Universidade Estadual Paulista
Instituto de Química de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

FÁBIO AURÉLIO ESTEVES TORRES

LEISHMANIOSES E A BUSCA DE COMPOSTOS DE ORIGEM MARINHA: AS MACROALGAS COMO MATRIZ SUSTENTÁVEL PARA ESTUDOS DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA.

ARARAQUARA
2014

FÁBIO AURÉLIO ESTEVES TORRES

Leishmanioses e a busca de compostos de origem marinha: as macroalgas como matriz sustentável para estudos de atividade leishmanicida.

Dissertação apresentada ao programa de Biotecnologia do Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Márcia A. S. Graminha

Araraquara

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Torres, Fábio Aurélio Esteves
T693L Leishmanioses e a busca de compostos de origem marinha: as macroalgas como matriz sustentável para estudos de atividade leishmanicida / Fábio Aurélio Esteves Torres. – Araraquara : [s.n], 2014
265 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Márcia Aparecida Silva Graminha

1. Produtos naturais. 2. Algas. 3. Leishmania. 4. Leishmaniose. 5. Extração por solventes. I. Título

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

FÁBIO AURÉLIO ESTEVES TORRES

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 02 de dezembro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. MÁRCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA (Orientadora)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara

Prof. Dr. LUIS VITOR SILVA DO SACRAMENTO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara

Prof. Dr. PIO COLEPICOLO NETO
Instituto de Química / USP / São Paulo

Dedicatória

À Deus.

À minha família: **José Fábio Esteves Torres**, **Renata Aparecida Ranieri** e avós,

pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional. Que sempre me impulsiona em direção às vitórias dos meus desafios.

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê."

Arthur Schopenhauer

Agradecimentos

Durante esse dois anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Serei eternamente grato a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

Primeiramente, agradeço a **Márcia Graminha**, por acreditar que eu era capaz e pela orientação. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e dedicação.

Ao **Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto,** muito obrigado pela ajuda, ensinamentos, orientações e contribuições. Por me receber em seu laboratório de portas abertas e sempre estar à disposição.

Ao **Leonardo Zambotti Vilela**, por ter explicado passo a passo o funcionamento de HPLC e também por ter me auxiliado com todas as análises químicas.

Ao **Daniel Xavier Andreguetti** e a **Érika Stein**, por terem vindo até minha cidade e explicar os princípios e a técnica da extração e também por terem cedido alguns extratos para a realização deste projeto.

Ao **Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos**, por disponibilizar seu laboratório para realizar a extração de meus compostos.

Ao **Caio Humberto Perego**, por ter me auxiliado com todas as extrações.

À **Bel**, por ter tido paciência para me ensinar e também para dar puxões de orelha quando necessário. Obrigado por tudo, pelas risadas e principalmente pelo apoio nos momentos difíceis.

Aos amigos **Thais**, **Letícia**, **Mayara** e **Angela** por estarem ao meu lado todos os dias apoiando e dando forças para a conclusão deste projeto.

À minha esposa, **Juliana Martinez**, por ter me auxiliado nestes dois anos de projeto. Obrigado, por me dar forças, apoio e inspiração todos os dias de minha vida para poder sempre dar o melhor de mim.

À seção de pós-graduação por toda atenção e gentileza que sempre demostraram.

À CAPES pela bolsa concedida, a FAPESP, CNPq e MCT-ProAntar, pelos equipamentos e consumíveis adquiridos.

RESUMO

Diversas doenças causadas por protozoários atingem milhões de indivíduos no mundo, afetando países que não possuem infraestrutura ou recursos para realizar um combate efetivo às enfermidades, denominadas de doenças negligenciadas. Leishmanioses e a tripanossomiase africana humana são consideradas doenças negligenciadas com poucos fármacos voltados para o tratamento destas doenças. Além disso, estes fármacos são tóxicos, muitas vezes ineficazes devido ao surgimento de cepas resistentes. Desta forma, este estudo realizou a triagem de extratos de diferentes espécies de macroalgas provenientes das regiões Antártica (continente Antártico) e Subantartica (Chile) e Tropicais (costa brasileira). O extrato hexânico da alga Antártica *Himantothalus grandifolius* apresentou a melhor atividade antiprotozoária e, portanto, também foi avaliada quanto aos seus componentes químicos com potencial atividade antiprotozoária. O subfracionamento do extrato hexânico de *H. grandifolius* mostrou-se 2,6 vezes mais potente quando comparada com seu extrato bruto. A análise química por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa de ambas subfrações revelou um pico majoritário correspondente ao composto 13E-Docosenamide, o qual, provavelmente, é o responsável pela ação leishmanicida deste extrato.

ABSTRACT

Neglected diseases affect millions of people worldwide in countries which lack infrastructure or resources to combat these diseases. Leishmaniasis and human African trypanossomiasis are included in this group of diseases with few drugs currently available. Furthermore, these drugs are toxic and often ineffective due to the emergence of resistant strains. Thus, the aim of this study is to evaluate macroalgae as potential source of antiprotozoal compounds. In order to reach this goal, we conducted screening of extracts and fractions of different species of macroalgae from the Antarctic (Antarctic continent) and Subantarctic (Chile) and Tropical (Brazilian coast) regions. The hexane extract of the Antarctic macroalgae *Himantothalus grandifolius* presented the best antiprotozoal activity and, therefore, was also evaluated for its chemical components with potential antiprotozoal activity. The subfractions HGS11 e HGS12 of *H. grandifolius* proved to be 2.6 times more potent when compared to its crude extract. The chemical analysis of both subfractions by High Performance Liquid Chromatography coupled to mass spectrometry revealed a major peak corresponding to the compound Docosenamide-13E, which is probably responsible for the antileishmanial action of these fractions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição dos casos de leishmaniose cutânea e visceral nos diferentes continentes. 22

