

**ANA MARGARIDA LEMOS BETTENCOURT**

**ACTIVIDADES BIOLÓGICAS E METABOLITOS SECUNDÁRIOS  
DE ESPÉCIES MARINHAS EXÓTICAS DOS AÇORES**

---

Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas



UNIVERSIDADE DOS AÇORES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PONTA DELGADA, 2014

**ANA MARGARIDA LEMOS BETTENCOURT**

**ACTIVIDADES BIOLÓGICAS E METABOLITOS SECUNDÁRIOS  
DE ESPÉCIES MARINHAS EXÓTICAS DOS AÇORES**

---

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

Orientadores científicos | Doutora Maria do Carmo Barreto  
Doutora Ana Maria Loureiro Seca



UNIVERSIDADE DOS AÇORES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PONTA DELGADA, 2014





*A verdadeira sabedoria está em saber que nada sei.*

*Sócrates*



## *Agradecimentos*

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e o contributo, de forma directa ou indirecta, de várias pessoas, às quais gostaria de exprimir algumas palavras sinceras de agradecimento e profundo reconhecimento, em particular:

Um agradecimento especial às minhas orientadoras, Doutora Maria do Carmo Barreto e Doutora Ana Maria Loureiro Seca, por me terem acolhido na realização desta tese, por todos os conhecimentos transmitidos, todo o apoio, paciência, compreensão, motivação e disponibilidade, inclusivamente nas questões pessoais.

À Doutora Ana Cristina Costa, à Doutora Joana Micael e à Doutora Manuela Parente pela recolha e identificação das espécies e pela disponibilidade demonstrada no esclarecimento de questões relacionadas com a taxonomia e a ecologia das espécies estudadas.

A todos os meus colegas do Departamento de Ciências Tecnológicas e Desenvolvimento pela ajuda disponibilizada, em particular à senhora Helena Figueiredo por todo o auxílio técnico prestado e sua amizade.

À Dr.<sup>a</sup> Marina Pi, amiga e colega de laboratório cuja companhia tornou o trabalho menos monótono e agradável.

Ao João Fontes que passou e viveu comigo os altos e baixos ao longo deste ano, por estar sempre lá para mim. Têm sido 7 anos a ultrapassar etapas lado a lado, e que muitos se sigam.

Aos meus pais por me terem criado e aos meus irmãos e irmã, José, Mariana e Mário Bettencourt, por se lembrarem sempre de mim.

À minha amiga Sara Machado, minha companheira neste percurso, por todo o auxílio prestado e pela discussão de ideias. Espero tê-la ajudado tanto a ela, como ela a mim.

Ao Fundo Regional para a Ciência e Tecnologia pelo financiamento do Projeto ASMAS, M2.1.2/F/032/2011.

# ÍNDICE

Resumo .....	viii
Abstract.....	ix
Lista de abreviaturas e símbolos.....	x
Objectivos.....	12
I – Revisão bibliográfica.....	14
1. Espécies invasoras/exóticas alvo.....	15
1.1. Macroalgas.....	15
1.1.1. <i>Asparagopsis taxiformis</i> (Delile) Trévisan de Saint-Léon, 1845 e <i>Asparagopsis armata</i> Harvey, 1855.....	16
1.1.2. <i>Codium fragile</i> subsp. <i>fragile</i> (Suringar) Hariot, 1889 .....	21
1.2. Macro-invertebrados aquáticos.....	22
1.2.1. Briozoários .....	23
1.2.1.1. <i>Bugula neritina</i> Linnaeus, 1758.....	23
1.2.1.2. <i>Tricellaria inopinata</i> d’Hondt e Occhipinti-Ambrogi, 1985 .....	25
1.2.1.3. <i>Zoobotryon verticillatum</i> Delle Chiaje, 1822 .....	26
1.1.2. Tunicados (Ascídias).....	28
1.1.2.1. <i>Microcosmus squamiger</i> Michaelsen, 1927.....	28
2. Actividades biológicas .....	29
2.1. Actividade antitumoral .....	29
2.2. Actividade anticolinesterásica .....	32
2.3. Actividade antioxidante .....	34
II – Resultados e discussão.....	35
1. Actividades biológicas .....	35
1.1. Actividade Antitumoral .....	35
1.2. Actividade Anticolinesterásica .....	39
1.3. Actividade Antioxidante .....	41
2. Caracterização estrutural dos compostos isolados dos extractos .....	41
2.1. Composto 1: saliramofenol.....	42
2.2. Composto 2.....	47
2.3. Composto 3 .....	49
Conclusão .....	51
Perspectivas de trabalho futuro.....	52

III – Parte experimental .....	53
1. Recolha e preparação das amostras .....	53
2. Preparação dos extractos .....	54
3. Fraccionamento dos extractos brutos .....	55
4. Dados espectroscópicos dos compostos isolados.....	58
5. Determinação das actividades biológicas <i>in vitro</i> .....	60
5.1. Actividade antitumoral .....	60
5.1.1. Linhagens celulares .....	60
5.1.2. Cultura de células .....	60
5.1.3. Ensaio antitumorais.....	61
5.1.4. Quantificação da viabilidade celular .....	61
5.1.5. Determinação da EC <sub>50</sub> .....	62
5.2. Actividade anticolinesterásica .....	62
5.3. Actividade antioxidante .....	63
Bibliografia.....	65

## RESUMO

Neste trabalho avaliou-se o potencial farmacológico dos extractos de algumas espécies invasoras/exóticas dos Açores, *Asparagopsis armata*, *Asparagopsis taxiformis*, *Codium fragile* subsp. *fragile*, *Microscosmus squamiger*, *Bugula neritina*, *Tricellaria inopinata* e *Zoobotryon verticillatum*, colhidos em marinas de Santa Maria (SMA) e São Miguel (SMI). Os extractos de diclorometano e metanol foram preparados sequencialmente a partir do material liofilizado. Determinou-se a actividade *in vitro* dos extractos contra as linhagens tumorais HeLa, A549 e MCF-7 em fase *lag* e *log*, usando a linhagem não-tumoral Vero como controlo. Nenhum dos extractos apresentou actividade contra A549, nem nenhuma das linhagens em fase *log*, à concentração máxima de 200 µg/mL. No entanto, em fase *lag*, o extracto de diclorometano de *Z. verticillatum* foi o que apresentou a melhor actividade contra as células MCF-7 ( $EC_{50} = 39,52 \pm 7,58$  µg/mL), e foi o único activo contra as células HeLa ( $EC_{50} = 94,84 \pm 12,31$  µg/mL). Este extracto também mostrou ser selectivo (IS 1,94 e 4,64 para HeLa e MCF-7, respectivamente). O extracto de metanol de *B. neritina* SMI foi o único extracto de metanol com actividade antitumoral ( $EC_{50} = 132,56 \pm 11,08$  µg/mL contra as células MCF-7). O extracto que apresentou melhor actividade anticolinesterásica *in vitro* foi o de metanol de *M. squamiger* (SMA), com um  $IC_{50} = 66,0 \pm 5,04$  µg/mL, mais activo que a galantamina ( $IC_{50} = 78,0 \pm 6,06$  µg/mL), o fármaco mais utilizado actualmente no tratamento da doença de Alzheimer. Nenhum dos extractos testados mostrou actividade antioxidante *in vitro* à concentração de 250 µg/mL. Isto pode dever-se ao longo método de extracção, o que terá promovido a oxidação da maioria dos compostos antioxidantes. No estudo fitoquímico dos extractos foram isolados três compostos, um composto alcalóide da família das piridonas (composto 3), e mais dois com anéis aromáticos com padrão de substituição idênticos ao do 4-*terc*-butilfenol (contaminante) e do BHT (antioxidante), composto 1 e composto 2, respectivamente. O tipo de estrutura e a presença destes últimos dois compostos em extractos de espécies variadas sugerem a existência de vias de síntese destes compostos a partir de substâncias de origem antropogénica. Mais estudos são necessários para elucidar a origem e o mecanismo de biossíntese destes compostos.

**Palavras-chave:** anticolinesterásica, antitumoral, antioxidante, extractos, metabolitos secundários, espécies marinhas invasoras/exóticas.

## ABSTRACT

In this work the potential of several extracts of marine alien species from the Azores, *Asparagopsis armata*, *Asparagopsis taxiformis*, *Codium fragile* subsp. *fragile*, *Microcosmus squamiger*, *Bugula neritina*, *Tricellaria inopinata* and *Zoobotryon verticillatum*, collected in the marinas of Santa Maria (SMA) and S. Miguel (SMI), was evaluated as a source of pharmaceutical compounds. The dichloromethane and methanol extracts were prepared by sequentially extracting the lyophilized material. The *in vitro* activity of the extracts was determined against the tumor HeLa, A549 and MCF-7 cell lines in *lag* and *log* phases, the non-tumor Vero cell line was used as control. None of the extracts presented antitumor activity against A549 cell line or against any cells lines in *log* phase at 200  $\mu\text{g/mL}$ . However, in *lag* phase, the dichloromethane extract from *Z. verticillatum* presented the best activity against MCF-7 cells ( $\text{EC}_{50} = 39.52 \pm 7.58 \mu\text{g/mL}$ ), and was the only extract active against HeLa cells ( $\text{EC}_{50} = 94.84 \pm 12.31 \mu\text{g/mL}$ ). This extract also showed selectivity (SI 1.94 and 4.64 against HeLa and MCF-7 cells, respectively). The methanol extract of *B. neritina* SMI was the only methanol extract with antitumoral activity ( $\text{EC}_{50} = 132.56 \pm 11.08 \mu\text{g/mL}$  against MCF-7 cell line). The extract that presented the best *in vitro* anticholinesterasic activity was the methanol extract of *M. squamiger* (SMA), with an  $\text{IC}_{50} = 66.0 \pm 5.04 \mu\text{g/mL}$ , more active than galanthamine ( $\text{IC}_{50} = 78.0 \pm 6.06 \mu\text{g/mL}$ ), the drug most currently used in the therapeutics of Alzheimer's disease. None of the extracts presented *in vitro* antioxidant activity at 250  $\mu\text{g/mL}$ . This may have been due to the length of the extraction method, which may have promoted the oxidation of most of the antioxidant compounds. In the phytochemical study, three compounds were isolated, one alkaloid from the piridone family, and two compounds with aromatic rings with substitution patterns identical to 4-*terc*-butylphenol (contaminant) and BHT (antioxidant), compound 1 and compound 2, respectively. This type of structure and its presence in extracts from diverse species, suggests the presence of synthesis pathways to these compounds from anthropogenic substances in the environment. More studies are required to assess the origin and biosynthesis mechanisms of these compounds.

**Keywords:** anticholinesterasic, antitumoral, antioxidant, extracts, secondary metabolite, marine alien species.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ACh – Acetilcolina
- AChE – Acetilcolinesterase
- AChEI – Inibidor da acetilcolinesterase
- AcEt – Acetato de Etilo
- CC – Cromatografia preparativa em coluna
- COSY – Espectro bidimensional de correlação espectroscópica homonuclear
- $\delta$  – Desvio químico (em ppm)
- d* – Duplete
- dd* – Duplo duplete
- dt* – Duplo tripleto
- DA – Doença de Alzheimer
- DCM – Diclorometano
- DEPT – “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”
- DMEM - Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DPPH - Radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- DTNB – Ácido 5,5’-ditiobis-(2-nitrobenzóico) ou reagente de Ellman
- EC<sub>50</sub> – Concentração que provoca 50% de mortalidade celular
- FBS (*Fetal Bovine Serum*) – Soro fetal bovino
- H - Hexano
- HMBC – Correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância (bidimensional) em RMN
- IC<sub>50</sub> – Concentração necessária para inibir 50% da actividade
- IS – Índice de selectividade
- IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada
- J* – Constante de acoplamento (em Hz)
- MeOH – Metanol
- MTT – 3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium
- ppm – Partes por milhão
- RMN <sup>13</sup>C – Ressonância magnética nuclear de carbono 13
- RMN <sup>1</sup>H – Ressonância magnética nuclear de protão
- TLC – Cromatografia preparativa em camada fina

## OBJECTIVOS

A ocorrência de espécies exóticas marinhas no arquipélago dos Açores está a ser estudada no âmbito do Projeto ASMAS (Açores: Stop-over for Marine Alien Species? - M2.1.2/F/032/2011), financiado pelo Fundo Regional para a Ciência e Tecnologia do Governo Regional dos Açores e no qual se insere o presente trabalho de mestrado.

Apesar dos efeitos adversos das espécies invasoras para a biodiversidade e equilíbrio dos sistemas biológicos, estas espécies têm potencial como produtoras de agentes terapêuticos naturais e compostos de valor acrescentado para, por exemplo, as indústrias alimentar e cosmética. Pretende-se assim avaliar o potencial de algumas espécies marinhas exóticas e/ou invasoras, para permitir o desenvolvimento de possíveis aplicações destas e conseqüentemente diminuir o seu impacto negativo para a Região.

Actualmente sabe-se que: a) o cancro é uma das principais causas de morte nos países industrializados [1]; b) a utilização de inibidores da acetilcolinesterase permite obter melhorias cognitivas, aliviando os sintomas da doença de Alzheimer (DA), uma doença neurodegenerativa debilitante e incurável [2], [3]; c) nos últimos anos, há um crescente interesse nos produtos naturais para aplicações farmacológicas e biotecnológicas [4], [5]; d) existe ainda uma lacuna no conhecimento científico sobre o potencial das espécies exóticas do mar dos Açores como agentes anti-acetilcolinesterásicos, sendo também muito limitado o número de linhas celulares contra as quais foi avaliado o seu potencial antitumoral. Pelo exposto, verifica-se ser útil e oportuno avaliar o potencial farmacológico de algumas espécies invasoras/exóticas dos Açores, focando a investigação em três vertentes principais, relacionadas com a saúde humana: (i) actividade antitumoral, (ii) actividade anticolinesterásica e (iii) actividade antioxidante.

As espécies exóticas identificadas no mar dos Açores, cujo potencial farmacológico é avaliado neste trabalho são as macroalgas *Asparagopsis armata* Harvey, 1855, *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trévisan de Saint-Léon, 1845, e *Codium fragile* subsp. *fragile* (Suringar) Hariot, 1889, e os macro-invertebrados *Microscosmus squamiger*, Michaelsen, 1927, *Bugula neritina* L., 1758, *Tricellaria inopinata* d'Hondt e Occhipinti-Ambrogi, 1985 e *Zoobotryon verticillatum* Delle Chiaje, 1822. São espécies com potencial invasor que têm prosperado nas ilhas

Açorianas e são muito fáceis de obter em quantidade, o que facilita o estudo das mesmas.

Assim, os objectivos do estudo são: *i)* determinar as actividades antitumoral, anticolinesterásica e antioxidante dos extractos das espécies acima referidas com vista à avaliação do potencial das espécies exóticas do mar dos Açores como fonte de produtos com potencial farmacológico; *ii)* isolar e caracterizar estruturalmente os metabolitos secundários dos extractos mais activos; *iii)* propôr possíveis aplicações para estes recursos marinhos para os quais não há actualmente qualquer aplicação, contribuindo para a valorização de espécies existentes no mar dos Açores.

## **I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Com mais de 70% da superfície do planeta coberta por água, os oceanos são provavelmente o habitat mais promissor para explorar novos produtos químicos com propriedades biológicas. No entanto, é actualmente reconhecido que apenas uma pequena fracção destes têm sido estudada e identificada [4], [5].

O interesse nos organismos marinhos como uma potencial e promissora fonte de agentes farmacológicos tem aumentado nos últimos anos [4], [5]. Vários organismos marinhos produzem metabolitos bioactivos em resposta a pressões ecológicas, tais como a competição por espaço, a manutenção de superfícies limpas, a dissuasão da predação e a capacidade de reprodução com sucesso [6]. De entre os organismos marinhos, as espécies exóticas e/ou invasoras marinhas são um objecto de estudo a privilegiar. De facto, as espécies invasoras possuem mecanismos químicos de ataque/defesa muito eficazes tornando-as dominantes na ecologia química. Isto parece dever-se à presença de compostos que exibem potentes actividades biológicas e que são diferentes dos biossintetizados por outras espécies [7].

A introdução de espécies exóticas potencialmente invasoras tem vindo a aumentar com a globalização, e é reconhecida como uma das principais ameaças aos oceanos e a segunda maior causa de perda de biodiversidade, unicamente superada pelas perdas directas devido à destruição de habitats, apresentando impactos ambientais, económicos e sociais graves, quer ao nível regional, nacional e internacional [8], [9]. O potencial de invasão no arquipélago dos Açores é elevado, tendo em conta o aumento do tráfego marítimo e a localização do arquipélago [10].

Diversos factores antrópicos funcionam como vectores de entrada de espécies marinhas em áreas fora do seu alcance biogeográfico natural [11]. Entre estes, estão os cascos das embarcações, a água de lastro, lastro sólido, a náutica de recreio e as práticas de mergulho, pesca e comércio aquáticos que são actividades relevantes nos Açores [10].

## **1. Espécies invasoras/exóticas alvo**

Por uma ou mais das vias atrás referidas foram-se fixando, nas últimas décadas, nas zonas portuárias da Região Autónoma dos Açores diversas macroalgas e macro-invertebrados cujas características morfológicas e ambiente em que se desenvolvem, assim como os resultados de estudos biológicos e fitoquímicos mais relevantes são apresentados e discutidos nos pontos abaixo.

### **1.1. Macroalgas**

As algas podem ser definidas como plantas fotossintéticas, avasculares, que contêm clorofila *a* e possuem estruturas reprodutoras simples [12]. A designação deve-se ao seu tamanho, estrutura multicelular, e fixação a um substrato [13]. As macroalgas encontram-se organizadas em três divisões: Chlorophyta (algas verdes), Ocrophyta (algas castanhas) e Rhodophyta (algas vermelhas) [14]. As algas marinhas são ricas em fibras alimentares, minerais, lípidos, proteínas, ácidos gordos ómega-3, aminoácidos essenciais, polissacarídeos, e vitaminas A, B, C e E [15]–[19].

Tendências recentes na pesquisa de compostos de origem natural sugerem que as algas são uma promissora fonte de novas substâncias bioquímicas activas [4], [5], [20]. Possivelmente, para sobreviver num ambiente competitivo, as algas têm desenvolvido estratégias de defesa evoluindo para um nível significativo de biodiversidade química resultante de diferentes vias metabólicas [6], [7].

Muitas espécies de macroalgas são utilizadas como alimento e também utilizadas na medicina tradicional por causa dos seus benefícios para a saúde [21]. Também, pelas suas várias actividades biológicas, os compostos derivados de algas marinhas são ingredientes importantes em muitos produtos, tais como cosméticos e medicamentos para o tratamento de cancro e outras doenças. Os produtos naturais derivados de algas marinhas protegem as células, através da modulação dos efeitos do stress oxidativo. Porque o stress oxidativo desempenha um papel importante nas reacções inflamatória e na carcinogénese, estes produtos têm potencial para serem utilizados em medicamentos anticancerígenos e anti-inflamatórios [22].

### 1.1.1. *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trévisan de Saint-Léon, 1845 e *Asparagopsis armata* Harvey, 1855

O género *Asparagopsis* engloba duas espécies potencialmente invasoras nos Açores: *Asparagopsis taxiformis* originária de águas quentes-temperadas a tropicais e *Asparagopsis armata*, geralmente encontrada em águas frias a quentes-temperadas [23]. Este género é caracterizado por um ciclo de vida haplodiplonte dimórfico: os gametófitos haplóides correspondem à fase de '*Asparagopsis*' e os tetraesporófitos diplóides correspondem à fase '*Falkenbergia*'. A fase diplóide e a fase haplóide são morfológicamente tão diferentes que chegaram a ser identificadas como duas espécies distintas e a possuir nomes científicos distintos [24].

**Tabela 1.** Classificação taxonómica do género *Asparagopsis*. [25]

Classificação	
<b>Filo</b>	Rhodophyta
<b>Subfilo</b>	Eurhodophytina
<b>Classe</b>	Florideophyceae
<b>Subclasse</b>	Rhodymeniophycidae
<b>Ordem</b>	Bonnemaisoniales
<b>Família</b>	Bonnemaisoniaceae
<b>Género</b>	<i>Asparagopsis</i>

*A. taxiformis* (Tabela 1, Figura 1) é uma alga vermelha edível no Havai, onde é conhecida como *limu kohu*, que em havaiano significa “alga suprema”, e é altamente estimada pelo seu aroma e sabor [26].



**Figura 1.** *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trévisan de Saint-Léon [27].

Encontram-se descritos numerosos produtos naturais isolados a partir do género *Asparagopsis*, incluindo compostos derivados dos ácidos acético e acrílico, como por exemplo derivados halogenados, ésteres e cetonas, compostos apolares e ainda compostos voláteis [28]–[31].

A espécie *A. taxiformis* tem sido descrita como tendo propriedades antibacteriana e antiprotozoária. No entanto, a actividade antibiótica destas espécies de algas pode variar, dependendo de muitos factores ecológicos e biogeográficos [32], [33].

