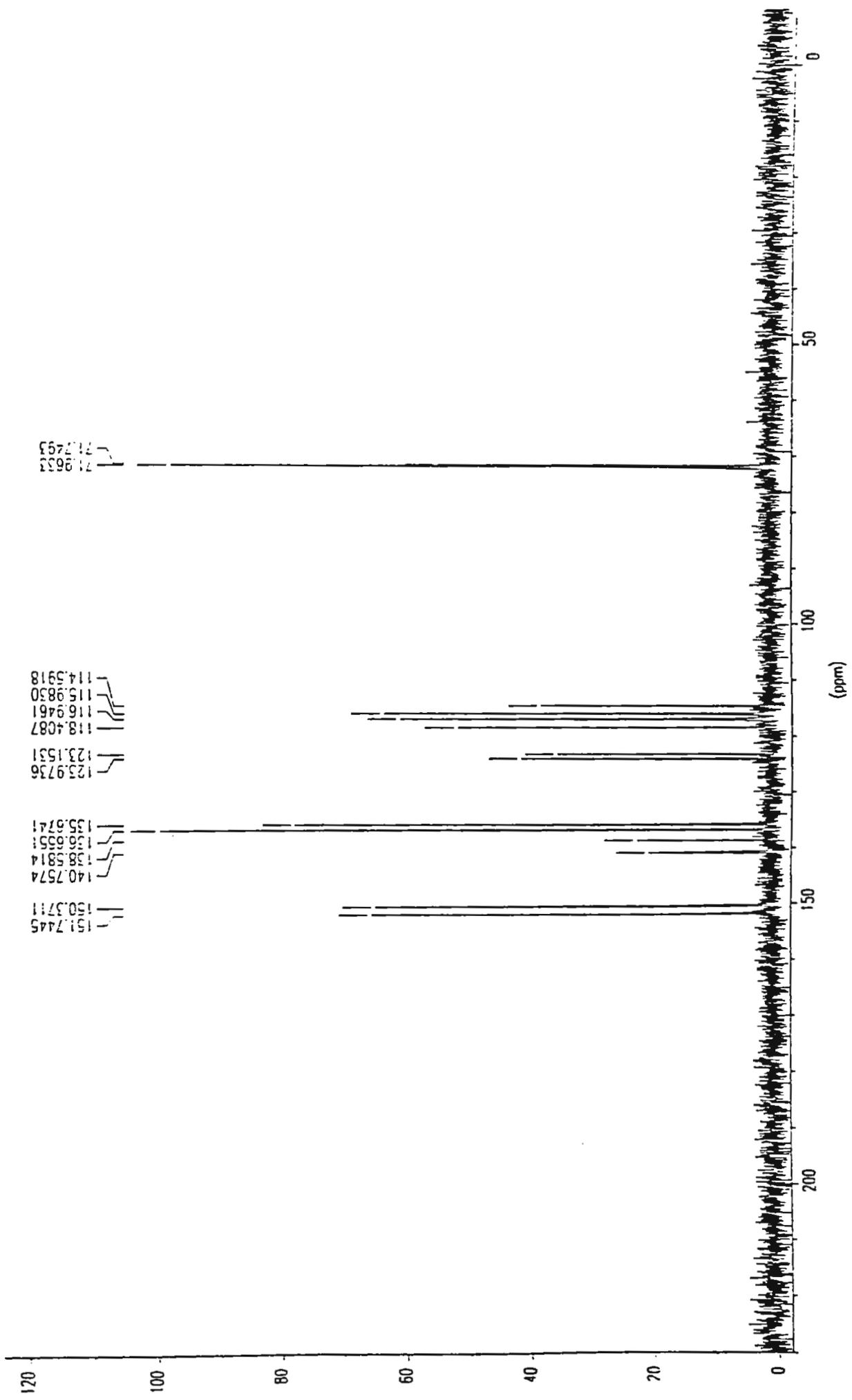


Figura 69. Espectro de RMN ¹³C (PND) de 48 (50MHz, D₂O)