Figura 2: Taxa média de incidência (por 10.000 habitantes) no período de 10 anos (2001-2010) para leishmaniose cutânea (esquerda) e leishmaniose visceral (direita). Municípios em azul foram excluídos devido à falta de dados. 23

Figura 3: Casos de leishmaniose cutânea onde se é possível visualizar as ulceras derivadas desta patogênese. 24

Figura 4: Dois casos de leishmaniose mucocutânea. Na direita, ulcera destrutiva no nariz e na foto da esquerda lesão da mucosa do palato. 24

Figura 5: Paciente apresentando hepatoesplenomegalia, sintoma decorrente de leishmaniose visceral. 24

Figura 6: Mapa de distribuição dos casos de coinfecção *Leishmania*/HIV no mundo até 2010. 27

Figura 7: Distribuição dos casos de coinfecção leishmaniose visceral/SIDA nos diferentes municípios do Brasil no período de 2007 e 2008. 28

Figura 8: Ciclo de vida do parasito *Leishmania* no inseto (flebotomíneo) e no hospedeiro vertebrado. 28

Figura 9: Estrutura química dos fármacos **(A)** anfotericina B, **(B)** paromomicina, **(C)** miltefosina, **(D)** estibogluconato de sódio, **(E)** pentamidina e **(F)** antimoniato de metilglucamina. 31

Figura 10: Algas *C. littoralis* **(A)**, *D. dichotoma* **(B)**, *L. catarinensis* **(C)**, *L. dendroidea* **(D)**, *L. intricata* **(E)** e *P. brasiliense* **(F)**. 38

Figura 11: Algas *A. plicata* **(A)**, *S. crispata* **(B)** e *D. antarctica* **(C)**. 39

Figura 12: Alga *H. grandifolius.* 39

Figura 13: Curva de crescimento em meio LIT de *L. amazonensis* (■). O número de parasitos foi estimado através de contagem das células vivas em câmara de Neubauer, dia a dia, partindo-se de uma cultura $2x10^5$ células/mL^{-1}. 46

Figura 14: Localização geográfica do local da coleta da alga *H. grandifolius* nas Ilhas Shetlands do Sul, ilha Rei George, baía do Almirantado, próximo à estação polonesa “Henryk Arctowski”. 47

Figura 15: Representação gráfica do estado do Espírito Santo com destaque para as regiões de Guarapari e Anchiete, onde se encontram as praias onde foram

realizadas as coletas das algas *C. littoralis, D. dichotoma, L. catarinensis, L. dendroidea, L. intricata* e *P. brasiliensis.* 48
Figura 16: Seno Otway, Chile, local onde foram realizadas coletas de macroalgas subantárticas *A. plicata, S. crispata* e *D. antarctica.* 48
Figura 17: Fluxograma para o procedimento de extração das algas utilizadas nos ensaios biológicos. 49
Figura 18: Polaridade em ordem crescente dos solventes utilizados para obtenção dos extratos das diferentes algas utilizadas. 50
Figura 19: Esquema de montagem das placas para ensaios de atividade leishmanicida frente a formas amastigotas axênicas e promastigotas de *L. amazonensis*. Para os ensaios de avaliação de atividade, foram utilizados 97 μl/poço de uma suspensão de parasitos (concentração de 1.10^7 parasito/mL) e 3 μl/poço dos diferentes extratos em diferentes concentrações (500 $\mu g/mL^{-1}$ até 7,81 $\mu g/mL^{-1}$ para algas antárticas e subantárticas, 250 $\mu g/mL^{-1}$ até 3,906 $\mu g/mL^{-1}$ para subfrações do extrato hexânico da alga *H. grandifolius* e 100 $\mu g/mL^{-1}$ até 1,5625 $\mu g/mL^{-1}$ para algas brasileiras, em diluições seriadas, na proporção de 1:2). Como controle positivo utilizou-se parasitos incubados na presença de anfotericina B e pentamidina (100 $\mu g/mL^{-1}$ até 1,5625 $\mu g/mL^{-1}$) e como controle negativo utilizou-se parasitos na ausência dos extratos e subfrações. 51
Figura 20: Esquema de montagem das placas para ensaios de atividade tripanocida frente a formas prociclicas de *T. brucei*. Para os ensaios de avaliação de atividade, foram utilizados 97 μl/poço de uma suspensão de parasitos (concentração de 1.10^7 parasito/mL) e 3 μl/poço dos diferentes extratos em diferentes concentrações (500 $\mu g/mL^{-1}$ até 7,81 $\mu g/mL^{-1}$ para algas antárticas e subantárticas e 100 $\mu g/mL^{-1}$ até 1,5625 $\mu g/mL^{-1}$ para algas brasileiras, em diluições seriadas, na proporção de 1:2). Como controle positivo utilizou-se parasitos incubados na presença de anfotericina B e pentamidina (100 $\mu g/mL^{-1}$ até 1,5625 $\mu g/mL^{-1}$) e como controle negativo utilizou-se parasitos na ausência dos extratos. 52
Figura 21: Esquema de montagem das placas para ensaios de citotoxicidade frente a macrófagos J774.A1. Para os ensaios de avaliação de citotoxicidade, foram utilizados 97μl/poço de uma suspensão de macrófagos (concentração de 4.10^5 células/mL) e 3 μl/poço dos diferentes extratos em diferentes concentrações (500 $\mu g/mL^{-1}$ até 7,81 $\mu g/mL^{-1}$ para algas antárticas e subantárticas, 250 $\mu g/mL^{-1}$ até