O extracto de etanol de *A. taxiformis*, a uma concentração de 50 mg/mL foi testado contra os fungos *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus* e *A. flavus*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae*, e *Saccharomyces cerevisiae*. Foi observada actividade contra todas as espécies testadas com valores de concentração mínima inibitória a variar entre 0,15 - 5 mg/mL [34].

Os extractos de etanol de amostras recolhidas em diferentes meses foram testados *in vitro* a uma concentração de 100 mg/mL, pelo método de difusão em agar com discos, contra as seguintes estirpes de bactérias patogénicas em peixe e marisco: *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Salmonella* sp. [35]. Só o extracto de Maio exibiu actividade contra todas as estirpes, o de Março teve alguma actividade (mas muito menor) e os restantes extractos não exibiram actividade. Os autores também testaram os efeitos citotóxicos destes extractos algais às concentrações de 2 mg/mL e 4 mg/mL nas glândulas digestivas *Mytilus galloprovincialis*, e não observaram actividade [35]. Os resultados deste trabalho devem ser considerados pouco relevantes pois a concentração testada é muito elevada.

O extracto de metanol da alga *A. taxiformis* exibiu actividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*

*aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Mycobacterium smegmatis* e antifúngica contra dois fungos *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, e contra o fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* [36]. Este trabalho foi realizado pelo método do disco de agar não quantitativo e os autores não apresentam a concentração de extracto (massa de extracto/volume) testada dificultando a comparação com outros resultados publicados.

Para a espécie *A. taxiformis* existem estudos que mostram que o extracto de metanol foi testado *in vitro* contra as larvas do nemátode *Meloidogyne javanica* tendo provocado uma mortalidade de 50% ao fim de 72 h à concentração de 1 mg/mL [37].

Jha *et al.* [38] indica num *screening* de 30 macroalgas, que o extracto de metanol de *A. taxiformis* exhibe a maior actividade *anti-quorum sensing* contra as bactérias *Chromobacterium violaceum* e *Serratia liquefaciens*.

Num ensaio anti-incrustação, uma fracção do extracto de metanol da alga *A. taxiformis* revelou-se bastante activa [39]. O ensaio foi efectuado com o molusco *Limnea truncatula*, e a fracção algal activa produziu 80% de repelência a 150 mg/L, enquanto que no ensaio anticianobactéria esta fracção inibiu 100% do crescimento de *Trichodesmium* sp., a 320 mg/L. A mesma fracção algal mostrou efeito piscicida contra *Oreochromis mossambicus* a 60 mg/L. Confirmou-se que a fracção activa provoca nenhuma a moderada toxicidade contra crustáceos não-alvo e de valor comercial, tais como *Penaeus monodon* e *Macrobrachium rosenbergii* [39].

O extracto aquoso da mesma espécie foi testado *in vivo* contra o ectoparasita *Neobenedenia* sp em diferentes estados larvares. Apesar do extracto não ter efeito no estado adulto, nem na larva, foi muito eficaz a inibir o desenvolvimento embrionário reduzindo a probabilidade de eclosão dos ovos de 99% para apenas 3% em água do mar; e dos 3% que eclodiram, o tempo de eclosão foi retardado (14 a 18 dias) comparado com o controlo (5 a 7 dias) [40].

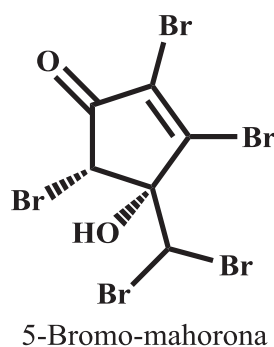
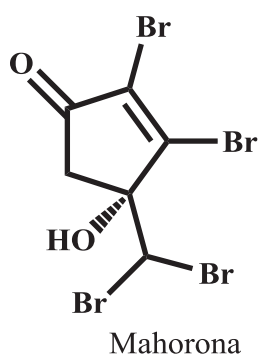
Os extractos de hexano, diclorometano e etanol de *A. taxiformis* foram testados *in vitro* contra promastigotas de *Leishmania donovani* para determinar a actividade anti-protozoária. Os extractos de hexano e diclorometano mostraram uma forte inibição com IC<sub>50</sub> de 17,00 µg/mL e 16,00 µg/mL, respectivamente. Duas fracções do extrato de etanol (eluídas com hexano:acetato de etilo e acetato de etilo) revelaram-se também activas com um IC<sub>50</sub> de 14,00 µg/mL e 20,00 µg/mL, respectivamente [41].

A fracção em acetato de etilo de *A. taxiformis* revelou uma elevada actividade antioxidante, 98,40%, e actividade citotóxica contra as células MDBK, para uma concentração testada de 400 µg/mL [42].

No que diz respeito a estudos fitoquímicos, a fracção lipídica desta alga foi estudada, tendo-se concluído que o estigmasterol e o docosano são os compostos mais abundantes, o ácido linolénico é o ácido gordo mais abundante, enquanto o heptadecano é o composto maioritário da fracção volátil, sendo também rica em sais minerais como o sódio e o potássio [42].

Um polissacarídeo sulfatado purificado a partir da *A. taxiformis* mostrou ter uma actividade anticoagulante exibindo um factor de coagulação relativo de 28,57 obtido a 48 µg/mL e que é comparável com a heparina a 60 µg/mL [43].

Um estudo mais recente sobre esta alga conseguiu isolar dois novos compostos: a mahorona e a 5-bromomahorona. A actividade ecotoxicológica destes compostos foi avaliada contra a bactéria marinha *Vibrio fischeri* ( $EC_{50}$  0,16 µM para os dois compostos). Estes compostos também foram testados em ensaios antibacterianos e antifúngicos, e tiveram uma actividade moderada contra a bactéria patogénica humana *Acinetobacter baumannii*. Quando testados contra as linhagens tumorais A549, HepG2, HT29, MCF7 e MiaPaca2 e linhagem não-tumoral Fa2N4 a 5 µM, nenhum dos compostos revelou citotoxicidade contra as linhagens tumorais sendo apenas o composto mahorona activo contra a linhagem Fa2N4 [44].



Os gametófitos de *A. armata* (Tabela 1, Figura 2) são distintos dos exibidos pela *A. taxiformis*, na medida em que os ramos desta última não possuem os espinhos que são característicos da *A. armata* [45].



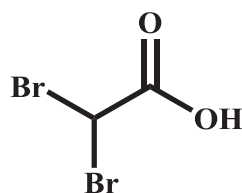
**Figura 2.** *Asparagopsis armata* Harvey. Foto tirada por Fiona Crouch [46].

Da espécie *A. armata* sabe-se que o extracto metanólico a 1 mg/mL (ensaio a 24 horas) exhibe actividade citotóxica contra a linha celular HEPG-2, reduzindo a proliferação celular em 36% [47].

A alga moída e o extracto metanólico da *A. armata* foram testados contra *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e a fungo *Candida albicans*. Ambos exibiram um amplo espectro de actividade contra todas as bactérias, sendo que a alga moída, aplicada directamente em poços no agar da placa de Petri contendo as culturas, foi mais activo do que o extracto de metanol [48].

Num *screening* de 26 extratos de diclorometano de algas, testados contra as estirpes patogénicas em peixes *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, *A. hydrophila* ssp., *hydrophila*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri*, o extracto de *A. armata*, foi o que exibiu maior halo de inibição [49].

Os extractos de metanol e diclorometano desta alga mostraram actividade antibacteriana contra as estirpes *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis* e *Escherichia coli* [50]. O bromofórmio (CHBr<sub>3</sub>) e o ácido di-bromoacético foram os compostos mais abundantes no extracto de metanol, tendo também revelado actividade (a 5 µmol) contra as mesmas bactérias, sendo o ácido di-bromoacético o que apresenta maior área de inibição contra todas as estirpes bacterianas [50].



Ácido di-bromoacético

Os polissacarídeos sulfatados solúveis em água extraídos de *A. armata* exibem actividade antiviral com um IC<sub>50</sub> de 10 µg/mL contra HSV-1, sem afectar a viabilidade das células hospedeiras MT4. [51].

### 1.1.2. *Codium fragile* subsp. *fragile* (Suringar) Hariot, 1889

*Codium fragile* subsp. *fragile* é uma alga verde (Tabela 2, Figura 3), conhecida anteriormente como *Codium fragile* subsp. *tomentosoides*. Consiste na ramificação repetida de segmentos cilíndricos com uma superfície macia. É uma alga invasora e que se encontra amplamente distribuída a nível mundial [9].

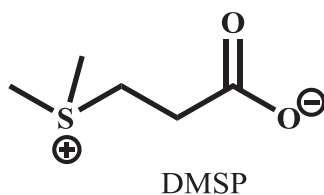
**Tabela 2.** Classificação taxonómica do género *Codium*.

Classificação	
<b>Filo</b>	Chlorophyta
<b>Classe</b>	Ulvophyceae
<b>Ordem</b>	Bryopsidales
<b>Família</b>	Codiaceae
<b>Género</b>	<i>Codium</i>



**Figura 3.** *Codium fragile* subsp. *fragile* (Suringar) Hariot [52].

*C. fragile* subsp. *fragile* mostrou conter concentrações relativamente elevadas de dimetilsulfoniopropionato (DMSP) e produtos da sua clivagem, sendo que estes actuam como uma defesa química contra o ouriço-do-mar *Strongylocentrotus droebachiensis* [53]. Um dos predadores do *C. fragile* subsp. *fragile*, *Littorina littorea* também evita esta alga assim que ela ultrapassa os 3 cm [54].



Foi também efectuado um estudo em que foram avaliadas as actividades antiprotozoária, antibacteriana de *C. fragile* subsp. *fragile*. O extracto *iso*-propílico desta alga exibiu um IC<sub>50</sub> de 8,9 µg/mL contra o protozoário *Trypanosoma brucei rhodesiense*, e um IC<sub>50</sub> de 16,6 µg/mL contra *Leishmania donovani* e não teve actividade contra *Trypanosoma cruzi*. Verificou-se ainda que não exibiu actividade antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* (concentração máxima testada de 256 µg/mL) mas também não exibiu toxicidade contra as células L6 (a concentração máxima testada foi de 90 µg/mL) [55].

É de referir ainda que em vários estudos publicados sobre actividades antiviral [56], antiherpética [57], antibacteriana [58], antitumoral [58]–[60] e o efeito imunomodulador [61], não foi especificada qual a sub-espécie de *Codium fragile* utilizada, pelo que não é possível saber se se tratou da mesma sub-espécie que é objecto de estudo desta tese. As actividades exibidas pela espécie *C. fragile* podem ser vistas como um indicador do potencial medicinal das sub-espécies desta alga.

## 1.2. Macro-invertebrados aquáticos

Os animais que não possuem espinha dorsal são conhecidos como invertebrados. Mais de 98 % das espécies na Terra são invertebrados que dependem de outras estratégias que não a espinha dorsal, tais como o recurso à pressão hidrostática, um exosqueleto externo, conchas e, em alguns casos, até mesmo espículas de vidro. Os invertebrados marinhos são organismos que vivem numa zona bêntica pelo menos durante uma parte do seu ciclo de vida. Os invertebrados marinhos mais comuns são esponjas, cnidários, anelídeos, lofoforados, moluscos, artrópodes, equinodermes e os hemicordados [62].

### 1.2.1. Briozoários

Os briozoários representam um filo de animais coloniais sésseis e bentónicos, que se alimentam por filtração de partículas em suspensão. Podem ser encontrados abundantemente em águas frias e recifes tropicais, sedimentos silicoclásticos, regiões polares e até nas profundezas do mar. É o filo com o maior grupo de animais exclusivamente clonais. As colónias são formadas pela repetição de zoóides, enxertos geneticamente (mas nem sempre morfológicamente) idênticos, fisicamente ligados e intercomunicadores [63].

Os briozoários marinhos podem ser uma fonte rica de compostos farmacologicamente promissores como alcalóides [64] e lactonas macrocíclicas (briostatinas) [65].

#### 1.2.1.1. *Bugula neritina* Linnaeus, 1758

O briozoário *Bugula neritina* (Tabela 3, Figura 4) pode ser descrito como uma colónia erecta e ramificada que cresce verticalmente a partir de uma ancestrula (primeiro zoóide). A colónia pode estar fixa através de rizóides que surgem nas superfícies autozoidais. As paredes basais e laterais são ligeiramente calcificadas, e a membrana ocupa a maioria da superfície frontal. Costumam apresentar espinhos [66].

**Tabela 3.** Classificação taxonómica do género *Bugula*.

Classificação	
Reino	Animalia
Filo	Bryozoa
Classe	Gymnolaemata
Ordem	Cheilostomatida
Família	Bugulidae
Género	<i>Bugula</i>



**Figura 4.** *Bugula neritina* Linnaeus [67].

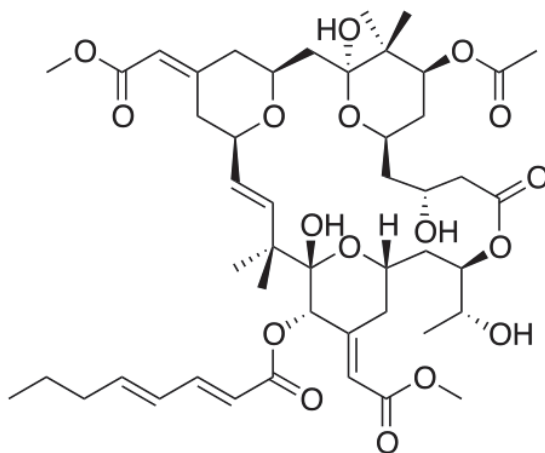
Actividades humanas como a navegação e maricultura são influenciadas negativamente pela presença de *B. neritina*. Porém, pelo facto de possuir um grupo de substâncias particularmente activas, as lactonas macrocíclicas briostatinas, encontradas

em algumas das espécies de *Bugula*, incluindo a *B. neritina*, são actualmente muito estudadas à procura de novos derivados [65]. Na realidade as briostatinas são biossintetizadas pela  $\gamma$ -proteobactéria endossimbiótica “*Candidatus Endobugula sertula*” [68]–[72].

A classe das briostatinas, cerca de 20 compostos descobertos até ao momento, tem sido reconhecida como candidata para ser utilizada em quimioterapia para o tratamento do cancro, devido à sua actividade antineoplásica combinada com a sua baixa toxicidade [73]. A briostatina-1 foi a primeira a ser isolada de *B. neritina* [73], e é uma das briostatinas que já se encontra na fase II de avaliação para aplicação no tratamento da doença de Alzheimer [74].

A briostatina-1 demonstrou uma elevada actividade anticancerígena, devido em parte, à sua capacidade de interagir com isozimas da proteína quinase C (PKC). Inicialmente ensaios clínicos indicavam que este composto pudesse ser eficaz em combinação com outras terapias. No entanto, nenhuma combinação eficaz foi encontrada, devido predominantemente aos severos efeitos secundários revelados [75].

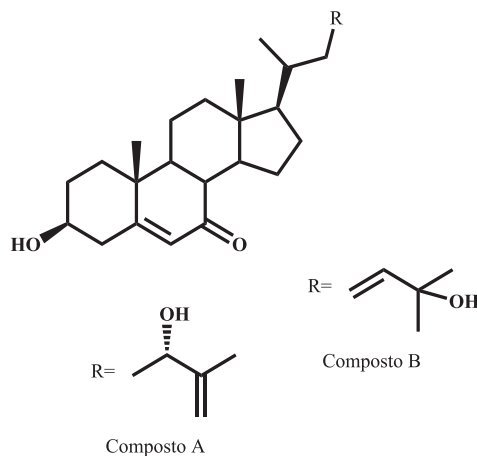
As briostatinas têm sido alvo de estudos químicos com o objectivo de sintetizar derivados que possuam idêntica ou maior actividade, particularmente em relação à ligação às isozimas da proteína quinase C [76].



Briostatina-1

Dois esteróis oxigenados foram isolados a partir do extracto de etanol de *B. neritina*, 3 $\beta$ ,24(*S*)-di-hidróxi-colesta-5,25-dieno-7-ona (A) e 3 $\beta$ ,25-di-hidróxi-colesta-5,23-dieno-7-ona (B). Ambos os compostos exibiram actividade citotóxica contra as

linhagens celulares tumorais, HepG2, HT-29 e NCIH460, com valores de IC<sub>50</sub> 25,48, 53,41 e 34,72 µg/mL para o composto A, e 22,58, 31,32 e 29,58 µg/mL, para o composto B [77].



### 1.2.1.2. *Tricellaria inopinata* d’Hondt e Occhipinti-Ambrogi, 1985

A *Tricellaria inopinata* (Tabela 4, Figura 5) é um briozoário oportunista e robusto, capaz de suportar uma ampla gama de temperaturas e salinidades e de se estabelecer tanto em substratos naturais como antropogénicos [78]. Encontra-se na “Lista das 100 piores espécies invasoras da Europa” do projecto europeu **DAISIE** - Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe [79].

**Tabela 4.** Classificação taxonómica do género *Tricellaria* [80].

Classificação	
<b>Reino</b>	Animalia
<b>Filo</b>	Bryozoa
<b>Classe</b>	Gymnolaemata
<b>Ordem</b>	Cheilostomata
<b>Família</b>	Scrupocellariidae
<b>Género</b>	<i>Tricellaria</i>



**Figura 5.** *Tricellaria inopinata* d’Hondt e Occhipinti-Ambrogi [81].

Existem vários trabalhos sobre a morfologia e a distribuição desta espécie [82]–[89], mas ainda não existem nenhuns estudos feitos para avaliar a existência de actividades biológicas.

### 1.2.1.3. *Zoobotryon verticillatum* Delle Chiaje, 1822

*Zoobotryon verticillatum* (Tabela 5, Figura 6) é um briozóario estolonífero incrustante que cresce sobre a forma de colónias translúcidas irregularmente ramificadas que podem atingir comprimentos superiores a um metro [90]. Esta espécie pode ser encontrada em águas temperadas e quentes por todo o mundo e apresenta um crescimento óptimo em temperaturas superiores a 22 °C [91], [92]. *Z. verticillatum* é normalmente encontrado em cascos de barcos, o que pode explicar a sua corrente distribuição e o seu estatuto como espécie exótica invasora [90], [91], [93].

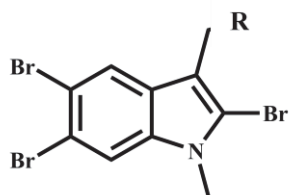
**Tabela 5.** Classificação taxonómica do género *Zoobotryon* [94].

Classificação	
<b>Reino</b>	Animalia
<b>Filo</b>	Bryozoa
<b>Classe</b>	Gymnolaemata
<b>Ordem</b>	Ctenostomatida
<b>Família</b>	Vesiculariidae
<b>Género</b>	<i>Zoobotryon</i>



**Figura 6.** *Zoobotryon verticillatum* Delle Chiaje [95].

Sobre os compostos bioactivos de *Z. verticillatum* sabe-se que produz alcalóides bromados como metabolitos secundários, a 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina (A) e a cadeia *N*-óxido (B) [96] e o 2,5,6-tribromo-*N*-metilindol-3-carbaldeído (C) [97], este último inibe a divisão dos ovos fertilizados do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus*. Isto pode ser indicação de um possível efeito anti-mitótico, o que pode indicar a presença de actividade antitumoral.



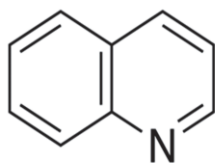
2,5,6-tribromo-1-metilgramina

- (A) R = CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>  
 (B) R = CH<sub>2</sub> N(O)Me<sub>2</sub>  
 (C) R = CHO

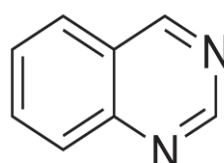
Estes metabolitos secundários parecem prevenir a predação da sua espécie e limitam a fixação de outros organismos, e são conhecidas apenas algumas espécies de nudibrânqueos, nomeadamente *Okenia zoobotryon*, que se alimentam directamente de *Z. verticillatum* [98]. Amat & Tempera [95] sugerem que a falta de controlo predatório nos locais onde esta espécie é introduzida contribui para o seu potencial como invasora.

A 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina também foi isolada de outra espécie do mesmo género, *Zoobotryon pellucidum* (extracto de acetona) [99], e demonstrou uma elevada actividade anti-incrustante, com uma concentração mínima inibitória cerca de seis vezes menor que o óxido de tributilestanho ou TBTO (forma oxidada do tributilestanho, composto incorporado em tintas anti-incrustantes, mas com impacto negativo no ambiente marinho [100]), mas dez vezes menos tóxica contra as larvas de *Balanus amphitrite*. Também se verificou que a 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina inibe a fixação de *Mytilus edulis*, outro organismo incrustante [99], é possível que esta actividade se dê através da inibição de neurónios serotoninérgicos [101].