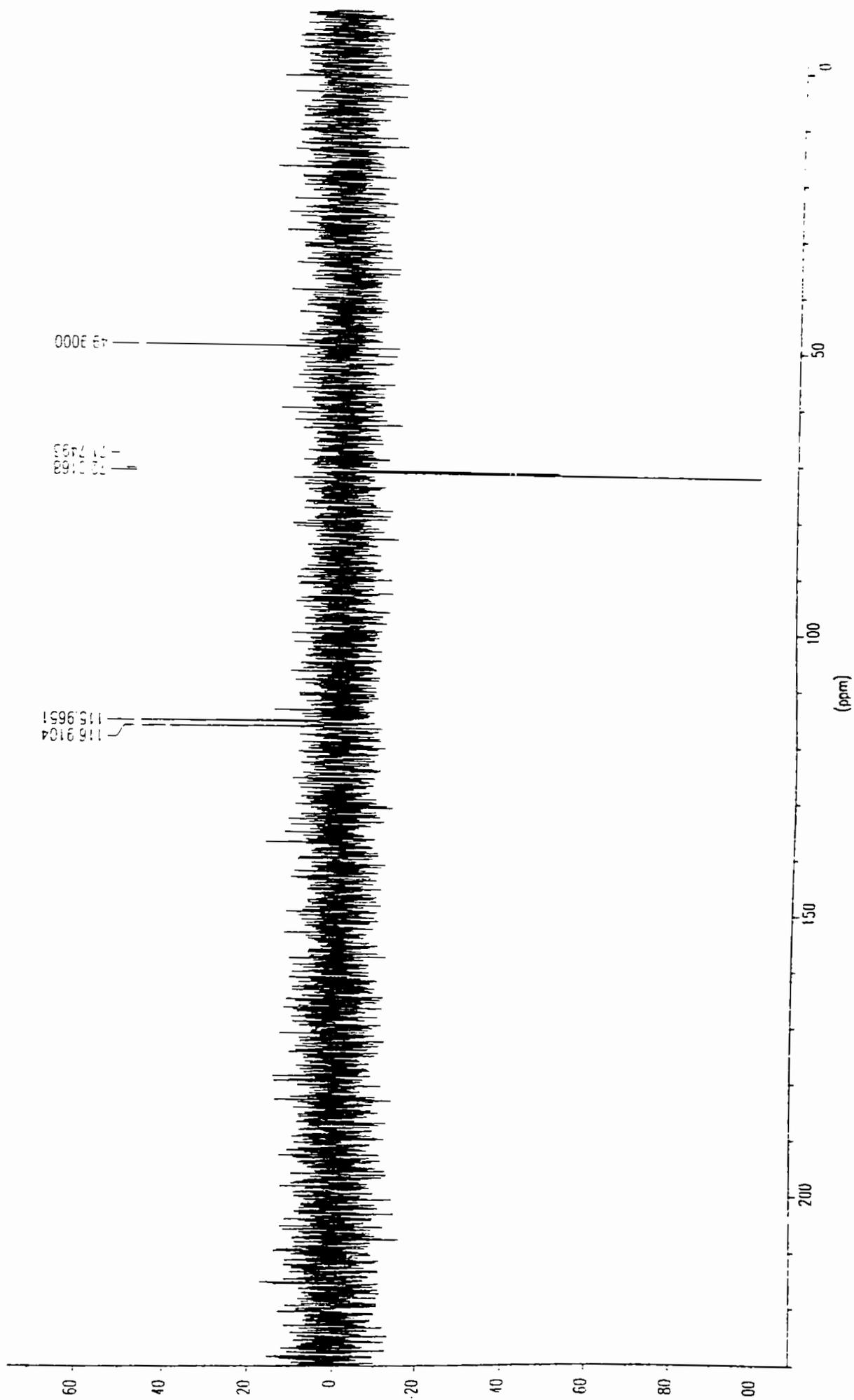


Figura 70. Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135 $^\circ$) de **48** (50 MHz, D_2O).