3,906 μg/mL^{-1} para subfrações do extrato hexânico da alga *H. grandifolius* e 100 μg/mL^{-1} até 1,5625 μg/mL^{-1} para algas brasileiras, em diluições seriadas, na proporção de 1:2). Como controle positivo utilizou-se macrófagos incubados na presença de anfotericina B e pentamidina (100 μg/mL^{-1} até 1,5625 μg/mL^{-1}) e controle negativo utilizou-se macrófagos na ausência dos extratos e subfrações. 53

Figura 22: Mortalidade de promastigotas na presença dos extratos hexânico e etanólico da alga *H. grandifolius*. Placas de 96 poços contendo a cultura de formas promastigotas de *L. amazonensis* na presença de diferentes concentrações dos extratos (500 μg/mL^{-1} a 7,8125 μg/mL^{-1}) foram incubadas por 72 horas a 26ºC. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. 63

Figura 23: Mortalidade de amastigotas na presença do extrato hexânico da alga *H. grandifolius*. Formas amastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio LIT pH 5,4 a 38ºC e 5% CO_2. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações do extrato (500 μg/mL^{-1} a 7,8125 μg/mL^{-1}) foram incubadas por 72 horas a 38ºC e 5% CO_2. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. 63

Figura 24: Mortalidade de macrófagos na presença dos extratos hexânico, etanólico e etanólico 30% da alga *H. grandifolius*. Macrófagos foram cultivados em meio RPMI a 38ºC e 5% CO_2. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (500 μg/mL^{-1} a 7,8125 μg/mL^{-1}) foram incubadas por 24 horas a 38ºC e 5% CO_2. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada em leitor de microplacas (Bio-Tek Elx 800), onde a absorbância foi determinada em comprimento de onda de 540 nm. 64

Figura 25: Mortalidade de promastigotas na presença das algas que apresentaram brasileiras cujo CI_{50} foi menor que 50 μg/mL^{-1}. Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio LIT a 26ºC.Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (100 μg/mL^{-1} a 1,5625 μg/mL^{-1}) foram incubadas por 72 horas a 26ºC. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. 64

Figura 26: Mortalidade de amastigotas na presença das algas *P. brasiliense*, extrato aquoso subcrítico e *C.littoralis*, extrato hexânico. Formas amastigotas de *L.*

amazonensis cultivadas em meio LIT pH 5,4 a 38ºC e 5% CO_2. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (100 µg/mL^{-1} a 1,5625 µg/mL^{-1}) foram incubadas por 72 horas a 38ºC e 5% CO_2. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. 65

Figura 27: Mortalidade de promastigotas na presença do extrato hexânico das algas *A.plicata, D. antarctica, S.crispata*(carposporangia) e *S. crispata* (tetrasporofitica). Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio LIT a 26ºC. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (500 µg/mL^{-1} a 7,8125 µg/mL^{-1}) foram incubadas por 72 horas a 26ºC. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. 65

Figura 28: Mortalidade de promastigotas na presença do extrato etanólico das algas *A.plicata, D.antarctica, S.crispata*(carposporangia) e *S. crispata* (tetrasporofitica). Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio LIT a 26ºC. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (500 µg/mL^{-1} a 7,8125 µg/mL^{-1}) foram incubadas por 72 horas a 26ºC. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. 66

Figura 29: Mortalidade de macrófagos na presença do extrato hexânico das algas *A. plicata, D. antarctica* e *S. crispata.* Macrófagos foram cultivados em meio RPMI a 38ºC e 5% CO_2. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (500 µg/mL^{-1} a 7,8125 µg/mL^{-1}) foram incubadas por 24 horas a 38ºC e 5% CO_2. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada em leitor de microplacas (Bio-Tek Elx 800), na qual a absorbância foi determinada em comprimento de onda de 540 nm. 66

Figura 30: Mortalidade de macrófagos na presença do extrato etanólico das algas *A. plicata, D. antarctica* e *S. crispata.* Macrófagos foram cultivados em meio RPMI a 38ºC e 5% CO_2. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (500 µg/mL^{-1} a 7,8125 µg/mL^{-1}) foram incubadas por 24 horas a 38ºC e 5% CO_2. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada em leitor de microplacas (Bio-Tek Elx 800), na qual a absorbância foi determinada em comprimento de onda de 540 nm. 67

Figura 31: Cromatograma do extrato hexânico da alga *H. grandifolius,* obtido por CLAE-EM. 69
Figura 32: Mortalidade de promastigotas na presença das subfrações do extrato hexânico da alga *H. grandifolius*. Formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio LIT a 26ºC. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (250 µg/mL^{-1} a 3,906174 µg/mL^{-1}) foram incubadas por 72 horas a 26ºC. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. 73
Figura 33: Mortalidade de promastigotas na presença das subfrações do extrato hexânico da alga *H. grandifolius*. Formas amastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio LIT pH 5,4 a 38ºC e 5% CO_2. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (250 µg/mL^{-1} a 3,906175 µg/mL^{-1}) foram incubadas por 72 horas a 38ºC e 5% CO_2. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. 73
Figura 34: Cromatograma da subfração HSG11 do extrato hexânico da alga *H. grandifolius,* obtido por CLAE-EM. 74
Figura 35: Cromatograma da subfração HSG12 do extrato hexânico da alga *H. grandifolius,* obtido por CLAE-EM. 74
Figura 36: Estrutura química do composto 13E-Docosenamide 75
Figura 37: Reação de protonação e hidrólise, bem como os compostos resultantes, que 13E-Docosenamide por estar sofrendo no ambiente acídico no qual o ensaio de amastigota axênica foi realizado. 76
Figura 38: Distribuição dos casos de Tripanossomiase Africana no continente africano no ano de 2009. 141
Figura 39: Ciclo de vida do parasito *T. brucei* no vetor vertebrado e invertebrado (mosca Tse-Tse). 142
Figura 40: Estrutura química dos fármacos suramina, eflortina, pentamidina, melarsoprol e nifurtimos, utilizados no tratamento da tripanossomíase africana. 144