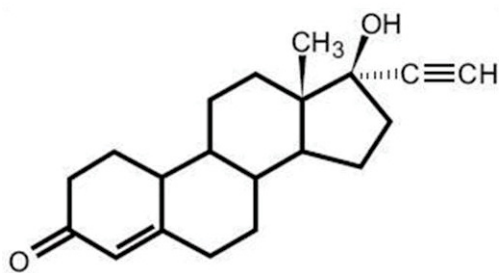
Num *screening* de compostos biologicamente activos verificou-se que *Z. verticillatum* é também rico em outros alcalóides, tipo a quinolina, purina e a quinazolina, e esteróides, como a noretindrona e a prednisona. Estes compostos foram identificados por HPLC a partir da fracção rica em alcalóides [102].



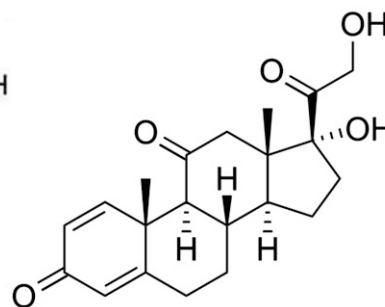
Quinolina



Quinazolina



Noretindrona



Prednisona

O extracto de éter dietílico de *Z. verticillatum* foi avaliado *in vivo* em relação á sua actividade anti-inflamatória, anti-úlceras, antipirética, analgésica e estimuladora do SNC (Sistema Nervoso Central) [103]. O extracto a 200 mg/kg teve actividade anti-inflamatória equivalente ao Diclofenac a 10 mg/kg, actividade analgésica inferior à Pentazocina, mas significativa em relação ao controlo negativo, actividade antipirética equivalente ao paracetamol a 45 mg/kg, foi mais activo de que a cafeína a 4 mg/kg na estimulação do SNC, e a actividade anti-úlceras gástrica dose- dependente, comparável com a ranitidina a 13,5 mg/kg [103].

### 1.1.2. Tunicados (Ascídias)

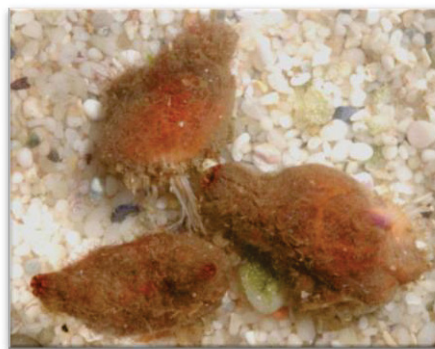
Os tunicados são uma fonte de compostos actividades biológicas [4], [5], [104]. Ascidiacea é uma classe do subfilo Tunicata (também conhecido como Urochordata), filo Chordata. Encontram-se descritas aproximadamente 3000 espécies em todos os habitats marinhos, desde águas rasas às profundezas do mar [105]. As ascídias fornecem um terreno fértil para estudos na área dos produtos naturais. Semelhante às esponjas e aos briozoários, muitas ascídias evitam a predação ou incrustação produzindo metabolitos secundários [106],[107].

#### 1.1.2.1. *Microcosmus squamiger* Michaelsen, 1927

As ascídias da espécie *Microcosmus squamiger* (Tabela 6, Figura 7) são invertebrados marinhos sésseis nativos da Austrália, que se propagam durante o seu curto estado larval planctónico. São ascídias solitárias que podem ser encontradas em habitats litorais rochosos rasos, particularmente em baías e portos [108].

**Tabela 6.** Classificação taxonómica do género *Microcosmus*.

Classificação	
Reino	Animalia
Filo	Chordata
Classe	Ascidiacea
Ordem	Stolidobranchia
Família	Pyuridae
Género	<i>Microcosmus</i>



**Figura 7.** *Microcosmus squamiger* Michaelsen [109].

Esta ascídia tem um grande potencial invasor [110], [111], nos locais onde é introduzida, dissemina-se em substratos rochosos, sejam eles naturais ou artificiais, podendo ser encontrada em elevadas densidades em habitats costeiros abertos, afectando a vida marinha nativa, bem como em grandes portos de transporte onde *M. squamiger* forma densos aglomerados que revestem o substrato disponível [110].

Ainda não foram publicados nenhuns estudos farmacológicos ou fitoquímicos sobre esta espécie.

## 2. Actividades biológicas

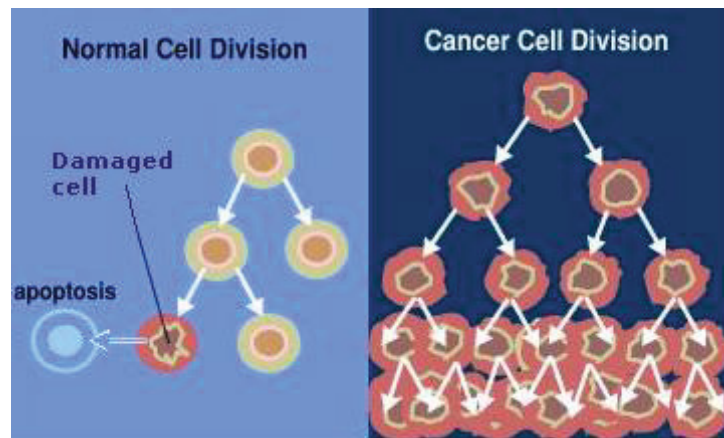
### 2.1. Actividade antitumoral

O cancro é um grupo de doenças caracterizadas por uma população de células que cresce e se multiplica sem respeitar os limites normais, invade e destrói tecidos adjacentes, e se espalha para outras partes distantes no corpo pelo processo de metastização. O cancro é diferente dos tumores benignos, que são auto-limitados no seu crescimento e não invadem os tecidos adjacentes, embora alguns tumores benignos sejam capazes de se tornar malignos [112]. O cancro pode afectar pessoas de todas as idades, mas o risco para a maioria dos tipos de cancro aumenta com o acréscimo da idade [113].

Normalmente, as células crescem e multiplicam-se de forma controlada de maneira a permitir a taxa de substituição necessária para manter o organismo saudável.

Assim, quando as células se tornam velhas ou danificadas, é desencadeada a apoptose, morrem e são substituídas por células novas. No entanto, quando os mecanismos que controlam o crescimento das células falham, o material genético das mesmas pode ficar alterado ou danificado, dando origem a mutações que afectam o crescimento e divisão celular normais. Estas células podem formar uma massa anormal de tecido, um tumor (Figura 8) [114].

Apesar da proliferação celular anormal causada pela desregulação do mecanismo de controlo celular não ser a única alteração observada nas células cancerígenas, é certamente uma das características fundamentais. As anomalias no material genético de células transformadas podem ser resultado dos efeitos carcinogénicos, por exemplo, do tabaco, da radiação solar ionizante, substâncias químicas ou agentes infecciosos. Pode também ser resultado de anomalias genéticas que são adquiridas através de mutações espontâneas ou erros na replicação do DNA, ou são herdadas geneticamente, e consequentemente estão presentes em todas as células ao nascimento [115].



**Figura 8.** Divisão celular em células normais e células cancerígenas [116].

Nenhuma célula se torna neoplásica apenas com única uma mutação. Normalmente são necessárias várias para haver desregulação do ciclo celular e proliferação excessiva, e ainda mais outras para que haja invasão dos órgãos adjacentes ou distantes.

As anomalias genéticas encontradas no cancro afectam tipicamente três classes gerais de genes: os genes promotores de cancro, os genes supressores de tumores e os genes reparadores do DNA [117].

Os oncogenes ou genes promotores do cancro, são genes que normalmente estão envolvidos na proliferação celular (no estado normal, designam-se como proto-oncogenes). Estes genes, estão geralmente sobre-expressados nas células cancerígenas, fornecendo a estas células novas propriedades, como o crescimento e a divisão descontrolados, protecção contra a morte celular, capacidade de invasão dos tecidos normais e a habilidade de se tornarem estáveis em diversos ambientes teciduais [115].

Os genes supressores de tumores são genes que suprimem a proliferação caso detectem anormalidades celulares, desencadeando a apoptose quando os danos são excessivos. Estes genes estão geralmente inactivos nas células cancerígenas, resultando na perda das funções normais destas células, como o controlo da replicação do DNA, controlo do ciclo celular, orientação e aderência nos tecidos e a interação com as células de defesa do sistema imunitário [115].

Os genes reparadores de DNA estão envolvidos na reparação de DNA e na manutenção da estrutura cromossomal. Estes genes codificam várias proteínas que corrigem os erros no DNA. Se estes genes estiverem inactivados, há um aumento na taxa de mutações e portanto a probabilidade de haver mutações nos genes referidos anteriormente é maior, dá-se um fenómeno de instabilidade genética [115].

Apesar dos recentes avanços no conhecimento da patogénese molecular e terapias-alvo, o cancro continua a ser uma das doenças mais malignas que ameaçam a saúde e qualidade de vida humana. A Organização Mundial de Saúde definiu o cancro como uma das dez maiores causas de mortalidade no mundo [118]. A quimioterapia combinada com radioterapia e cirurgia é a principal estratégia para o tratamento contra o cancro. No entanto, esta estratégia possui limitações, incluindo a multi-resistência a fármacos e efeitos secundários graves na aplicação clínica [119], por conseguinte impelindo a pesquisa de novos fármacos anticancerígenos com maior eficiência terapêutica ou menos efeitos secundários. Muitos dos agentes quimoterápicos utilizados são de origem natural como os alcalóides isolados de plantas, por exemplo o paclitaxel (taxol<sup>®</sup>) e a vincristina (Oncovin<sup>®</sup>) [120], [121]. Os produtos naturais têm ganho cada vez mais atenção do ponto de vista terapêutico e tornaram-se de forma consistente a fonte mais bem sucedida de potenciais novos medicamentos [4], [5].

## 2.2. Actividade anticolinesterásica

A inibição da acetilcolinesterase (AChE) humana tem várias aplicações importantes em tratamentos médicos, especialmente na doença de Alzheimer (DA), que é uma das principais causadoras de demência em idosos e afecta cerca de 35,6 milhões de pessoas em todo o mundo [122]. Esta doença causa a diminuição da actividade dos neurónios colinérgicos, um problema que pode ser tratado aumentando a quantidade do neurotransmissor acetilcolina (ACh), cujo nível é anormalmente reduzido no cérebro dos doentes com DA. Até ao momento, a melhor maneira de aumentar a concentração de ACh consiste na inibição da sua degradação pela AChE [123].

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor formado na região terminal dos neurónios, chamada de axónio terminal. Esta permanece armazenada em vesículas sinápticas e, quando um impulso nervoso chega ao axónio terminal, é libertada pelo neurónio para a região sináptica, onde é atraída pelos receptores colinérgicos que estão localizados no neurónio próximo (Figura 9) [124].

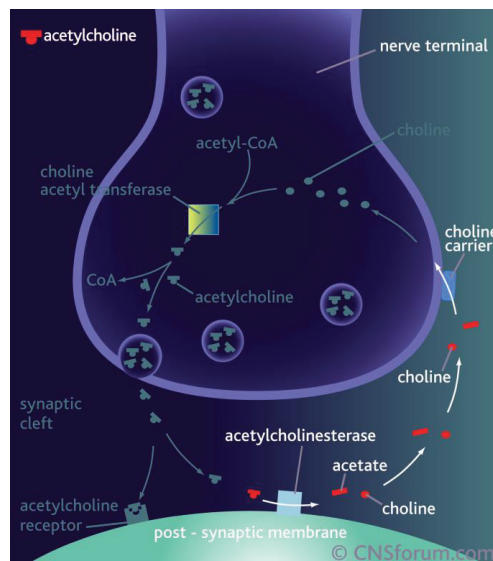


Figura 9. Mecanismo de acção da Acetilcolinesterase [125].

Quando a ACh interage com os receptores regenera o impulso nervoso no neurónio, levando assim à continuidade da transmissão. Uma vez transmitido, o impulso nervoso é importante que o processo de interacção da ACh com o receptor seja interrompido, para evitar o excesso de transmissão nervosa, que pode levar a problemas

de funcionamento do corpo [126]. O nosso organismo possui a enzima acetilcolinesterase (AChE) é um membro da super família de proteína hidrolases  $\alpha/\beta$  [127], que hidrolisa a ACh e a converte em colina (Ch) (Figura10), que é reabsorvida pelo primeiro neurónio para ser reconvertida em ACh, permitindo assim a sua reutilização na transmissão de impulsos nervosos [128].

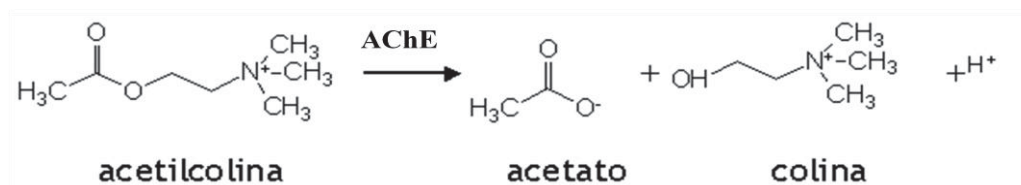
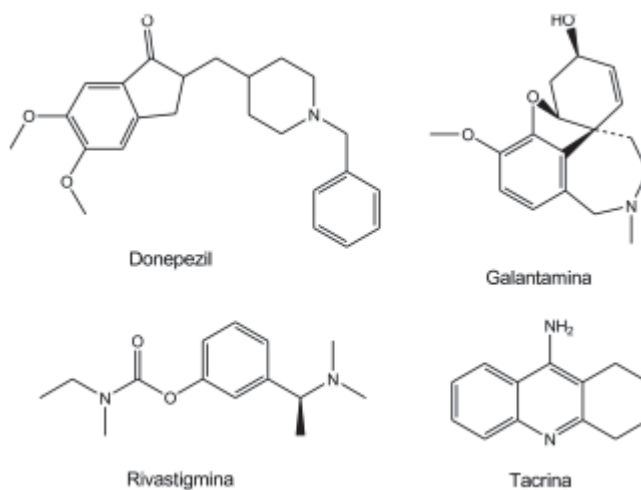


Figura10. Hidrólise da ACh pela AChE.

Os fármacos inibidores da AChE utilizados para o tratamento da DA são o donepezil, a galantamina, a tacrina e a rivastigmina. Estes fármacos proporcionam um efeito terapêutico limitado, e apresentam efeitos secundários sérios, principalmente a nível gastrointestinal. A necessidade de medicamentos eficazes e com menos efeitos secundários tem estimulado a busca de novas drogas sobretudo de fontes naturais [129].



### 2.3. Actividade antioxidante

O stress oxidativo é um desequilíbrio na homeostasia entre pró-oxidantes/antioxidantes tóxicos para as células [130], e encontra-se envolvido na génese de várias desordens crónicas e degenerativas, tais como inflamação [131], cancro [132], doenças cardiovasculares [133] e neurodegenerativas [134].

A problemática do metabolismo é que, enquanto a grande maioria da vida complexa na Terra requer oxigénio para a sua existência, o oxigénio é uma molécula altamente reactiva que danifica as células através da produção de espécies reactivas de oxigénio [135].

As espécies reactivas do oxigénio produzidas nas células incluem o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), e os radicais livres, tais como os radicais hidroxilo ( $\bullet OH$ ) e o anião superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) [136]. Estes oxidantes podem danificar as células ao iniciar reacções químicas em cadeia, tais como a peroxidação lipídica, a oxidação de DNA ou das proteínas [137]. Os danos no DNA podem provocar mutações e, possivelmente, cancro, se estas não forem revertidas por mecanismos de reparação do DNA [138], enquanto danos nas proteínas provocam inibição enzimática, desnaturação e degradação [139].

Por conseguinte, os organismos contêm uma complexa rede de metabolitos antioxidantes e enzimas que trabalham em conjunto para prevenir as lesões resultantes do stress oxidativo nos componentes celulares, tais como DNA, proteínas e lípidos [137]. Em geral, os sistemas antioxidantes servem para remover as espécies reactivas, antes que estas danifiquem componentes vitais à célula, no entanto, as espécies reactivas de oxigénio também desempenham funções celulares úteis, tais como sinalização *redox*. Assim, a função dos sistemas antioxidantes não é remover completamente oxidantes, mas mantê-los a um nível óptimo [140].

Um equilíbrio entre os radicais livres e antioxidantes é necessário para a função fisiológica adequada. Quando os radicais livres sobrecarregam a capacidade do corpo de os regular, dá-se uma condição conhecida como stress oxidativo. Daí que a aplicação de fontes externas de antioxidantes pode ajudar a controlar o stress oxidativo e a prevenir os seus efeitos prejudiciais.

## II – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Actividades biológicas

#### 1.1. Actividade Antitumoral

O efeito inibitório de crescimento (fase *lag*) e a citotoxicidade (fase *log*) dos extractos foram determinados expondo as linhagens celulares tumorais HeLa, A549 e MCF-7 e a linhagem celular não tumoral Vero, em fase *lag* e *log* do crescimento celular, a concentrações diferentes, até um máximo de 200 µg/mL.

A fase *lag* corresponde a um período que ocorre pouca ou ausência de divisão celular. As células encontram-se em estado de latência (repouso). Na fase *log* ou exponencial, as células iniciam seu processo de divisão entrando no período de crescimento. Nesse período a reprodução celular encontra-se extremamente ativa e com maior atividade metabólica.

O resultado de ambas as actividades foi expressa em termos de EC<sub>50</sub> (concentração de extracto que provoca 50% de mortalidade celular). Os resultados dos EC<sub>50</sub> obtidos para a inibição do crescimento e citotoxicidade encontram-se apresentados nas Tabela 7 e Tabela 8, respectivamente. Nos extractos em que não foi possível obter o EC<sub>50</sub>, pois o extracto não provocou 50 % de mortalidade celular para as concentrações testadas, os resultados foram expressos em percentagem de mortalidade celular à concentração mais alta testada, que foi 200 µg/mL.

**Tabela 7.** Actividade inibidora de crescimento celular dos extractos testados contra as linhagens celulares Vero, HeLa, A549 e MCF-7 (resultados expressos como média±desvio-padrão).

			Inibição EC50 (µg/mL)				
Espécie			Vero	HeLa	A549	MCF-7	
Macroalgas	<i>Asparagopsis armata</i>	DCM	<b>191,86±11,53</b>	n.a.	[27,09%]	<b>99,42±7,20</b> <b>IS 1,93</b>	
		MeOH	[20,68%]	n.a.	[10,34%]	[23,14%]	
	<i>Asparagopsis taxiformis</i>	DCM	<b>151,62±7,21</b>	n.a.]	[9,62%]	<b>193,25±5,82</b> <b>IS 0,78</b>	
		MeOH	[10,88%]	[7,37%]	[17,23%]	[30,06%]	
	<i>Codium fragile fragile</i>	DCM	[39,81%]	n.a.	[32,15%]	[31,81%]	
		MeOH	[7,70%]	[14,78%]	n.a.	[34,27%]	
Macro-invertebrados	<i>Bugula neritina</i>	SMA	DCM	[17,75%]	[7,42%]	n.a.	<b>125,44±5,51</b>
			MeOH	[42,56%]	n.a.	n.a.	[44,14%]
		SMI	DCM	[26,73%]	[24,98%]	[46,95%]	<b>116,87±8,51</b>
			MeOH	[26,44%]	n.a.	[18,24%]	<b>132,56±11,08</b>
	<i>Microcosmus squamiger</i>	SMA	DCM	[7,54%]	[0,68%]	[25,38%]	<b>184,12±16,94</b>
			MeOH	[6,64%]	[4,25%]	[26,61%]	[32,52%]
		SMI	DCM	[9,42%]	n.a.	n.a.	[36,82%]
			MeOH	[8,37%]	[14,63%]	[21,81%]	[9,88%]
	<i>Tricellaria inopinata</i>	DCM	[40,91%]	[33,13%]	n.a.	[32,52%]	
		MeOH	[25,41%]	[16,34%]	[35,26%]	[28,39%]	
	<i>Zoobotryon verticillatum</i>	DCM	<b>183,68±16,37</b>	<b>94,84±12,31</b> <b>IS 1,94</b>	[43,73%]	<b>39,52±7,58</b> <b>IS 4,64</b>	
		MeOH	[13,31%]	[38,73%]	[26,54%]	[38,29%]	
<b>Controlo</b>	Colchicina		1,43±0,06	1,67±0,06	1,37±0,16	0,02±0,00	

\*% de mortalidade celular a 200 µg/mL, quando IC<sub>50</sub>>200. n.a. não activo.

Como se pode verificar na Tabela 7, no teste para inibição de crescimento (fase lag), a maioria dos extractos apresentou alguma actividade, particularmente em relação à linhagem MCF-7, que foi também mais sensível ao efeito da colchicina, um composto que interage com a tubulina e perturba a formação dos microtúbulos [141]. Os extractos mais activos foram os extractos de diclorometano, tendo apenas sido possível calcular o valor de EC<sub>50</sub> para um extracto de metanol, do briozóario *Bugula neritina* de São Miguel, contra a linhagem MCF-7.