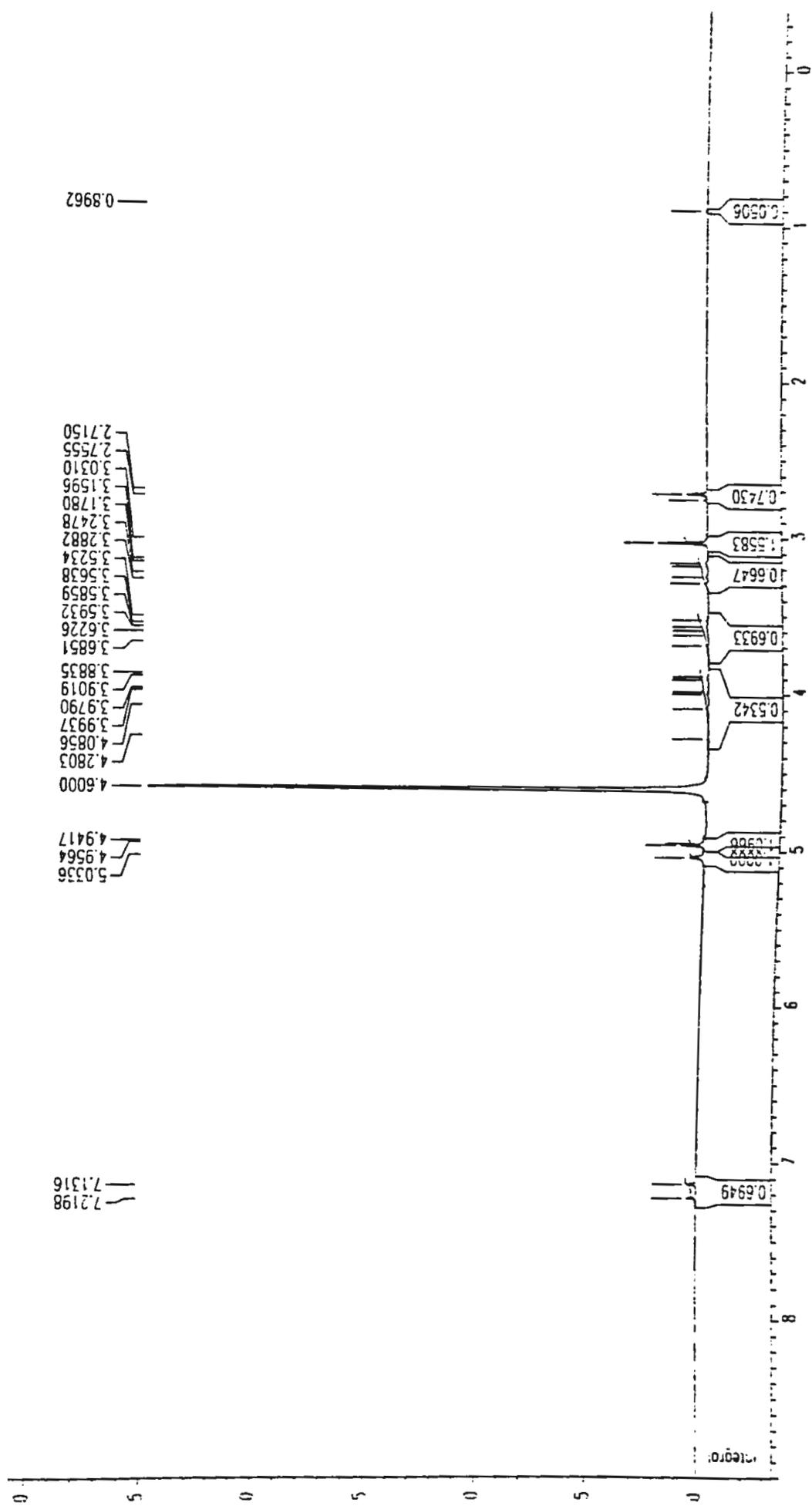


Figura 71. Espectro de RMN ^1H da fração VP-I-71 (300 MHz, D_2O).

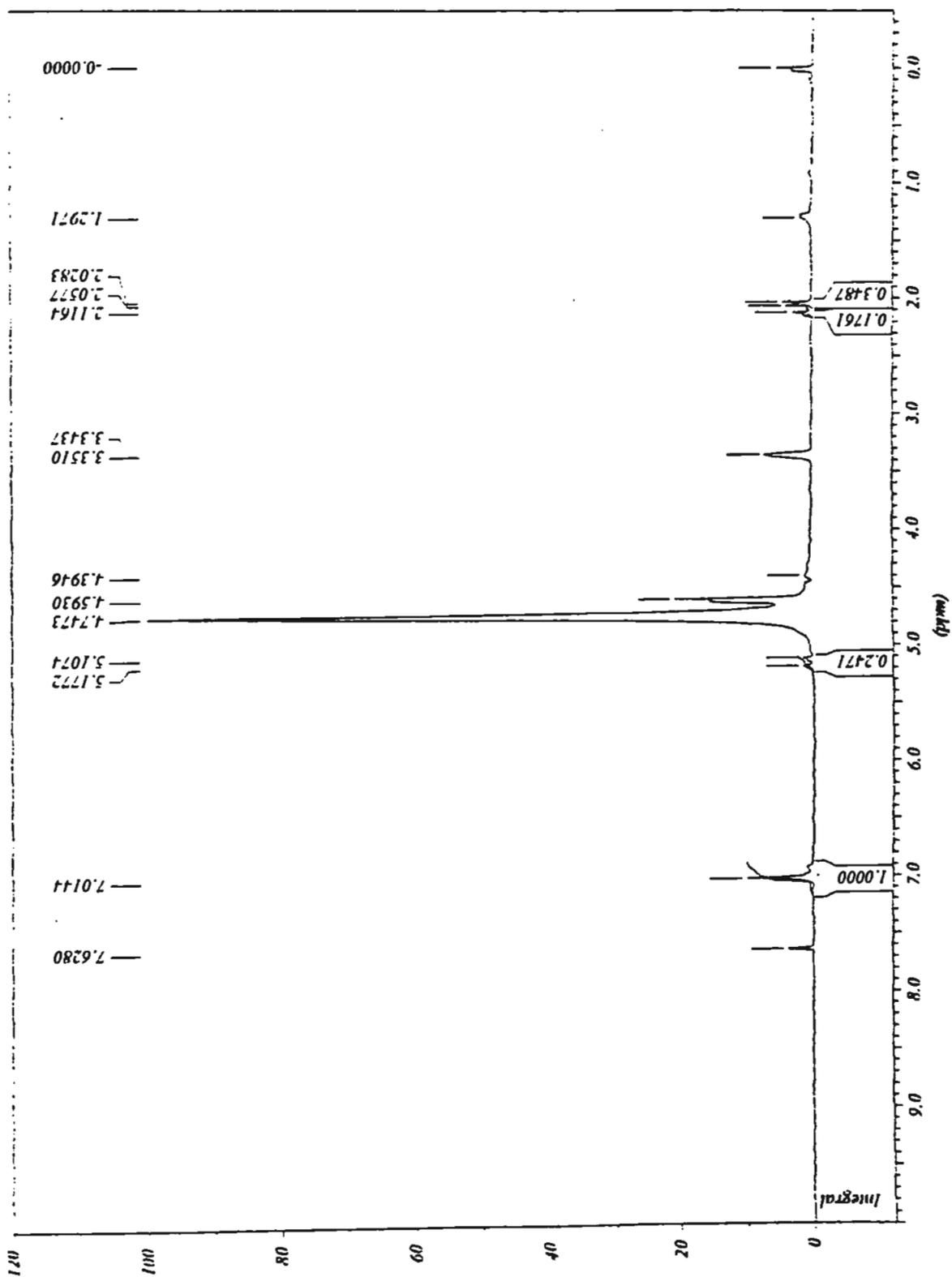


Figura 72. Espectro de RMN ¹H da fração VP-I-71, após hidrólise (200 MHz, CD₃OD/D₂O).