Obs.: As figuras 14 a 31, 33, 34 e 38 são de autoria do candidato e elaboradas ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: As treze principais doenças negligenciadas. 20
Tabela 2: Espécies de *Leishmania* que causam infecção em humanos em relação à localização mundial e seu tropismo. 23
Tabela 3: Mecanismo de evasão das diferentes espécies de *Leishmania.* 26
Tabela 4: Fármacos de primeira escolha e novos tratamentos que se encontram em fase testes clínicos para o tratamento das formas visceral e cutânea causada por *Leishmania*. 32
Tabela 5: Uso de algumas espécies algais em diferentes setores da indústria. 37
Tabela 6: Condições analíticas utilizadas para a análise química por CLAE-EM do extrato hexânico da alga *H. grandifolius.* 55
Tabela 7: Condições analíticas utilizadas para o subfracionamento do extrato hexânico da alga *H. grandifolius*. 56
Tabela 8: Subfrações obtidas por CLAE-EM e tempo de coleta respectivo de cada subfração. 57
Tabela 9: Atividade biológica das algas *H. grandifolius, C. littoralis, D. dichotoma, L. catarinensis, L. dendroidea, L. intricata, P. brasiliensis, A. plicata, S. crispata* e *D. antarctica,* juntamente com os controles anfotericina B e pentamidina, frente a formas amastigotas axênicas e promastigotas de *L. amazonensis,* formas procíclicas de *T. brucei* e macrófragos J774.A1. 60
Tabela 10: Atividade biológica do extrato bruto e subfrações alga *H. grandifolius* juntamente com os controles anfotericina B e pentamidina, frente a formas amastigotas axênicas e promastigotas (CI_{50}) de *L. amazonensis* e macrófragos J774.A1 (CC_{50}). 71
Tabela 11: Atividade biológica das algas *H. grandifolius, C. littoralis, D. dichotoma, L. catarinensis, L. dendroidea, L. intricata, P. brasiliensis, A. plicata, S. crispata* e *D. antarctica,* juntamente com os controles anfotericina B e pentamidina, frente a formas próciclicas de *T. brucei* e macrófragos J774.A1 (CC_{50}). 145

Obs: As tabelas 4, 6, 7 e 8 são de autoria do candidato e elaboradas ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

CC_{50} = Concentração citotóxica que mata ou inibi 50% dos macrófagos

CI_{50} = Concentração Inibitória necessária para matar ou inibir 50% das células em estudo

CDC = Center for Disease Control and Prevention

CH_2O_2 = Ácido Fórmico

CH_3CN = Acetonitrila

C_3H_8N = Isopropanol

CLAE-EM = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa

DMSO = Dimetilsufóxido

DTN = Doenças Tropicais Negligenciadas

HEPES = àcido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfónico

IS = Índice de Seletividade

LC = Leishmaniose Cutânea

LIT = Liver Infusion Tryptose

LMC = Leishmaniose Mucocutânea

LV = Leishmaniose Visceral

MEM = Meio Essencial Mínimo

MOPS = 3-morfolino ácido propano-1-sulfonico

MTT = [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio brometo]

OMS = Organização Mundial da Saúde

PN = Produtos Naturais

RPMI = Roswell Park Memorial Institue medium

SDM-79 = Semi-defined medium published in 1979

SDS = Dodecil sulfato de sódio

SFB = Soro Fetal Bovino

SIDA = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

VIH = Vírus da Imunodeficiência Humana

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 19
1. Doenças Tropicais Negligenciadas 20
1.1. Leishmanioses 21
1.1.1. Ciclo de vida 28
1.1.2. Tratamento 29
1.2. Produtos Naturais e a Busca por Novos Fármacos 33
1.2.1. Importância econômica das macroalgas 35
OBJETIVOS 41
2. Objetivos 42
MATERIAL E MÉTODOS 43
3. Material e Métodos 44
3.1. Linhagens utilizadas 44
3.2. Meios de cultura 44
3.3. Cultivo de leishmania 45
3.3.1. Formas promastigotas 45
3.3.2. Formas amastigotas axênicas 45
3.4. Curca de crescimento de *L. amazonensis* 46
3.5. Cultivo de formas procíclicas de *T. brucei* 46
3.6. Cultivo de macrófagos J774.A1 46
3.7. Macroalgas 47
3.7.1. Procedência do material 47
3.7.2. Material para obtenção dos extrato 49
3.7.3. Obtenção dos extrato 49
3.7.4. Solubilização dos extrato 50
3.8. Ensaio biológico para determinação de atividade leishmanicida, tripanocida e citotóxica das algas marinhas 50
3.8.1. Atividade leishmanicida 50
3.8.2. Atividade tripanocida 52
3.8.3. Atividade citotóxica 53
3.8.4. Cálculo para determinação do Indice de Seletividade (IS) 54
3.9. Análise Química do extrato hexânico da alga *H. grandifolius* por CLAE 54