O extracto mais activo foi o extracto de diclorometano de *Zoobotryon verticillatum*, com um EC<sub>50</sub> em relação a MCF-7 pouco superior ao valor de 30 µg / mL considerado promissor para extractos brutos pelo NCI (National Cancer Institute) [142]. Este extracto foi ainda o único para o qual foi possível calcular o valor de EC<sub>50</sub> em relação à linhagem celular HeLa, sendo também um dos extractos que não exibiu

actividade suficiente para calcular o EC<sub>50</sub> contra a linhagem A549, mas que obteve uma percentagem de mortalidade celular de 43,7% à concentração mais elevada do ensaio (200 µg/mL). É ainda de referir que o IS (índice de selectividade, definido como EC<sub>50</sub>Vero/EC<sub>50</sub> linhagem tumoral testada) do extracto de diclorometano de *Z. verticillatum* para a linhagem HeLa foi de 1,94 e para a linhagem MCF-7 foi de 4,64 pelo que se verifica uma diferença de sensibilidade, em que o efeito é mais pronunciado sobre as linhagens tumorais, e particularmente elevado na linhagem MCF-7. Foi observado anteriormente no invertebrado *Zoobotryon verticillatum* um alcalóide 2,5,6-tribromo-*N*-metilindol-3-carbaldeído capaz de inibir a divisão dos ovos fertilizados do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* [97], e outros alcalóides como a quinolina e a quinazolina [102] que possuem actividade antitumoral [143], [144]. A actividade biológica de *Zoobotryon verticillatum* observada neste estudo confirma a existência de compostos nesta espécie com actividade antitumoral.

Curiosamente, detectaram-se algumas diferenças entre as actividades de extractos dos exemplares de *B. neritina* recolhidos em Agosto na Ilha de Santa Maria e os extractos de *B. neritina* recolhidos em Outubro na Ilha de São Miguel, com uma actividade mais elevada para os de S. Miguel. O briozoário *Bugula neritina* é reconhecido pela sua capacidade de produzir as lactonas macrolídeas conhecidas como briostatinas, cuja actividade antitumoral é altamente reconhecida [145], mas neste estudo a actividade dos extractos não foi tão alta como esperado. No entanto, já foi verificado anteriormente que amostras da espécie *B. neritina* podem ter actividades muito distintas, pois os produtos naturais deste briozoário variam conforme diferentes populações, e estas diferenças devem-se provavelmente a diferenças genéticas [68]. O mesmo se verificou neste estudo, em que amostras de locais diferentes obtiveram actividades diferentes. Também as amostras de *Microcosmus squamiger* revelaram actividades diferentes consoante o local da colheita, mas no momento da escrita desta tese ainda não existem estudos relativos às actividades desta espécie ou sobre compostos provenientes da mesma, por isso, os resultados neste estudo são pioneiros e indicam pela primeira vez que esta espécie pode ser uma fonte de novos compostos com actividade biológica.

Os extractos de diclorometano das duas espécies de *Asparagopsis* também mostraram actividade na fase *lag* contra as linhagens Vero e MCF-7. Comparando estes dois extractos, verifica-se que o extracto de *A. armata* foi mais activo contra a linhagem

MCF-7 do que o extracto de alga *A. taxiformis*, para além de apresentar um IS de 1,93, o que mostra que é mais activo contra a linhagem tumoral MCF-7 do que a linhagem não-tumoral, ao contrário do que se verifica no extracto de diclorometano da *A. taxiformis* que é mais activo contra a linhagem não-tumoral do que a linhagem tumoral, o que se confirma pelo IS de 0,78.

**Tabela 8.** Actividade citotóxica dos extractos testados contra as linhagens celulares Vero, HeLa, A549 e MCF-7 (resultados expressos como média±desvio-padrão).

			Citotoxicidade EC50 (µg/mL)				
Espécie			Vero	HeLa	A549	MCF-7	
Macroalgas	<i>Asparagopsis taxiformis</i>	DCM	n.a.	n.a.	[36,05%]	[34,47%]	
		MeOH	[5,92%]	n.a.	n.a.	[32,17%]	
	<i>Asparagopsis armata</i>	DCM	n.a.	n.a.	[2,46%]	[2,82%]	
		MeOH	n.a.	n.a.	[14,95%]	n.a.	
	<i>Codium fragile fragile</i>	DCM	n.a.	[8,81%]	[2,12%]	[5,78%]	
		MeOH	[4,11%]	n.a.	n.a.	[2,37%]	
Maro-invertebrados	<i>Bugula neritina</i>	SMA	DCM	[49,04%]	[27,84%]	[16,72%]	[5,04%]
			MeOH	[13,65%]	[11,20%]	[0,10%]	n.a.
		SMI	DCM	n.a.	[18,54%]	[29,70%]	n.a.
			MeOH	[7,12%]	[36,82%]	[45,37%]	[32,23%]
	<i>Microcosmus squamiger</i>	SMA	DCM	[13,89%]	[18,73%]	[16,95%]	[30,05%]
			MeOH	n.a.	[37,95%]	[7,05%]	n.a.
		SMI	DCM	n.a.	[27,98%]	[13,44%]	[25,38%]
			MeOH	n.a.	[45,43%]	[9,44%]	n.a.
	<i>Tricellaria inopinata</i>	DCM	n.a.	n.a.	[17,71%]	[29,04%]	
		MeOH	n.a.	n.a.	n.a.	[13,72%]	
	<i>Zoobotryon verticillatum</i>	DCM	[22,19%]	[45,27%]	[37,39%]	[44,64%]	
		MeOH	[44,28%]	[47,87%]	[12,75%]	n.a.	

\*% de mortalidade celular a 200 µg/mL, quando IC<sub>50</sub>>200. n.a. não activo.

Na Tabela 8 apresentam-se as actividades dos extractos contra as linhagens em fase *log*. Os ensaios celulares em fase *log* permitem testar os efeitos dos extractos a nível dos mecanismos relacionados com a divisão celular [146]. Não foi possível calcular o valor de EC<sub>50</sub> para nenhum dos extractos, uma vez que a mortalidade celular foi sempre inferior a 50%. O extracto de diclorometano de *Zoobotryon verticillatum* destacou-se em termos relativos, quanto ao seu efeito contra HeLa e MCF7, embora a actividade fosse mais baixa que na fase *lag*.

Em uma análise comparativa entre a Tabela 7 e Tabela 8, observa-se que a actividade antitumoral encontra-se mais pronunciada na fase *lag* do que na fase *log*. Sendo a inibição de crescimento (fase *lag*) determinada pela exposição das células ao extracto na fase inicial de crescimento, pode-se concluir que o processo ao nível da adesão celular ao substrato foi o mais afectado.

É possível que os extractos onde se observou inibição da fase *lag* possuam compostos que actuam ao nível das MAC (moléculas de adesão celular), nomeadamente nos mecanismos de adesão intercelular mediados pelas caderinas [147].

Em geral, a linhagem celular MCF-7 parece ser mais sensível aos extractos do que as outras linhagens estudadas, isto confirma-se pelos valores de EC50 e pela % de mortalidade celular, tanto na fase *lag*, como na fase *log*.

Nenhum dos extractos provocou 50% de mortalidade celular em fase *lag* ou fase *log* contra a linhagem tumoral A549, sendo as percentagens de mortalidade mais altas contra esta linhagem de 46,95% na fase *lag* pelo extracto de diclorometano de *Bugula neritina* SMI e de 45,33% na fase *log* pelo extracto de metanol da amostra mesma espécie.

Globalmente, a actividade antitumoral registada nos extractos é muito menor do que a verificada na colchicina, o controlo positivo, mas é necessário relembrar que os extractos testados estavam na sua forma bruta, pelo seria necessário testar os compostos isolados e purificados nestes para avaliar a verdadeira actividade antitumoral destas espécies.

## **1.2. Actividade Anticolinesterásica**

Neste ensaio, todos os extractos foram testados a uma concentração máxima de extracto 150 µg/mL e a galantamina foi utilizada como padrão para a inibição da enzima acetilcolinesterase. O resultado da inibição da actividade da acetilcolinesterase foi expressa em termos de IC<sub>50</sub> (concentração de extracto que provoca 50% de inibição enzimática e encontram-se apresentados na Tabela 9. Nos casos em que não foi possível determinar o IC<sub>50</sub>, pois o extracto não atingiu 50 % de actividade inibitória para as concentrações testadas, os resultados foram expressos em percentagem de inibição à concentração mais alta testada, que foi 150 µg/mL.

**Tabela 9.** Inibição da actividade da acetilcolinesterase dos extractos de diclorometano e metanol das espécies testadas expressas em IC<sub>50</sub> (Resultados expressos como média±desvio-padrão).

	Espécie	Local de Recolha	Solvente	Inibição IC <sub>50</sub> (µg/mL) [% de inibição a 150 µg/mL]*
Macroalgas	<i>Asparagopsis taxiformis</i>	São Miguel	DCM	<b>116,50±10,94</b>
			MeOH	>150 [14,3%±4,6]
	<i>Asparagopsis armata</i>	São Miguel	DCM	>150 [41,1%±2,0]
			MeOH	>150 [22,5%±11,6]
	<i>Codium fragile</i> subsp. <i>fragile</i>	Santa Maria	DCM	>150 [20,4%±1,5]
			MeOH	>150 [8,2%±5,5]
Macro-invertebrados	<i>Bugula neritina</i>	Santa Maria	DCM	<b>99,12±7,94</b>
			MeOH	>150 [12,8%±3,0]
		São Miguel	DCM	>150 [19,2%±4,1]
			MeOH	>150 [10,6%±1,4]
	<i>Microcosmus squamiger</i>	Santa Maria	DCM	>150 [5,2%±1,7]
			MeOH	<b>65,97±5,04</b>
		São Miguel	DCM	>150 [24,8%±5,2]
			MeOH	>150 [13,7%±4,1]
	<i>Tricellaria inopinata</i>	Santa Maria	DCM	>150 [41,7%±5,3]
			MeOH	>150 [16,0%±2,3]
	<i>Zoobotryon verticillatum</i>	São Miguel	DCM	<b>127,43±2,00</b>
			MeOH	>150 [11,4%±1,0]

\*% de inibição a 150 µg/mL, quando IC<sub>50</sub>>150.

De todos os extractos testados apenas foi possível determinar o IC<sub>50</sub> nos extractos de diclorometano das espécies *Asparagopsis taxiformis*, *Bugula neritina* de Santa Maria (SMA) e *Zoobotryon verticillatum*, e no extracto metanólico de *Microcosmus squamiger* de Santa Maria (SMA). O extracto que apresentou a maior actividade de inibição foi este último, o extracto metanólico de *Microcosmus squamiger* de Santa Maria (SMA). Dos extractos que mostraram actividade, apenas um é uma macroalga, a *A. taxiformis* e os restantes são macro-invertebrados: *Bugula neritina* (SMA), *Microcosmus squamiger* (SMA), *Zoobotryon verticillatum*, pelo que os macro-invertebrados mostraram mais actividade.

No caso da *Bugula neritina*, a actividade observada foi menor do que a esperada, visto que foi nesta espécie que se isolou compostos como a briostatina-1, que é das briostatinas que já se encontra na fase II de avaliação para aplicação no tratamento da

doença de Alzheimer [74]. Contudo, como já se observou nos ensaios de actividade antitumoral, fazendo novamente uma comparação entre os resultados de extractos da mesma espécie, mas colhidos em locais e épocas diferentes, como é o caso de *Bugula neritina* e *Microcosmus squamiger*, observa-se que em ambos os casos, os extractos de Santa Maria é que apresentaram actividade. Este facto pode ter-se devido tanto ao local onde as amostras foram colhidas como à altura do ano em que foram apanhadas, uma vez que as amostras de Santa Maria foram apanhadas no Verão e as amostras de São Miguel foram apanhadas quase no Outono.

Os resultados observados na espécie *Microcosmus squamiger* são os mais surpreendentes, pois apesar desta espécie estar tão pouco estudada, as actividades por ela apresentada parecem ser muito promissoras.

### **1.3. Actividade Antioxidante**

O método do DPPH permite avaliar a capacidade que um composto tem na captação de radicais livres e espécies reactivas de oxigénio. Neste estudo nenhum dos extractos testados demonstraram actividade antioxidante à concentração de 250 µg/mL. Isto poderá ter-se devido ao método de obtenção dos extractos que envolveu um longo período de extracção (4 dias em diclorometano e 4 dias em metanol, com troca de solvente a cada 24 horas). Uma vez que a função dos antioxidantes é se oxidarem, é possível que durante a extracção os compostos antioxidantes tenham perdido a sua actividade.

## **2. Caracterização estrutural dos compostos isolados dos extractos**

Os compostos descritos neste estudo foram isolados através de métodos cromatográficos preparativos a partir dos extractos de diclorometano e metanol que obtiveram maior actividade. A estrutura química dos compostos isolados foi determinada recorrendo principalmente a estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , mono e bidimensional, e espectrometria de massa (EM). Em seguida serão apresentadas as evidências espectroscópicas mais relevantes, observadas nos espectros analisados e que permitiram elucidar a estrutura química dos compostos.

## 2.1. Composto 1: saliramofenol

Do extracto de diclorometano da *Asparagopsis taxiformis* foi isolado o composto 1 cuja estrutura se elucidou a seguir

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 1 (Figura 11), observa-se a presença de sinais a  $\delta_{\text{H}}$  7,14 (*dd*,  $J = 2,4$  e  $8,6$  Hz), 7,54 (*d*,  $J = 8,6$  Hz) e dois dupletos quase coincidentes a 7,36 e 7,37 ppm, ambos com uma constante de acoplamento ( $J$ ) de  $2,4$  Hz, o desvio químico destes sugere tratarem-se de prótons aromáticos, enquanto a forma dos sinais sugere trata-se de um anel aromático trissubstituído, ou seja um anel aromático com 3 grupos CH e 3 carbonos quaternários. O facto dos desvios químicos dos sinais a  $\delta_{\text{H}}$  7,36 e 7,37 serem muito próximos permite concluir que estes prótons não pertencem ao mesmo anel aromático, sendo a primeira evidência da presença de pelo menos dois anéis aromáticos trissubstituídos não equivalentes.

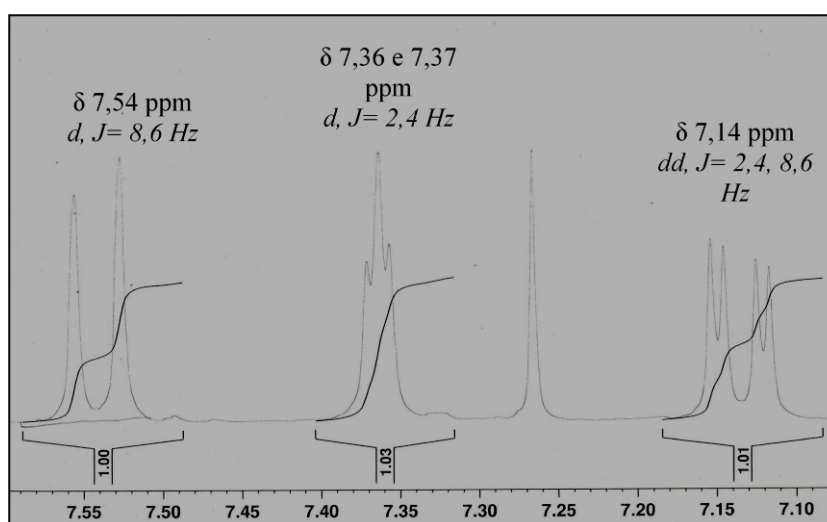


Figura 11. Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 1.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto 1 observa-se a presença dos sinais correspondentes à ressonância de 5 carbonos aromáticos quaternários a  $\delta_{\text{C}}$  138,4, 138,6, 147,1, 147,6, 147,7 ppm, com desvios muito próximos (como se fossem sinais desdobrados) o que reforça a ideia de existirem na estrutura vários anéis aromáticos não equivalentes mas com diferenças estruturais muito pequenas e que por isso não se reflecte no desvio químico de todos os carbonos.

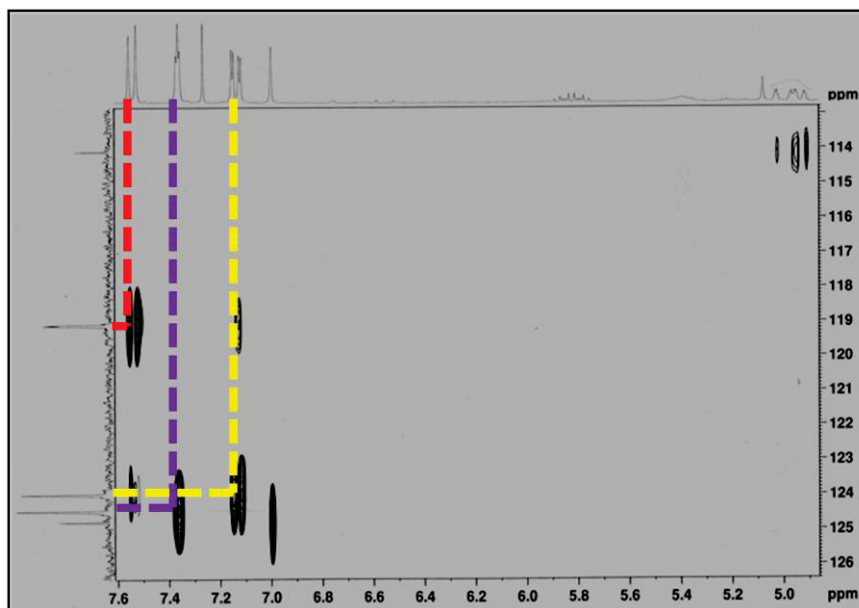


Figura 12. Ampliação do espectro de RMN de HSQC do composto 1.

A análise do espectro de correlação heteronuclear a uma ligação com detecção inversa (HSQC) (Figura12) mostra haver correlação entre os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  referidos inicialmente ( $\delta$  7,14; 7,36; 7,37 e 7,54 ppm) e os de  $^{13}\text{C}$  a  $\delta$  124,0, 124,5 e 119,1 ppm, respectivamente. Isto confirma que os carbonos cujas ressonâncias dão origem aos sinais a  $\delta_{\text{C}}$  124,0, 124,5 e 119,1 ppm são carbonos protonados, ou seja, estão directamente ligados a protões.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 1 apresenta também dois sinais que surgem a  $\delta_{\text{H}}$  1,29 e 1,34, desvios químicos típicos de protões metílicos, em forma de singuleto, indicativo de não terem outros protões na vizinhança próxima, ou seja, grupos  $\text{CH}_3$  ligados a carbonos quaternários. A análise do espectro de HSQC mostra que estes protões metílicos estão ligados aos carbonos a  $\delta_{\text{C}}$  31,5 e 30,2 respectivamente, e que o espectro de DEPT confirma pertencerem a grupos  $\text{CH}_3$ .

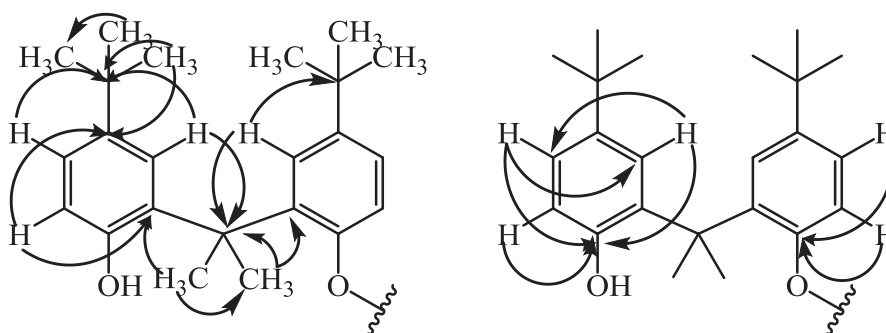
As conectividades observadas no espectro bidimensional de correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância (HMBC) e indicadas na figura 13, permitem concluir que os protões metílicos a  $\delta_{\text{H}}$  1,29 ppm têm correlação a longa distância (chamadas conectividades) com dois carbonos quaternários, um alifático a  $\delta_{\text{C}}$  34,5 e outro aromático a  $\delta_{\text{C}}$  147,1 já indicado acima. E os protões do outro grupo metilo ( $\delta_{\text{H}}$  1,34) exibem conectividades com três carbonos quaternários, a  $\delta_{\text{C}}$  34,9, 138,4 e 138,6, sendo estes dois últimos também assinalados acima). Isto permite concluir que

estes grupos metilo estão ligados ao anel aromático em posições distintas. O facto dos protões metílicos a  $\delta_H$  1,34 exibirem conectividades com 2 carbonos aromáticos quaternário diferentes ( $\delta_C$  138,4 e 138,6) sugere que poderão estar na ligação entre dois anéis aromáticos.

A presença de grupos *terc*-butilo é evidenciada pela conectividade observada entre os protões a  $\delta_H$  1,29 e carbonos a  $\delta_C$  31,5 à distância de 3 ligações, ou seja carbonos equivalentes ao do grupo metilo já identificado. Um efeito idêntico é observado entre os protões a  $\delta_H$  1,34 e o carbono a  $\delta_C$  34,9 sugerindo a existência, neste caso, de dois grupos metilo equivalentes.

Se se tiver em conta, a existência de pelo menos, dois anéis aromáticos, sugere-se a presença de dois grupos *terc*-butilo correspondentes ao sinal  $\delta_H$  1,29 e mais dois grupos metilo na forma de  $C(CH_3)_2$  cuja ressonância dos protões surge a  $\delta_H$  1,34.