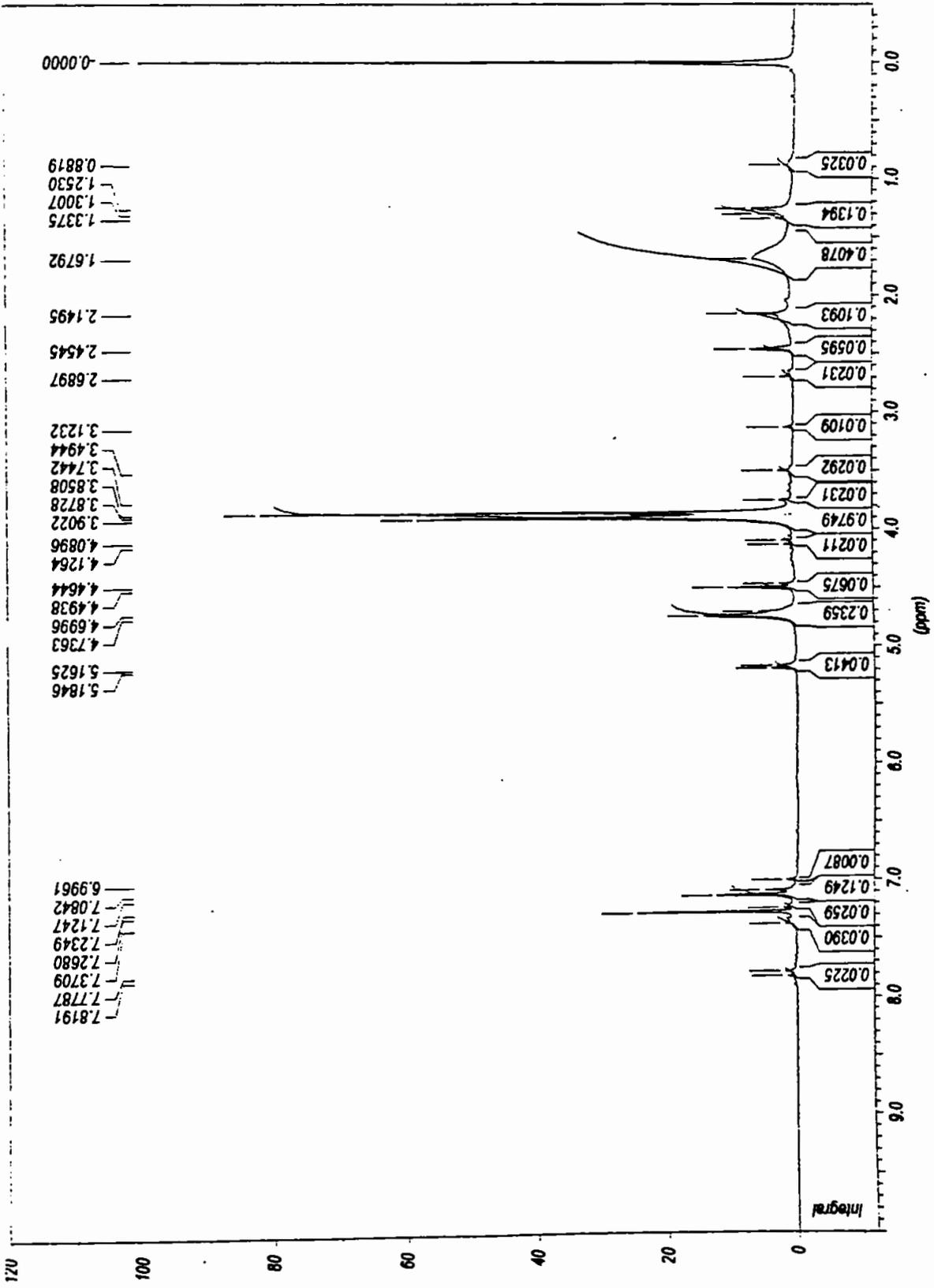


Figura 73. Espectro de RMN ¹H da fração VP-I-71 hidrolisada e metilada (200 MHz, CDCl₃)