3.9.1. Subfracionamento do extrato hexânico da alga *H. grandifolius* 56
3.10. Análise Química das subfrações do extrato hexânico da alga *H. grandifolius* que apresentaram atividade leishmanicida 56
RESULTADOS E DISCUSSÃO 58
4. Resultados e Discussão 59
4.1. Obtenção de amastigotas axênicas 59
4.2. Avaliação da atividade antiprotozoária e citotóxica de extratos brutos de macroalgas antárticas, subantárticas e tropicais 59
4.3. Análise química do extrato hexânico da alga *H. grandifolius* por CLAE 68
4.3.1. Análise química do extrato hexânico da alga *H. grandifolius* 68
4.4. Análise da atividade leishmanicida e citotóxica das subfrações da alga *H. grandifolius* 70
4.5. Análise química das subfrações do extrato hexânico da alga *H. grandifolius* 74
CONCLUSÕES 77
5. Conclusões 78
PERSPECTIVAS 80
6. Perspectivas 81
REFERÊNCIAS 82
7. Referências 83
ANEXOS 94
8. Anexos 95
8.1. Anexo A 95
8.2. Anexo B 126
APÊNDICES 139
9. Apêndices 140
9.1. Apêndice A 140
9.2. Apêndice B 145
9.3. Apêndice C 216

Introdução

1. Doenças Tropicais Negligenciadas

Diversas doenças causadas por protozoários atingem milhões de indivíduos no mundo, afetando países que não possuem infraestrutura ou recursos para realizar um combate efetivo às enfermidades, denominadas de doenças tropicais negligenciadas (DTN).

Muitas doenças podem ser consideradas “negligenciadas” em nível global ou local e o aumento do interesse no controle de tais enfermidades faz com que várias destas possam se encaixar na descrição de DTN. Das doenças já confirmadas como negligenciadas, 13 são de grande importância em termos de frequência e impactos sociais, clínicos e econômicos (Tabela 1). Em adição a importância das DTN como causadoras de morbidade e mortalidade entre populações pobres, a existência, comprovada, de tratamentos com alto custo financeiro fornece outro fator importante para fazer com que o controle de tais doenças seja prioridade da saúde pública (FEASEY et al., 2010). Além destes fatores, como reportado por Njoroge e colaboradores (2014), o baixo número no desenvolvimento de novos fármacos contra tais doenças é preocupante; dos mais de 148.00 ensaios clínicos realizados até o final 2011, apenas 1% era focado em DTN (NJOROGE et al., 2014).

Tabela 1: As treze principais doenças negligenciadas.

Doença	Agente Etiológico	Número de Infectados (Milhões)
Ascaridíase	*Ascaris lumbricoides*	807-1221
Dracunculiasis	*Dracunculus medinensis*	0,002
Ancilostomíase	*Ancilostoma duodenale, Necator americanus*	576-740
Filariose	*Wuchereria bancrofti, Brugia malayi, Brugia timori*	120
Oncocercose	*Onchocerca volvulus*	37
Esquistossomose	*Schistosoma mansoni, Schistosoma haematobium, Schistosoma japonicum, Schistosoma intercalatum, Schistosoma mekongi*	200
Tricuriase	*Trichuris trichiuria*	604-795
Doença de Chagas	*Trypanosoma cruzi*	15
Tripanossomiase Africana	*Trypanosoma brucei*	<0,1
Leishmaniose	Mais de 20 espécies de *Leishmania*	12
Úlcera de Buruli	*Mycobacterium ulcerans*	Desconhecido
Leprose	*Mycobacterium leprae*	0,4
Tracoma	*Chlamydia trachomatis*	84

Fonte: Adaptado de FEASEY et al., 2009.

Levando em consideração a atual situação para DTN, e aproveitando o avanço tecnológico e científico, tornou-se possível a realização de diversos ensaios para o desenvolvimento/planejamento de fármacos com o intuito de atingir alvos específicos e essenciais nos parasitos, procurando minimizar os efeitos colaterais das substâncias nos indivíduos. Baseando-se nisto, este projeto visou o screening de diferentes extratos de várias espécies de algas frente aos parasitos *Leishmania amazonensis* e *T. brucei*.

1.1. Leishmanioses

Leishmanioses são classificadas como DTN e afetam, principalmente, populações pobres de países em desenvolvimento. O curso das infecções varia de acordo com a idade, constituição genética, nutrição, estado imunológico do indivíduo, espécie infecciosa, mudanças ambientais e migração de pessoas não imunes para áreas endêmicas (FEASEY et al., 2010; ALVAR et al., 2012; BHARGAVA E SINGH, 2012).

O gênero *Leishmania* compreende mais de 30 espécies de parasitos, morfologicamente similares, onde 20 destas espécies são responsáveis pela doença em humanos. Dentro do gênero, existem dois subgêneros, o *L. Leishmania* e *L. Viannia* que levam em consideração a localização do parasito no intestino do vetor, onde as espécies do subgênero *L. Leishmania* se desenvolvem dentro da parte anterior do tubo digestivo e, também, no intestino do flebotomíneo; espécies do subgênero *L. Viannia* passam por uma etapa adicional de desenvolvimento dentro do intestino grosso do vetor (CUPOLILLO et al., 2000; FRAGA et al., 2010).