As conectividades observadas no espectro de HMBC e indicadas na Figura 13 permitem assinalar inequivocamente todos os carbonos e protões indicados



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

Como já referido atrás, parece existir uma particularidade estrutural que se centra á volta dos carbonos 1, 1', 2, 2', 6 e 6' (ver numeração na Figura 14) e que provoca algum grau de assimetria na estrutura apresentada na Figura. Sugere-se que essa particularidade possa estar relacionada com a presença de um grupo OH e um grupo O-R em cada um dos anéis.

O espectro de massa deste composto apresenta dois picos a  $m/z$  663 correspondente a  $[M+H]^+$  e  $m/z$  685 correspondente a  $[M+Na]^+$  indicando uma massa molecular de 662 daltons ou seja uma fórmula molecular de  $C_{46}H_{62}O_3$  mostrando uma estrutura dimérica da que evidenciada pelos espectros de RMN.

O conjunto dos dados estruturais apresentados até aqui, permite concluir que a estrutura do composto 1 é a apresentada na Figura 14 e cujo nome IUPAC é o 2,2'-((oxibis(3-(*terc*-butilo)-6,1-fenileno))bis(propano-2,2-di-il))bis(4-(*terc*-butilo)fenol).

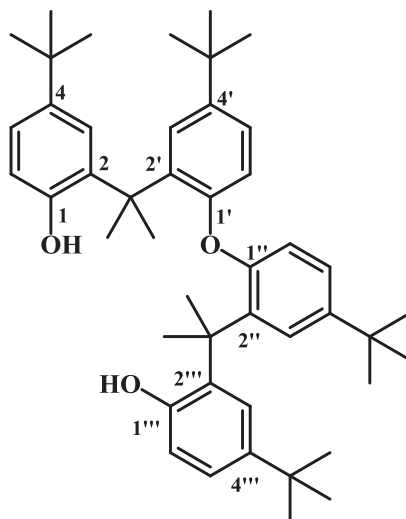


Figura 14. Estrutura do composto 1.

No presente trabalho o composto 1 (saliramofenol) foi isolado nos extractos de diclorometano de diferentes espécies: nas algas *A. taxiformis*, e *C. fragile* subsp. *fragile*, e também nos invertebrados *B. neritina* e *Z. verticillatum*, sendo este último o mais activo em termos de inibição de crescimento celular. Este facto leva a ponderar as implicações ecológicas que a presença deste composto tem numa variedade de seres tão distintos.

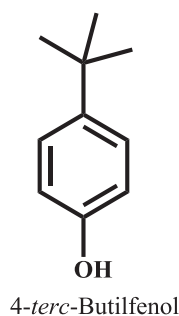
Através de uma pesquisa verificou-se que um composto com esta estrutura já foi isolado e caracterizado, ao qual foi atribuído o nome trivial de saliramofenol. Trata-se de um composto anteriormente identificado na halófito *Salicornia ramosissima*, uma espécie que cresce de forma espontânea no sapal da Ria de Aveiro junto ao canal da ria que serve de entrada ao porto marítimo de Aveiro [148].

Uma pesquisa em base de dados da especialidade (SciFinder) mostra que o saliramofenol não é um composto comercial ou sintetizado, pelo que não pode ser um composto proveniente de contaminação laboratorial ou ambiental.

As espécies de onde se isolou o composto 1 têm em comum com a *Salicornia ramosissima*, da qual foi, pela primeira vez, isolado o saliramofenol, o facto de todas

provirem de zonas banhadas por águas portuárias, caracterizadas por intenso movimento marítimo e poluídas.

Ao analisar a estrutura do composto 1 verifica-se que este parece resultar da polimerização do monómero 4-*terc*-butilfenol.



O 4-*terc*-butilfenol é um composto orgânico comercial que é utilizado como monómero em resinas sintéticas tipo resinas fenólicas e como aditivo nas resinas epóxi [149]. Em 2001 foram utilizadas, só na União Europeia um total de 26,617 toneladas deste composto [150]. A nível europeu estima-se que sejam libertadas para o ambiente até cerca de 166 kg/d [149] pelo que é um contaminante que se encontra distribuído em vastas áreas nos meios aquáticos, como as águas de rios [151], sedimentos de rios e no mar [152], sedimentos marinhos [153], e amostras de efluentes de estações de tratamento de águas residuais [154].

As semelhanças estruturais entre o 4-*terc*-butilfenol e os monómeros do composto saliramofenol parecem sugerir que este último pode ter surgido da incorporação do 4-*terc*-butilfenol no metabolismo de microorganismos presentes nas espécies estudadas, o que explica a sua presença em extractos de espécies diferentes. Este não seria o primeiro caso em que o 4-*terc*-butilfenol é assimilado por microorganismos. Por exemplo, as estirpes bacterianas de *Sphingobium fuliginis* isoladas a partir de *Phragmites australis* são capazes de utilizar o 4-*terc*-butilfenol como fonte de carbono e de energia [155].

A transformação do 4-*terc*-butilfenol em saliramofenol significaria a sua dimerização através de uma fonte extra de 3 carbonos (que em termos laboratoriais poderia ser a acetona [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C=O]) e uma dimerização deste dímero por uma ligação éter. Enquanto que, esta última dimerização corresponde à formação de uma ligação muito comum em produtos naturais (por exemplo na classe dos fenilpropanoides), não foi encontrada qualquer referência na literatura para a reação em meio natural

correspondente à primeira dimerização pelo que, não é possível neste trabalho concluir ou sugerir uma via biossintética para a formação do saliramofenol. Este é um ponto de discussão e estudo futuro.

Sendo o 4-*terc*-butilfenol um composto tóxico [156], [157], a transformação biológica deste em saliramofenol poderá ser visto como uma forma de destoxificação ambiental. Tal hipótese poderia ser avaliada estudando as actividades biológicas exibidas por este composto.

## **2.2. Composto 2**

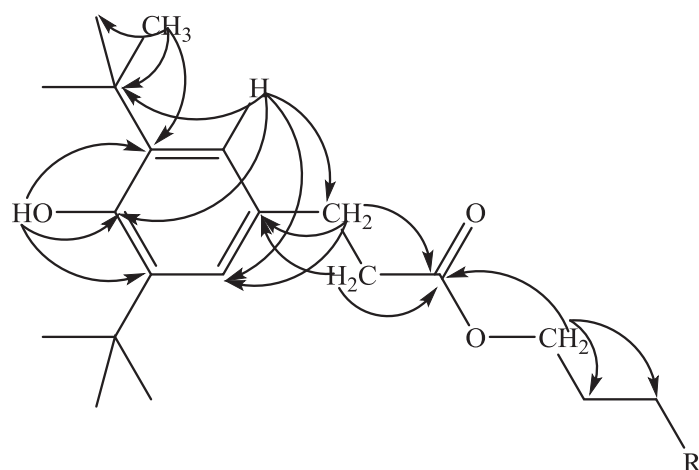
No extracto de diclorometano da *Asparagopsis taxiformis*, da mesma fracção onde se isolou o saliramofenol foi também identificado um segundo composto (composto 2).

Da análise dos espectros de RMN do composto 2 é possível inferir a existência de um anel aromático tetrasubstituído, pois identificam-se 4 carbonos quaternários com desvios típicos de anéis aromáticos ( $\delta_C$  131,2, 135,9, 135,9 e 152,1), mas apenas se identificam 2 carbonos protonados equivalentes cujo sinal de ressonância de próton surge na forma de singuleto ( $\delta_H$  6,99;  $\delta_C$  124,8).

De forma muito idêntica ao que se observou no caso do composto saliramofenol, foram identificados no composto 2, dois grupos *terc*-butilo equivalentes ( $\delta_C$  34,3, um carbono quaternário e a  $\delta_C$  30,3 um carbono metílico com a ressonância dos prótons a surgir a  $\delta_C$  1,44 em forma de singuleto).

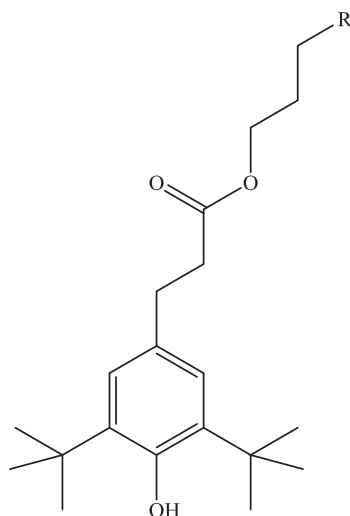
Os restantes carbonos da molécula são carbonos alifáticos na forma de grupos  $CH_2$ , com excepção de um carbono cuja ressonância surge a  $\delta_C$  173,4 que é típica de carbono carboxílicos (-COO-).

As conectividades observadas no espectro de HMBC permitiram correlacionar os diferentes grupos identificados (Figura 15).

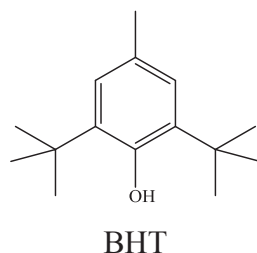


**Figura 15.** Estrutura do composto 2.

Na estrutura apresentada surge um grupo R que corresponde a uma pequena parte da molécula cuja estrutura não foi possível elucidar pelas técnicas disponíveis mas que muito provavelmente corresponde a uma cadeia alifática. Assim a estrutura do composto 2 é apresentada a seguir.



Embora a estrutura do composto 2 não esteja completamente elucidada, é impossível não reconhecer nela um anel aromático com um padrão de substituição idêntico ao que surge no composto sintético comercial BHT. O BHT é um composto muito utilizado como aditivo alimentar com propriedades antioxidante [158] e como aditivo na produção de plásticos, e a detecção da sua ocorrência no meio ambiente é cada vez maior [159], [160].

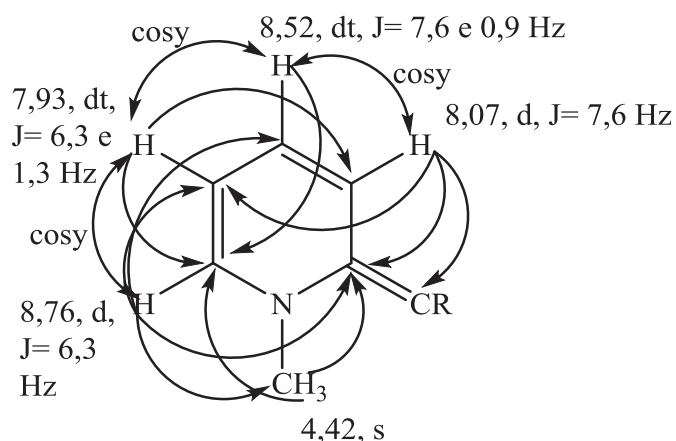


Assim sendo, levanta-se a questão de qual a origem deste composto. As pesquisas efectuadas recorrendo a bases de dados adequadas (SciFinder) não revelaram qualquer composto com uma estrutura idêntica a esta, o que significa que não se trata de um composto totalmente sintético. Contudo, compostos com este tipo de substituição no anel aromático encontrados na natureza são raros [161]. Fica aqui mais um ponto de discussão e avaliação futura no sentido de esclarecer a origem e o processo de biossíntese que poderá conduzir à formação deste composto.

### 2.3. Composto 3

Do extrato de metanol da amostra de *Microcosmus squamiger* colhida em Santa Maria, o mesmo extracto que apresentou a melhor actividade anticolinesterásica neste estudo, foi isolado um composto (composto 3) de massa molecular 159 (espectro de massa apresenta um pico a  $m/z$  a 160 correspondente a  $[M+H]^+$ , outro a  $m/z$  182 correspondente a  $[M+Na]^+$ , outro a  $m/z$  198  $[M+K]^+$  e ainda a  $m/z$  319 correspondente a  $[M+H+M]^+$ ). O facto da massa molecular ser impar é um indício de a molécula conter um número impar de átomos de nitrogénio na sua estrutura. A análise dos espectros de RMN de protão e carbono, permite concluir que nesta estrutura também existem 1 grupo metilo ( $\delta_C$  47,4 e  $\delta_H$  4,42 em forma de singuleto) ligado a um elemento electronegativo como oxigénio ou nitrogénio. Na estrutura também existem 4 grupos CH com desvios químicos característicos de 2 duplas ligações ( $\delta_C$  127,4; 127,5; 146,4; 146,9) e 2 carbonos quaternários ( $\delta_C$  155,4; 165,2).

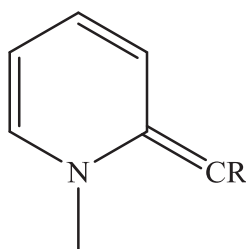
A análise dos espectros de RMN 2D (COSY, HSQC e HMBC) permitiram, conjugar estas particularidades estruturais e estão indicadas na figura 16.



**Figura 16.** Estrutura do composto 3.

Infelizmente a estrutura apresentada não corresponde a uma massa molecular de 159 dalton mas apenas de 105 dalton pelo que há um fragmento da estrutura correspondente a 54 dalton cuja composição química não foi possível determinar recorrendo às técnicas disponíveis.

Assim, não foi possível elucidar de forma inequívoca a estrutura química do composto 3 em tempo útil para a escrita desta dissertação. No entanto, uma vez que foi determinada uma parte significativa dessa estrutura, optou-se por apresentar aqui a estrutura parcial para este composto.



Esta estrutura mostra que o composto 3 pertence à família dos alcalóides tipo dihidropiridonas.

## CONCLUSÃO

Esta dissertação teve como objectivo principal avaliar o potencial farmacológico de algumas espécies invasoras/exóticas dos Açores. Após a realização do trabalho de investigação pode-se concluir que, em geral, os extractos de diclorometano e metanol não foram muito activos, embora os de diclorometano apresentem mais actividade do que os de metanol. No entanto, *Zoobotryon verticillatum* parece ser relativamente promissor, nomeadamente o extracto de diclorometano desta espécie foi bastante activo contra a linhagem tumoral MCF-7, apresentou actividade antitumoral selectiva e actividade acetilcolinesterásica. O mesmo se pode dizer para o briozoário *Microcosmus squamiger*, que foi a espécie com o extracto mais activo na actividade anticolinesterásica. O potencial farmacológico destas espécies é evidente e encontra-se muito pouco estudado.

O estudo fitoquímico destas espécies permitiu identificar três compostos, o saliramofenol e mais outros dois em que não foi possível chegar à estrutura exacta. O mais interessante é que tanto o saliramofenol como o composto 2 possuem anéis aromáticos com padrões de substituição idênticos ao 4-*terc*-butilfenol e o BHT, respectivamente. O facto destes compostos serem de origem antropogénica e se encontrarem incorporados na sua estrutura levanta imensas questões, nomeadamente o seu mecanismo de biossíntese, em que contexto estes compostos estão a ser produzidos, e qual a sua função.

## **PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO**

Este foi um estudo preliminar no que diz respeito ao potencial farmacológico das espécies invasoras/exóticas dos Açores.

Uma vez que as actividades biológicas foram testadas com extractos brutos, que são misturas de compostos, e não com compostos puros, é fundamental prosseguir a purificação até à obtenção de compostos puros e identificar quais os compostos responsáveis pelas actividades antitumoral e anticolinesterásica evidenciadas neste estudo, como foi no caso do *Zoobotryon verticillatum* e do *Microcosmus squamiger*.

Desses compostos, os que revelarem ser responsáveis pela actividade antitumoral, poderão ser submetidos a técnicas de microscopia de fluorescência para perceber de que modo os compostos actuam nas células (necrose ou apoptose) e através de testes de via das caspases, para apurar o mecanismo de acção nestes compostos que induz morte celular. Para além de tentar perceber o mecanismo de acção é também necessário estabelecer uma relação estrutura/actividade do composto.

Também se pretende continuar a pesquisa de mais compostos, quer dentro das espécies deste estudo, quer noutras espécies invasoras/exóticas nos Açores, como por exemplo *Styela plicata*, e efectuar mais testes de actividades, como por exemplo ensaios de actividade antibacteriana ou antifúngica.

Em relação aos compostos identificados na análise fitoquímica identificados em certas espécies deste estudo, nomeadamente o saliramofenol e o composto 2, é necessário proceder à sua purificação e tentar apurar a origem deste composto, o contexto em que é produzido e o seu impacto a nível ambiental.

### III – PARTE EXPERIMENTAL

#### 1. Recolha e preparação das amostras

As amostras foram recolhidas em 2013 durante os meses de Agosto e Outubro na marina de Vila do Porto, Ilha de Santa Maria e na marina de Ponta Delgada, Ilha de São Miguel.

O material vegetal recolhido foi limpo, lavado com água destilada, identificado e caracterizado morfológicamente, e devidamente acondicionado a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas, tendo sido posteriormente liofilizado durante 48 horas (massas de material usados indicados na Tabela 12) e armazenado novamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

As espécies algais foram identificadas taxonomicamente pela Doutora Manuela Parente da Universidade dos Açores e os *vouchers* encontram-se depositados na colecção particular da mesma, na Universidade dos Açores. Os números correspondentes aos *vouchers* das amostras das algas estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Números de identificação dos *vouchers* das amostras de algas.

Número de identificação do <i>voucher</i>	Amostra
MD0002396	<i>Asparagopsis taxiformis</i>
MD0002400	<i>Asparagopsis armata</i>
MD0002710	<i>Codium fragile</i> subsp. <i>fragile</i>

As amostras dos macro-invertebrados foram identificadas taxonomicamente pela Doutora Joana Micael e os respectivos *vouchers* encontram-se depositados na colecção do Museu Nacional de História Natural e da Ciência, em Lisboa. Os números de identificação correspondentes aos *vouchers* dos macro-invertebrados encontram-se indicados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Números de identificação dos *vouchers* das amostras dos macro-invertebrados.

Número de identificação do <i>voucher</i>	Amostra
MB37-000050	<i>Bugula neritina</i> de Santa Maria
MB37-000053	<i>Bugula neritina</i> de São Miguel
MB44-000003	<i>Microcosmus squamiger</i> de São Miguel
MB44-000004	<i>Microcosmus squamiger</i> de Santa Maria
MB37-000051	<i>Tricellaria inopinata</i>
MB37-000052	<i>Zoobotryon verticillatum</i>

## 2. Preparação dos extractos

Os solventes (diclorometano e metanol) usados na obtenção dos extractos eram analiticamente puros.

Após terem sido liofilizadas cada uma das amostras foi macerada num almofariz e submetida a extracção (4 ciclos de 24 horas, com renovação de solvente a cada 24 horas), primeiro com diclorometano (DCM) e depois com metanol (MeOH), à temperatura ambiente com agitação, usando uma razão de amostra/solvente de aproximadamente 1:8 (g/mL). No fim de cada ciclo, a fracção líquida foi separada por filtração. Cada extracto resultou da combinação das fracções líquidas obtidas com o mesmo solvente. O solvente de cada extracto foi evaporado sob vácuo a 40°C. Posteriormente, os extractos foram ainda secos até peso contante numa estufa a 40°C. Os extractos foram armazenados à temperatura ambiente e protegidos da luz até ao momento dos ensaios e fraccionamento cromatográfico. As massas obtidas de extracto encontram-se apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12. Rendimentos das extracções.

	Espécie	Data	Local de recolha	Peso fresco (em gramas)	Peso liofilizado (em gramas)	Peso do extracto (em gramas)	
Macroalgas	<i>Asparagopsis taxiformis</i>	20 - Agosto	São Miguel	168,54	12,50	DCM	0,556
						MeOH	1,353
	<i>Asparagopsis armata</i>	20 - Agosto	São Miguel	150,14	12,44	DCM	0,177
						MeOH	2,123
	<i>Codium fragile</i> subsp. <i>fragile</i>	8/9 - Agosto	Santa Maria	256,29	15,09	DCM	0,281
						MeOH	4,620
Macro-invertebrados	<i>Bugula neritina</i>	8 - Outubro	São Miguel	10,57	4,05	DCM	0,086
						MeOH	0,134
		7 - Agosto	Santa Maria	21,14	7,99	DCM	0,222
						MeOH	0,686
	<i>Tricellaria inopinata</i>	8 - Agosto	Santa Maria	41,08	7,00	DCM	0,103
						MeOH	0,289
	<i>Microcosmus squamiger</i>	9 - Agosto	Santa Maria	184,93	31,20	DCM	0,698
						MeOH	7,185
		3 - Outubro	São Miguel	313,85	42,76	DCM	0,809
						MeOH	8,517
<i>Zoobotryon verticillatum</i>	2 - Outubro	São Miguel	371,29	26,02	DCM	0,657	
					MeOH	4,140	

### 3. Fraccionamento dos extractos brutos

Os extractos que se revelaram mais activos e/ ou tinham maior massa foram submetidos a fraccionamento por cromatografia em coluna e em camada fina (TLC) preparativa, sendo as fracções obtidas re-cromatografadas, sempre que necessário, até à obtenção de compostos puros.