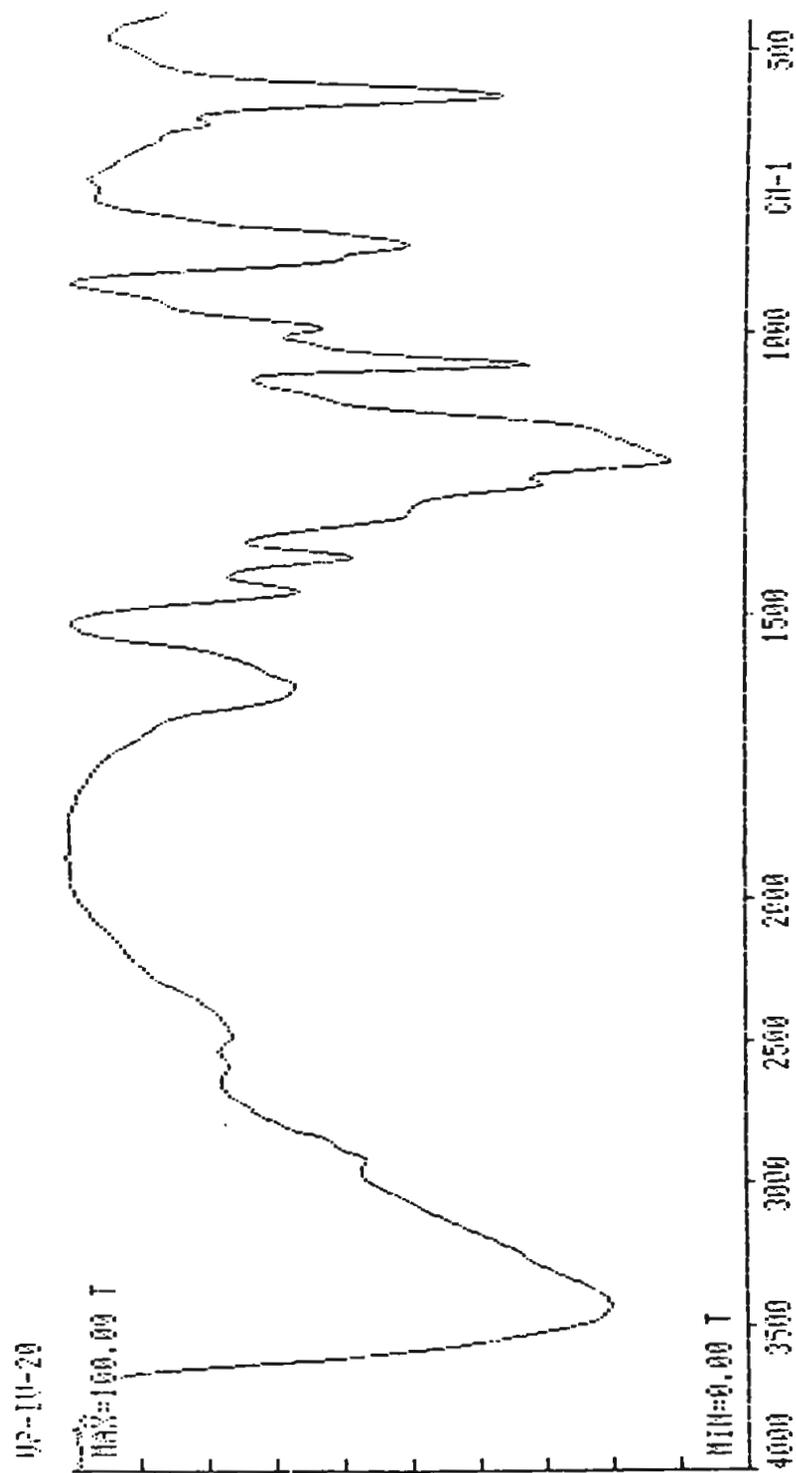


Figura 74. Espectro de I.V. (KBr) de 49.

vp IV 20 Luciana 15:56:15 19-Mar-1998
VPIV203 18 (0.628) Cm (2.18)