Estão distribuídas em 98 países de cinco continentes diferentes (Figura 1), com estimativas de aproximadamente 1,3 milhões de novos casos por ano, onde somente 600 mil são realmente reportados, e colocam mais de 310 milhões de indivíduos em situação de risco (WHO, 2014a). No Brasil, existe escassez de novos dados sobre os casos de leishmanioses no país. Karagiannis-Voules e colaboradores (2013) fizeram um levantamento geoestatístico da incidência de casos de leishmanioses no Brasil (Figura 2) e também reportaram que estratégias para o controle da doença no Brasil não foram modificados durante os últimos 60 anos, o que explica o fato de a incidência não diminuir e, de acordo com a resolução 60.10 da assembléia da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2007, a aplicação

de um programa de controle para leishmanioses esta em falta, pois há dificuldade na documentação e detecção de novos casos (KARAGIANNIS-VOULES et al., 2013).

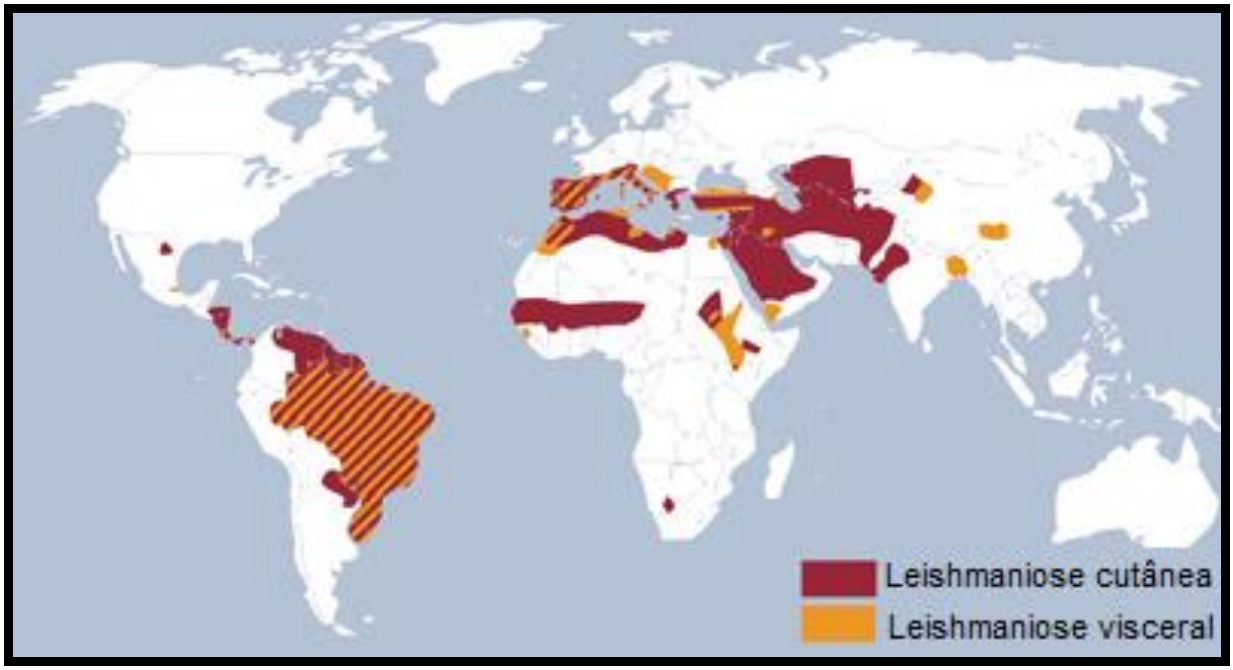


Figura 1: Distribuição dos casos de leishmaniose cutânea e visceral nos diferentes continentes.

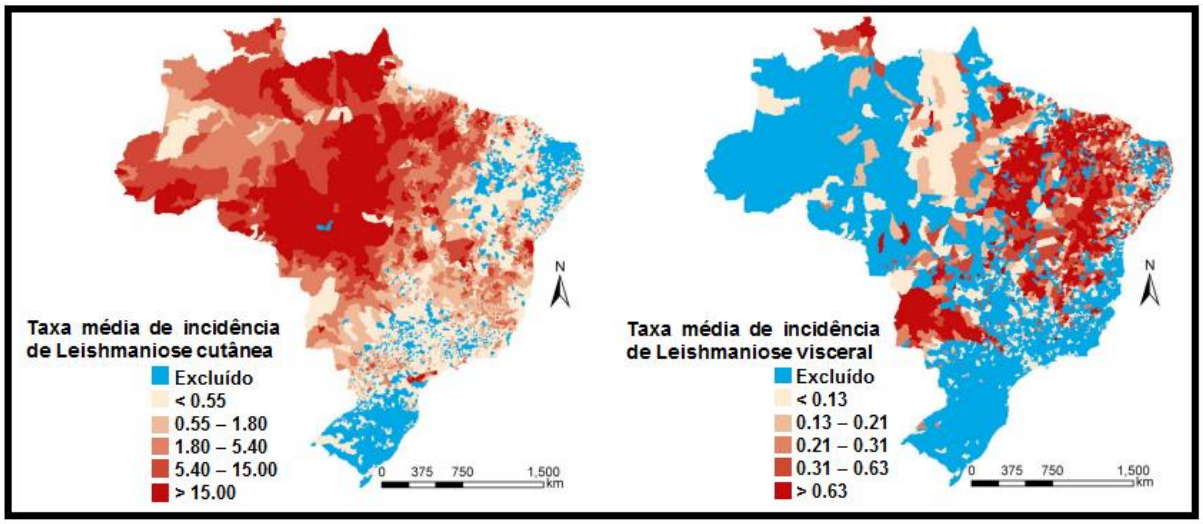


Figura 2: Taxa média de incidência (por 10.000 habitantes) no período de 10 anos (2001-2010) para leishmaniose cutânea (esquerda) e leishmaniose visceral (direita). Municípios em azul foram excluídos devido a falta de dados (KARAGIANNIS-VOULES et al., 2013).