Todos os solventes orgânicos usados na eluição e purificação dos metabolitos secundários eram de qualidade p.a. ou bi-destilados.

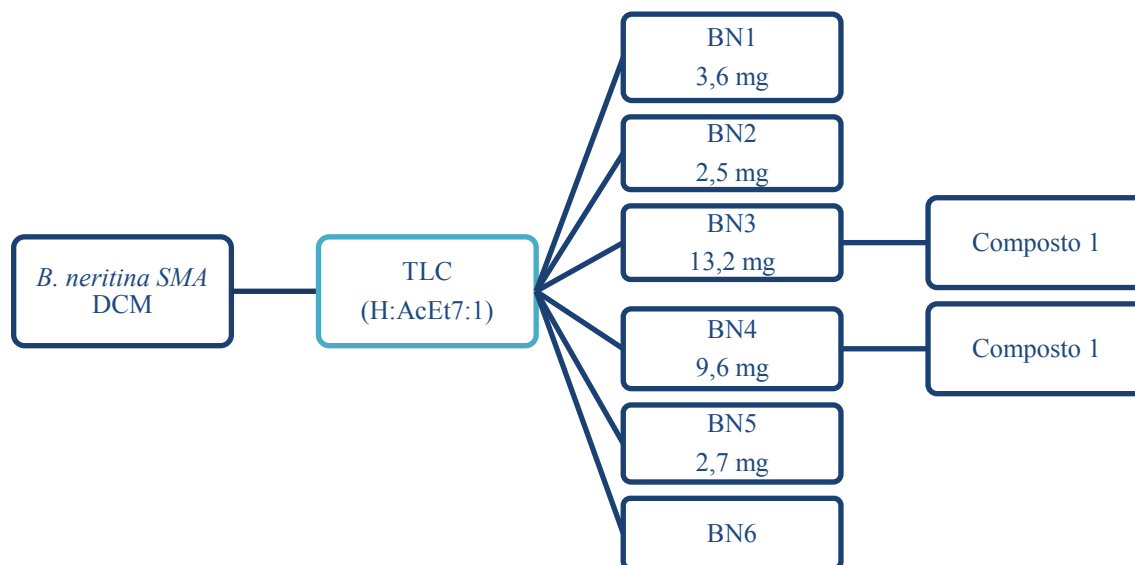
A otimização dos eluentes para cada separação cromatográfica foi efectuada recorrendo a cromatografia em camada fina analítica, em folhas plastificadas revestidas de sílica gel 60 GF<sub>254</sub> com indicador (*Merck*).

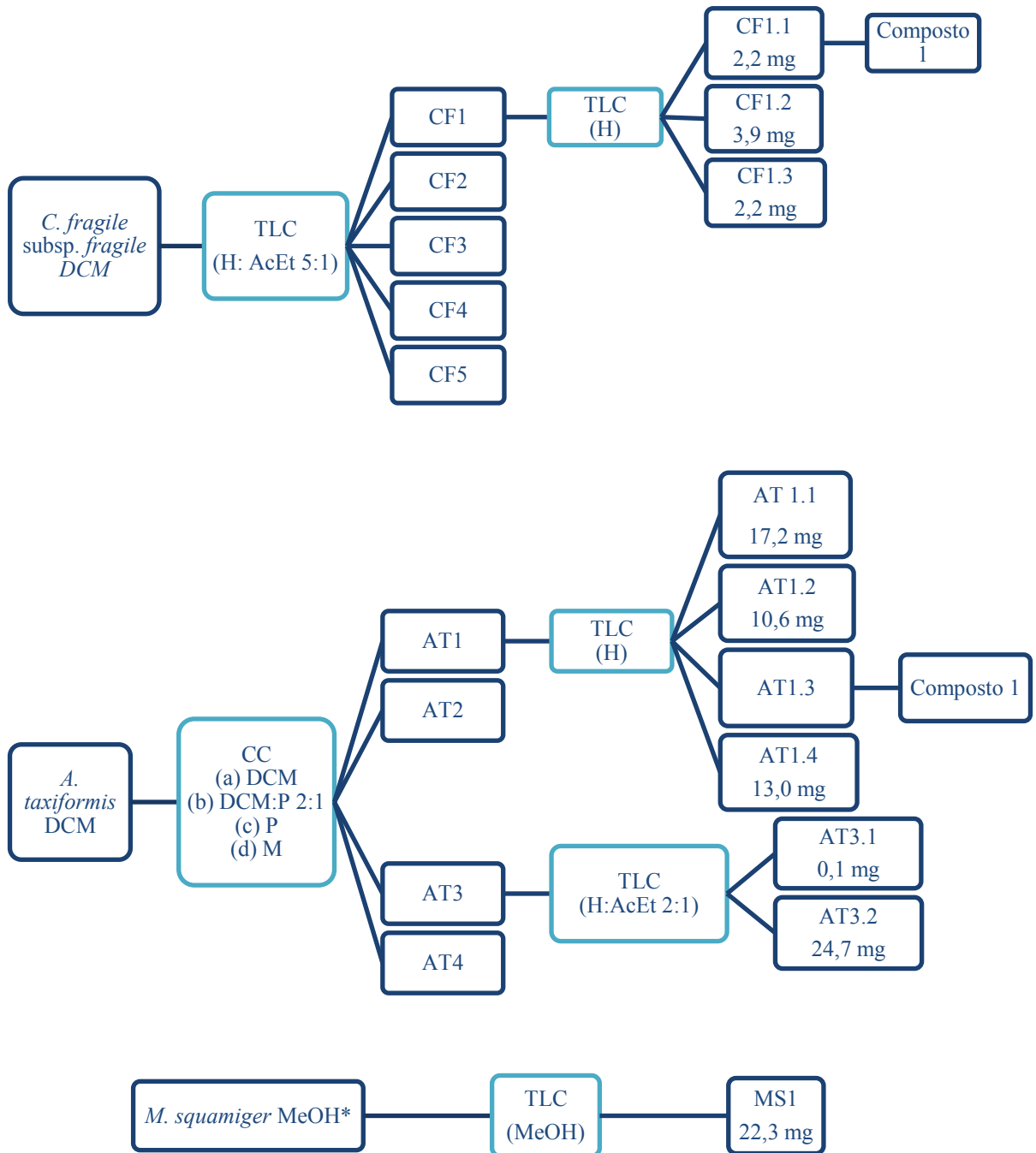
Os fraccionamentos por cromatografia em coluna foram efectuados usando como fase estacionária sílica gel 60, 230-400 Mesh (*Acne Synthetic Chemicals*) e as fracções obtidas foram posteriormente purificadas por TLC preparativo.

Nos fraccionamentos por TLC preparativo foram usadas placas de vidro (20 × 20 cm), previamente revestidas com uma camada (0,5 mm de espessura) de sílica gel 60 GF<sub>254</sub> (*Fluka*), e activadas na estufa a 110-115°C durante 12-14 horas. A detecção dos compostos foi realizada por observação das placas à luz UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm.

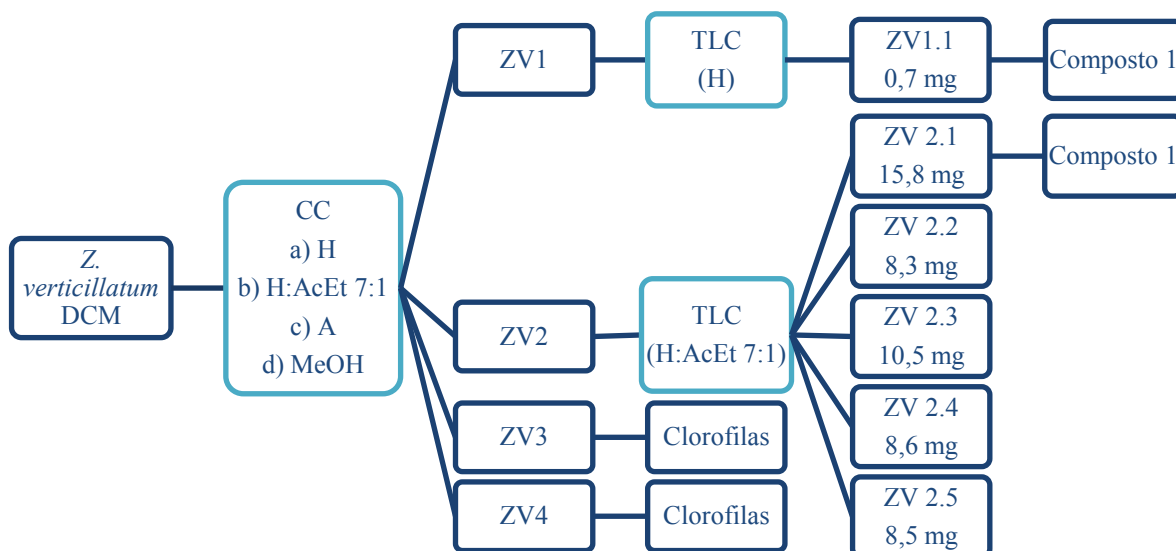
Os extractos de diclorometano das espécies *Codium fragile* ssp. *fragile*, *Asparagopsis taxiformis*, *Bugula neritina* (colhida em Santa Maria) e *Zoobotryon verticillatum* e a fracção solúvel em metanol do extracto de metanol de *Microcosmus squamiger* (colhido em Santa Maria) foram, separadamente, fraccionados por técnicas cromatograficas preparativas (CC e TLC) de acordo com os esquemas abaixo.

As sequências de fraccionamento e os solventes usados em cada caso são indicados de forma abreviada pelas iniciais do seu nome. Assim, H significa hexano; A- acetona; M- metanol; DCM- diclorometano; AcEt- acetato de etilo; P- 2-propanol.





\*Só foi analisado uma parte da fracção do extracto solúvel em metanol.

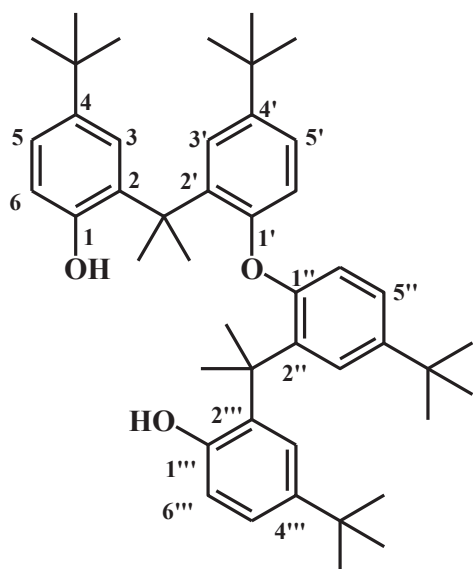


#### 4. Dados espectroscópicos dos compostos isolados

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HSQC e HMBC foram obtidos à temperatura ambiente recorrendo a espectrómetro de ressonância magnética nuclear, BRUKER AVANCE 300, operando a uma frequência de ressonância de próton e de carbono de 300,13 e 75,47 MHz, respetivamente. Os desvios químicos ( $\delta$ ) são expressos em ppm e as constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hz.

Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro Micromass Q-Tof-2TM, recorrendo-se à técnica de electrospray como fonte de ionização operando com o cone a 30 V. Os dados obtidos a partir dos espectros de massa são apresentados em termos de razão massa/carga ( $m/z$ ) dos iões correspondentes.

**Composto 1: Saliramofenol**

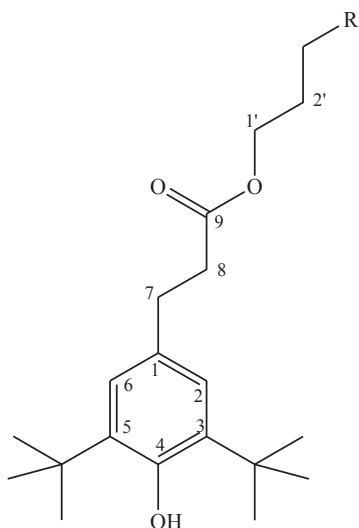


**RMN de  $^1\text{H}$  NMR (300,13 MHz)  $\delta$ :** 1,29 (*s*, 36H, 4, 4', 4'', 4''''-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,34 (*s*, 12H, 2, 2''-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 7,14 (*dd*, 4H, *J* = 2,4; 8,6 Hz, H-5, 5', 5'', 5'''); 7,36 (*d*, 2H, *J* = 2,4 Hz, H-3, 3''')\*, 7,37 (*d*, 2H, *J* = 2,4 Hz, H-3', 3''')\*, 7,54 (*d*, 4H, *J* = 8,6 Hz, H-6, 6', 6'', 6'''). (\* Podem estar trocados).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  NMR (75,47 MHz)  $\delta$ :** 30,2 (2, 2''-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 31,5 (4, 4', 4'', 4''''-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 34,5 (4, 4', 4'', 4''''-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 34,9 (2, 2''-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 119,1 (C-6, 6', 6'', 6'''), 124,0 (C-5, 5', 5'', 5'''), 124,5 (C-3, 3', 3'', 3'''), 138,4 (C-2', 2'')#, 138,6 (C-2, 2'')#, 147,1 (C-4, 4', 4'', 4'''), 147,6 (C-1, 1''')\*, 147,7 (C-1', 1'')\*. (\* e # Podem estar trocados entre si).

**EM (TOF MS ESI+) *m/z*:** 663 [M+H]<sup>+</sup> e 685 [M+Na]<sup>+</sup>.

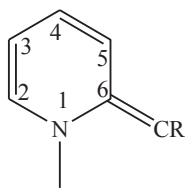
**Composto 2**



**RMN de  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>; 300,13 MHz)  $\delta$ :** 1,44 (*s*, 18H, 3, 5-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1,60 (*m*, 2H, H-2'), 2,60 (*t*, 2H, *J* = 8,0 Hz, H-8), 2,88 (*t*, 2H, *J* = 8,0 Hz, H-7), 5,08 (*s*, H, 4-OH), 7,00 (*s*, 2H, H-2,6).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>; 75,47 MHz)  $\delta$ :** 25,9 (C-3'), 28,7 (C-2'), 30,3 (3, 5-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 31,0 (C-7), 34,3 (3, 5-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 36,5 (C-8), 64,7 (C-1'), 124,8 (C-2, 6), 135,9 (C-3, 5), 152,1 (C-4), 173,4 (C-9).

### Composto 3



**RMN de  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CH}_3\text{OD}$ ; 500,13 MHz)  $\delta$ :** 4,42 (*s*, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7,93 (*dt*, 1H,  $J = 1,3; 6,3$  Hz, H-3); 8,07 (*d*, 1H,  $J = 7,6$  Hz, H-5), 8,52 (*dt*, 1H,  $J = 7,6; 0,9$  Hz, H-4), 8,76 (*d*, 1H,  $J = 6,3$  Hz, H-2).

**RMN de  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CH}_3\text{OD}$ ; 75,47 MHz)  $\delta$ :** 47,4 ( $\text{CH}_3$ ), 127,4\* (C-3), 127,5\* (C-5), 146,4 (C-2), 146,9 (C-4), 155,4 (C-6), 165,2 (6-C-C-R). (\* Podem estar trocados entre si).

**EM (TOF MS ESI+)  $m/z$ :** 160  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 182  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 198  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , e 319  $[\text{M}+\text{H}+\text{M}]^+$

## 5. Determinação das actividades biológicas *in vitro*

### 5.1. Actividade antitumoral

#### 5.1.1. Linhagens celulares

Foram testadas quatro linhagens celulares provenientes da ECACC (European Collection of cell Cultures), três das quais tumorais (HeLa, A549 e MCF-7) e uma não-tumoral, Vero, que serviu de controlo. A linhagem tumoral HeLa foi imortalizada a partir de células humanas de cancro do colo do útero, a linhagem tumoral A549 foi imortalizada a partir células humanas de cancro de pulmão e a linhagem tumoral MCF-7 a partir de células de cancro da mama. A linhagem não tumoral Vero foi estabelecida a partir de células isoladas de rim do macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops* Linnaeus, 1758.

#### 5.1.2. Cultura de células

Todas as linhagens foram cultivadas em monocamada, com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), suplementado com estreptomicina (750 U/mL)/penicilina (1000 U/mL), L-glutamina (2 mM) e ácido *p*-hidroxibenzóico (2x104 mg/mL). As células foram mantidas neste meio com soro fetal bovino (FBS) a 2% numa incubadora (SANYO CO2 Incubator) a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> e 80 % de humidade relativa [162].

### 5.1.3. Ensaaios antitumorais

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços (*Thermo Scientific Nunclon™ Δ delta surface*). Realizaram-se dois tipos de ensaio, (i) inibição de crescimento (fase *lag*) e (ii) citotoxicidade (fase *log*). No ensaio de fase *lag* foram adicionadas 20.000 células a cada poço das microplacas, num volume total de 100 µL, juntamente com os extractos a testar dissolvidos em DMEM com 2% de FBS. Neste tipo de ensaio as células ficaram sujeitas à acção dos compostos durante a fase inicial de adesão ao substrato. No ensaio de fase *log*, adicionaram-se 10.000 células a cada poço das microplacas em DMEM com 10% de FBS, deixando-as multiplicar durante 24h. Decorrido esse tempo aspirou-se o meio de cultura e adicionou-se os compostos às microplacas, dissolvidos em DMEM com 2% de FBS. Nestes ensaios os compostos foram assim adicionados às células na fase de crescimento exponencial.

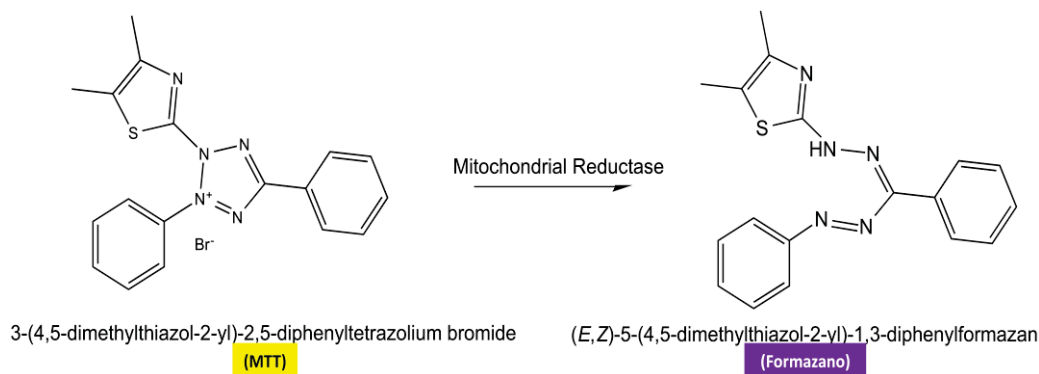
Os extractos testados nos ensaios foram dissolvidos em DMSO (Dimetilsulfóxido) numa concentração de 50 mg/mL (solução *stock*) e posteriormente diluídos em DMEM com 2% de FBS de modo a obter as concentrações necessárias. A concentração de DMSO no meio foi sempre inferior a 0,25% de modo a minimizar a interferência deste solvente. Estas concentrações foram obtidas através de diluições seriadas, sendo que a concentração máxima testada foi de 200 µg/mL, ficando estas soluções em contacto com as células durante 48h [162]. Foi utilizada como referência a colchicina.

### 5.1.4. Quantificação da viabilidade celular

Para a quantificação da viabilidade celular foi utilizado o MTT (3-(brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium). Este é um método colorimétrico que avalia a actividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, resultando na produção de cristais de formazano, intensamente coloridos de roxo, no interior das células. A reacção encontra-se representada no Esquema 1. Esta redução apenas ocorre quando as

redutases mitocondriais estão activas, pelo que é proporcional à quantidade de células vivas [162].

**Esquema 1.** Redução mitocondrial do MTT a Formazano [163].



Estes cristais foram dissolvidos num solvente orgânico, o DMSO, permitindo a sua quantificação através de espectrofotometria à absorvância de 550 nm com um leitor de microplacas (*Biorad Model 680*).

### 5.1.5. Determinação da $EC_{50}$

A  $EC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) corresponde à concentração de amostra necessária para causar 50% de inibição de crescimento ou viabilidade das células, utilizando-se como referência as células controlo em cada microplaca. O valor de  $EC_{50}$  foi calculado por interpolação da curva de inibição de crescimento em função da concentração de extracto.

## 5.2. Actividade anticolinesterásica

A actividade enzimática da Acetilcolinesterase (AChE) foi avaliada pelo método colorimétrico de Ellman [164] modificado por Arruda *et al.*, [165]. Este método baseia-se na medida da velocidade da produção de tiocolina através da hidrólise da acetilcolina, um análogo do substrato natural da AChE, a acetilcolina. A tiocolina reage com o chamado reagente de Ellman (DTNB ou Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico), formando uma mistura de dissulfetos e um anião amarelo (nitrobenzoato) com intensa absorção a

415 nm. As reacções que estão na base do método encontram-se representadas no Esquema 2:

**Esquema 2.** Reacções envolvidas no método empregue para monitorizar a actividade da AChE.



Neste caso foi quantificada a inibição da acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (Sigma Aldrich) na presença dos compostos a testar, em microplacas de 96 poços, de acordo com o descrito em Barreto *et al.* [166].