Scan ES+
1.20e3

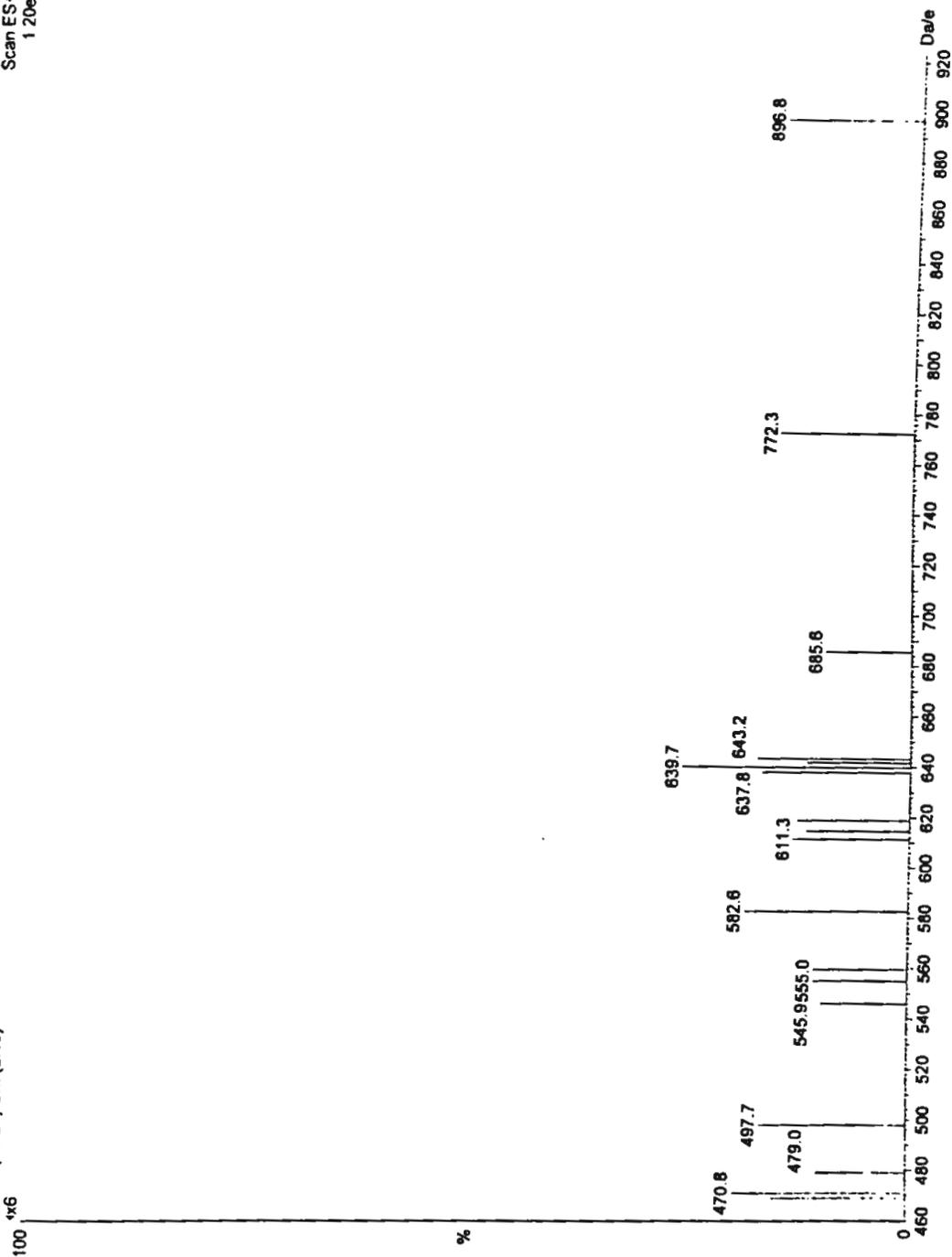


Figura 75. Espectro de massas (eletrospray) de 49.

100106 VP-IV-20

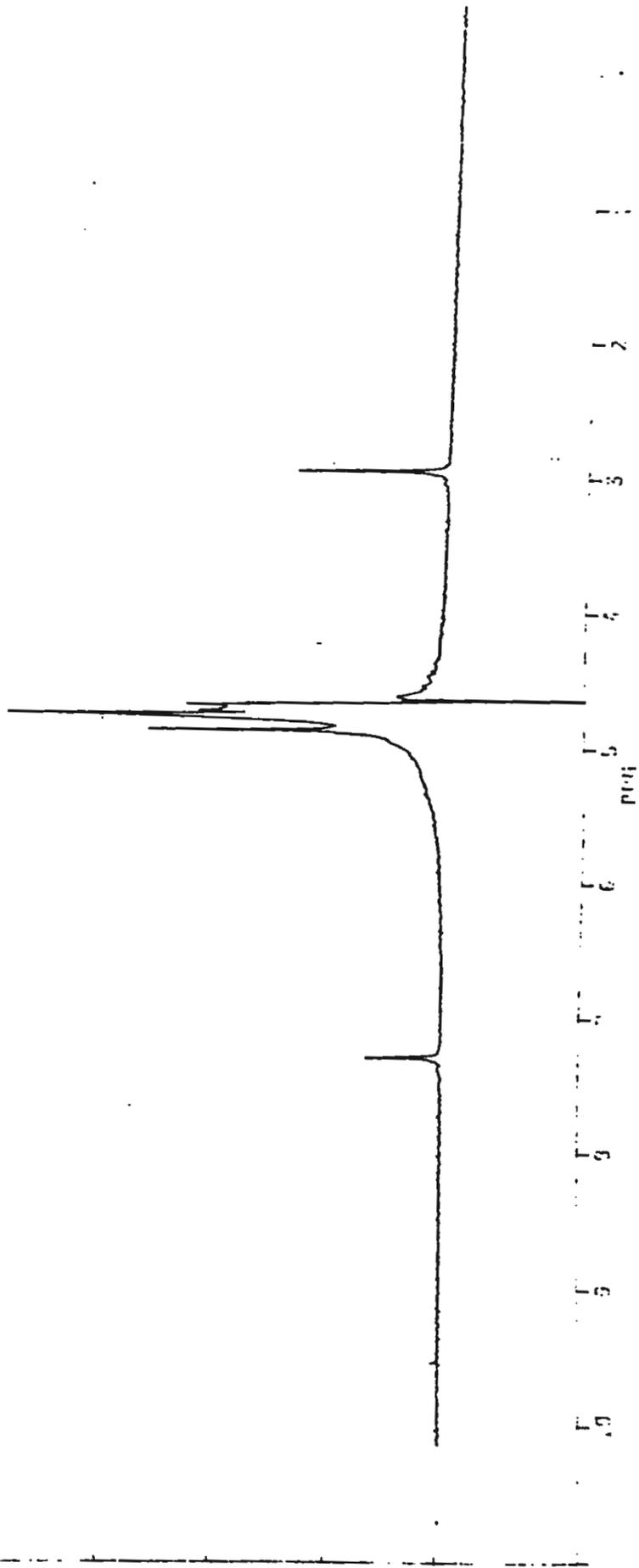


Figura 76. Espectro de RMN ^1H da fração VP-IV-20 (200 MHz, D_2O)