A infecção em humanos pode resultar em diferentes formas clínicas, variando de acordo com a espécie de *Leishmania* (Tabela 2), incluindo:leishmaniose cutânea (LC) (Figura 3), leishmaniose mucocutânea (LMC) (Figura 4) e leishmaniose visceral (LV) (Figura 5); esta última corresponde à forma mais agressiva da doença com intensa perda de peso, hepatoesplenomegalia, anemia e, em casos não tratados, pode levar os indivíduos infectados a óbito. (DOUVOYIANNIS et al., 2014; GOMES et al., 2014; READY, 2014; BURZA et al., 2014; WHO, 2014a).

Tabela 2: Espécies de *Leishmania* que causam infecção em humanos em relação à localização mundial e seu tropismo.

Subgênero	*L. (Leishmania)*	*L. (Leishmania)*	*L. (Viana)*	*L. (Viana)*
Velho Mundo	*L. donovani* *L. infantun*	*L. major* *L. tropica* *L. killicki* *L. aethiopica* *L. infantum*		
Novo Mundo	*L. infantum*	*L. infantum* *L. mexicana* *L. pifanol* *L. venezuelensis* *L. gamhami* *L. amazonensis*	*L. braziliensis* *L. guyanensis* *L. panamensis* *L. shawi* *L. naiffi* *L. lainsoni* *L. linderbergi* *L. peruviana* *L. colombiensis*	*L. braziliensis* *L. panamensis*
Tropismo	Viscerotrópica	Dermotrópica	Dermotrópica	Mucotrópica

Fonte: WHO 2010.

Velho Mundo = Países da Europa, África e Ásia
Novo Mundo = Países da América e Oceania

Figura 3: Casos de leishmaniose cutânea onde se é possível visualizar as ulceras derivadas desta patogênese. **Fonte: BERNARDES** FILHO et al., 2014.

Fonte: OKUMURA et al., 2014.

Figura 4: Dois casos de leishmaniose mucocutânea. Na direita, ulcera destrutiva no nariz e na foto da esquerda lesão da mucosa do palato.

Fonte: WHO, 2014a.

Figura 5: Paciente apresentando hepatoesplenomegalia, sintoma decorrente de leishmaniose visceral.

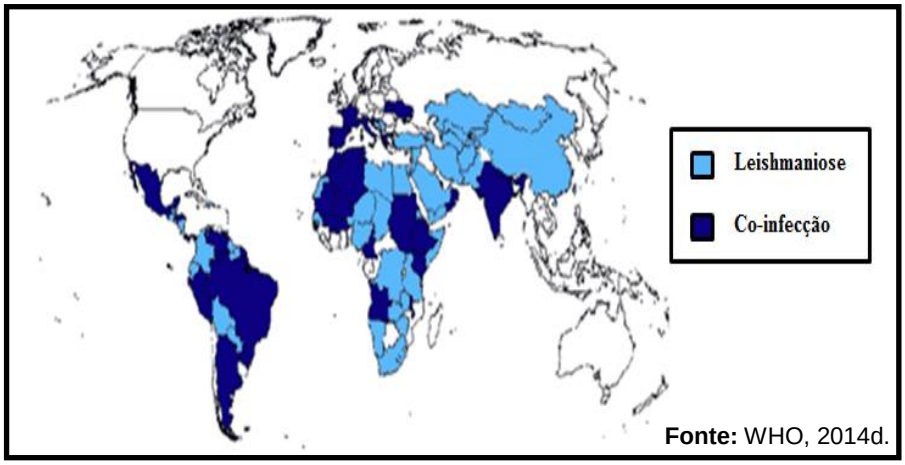
A morbidade e os altos índices de mortalidade associados a estes patógenos podem ser atribuídos a fatores socioeconômicos das populações atingidas e, também, à complexa relação parasito-hospedeiro. Além disso, a sobrevivência dos parasitos é garantida por diversos mecanismos sofisticados que permitem sua evasão do sistema imune do hospedeiro (Tabela 3) (BOGDAN e RÖLLINGHOFF, 1998; CUNNINGHAM, 2002; SPÄTH et al., 2003).

Tabela 3: Mecanismo de evasão das diferentes espécies de *Leishmania.*

Estratégia	Mecanismo	Exemplo
Alteração do sistema complemento do hospedeiro	Inativação dos componentes do sistema complemento por fosforilação (C3, C5 e C9)	Proteína quinase leishmanial (LPK-1, c-lpk2) [*L. amazonensis, L. major*]
	Conversão de C3b e C3bi catalisada por proteases na superfície do parasito → parasito é capturado pelo macrófago via CR3	Gp63 metaloproteinase
Proteção contra produtos antileishmaniais	Invasão de células do hospedeiro que apresentam falta de mecanismos leishmanicidas	Macrófagos não maduros, células de Langerhan e fibroblastos
	Inibição da fusão fagolisossomal	LPG da *L. donovani*
	Inibição da degradação ocasionada por enzimas fagolisossomais	Gp63
	Remoção de intermediários de oxigênio reativo	LGP, Superóxido dismutase leishmanial
	Transformação em amastigota	Aumenta resistência contra pH ácido, H2O2, óxido nítrico e enzimas lisossomais
Supressão da síntese de produtos antileishmaniais	Inibição do burst oxidativo	LPG, gp36
	Inibição da expressão ou da atividad de óxidonitro sintase (iNOS)	GIPL e fosfoglicanos (*L. major*)
Modulação de citocinas	Inibição de citocinas/desativação de macrófagos	Aumento de TGF-β por *L. braziliensis*. Indução diferencial de IL-10 por *L. aethiopica*
	Supressão ou falta de indução por citocinas ativadas	IL-1/TNF-α de *L. donovani.* Falta da expressão de IL-12 em macrófagos infectados por *L. major*
Inibição da apresentação de antígenos e estimulação de células T	Supressão da expressão de MHC de classe II	*L. donovani*
	Internalização e degradação de MHC de classe II	*L. amazonensis*
	Diminuição ou falta de indução por B7-I	*L. donovani*
	Inibição do processamento de antígenos por MHC	*L. donovani*, *L. major* e *L. amazonensis*
Alteração de células T na diferenciação e função	Indução de resposta exacerbada de células T (Th2)	Indução de um pico de início de IL-4 por *L. major*