A solução da enzima acetilcolinesterase utilizada no ensaio tinha uma concentração 0,25 U/mL e foi preparada a partir da diluição de uma solução *stock* de 1000U/mL em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 com 0,1% de BSA. Esta solução foi dividida em aliquotas e armazenada a -80°C até ser utilizada nos ensaios.

As soluções *stock* dos extractos foram preparadas de acordo com o solvente em que estes foram extraídos. Os extractos metanólicos foram dissolvidos em metanol e os extractos de diclorometano foram dissolvidos em DMSO, sendo que a concentração das soluções *stock* foi de 50 mg/mL. Subsequentemente, as soluções *stock* dos extractos foram diluídas em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 8,0, e submetidas a diluições seriadas, de modo a obter as concentrações necessárias, sendo que a concentração máxima testada foi de 150 µg/mL. A concentração de DMSO no meio de ensaio foi sempre inferior a 0,25%, para minimizar a interferência deste solvente com a reacção enzimática.

A actividade da acetilcolinesterase foi monitorizada a uma absorvância de 415 nm num leitor de microplacas (*Biorad model 680*) aos 0, 2,5, 5 e 7,5 min. O efeito anticolinesterásico foi expressado como IC<sub>50</sub>, que corresponde à concentração de extracto ou composto que provoca uma inibição de 50% da actividade enzimática e foi utilizada como referência a galantamina.

### 5.3. Actividade antioxidante

A actividade antioxidante foi determinada através de um método espectrofotométrico, modificado a partir de Blois (1958) [167]. Este método permite avaliar a actividade de redução do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), de coloração púrpura, que absorve a 517 nm. O DPPH é reduzido pela acção de um antioxidante (AH) formando a difenil-picrilhiazina, de coloração amarela. A actividade antioxidante é quantificada pelo decréscimo da absorvância.

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços, colocando-se os compostos, em diluições seriadas, na presença de uma solução de DPPH a 0,04 mg/mL em metanol, utilizando-se como controlo poços da microplaca sem a presença de compostos. Ao fim de 30 minutos ao abrigo da luz, leu-se a absorvância a 515 nm e calculou-se a percentagem de actividade antioxidante (AA%) utilizando a seguinte fórmula:

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

Ac é a absorvância do controlo e As é a absorvância da amostra. Esta percentagem de actividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH neutralizada pelo antioxidante. Sempre que possível expressou-se a actividade em EC<sub>50</sub> correspondente à quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração do radical a 50% (EC<sub>50</sub>). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor é o seu EC<sub>50</sub> e maior a sua actividade antioxidante. A concentração máxima testada foram 250 µg/mL.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] WHO, “WHO Projections of mortality and causes of death, br 2015 and 2030,” 2013. [Online]. Available: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/projections/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/). [Accessed: 19-Mar-2014].
- [2] M. Goedert e M. G. Spillantini, “A century of Alzheimer’s disease.,” *Science*, vol. 314, pp. 777–781, 2006.
- [3] M. Singh, M. Kaur, H. Kukreja, R. Chugh, O. Silakari, e D. Singh, “Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection.,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 70, pp. 165–188, 2013.
- [4] J. W. Blunt, B. R. Copp, R. A. Keyzers, M. H. G. Munro, e M. R. Prinsep, “Marine natural products.,” *Nat. Prod. Rep.*, vol. 30, no. 2, pp. 237–323, 2013.
- [5] G. M. Cragg e D. J. Newman, “Natural products: a continuing source of novel drug leads.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1830, pp. 3670–3695, 2013.
- [6] G. M. König, A. D. Wright, O. Sticher, C. K. Angerhofer, e J. M. Pezzuto, “Biological Activities of Selected Marine Natural Products,” *Planta Med.*, vol. 60, pp. 532–537, 1994.
- [7] R. M. Callaway e W. M. Ridenour, “Novel Weapons: Invasive Success and the Evolution of Increased Competitive Ability,” *Front. Ecol. Environ.*, vol. 2, p. 436, 2004.
- [8] J. G. Ehrenfeld, “Ecosystem Consequences of Biological Invasions,” *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, vol. 41, pp. 59–80, 2010.
- [9] S. Katsanevakis, I. Wallentinus, Z. Argyro, E. Leppäkoski, M. E. Çinar, O. Bayram, M. Grabowski, D. Golani, e A. C. Cardoso, “Impacts of invasive alien marine species on ecosystem services and biodiversity: A pan-European review,” *Aquat. invasions*, vol. 9, pp. 1–58, 2014.
- [10] F. Cardigos, F. Tempera, S. Ávila, J. Gonçalves, A. Colaço, e R. S. Santos, “Non-indigenous marine species of the Azores,” *Helgol. Mar. Res.*, vol. 60, pp. 160–169, 2006.
- [11] N. Bax, A. Williamson, M. Aguero, E. Gonzalez, e W. Geeves, “Marine invasive alien species: a threat to global biodiversity,” *Mar Policy*, vol. 27, pp. 313–323, 2003.
- [12] F. R. Trainor, *Introductory Phycology*, vol. 10, no. 2. New York: John Wiley & Sons, 1978, pp. 1–12.
- [13] H. C. Bold e M. J. Wynne, *Introduction to the algae: Structure and reproduction*, 2nd ed. New Jersey: Prentice Hall, 1985, pp. 1–720.
- [14] C. J. Dawes, *Marine Botany*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1998, pp. 1–5.
- [15] P. MacArtain, C. I. R. Gill, M. Brooks, R. Campbell, e I. R. Rowland, “Nutritional Value of Edible Seaweeds,” *Nutr. Rev.*, vol. 65, pp. 535–543, 2007.
- [16] M. Černá, “Seaweed proteins and amino acids as nutraceuticals.,” *Adv. Food Nutr. Res.*, vol. 64, pp. 297–312, 2011.

- [17] L. Mišurcová, S. Škrovánková, D. Samek, J. Ambrožová, e L. Machů, “Health benefits of algal polysaccharides in human nutrition.,” *Adv. Food Nutr. Res.*, vol. 66, pp. 75–145, 2012.
- [18] N. Rajapakse e S. Kim, “Nutritional and digestive health benefits of seaweed.,” *Adv. Food Nutr. Res.*, vol. 64, pp. 17–28, 2011.
- [19] M. Tabarsa, M. Rezaei, Z. Ramezanzpour, e J. R. Waaland, “Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source.,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 92, pp. 2500–2506, 2012.
- [20] P. B. Andrade, M. Barbosa, R. P. Matos, G. Lopes, J. Vinholes, T. Mouga, e P. Valentão, “Valuable compounds in macroalgae extracts.,” *Food Chem.*, vol. 138, pp. 1819–1828, 2013.
- [21] G. Jiao, G. Yu, J. Zhang, e H. S. Ewart, “Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae.,” *Mar. Drugs*, vol. 9, pp. 196–223, 2011.
- [22] J. Lee, M. Hou, H. Huang, F. Chang, C. Yeh, J. Tang, e H. Chang, “Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties.,” *Cancer Cell Int.*, vol. 13, p. 55, 2013.
- [23] N. Andreakis, G. Procaccini, e W. Kooistra, “*Asparagopsis taxiformis* and *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta): genetic and morphological identification of Mediterranean populations,” *Eur. J. Phycol.*, vol. 3, pp. 273–283, 2004.
- [24] J. Feldmann e G. Feldmann, “Récherches sur les Bonnemaisoniacées et leur alternances de générations,” *Ann. Sci. Nat. Sér II*, vol. 3, pp. 75–175, 1942.
- [25] M. D. Guiry e G. M. Guiry, “AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway.,” <http://www.algaebase.org>, 2013. [Online]. Available: [http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=636](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=636). [Accessed: 20-Nov-2013].
- [26] I. A. Abbott e E. H. Williamson, “Limu. An ethnobotanic study of some edible Hawaiian seaweeds.,” *Bull. Pacif. Trop. Bot. Gard.*, vol. 4, pp. 1–21, 1974.
- [27] J. J. Bolton, N. Andreakis, e R. J. Anderson, “Molecular evidence for three separate cryptic introductions of the red seaweed *Asparagopsis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) in South Africa,” *African J. Mar. Sci.*, vol. 33, pp. 263–271, 2011.
- [28] O. McConnell e W. Fenical, “Halogen chemistry of the red alga *Asparagopsis*,” *Phytochemistry*, vol. 16, pp. 367–374, 1977.
- [29] F. X. Woolard, R. E. Moore, e P. P. Roller, “Halogenated acetic and acrylic acids from the red alga *Asparagopsis taxiformis*.,” *Phytochemistry*, vol. 18, pp. 617–620, 1979.
- [30] L. D. S. Ferreira, I. C. C. Turatti, N. P. Lopes, T. Guaratini, P. Colepicolo, E. C. Oliveira Filho, e R. C. Garla, “Apolar compounds in seaweeds from fernando de noronha archipelago (northeastern coast of Brazil).,” *Int. J. Anal. Chem.*, vol. 2012, pp. 1–5, 2012.
- [31] B. J. Bureson, R. E. Moore, e P. P. Roller, “Volatile halogen compounds in the alga *Asparagopsis taxiformis* Rhodophyta,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 24, pp. 856–861, 1976.
- [32] I. S. Hornsey e D. Hide, “The production of antimicrobial compounds by British marine algae II. Seasonal variation in production of antibiotics.,” *Br. Phycol. J.*, vol. 11, pp. 63–67, 1976.

- [33] I. S. Hornsey e D. Hide, "The production of antimicrobial compounds by British marine algae. IV. Variation of antimicrobial activity with algal generation," *Br. Phycol. J.*, vol. 20, pp. 21–25, 1985.
- [34] G. Genovese, S. Leitner, S. A. Minicante, e C. Lass-Flörl, "The Mediterranean red alga *Asparagopsis taxiformis* has antifungal activity against *Aspergillus* species.," *Mycoses*, vol. 56, pp. 516–519, 2013.
- [35] G. Genovese, C. Faggio, C. Gugliandolo, A. Torre, A. Spanò, M. Morabito, e T. L. Maugeri, "In vitro evaluation of antibacterial activity of *Asparagopsis taxiformis* from the Straits of Messina against pathogens relevant in aquaculture.," *Mar. Environ. Res.*, vol. 73, pp. 1–6, 2012.
- [36] A. González del Val, G. Platas, A. Basilio, A. Cabello, J. Gorrochategui, I. Suay, F. Vicente, E. Portillo, M. Jiménez del Río, G. G. Reina, e F. Peláez, "Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain)," *Int. Microbiol.*, vol. 4, pp. 35–40, 2001.
- [37] M. A. Rizvi e M. Shameel, "In vitro nematocidal activities of seaweed extracts from Karachi coast," *Pakistan J. Bot.*, vol. 38, pp. 1245–1248, 2006.
- [38] B. Jha, K. Kavita, J. Westphal, A. Hartmann, e P. Schmitt-Kopplin, "Quorum sensing inhibition by *Asparagopsis taxiformis*, a marine macro alga: separation of the compound that interrupts bacterial communication.," *Mar. Drugs*, vol. 11, pp. 253–265, 2013.
- [39] A. Manilal, S. Sujith, B. Sabarathnam, G. S. Kiran, e J. Selvin, "Bioactivity of the red algae *Asparagopsis taxiformis* collected from the southwestern coast of India," *Brazilian J. Oceanogr.*, vol. 58, pp. 93–100, 2010.
- [40] K. S. Hutson, L. Mata, N. A. Paul, and R. de Nys, "Seaweed extracts as a natural control against the monogenean ectoparasite, *Neobenedenia* sp., infecting farmed barramundi (*Lates calcarifer*).," *Int. J. Parasitol.*, vol. 42, pp. 1135–1141, 2012.
- [41] G. Genovese, L. Tedone, M. T. Hamann, e M. Morabito, "The Mediterranean red alga *Asparagopsis*: a source of compounds against *Leishmania*.," *Mar. Drugs*, vol. 7, pp. 361–6, 2009.
- [42] G. S. El-Baroty, M. Y. Moussa, M. A. Shallan, M. A. Ali, A. Z. Sabh, e E. A. Shalaby, "Contribution to the Aroma , Biological Activities , Minerals , Protein , Pigments and Lipid Contents of the Red Alga : *Asparagopsis taxiformis* ( Delile ) Trevisan," *J. Appl. Sci. Res.*, vol. 3, pp. 1825–1834, 2007.
- [43] A. Manilal, S. Sujith, J. Selvin, N. Panikkar, Mamkoottahil Velayudhan, e G. Shiney, "Anticoagulant potential of polysaccharide from the indian red alga, *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan," *Thalassas*, vol. 28, pp. 9–15, 2012.
- [44] S. Greff, M. Zubia, G. Genta-Jouve, L. Massi, T. Perez, e O. P. Thomas, "Mahorones, highly brominated cyclopentenones from the red alga *Asparagopsis taxiformis*.," *J. Nat. Prod.*, vol. 77, pp. 1150–5, 2014.
- [45] H. B. S. Womersley, "The marine benthic algae of southern Australia. Rhodophyta. Part IIIb. Gracilariales, Rhodymeniales, Corallinales and Bonnemaisoniales.," *Canberra Aust. Biol. Resour. Study State Herb. South Aust.*, vol. 5, pp. 1–392, 1996.
- [46] M. Skewes, "*Asparagopsis armata*. Harpoon weed. Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key," *Plymouth*, 2003. [Online]. Available: <http://www.marlin.ac.uk/speciesinformation.php?speciesID=2643>. [Accessed: 03-Nov-2014].

- [47] C. Alves, S. Pinteus, A. Rodrigues, e R. Pedrosa, “*Sphaerococcus coronopifolius* and *Asparagopsis armata* induced cytotoxicity against HEPG2 cell line,” *Eur. Biotechnol. Congr.*, vol. 22S, pp. 44–45, 2011.
- [48] N. Salvador, A. G. Garreta, L. Lavelli, e M. A. Ribera, “Antimicrobial activity of Iberian macroalgae,” *Sci. Mar.*, vol. 71, pp. 101–113, 2007.
- [49] A. Bansemir, M. Blume, S. Schröder, e U. Lindequist, “Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria,” *Aquaculture*, vol. 252, pp. 79–84, 2006.
- [50] N. A. Paul, R. De Nys, e P. D. Steinberg, “Chemical defence against bacteria in the red alga *Asparagopsis armata* : linking structure with function,” *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol. 306, pp. 87–101, 2006.
- [51] C. Haslin, M. Lahaye, M. Pellegrini, e J. C. Chermann, “In vitro anti-HIV activity of sulfated cell-wall polysaccharides from gametic, carposporic and tetrasporic stages of the Mediterranean red alga *Asparagopsis armata*,” *Planta Med.*, vol. 67, pp. 301–305, 2001.
- [52] C. Theriault, “Marine Invasive Species in Nova Scotia,” *Nova Scotia*, 2001. [Online]. Available: <http://myweb.dal.ca/rescheib/codium.html>. [Accessed: 03-Nov-2014].
- [53] D. A. Lyons, K. L. Van Alstyne, e R. E. Scheibling, “Anti-grazing activity and seasonal variation of dimethylsulfoniopropionate-associated compounds in the invasive alga *Codium fragile* ssp. *tomentosoides*,” *Mar. Biol.*, vol. 153, pp. 179–188, 2007.
- [54] R. E. Scheibling, D. A. Lyons, e C. B. T. Sumi, “Grazing of the invasive alga *Codium fragile* ssp. *tomentosoides* by the common periwinkle *Littorina littorea*: Effects of thallus size, age and condition,” *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, vol. 355, pp. 103–113, 2008.
- [55] J. Spavieri, M. Kaiser, R. Casey, S. Hingley-Wilson, A. Lalvani, G. Blunden, e D. Tasdemir, “Antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic potential of some british green algae,” *Phytother. Res.*, vol. 24, pp. 1095–1098, 2010.
- [56] Y. Ohta, J.-B. Lee, K. Hayashi, e T. Hayashi, “Isolation of sulfated galactan from *Codium fragile* and its antiviral effect,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 32, pp. 892–898, 2009.
- [57] J.-B. Lee, K. Hayashi, M. Maeda, e T. Hayashi, “Antiherpetic activities of sulfated polysaccharides from green algae,” *Planta Med.*, vol. 70, pp. 813–817, 2004.
- [58] L. J. Villarreal-Gómez, I. E. Soria-Mercado, G. Guerra-Rivas, e N. E. Ayala-Sánchez, “Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface,” *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, vol. 45, pp. 267–275, 2010.
- [59] M. Tabarsa, S. Karnjanapratum, M. Cho, J.-K. Kim, e S. You, “Molecular characteristics and biological activities of anionic macromolecules from *Codium fragile*,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 59, pp. 1–12, 2013.
- [60] A. D. Kim, Y. Lee, S.-H. Kang, G. Y. Kim, H. S. Kim, e J. W. Hyun, “Cytotoxic effect of clerosterol isolated from *Codium fragile* on A2058 human melanoma cells,” *Mar. Drugs*, vol. 11, pp. 418–30, 2013.
- [61] J.-B. Lee, Y. Ohta, K. Hayashi, e T. Hayashi, “Immunostimulating effects of a sulfated galactan from *Codium fragile*,” *Carbohydr. Res.*, vol. 345, pp. 1452–1454, 2010.
- [62] MarineBio Conservation Society, “Marine Invertebrates - MarineBio.org.” [Online]. Available: <http://marinebio.org/oceans/marine-invertebrates/>. [Accessed: 28-Oct-2014].

- [63] J. Scholz, K. Nakajima, T. Nishikawa, J. Kaselowsky, e S. F. Mawatari, “First discovery of *Bugula stolonifera* Ryland, 1960 ( Phylum Bryozoa ) in Japanese waters, as an alien species to the Port of Nagoya,” *Bull. Nagoya Univ. Museum*, vol. 19, pp. 9–19, 2003.
- [64] J. W. Blunt, B. R. Copp, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, e M. R. Prinsep, “Marine natural products,” *Nat. Prod. Rep.*, vol. 21, pp. 1–49, 2004.
- [65] A. Kijjoo e P. Sawangwong, “Drugs and Cosmetics from the Sea,” *Mar. Drugs*, vol. 2, pp. 73–82, 2004.
- [66] J. S. Ryland e P. J. Hayward, “British Anascan Bryozoans. Keys and notes for the identification of species,” in *Linnean Society Synopses of the British Fauna*, 10th ed., London: Academic Press, 1977, p. 150.
- [67] J. Ryland, J. Bishop, H. De Blauwe, A. El Nagar, D. Minchin, C. Wood, e A. Yunnie, “Alien species of *Bugula* (Bryozoa) along the Atlantic coasts of Europe,” *Aquat. Invasions*, vol. 6, pp. 17–31, 2011.
- [68] S. K. Davidson e M. G. Haygood, “Identification of sibling species of the bryozoan *Bugula neritina* that produce different anticancer bryostatins and harbor distinct strains of the bacterial symbiont ‘*Candidatus Endobugula sertula*’,” *Biol. Bull.*, vol. 196, pp. 273–280, 1999.
- [69] S. K. Davidson, S. W. Allen, G. E. Lim, C. M. Anderson, e M. G. Haygood, “Evidence for the Biosynthesis of Bryostatins by the Bacterial Symbiont ‘*Candidatus Endobugula sertula*’ of the Bryozoan *Bugula neritina*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, pp. 4531–4537, 2001.
- [70] N. Lopanik, N. Lindquist, e N. Targett, “Potent cytotoxins produced by a microbial symbiont protect host larvae from predation,” *Oecologia*, vol. 139, pp. 131–139, 2004.
- [71] G. E. Lim-Fong, L. A. Regali, e M. G. Haygood, “Evolutionary relationships of ‘*Candidatus endobugula*’ bacterial symbionts and their *Bugula* bryozoan hosts,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, pp. 3605–3609, 2008.
- [72] N. B. Lopanik, N. M. Targett, e N. Lindquist, “Ontogeny of a symbiont-produced chemical defense in *Bugula neritina* (Bryozoa),” *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol. 327, pp. 183–191, 2006.
- [73] R. Mutter e M. Wills, “Chemistry and clinical biology of the bryostatins,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 8, pp. 1841–1860, 2000.
- [74] F. Mangialasche, A. Solomon, B. Winblad, P. Mecocci, e M. Kivipelto, “Alzheimer’s disease: clinical trials and drug development,” *Lancet Neurol.*, vol. 9, pp. 702–716, 2010.
- [75] R. J. Morgan, L. Leong, W. Chow, D. Gandara, P. Frankel, A. Garcia, H.-J. Lenz, e J. H. Doroshow, “Phase II trial of bryostatin-1 in combination with cisplatin in patients with recurrent or persistent epithelial ovarian cancer: a California cancer consortium study,” *Invest. New Drugs*, vol. 30, pp. 723–728, 2012.
- [76] N. Kedei, A. Telek, A. Czap, E. S. Lubart, G. Czifra, D. Yang, J. Chen, T. Morrison, P. K. Goldsmith, L. Lim, P. Mannan, S. H. Garfield, M. B. Kraft, W. Li, G. E. Keck, e P. M. Blumberg, “The synthetic bryostatin analog Merle 23 dissects distinct mechanisms of bryostatin activity in the LNCaP human prostate cancer cell line,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 81, pp. 1296–1308, 2011.
- [77] F. Yang, H. Zhang, J. Chen, H. Tang, S.-J. Piao, W.-S. Chen, e H.-W. Lin, “New cytotoxic oxygenated sterols from marine bryozoan *Bugula neritina*,” *Nat. Prod. Res. Former. Nat. Prod. Lett.*, vol. 25, pp. 1505–1511, 2011.