Luciana VP-I-13

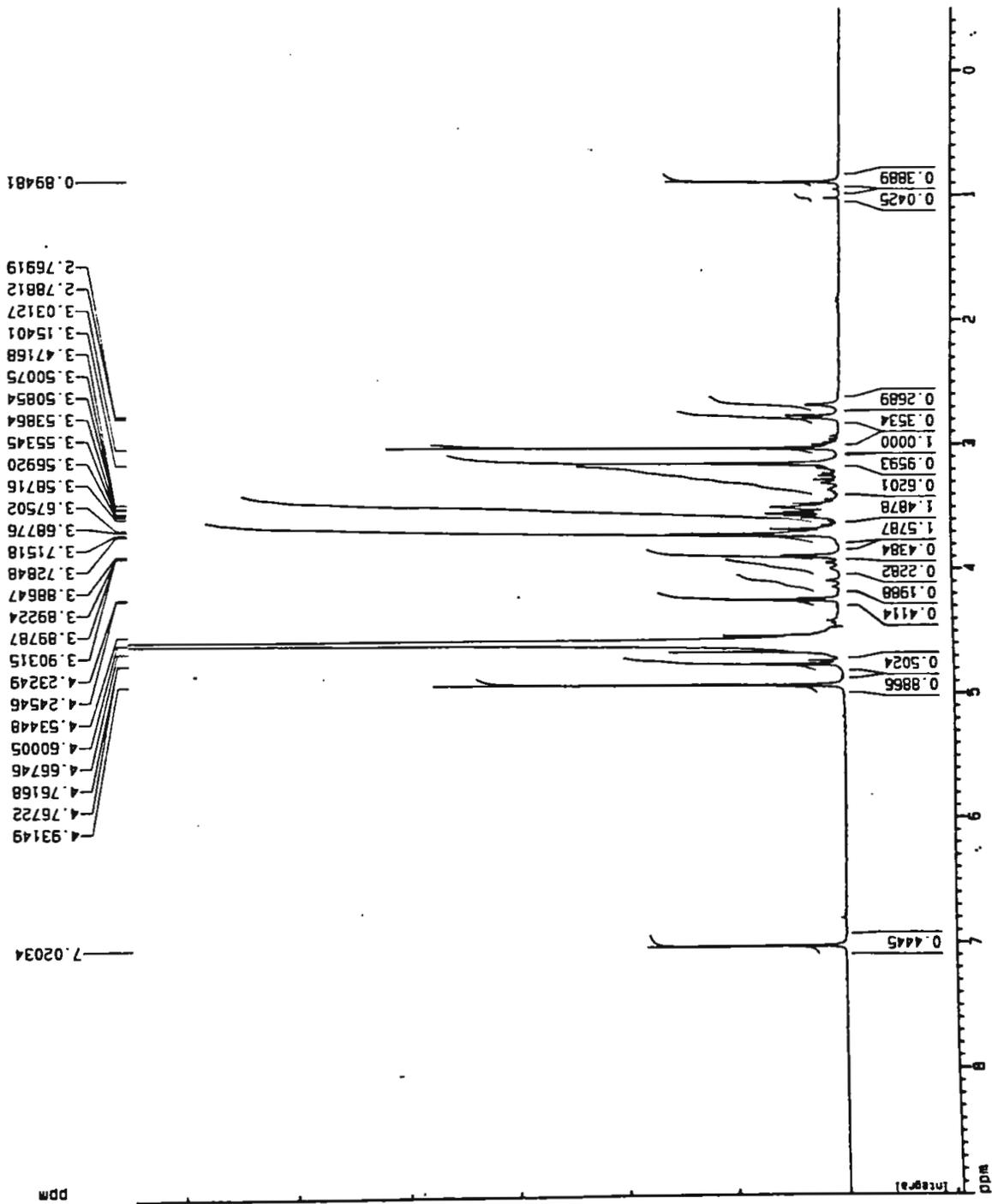


Figura 77. Espectro de RMN ¹H da fração VP-I-13 (300 MHz, D₂O)

Luciana VP-I-13 c/ metanol (tempo de aquisicao 14h 50min)

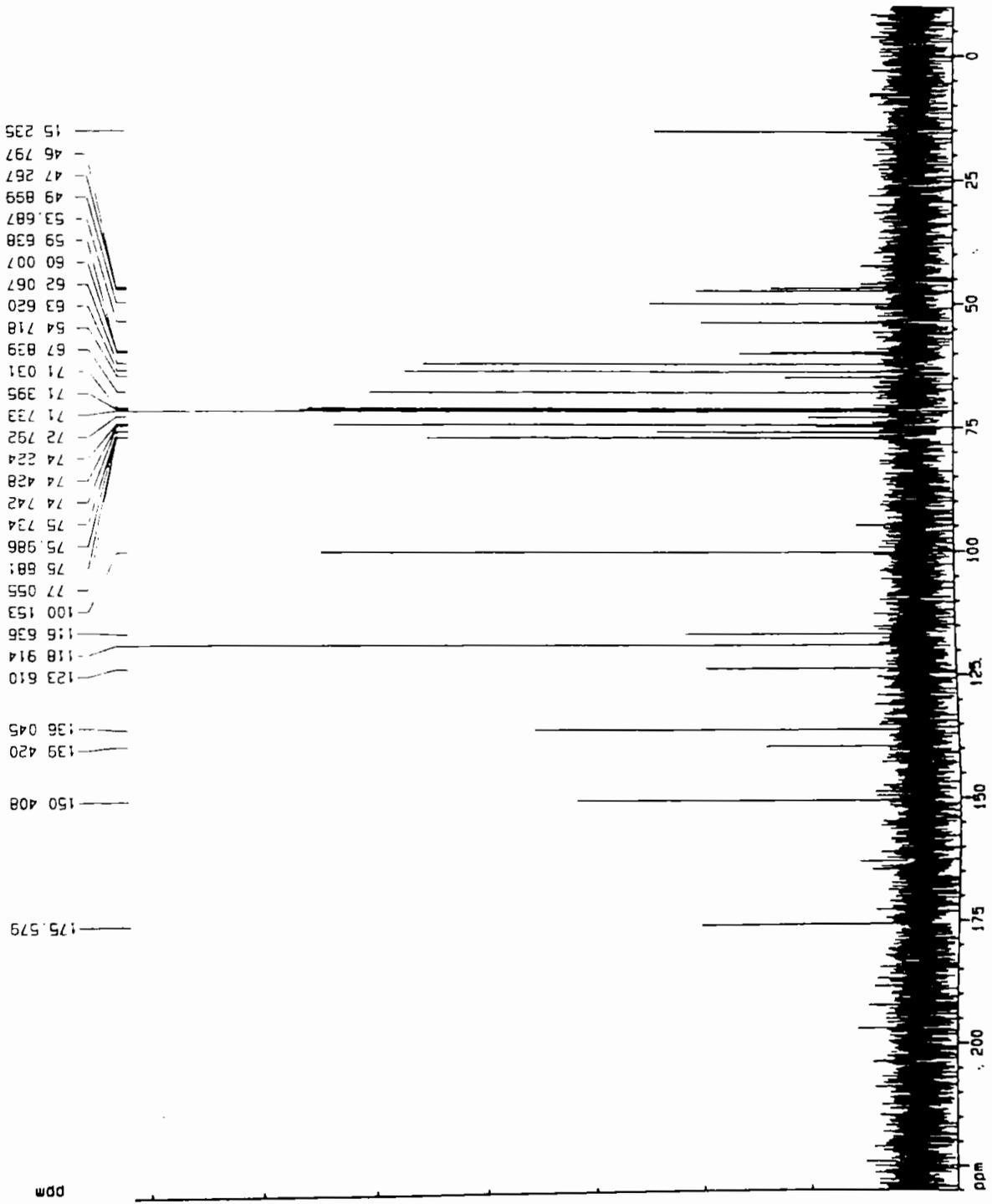


Figura 78. Espectro de RMN ^{13}C (PND) da fração VP-I-13 (75 MHz, D_2O)

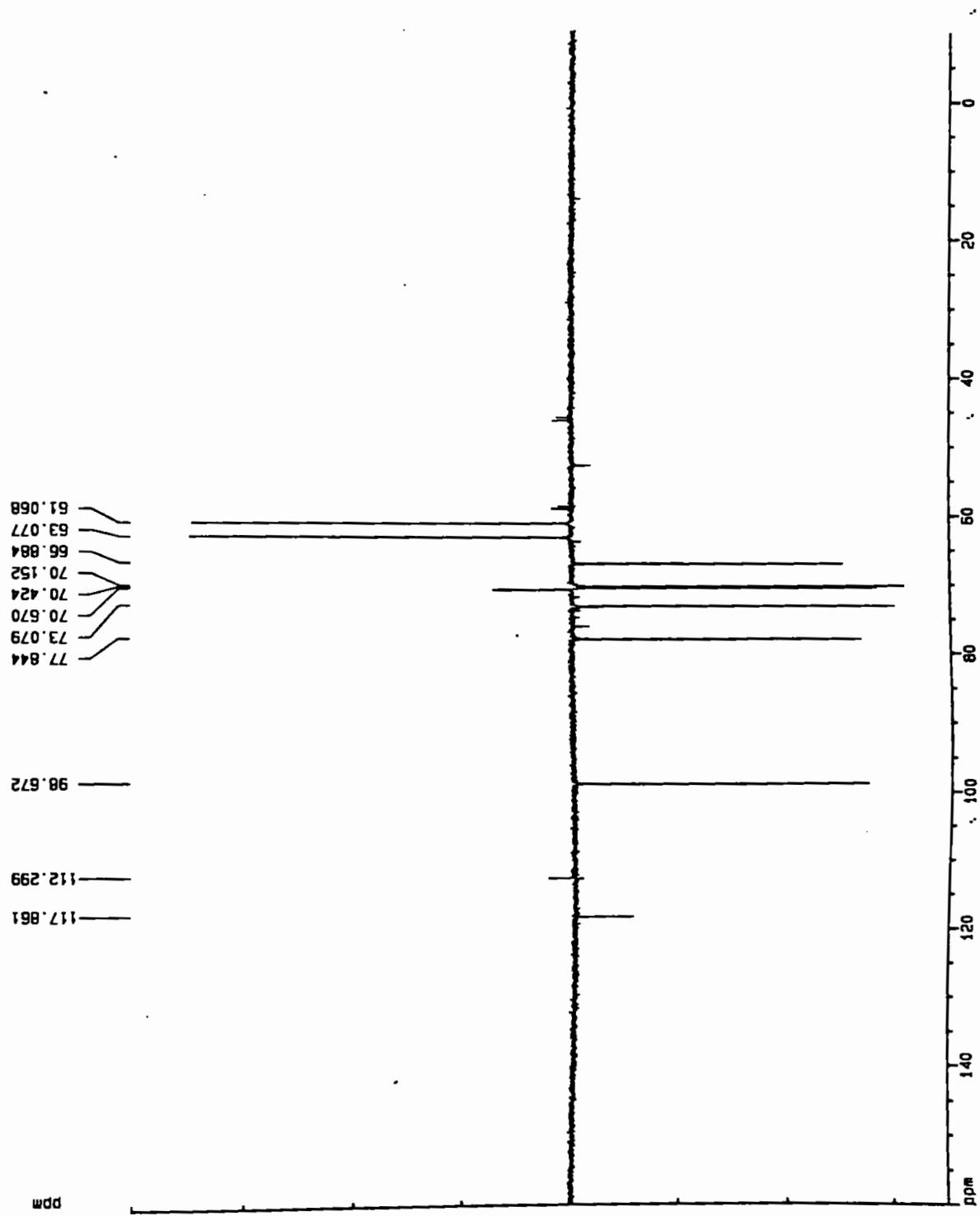


Figura 79. Espectro de RMN ¹³C (DEPT 135°) da fração VP-I-13 (75 MHz, D₂O).