- [78] B. S. Galil e A. Occhipinti-Ambrogi, “*Tricellaria inopinata*,” *DAISIE European Invasive Alien Species Gateway*, 2006. [Online]. Available: <http://www.europealiens.org/speciesFactsheet.do?speciesId=50567>. [Accessed: 08-Oct-2014].
- [79] “DAISIE European Invasive Alien Species Gateway.” [Online]. Available: <http://www.europealiens.org/>. [Accessed: 08-Oct-2014].
- [80] P. Bock e D. Gordon, “WoRMS - World Register of Marine Species - *Tricellaria inopinata* d’Hondt & Occhipinti Ambrogi, 1985,” *World Register of Marine Species*, 2014. [Online]. Available: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=111254>. [Accessed: 15-May-2014].
- [81] H. Blawe, *Mosdiertjes van de Zuidelijke bocht van de Noordzee: Determinatiewerk voor België en Nederland*. Oostende, 2009, p. 445.
- [82] A. O. Ambrogi e J. L. D’Hondt, “The invasion ecology of into the lagoon of Venice: morphological notes on larva and ancestrula,” in *Biology and Palaeobiology of Bryozoans*, P. Hayward, J. Ryland, and P. Taylor, Eds. 1994, pp. 139–144.
- [83] P. E. J. Dyrinda, V. R. Fairall, A. Occhipinti Ambrogi, e J.-L. D’Hondt, “The distribution, origins and taxonomy of *Tricellaria inopinata* d’Hondt and Occhipinti Ambrogi, 1985, an invasive bryozoan new to the Atlantic,” *J. Nat. Hist.*, vol. 34, pp. 1993–2006, 2000.
- [84] H. De Blauwe e M. Faasse, “Extension of the range of the Bryozoans *Tricellaria inopinata* and *Bugula simplex* in the north-east Atlantic ocean (Bryozoa: Cheilostomatida),” *Ned. Faun. Meded.*, vol. 14, pp. 103–112, 2001.
- [85] A. Marchini, M. R. Cunha, e A. Occhipinti-Ambrogi, “First observations on bryozoans and entoprocts in the Ria de Aveiro (NW Portugal) including the first record of the Pacific invasive cheilostome *Tricellaria inopinata*,” *Mar. Ecol.*, vol. 28, pp. 154–160, 2007.
- [86] G. Corriero, C. Longo, M. Mercurio, A. Marchini, e A. Occhipinti-Ambrogi, “Porifera and Bryozoa on artificial hard bottoms in the Venice Lagoon: Spatial distribution and temporal changes in the northern basin,” *Ital. J. Zool.*, vol. 74, pp. 21–29, 2007.
- [87] A. Lodola, D. Savini, e A. Occhipinti-Ambrogi, “First record of *Tricellaria inopinata* (Bryozoa: Candidae) in the harbours of La Spezia and Olbia, Western Mediterranean Sea (Italy),” *Mar. Biodivers. Rec.*, vol. 5, pp. 1–7, 2012.
- [88] C. Johnson, J. Winston, e R. Woollacott, “Western Atlantic introduction and persistence of the marine bryozoan *Tricellaria inopinata*,” *Aquat. Invasions*, vol. 7, pp. 295–303, 2012.
- [89] E. Cook, J. Stehlíková, C. Beveridge, M. Burrows, H. De Blauwe, e M. Faasse, “Distribution of the invasive bryozoan *Tricellaria inopinata* in Scotland and a review of its European expansion,” *Aquat. Invasions*, vol. 8, pp. 281–288, 2013.
- [90] K. Hayes, C. Sliwa, S. Migus, F. Mcennulty, e P. Dunstan, “National priority pests: Part II Ranking of Australian marine pests,” 2005.
- [91] G. Benavides, D. Renoud, e K. Wasson, “Least wanted aquatic invader. For Elkhorn slough and the Monterey Bay area,” 2002. [Online]. Available: <http://www.elkhornslough.org/invader>. [Accessed: 12-Dec-2013].
- [92] K. Hill, “Smithsonian Marine Station at Fort Pierce,” 2001. [Online]. Available: [http://www.sms.si.edu/irlSpec/Zoobot\\_vertic.htm](http://www.sms.si.edu/irlSpec/Zoobot_vertic.htm). [Accessed: 12-Dec-2013].

- [93] L. Gossett, J. Lester, e L. Gonzalez, “Galveston Bay Invasive Species Risk Assessment Final Report,” Texas, 2004.
- [94] P. Bock, D. Gordon, e P. Hayward, “WoRMS - World Register of Marine Species - *Zoobotryon verticillatum* (Delle Chiaje, 1822),” Bock, P.; Gordon, D. (2013) *World List of Bryozoa*. Accessed through: *World Register of Marine Species*, 2013. [Online]. Available: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=111670>. [Accessed: 12-Dec-2013].
- [95] J. N. Amat e F. Tempera, “*Zoobotryon verticillatum* Della Chiaje, 1822 (Bryozoa), a new occurrence in the archipelago of the Azores (North-Eastern Atlantic).,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 58, pp. 761–764, 2009.
- [96] A. Sato e W. Fenical, “Gramine-derived bromo-alkaloids from the marine bryozoan *Zoobotryon verticillatum*,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 24, pp. 481–484, 1983.
- [97] M. J. Ortega, E. Zubía, e J. Salvá, “A New Brominated Indole-3-carbaldehyde from the Marine Bryozoan *Zoobotryon verticillatum*,” *J. Nat. Prod.*, vol. 56, pp. 633–636, 1993.
- [98] N. M. Robinson, “Interactions between the nudibranch *Okenia zoobotryon* and its bryozoan prey *Zoobotryon verticillatum*,” University of Central Florida, 2004.
- [99] K. Kon-ya, N. Shimidzu, K. Adachi, e W. Miki, “*Zoobotryon pellucidum* an Antifouling Substance from the Marine Bryozoan In our screening for antifouling substances using laboratory-reared larvae of the barnacle *Balanus amphitrite*, the crude extract of the marine bryozoan *Zoobotryon pellucidum* exhibit,” *Fish. Sci.*, vol. 60, pp. 773–775, 1994.
- [100] K. Mochida e K. Fujii, *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Tokyo: Springer Japan, 2009, pp. 148–160.
- [101] H. Yamamoto, A. Tachibana, S. Kawaii, K. Matsumura, e N. Fusetani, “Serotonin involvement in larval settlement of the barnacle, *Balanus amphitrite*,” *J. Exp. Zool.*, vol. 275, pp. 339–345, 1996.
- [102] P. Yedukondala Rao e C. R. Sarma, “Some biochemical compounds of bryozoan, *Zoobotryon verticillatum* (Delle Chiaje, 1828) in the inner harbor of Visakhapatnam, east coast of India,” *Adv. Appl. Sci. Res.*, vol. 4, pp. 355–362, 2013.
- [103] R. Sankar, A. Murugan, e V. Sivakumar, “Anti-inflammatory, Anti-ulcer, Antipyretic, Analgesic and Cns Stimulant Activities of Marine Bryozoan *Zoobotryon verticillatum*,” *Pharmacologia*, vol. 4, pp. 15–21, 2013.
- [104] J. W. Blunt, B. R. Copp, R. a Keyzers, M. H. G. Munro, e M. R. Prinsep, “Marine natural products,” *Nat. Prod. Rep.*, vol. 31, pp. 160–258, 2014.
- [105] N. Shenkar, A. Gittenberger, G. Lambert, M. Rius, R. Moreira Da Rocha, B. J. Swalla, e X. Turron, “Ascidacea World Database,” 2014. [Online]. Available: <http://www.marinespecies.org/ascidiacea>. [Accessed: 12-Feb-2014].
- [106] S. L. Teo e J. S. Ryland, “Toxicity and palatability of some British ascidians,” *Mar. Biol.*, vol. 120, pp. 297–303, 1994.
- [107] J. B. McClintock, M. O. Amsler, C. D. Amsler, K. J. Southworth, C. Petrie, e B. J. Baker, “Biochemical composition, energy content and chemical antifeedant and antifoulant defenses of the colonial Antarctic ascidian *Distaplia cylindrica*,” *Mar. Biol.*, vol. 145, pp. 885–894, 2004.
- [108] P. Kott, “The Australian Ascidacea . Part 1 , Phlebobranchia and Stolidobranchia,” *Mem. Queensl. Museum*, vol. 23, pp. 1–439, 1985.

- [109] M. Rius, X. Turon, G. M. Dias, e D. J. Marshall, “Propagule size effects across multiple life-history stages in a marine invertebrate,” *Funct. Ecol.*, vol. 24, pp. 685–693, 2010.
- [110] X. Turon, T. Nishikawa, e M. Rius, “Spread of *Microcosmus squamiger* (Asciacea: Pyuridae) in the Mediterranean Sea and adjacent waters,” *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, vol. 342, pp. 185–188, 2007.
- [111] C. C. Lambert e G. Lambert, “Non-indigenous ascidians in southern California harbors and marinas,” *Mar. Biol.*, vol. 130, pp. 675–688, 1998.
- [112] R. W. Ruddon, *Cancer Biology*. 2007, pp. 1–530.
- [113] T. Finkel, M. Serrano, e M. a Blasco, “The common biology of cancer and ageing,” *Nature*, vol. 448, pp. 767–74, 2007.
- [114] W. M. Becker, L. J. Kleinsmith, e J. Hardin, “The cell cycle: DNA Replication, Mitosis, and Cancer,” in *The World of the Cell*, 5th ed., B. Cummings, Ed. San Francisco, 2003, p. 802.
- [115] W. M. Becker, L. J. Kleinsmith, e J. Hardin, “The cell cycle: DNA Replication, Mitosis, e Cancer,” in *The World of the Cell*, 5th ed., B. Cummings, Ed. San Francisco, 2003, p. 802.
- [116] K. Burgoine, “Stabilising G-quadruplex DNA - A New Cancer Cure?,” *Imperial College, London*, 2013. [Online]. Available: <http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/burgoine/homepage.txt.html>. [Accessed: 31-Oct-2014].
- [117] P. P. Hsu e D. M. Sabatini, “Cancer cell metabolism: Warburg and beyond,” *Cell*, vol. 134, pp. 703–7, 2008.
- [118] J. Ferlay, I. Soerjomataram, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman, e F. Bray, “GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet],” *International Agency for Research on Cancer*, 2013. [Online]. Available: <http://globocan.iarc.fr>. [Accessed: 12-Feb-2014].
- [119] J. A. Boyette-Davis, J. P. Cata, L. C. Driver, D. M. Novy, B. M. Bruel, D. L. Mooring, G. Wendelschafer-Crabb, W. R. Kennedy, e P. M. Dougherty, “Persistent chemoneuropathy in patients receiving the plant alkaloids paclitaxel and vincristine,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 71, pp. 619–626, 2013.
- [120] J. M. Pezzuto, “Plant-derived anticancer agents,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 53, pp. 121–133, 1997.
- [121] G. M. Cragg e D. J. Newman, “Plants as a source of anti-cancer agents,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 100, pp. 72–79, 2005.
- [122] C. P. Ferri, R. Sousa, E. Albanese, W. S. Ribeiro, e M. Honyashiki, “World Alzheimer Report 2009,” London, 2009.
- [123] T. Silva, J. Reis, J. Teixeira, e F. Borges, “Alzheimer’s disease, enzyme targets and drug discovery struggles: from natural products to drug prototypes,” *Ageing Res. Rev.*, vol. 15, pp. 116–45, 2014.
- [124] T. M. Rees e S. Brimijoin, “The role of acetylcholinesterase in the pathogenesis of Alzheimer’s disease,” *Drugs of Today*, vol. 39, p. 75, 2003.
- [125] B. G. Katzung, “Introduction to autonomic pharmacology,” in *Basic & clinical pharmacology*, 8th ed., The McGraw Hill Companies, Ed. New York, 2001, pp. 75–91.

- [126] T. M. Rees e S. Brimijoin, “The role of acetylcholinesterase in the pathogenesis of Alzheimer’s disease,” *Drugs of Today*, vol. 39, p. 75, 2003.
- [127] H. M. Greenblatt, H. Dvir, I. Silman, e J. L. Sussman, “Acetylcholinesterase: a multifaceted target for structure-based drug design of anticholinesterase agents for the treatment of Alzheimer’s disease.,” *J. Mol. Neurosci.*, vol. 20, pp. 369–83, 2003.
- [128] T. Silva, J. Reis, J. Teixeira, e F. Borges, “Alzheimer’s disease, enzyme targets and drug discovery struggles: from natural products to drug prototypes.,” *Ageing Res. Rev.*, vol. 15, pp. 116–45, May 2014.
- [129] L. Fang, S. Gou, X. Fang, L. Cheng, e C. Fleck, “Current progresses of novel natural products and their derivatives/ analogs as anti-Alzheimer candidates: an update.,” *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 13, pp. 870–887, 2013.
- [130] H. Sies, “Oxidative stress: oxidants and antioxidants.,” *Exp. Physiol.*, vol. 82, pp. 291–295, 1997.
- [131] Y.-W. Kim, X. Z. West, e T. V Byzova, “Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease.,” *J. Mol. Med. (Berl.)*, vol. 91, pp. 323–8, 2013.
- [132] B. Halliwell, “Oxidative stress and cancer: have we moved forward?,” *Biochem. J.*, vol. 401, pp. 1–11, 2007.
- [133] N. R. Madamanchi, A. Vendrov, e M. S. Runge, “Oxidative stress and vascular disease.,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, pp. 29–38, 2005.
- [134] B. Uttara, A. V Singh, P. Zamboni, e R. T. Mahajan, “Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options.,” *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 7, pp. 65–74, 2009.
- [135] S. Vertuani, A. Angusti, e S. Manfredini, “The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 10, pp. 1677–1694, 2004.
- [136] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, e J. Telsler, “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 39, pp. 44–84, 2007.
- [137] H. Sies, “Oxidative stress: oxidants and antioxidants.,” *Exp. Physiol.*, vol. 82, pp. 291–295, Mar. 1997.
- [138] Y. Nakabeppu, K. Sakumi, K. Sakamoto, D. Tsuchimoto, T. Tsuzuki, e Y. Nakatsu, “Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids.,” *Biol. Chem.*, vol. 387, pp. 373–379, 2006.
- [139] E. Stadtman, “Protein oxidation and aging,” *Science (80-. )*, vol. 257, pp. 1220–1224, 1992.
- [140] S. G. Rhee, “Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling,” *Science (80-. )*, vol. 312, pp. 1882–1883, 2006.
- [141] B. Bhattacharyya, D. Panda, S. Gupta, e M. Banerjee, “Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin.,” *Med. Res. Rev.*, vol. 28, pp. 155–83, 2008.
- [142] M. Suffness e J. M. Pezzuto, “Assays for bioactivity,” in *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*, K. Hostettmann, Ed. London: Academic Press, 1990, pp. 71–133.

- [143] J. P. Michael, “Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids.,” *Nat. Prod. Rep.*, vol. 21, pp. 650–668, Oct. 2004.
- [144] J. P. Michael, “Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids.,” *Nat. Prod. Rep.*, vol. 24, pp. 223–246, 2007.
- [145] K. J. Hale e S. Manaviazar, “New approaches to the total synthesis of the bryostatin antitumor macrolides.,” *Chem. Asian J.*, vol. 5, no. 4, pp. 704–54, Apr. 2010.
- [146] T. Mosmann, “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays,” *J. Immunol. Methods*, vol. 65, pp. 55–63, 1983.
- [147] E. M. Balzer e K. Konstantopoulos, “Intercellular adhesion: mechanisms for growth and metastasis of epithelial cancers.,” *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, vol. 4, pp. 171–181, 2012.
- [148] V. M. S. I. Isca, “*Salicornia ramosissima* J. Woods: Estudo fitoquímico das partes aéreas,” Universidade de Aveiro, 2013.
- [149] INERIS, *Données technico-économiques sur les substances chimiques en France: 4-tert-butylphénol, DRC-14-136881-02239A*. 2014, pp. 1–40.
- [150] European Chemicals Bureau, “European Union risk assessment report, p-tert-butylphenol risk assessment. Final approved version.,” Oslo, Norway, 2008.
- [151] K. Inoue, Y. Yoshie, S. Kondo, Y. Yoshimura, e H. Nakazawa, “Determination of phenolic xenoestrogens in water by liquid chromatography with coulometric-array detection,” *J. Chromatogr. A*, vol. 946, pp. 291–294, 2002.
- [152] O. . Heemken, H. Reincke, B. Stachel, e N. Theobald, “The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea,” *Chemosphere*, vol. 45, pp. 245–259, 2001.
- [153] C.-H. Koh, J. S. Khim, D. L. Villeneuve, K. Kannan, e J. P. Giesy, “Characterization of trace organic contaminants in marine sediment from Yeongil Bay, Korea: 1. Instrumental analyses.,” *Environ. Pollut.*, vol. 142, pp. 39–47, 2006.
- [154] E.-J. Ko, K.-W. Kim, S.-Y. Kang, S.-D. Kim, S.-B. Bang, S.-Y. Hamm, e D.-W. Kim, “Monitoring of environmental phenolic endocrine disrupting compounds in treatment effluents and river waters, Korea.,” *Talanta*, vol. 73, pp. 674–683, 2007.
- [155] T. Toyama, N. Momotani, Y. Ogata, Y. Miyamori, D. Inoue, K. Sei, K. Mori, S. Kikuchi, e M. Ike, “Isolation and characterization of 4-tert-butylphenol-utilizing *Sphingobium fuliginis* strains from *Phragmites australis* rhizosphere sediment.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, pp. 6733–6740, 2010.
- [156] A. V. Barse, T. Chakrabarti, T. K. Ghosh, A. K. Pal, e S. B. Jadhao, “One-tenth dose of LC<sub>50</sub> of 4-tert-butylphenol causes endocrine disruption and metabolic changes in *Cyprinus carpio*,” *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 86, pp. 172–179, 2006.
- [157] L. Hasselberg, S. Meier, e A. Svardal, “Effects of alkylphenols on redox status in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*).,” *Aquat. Toxicol.*, vol. 69, pp. 95–105, 2004.
- [158] V. C. Ramalho e N. Jorge, “Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos,” *Quim. Nova*, vol. 29, pp. 755–760, 2006.

- [159] R. Rodil, J. B. Quintana, G. Basaglia, M. C. Pietrogrande, e R. Cela, “Determination of synthetic phenolic antioxidants and their metabolites in water samples by downscaled solid-phase extraction, silylation and gas chromatography-mass spectrometry.,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, pp. 6428–6435, 2010.
- [160] M. Llompart, L. Sanchez-Prado, J. Pablo Lamas, C. Garcia-Jares, E. Roca, e T. Dagnac, “Hazardous organic chemicals in rubber recycled tire playgrounds and pavers.,” *Chemosphere*, vol. 90, pp. 423–431, 2013.
- [161] P. Bisel, L. Al-Momani, e M. Müller, “The *tert*-butyl group in chemistry and biology.,” *Org. Biomol. Chem.*, vol. 6, pp. 2655–2665, 2008.
- [162] L. Moujir, V. Gouveia, D. Toubarro, e M. C. Barreto, “Determination of cytotoxicity against tumour cell lines,” in *Determination of biological activities. A laboratory manual.*, Universidade dos Açores. Ponta Delgada., 2012, pp. 41–64.
- [163] J. Kronek, E. Paulovičová, L. Paulovičová, e Z. L. Kroneková, “Biocompatibility and Immunocompatibility Assessment of Poly(2-Oxazolines),” in *Practical Applications in Biomedical Engineering*, A. O. Andrade, A. Alves Pereira, E. L. M. Naves, and A. B. Soares, Eds. InTech, 2013, pp. 257–284.
- [164] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. J. Andres, e R. M. Featherstone, “A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 7, pp. 88–95, 1961.
- [165] M. Arruda, H. Viana, N. Rainha, N. R. Neng, J. S. Rosa, J. M. F. Nogueira, e M. D. C. Barreto, “Anti-acetylcholinesterase and antioxidant activity of essential oils from *Hedychium gardnerianum* Sheppard ex Ker-Gawl.,” *Molecules*, vol. 17, pp. 3082–92, 2012.
- [166] M. do C. Barreto, M. Arruda, E. Rego, J. S. Medeiros, e N. Rainha, “Cell-free assays,” in *Determination of biological activities. A laboratory manual.*, M. D. C. Barreto e N. Simões, Eds. Ponta Delgada, 2012, pp. 75–82.
- [167] M. S. Blois, “Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical,” *Nature*, vol. 181, pp. 1199–1200, 1958.