Fonte: Adaptado de BOGDAN e RÖLLINGHOFF, 1998

Além dos casos normalmente relatados, as leishmanioses participam do quadro de doenças oportunistas da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), sendo a LV a forma de infecção mais frequente (Figura 6) (DESJEUX E ALVAR 2003; CRUZ et al., 2006). A maioria dos casos de coinfecção registrados na América do Sul é referente ao Brasil e, dos 136.692 casos de morte por SIDA no Brasil entre 2000 e 2011 (BRASIL, 2012), houve 272 relatos da coinfecção LV/SIDA, sendo que destes, em 59,2% o vírus da imunodeficiência humana (VIH) (gênero *Lentivirus*, família *Retroviridae*) foi o agente causador do óbito, em 39,3% a causa do óbito foi a LV e, em apenas 1,1% dos óbitos, a coinfecção foi apresentada como causa da morte (Figura 7). Além disso, existem relatos de casos da coinfecção não responsivos à monoterapia (uso somente de miltefosina, por exemplo), sendo necessário o uso de terapia combinada (anfotericina B lipossomal + miltefosina) (MELO et al., 2014; PATOLE et al., 2014).



Fonte: WHO, 2014d.

Figura 6: Mapa de distribuição dos casos de coinfecção *Leishmania*/HIV no mundo até 2010.

Figura 7: Distribuição dos casos de coinfecção leishmaniose visceral/SIDA nos diferentes municípios do Brasil no período de 2007 e 2008.

1.1.1. Leishmania: Ciclo de Vida

A transmissão do parasito ao hospedeiro vertebrado é realizada por flebotomíneos fêmeas (*Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo) durante o repasto sanguíneo (Figura 8) (BATES, 2007).

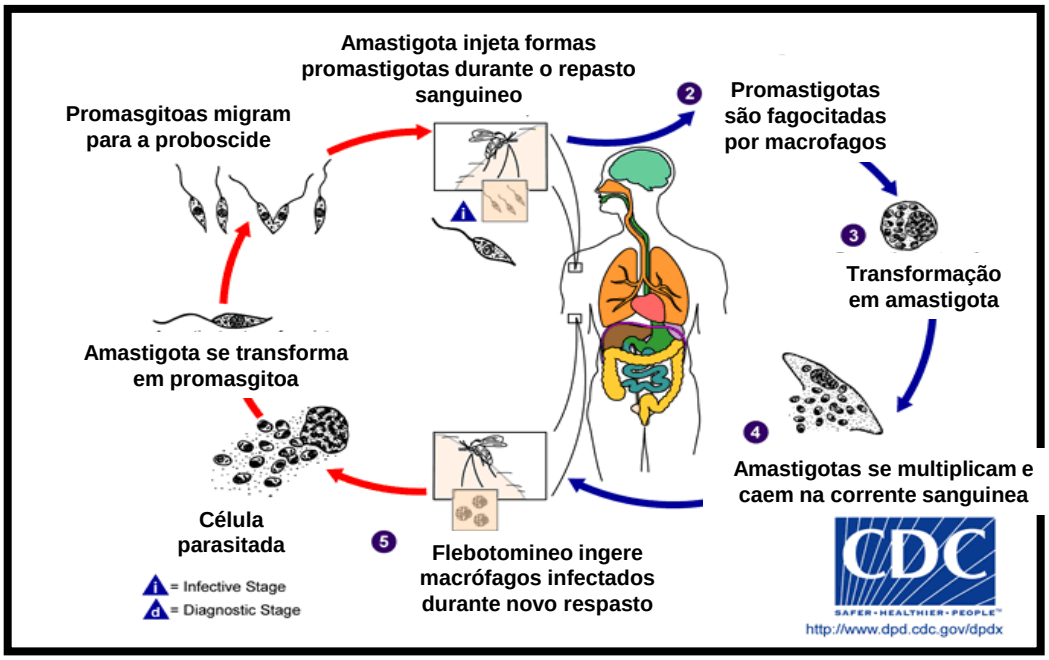


Figura 8: Ciclo de vida do parasito *Leishmania* no inseto (flebotomíneo) e no hospedeiro vertebrado.

O flebotomíneo fêmea regurgita as formas promastigotas no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. Estas promastigotas, na corrente sanguínea, serão fagocitadas por macrófagos e dentro destes irão sofrer modificações dando origem a sua forma amastigota, que irão se multiplicar causando o rompimento do macrófago e sua subsequente liberação para a corrente sanguínea onde irão infectar novas células fagocitárias.

Em novo repasto sanguíneo, em hospedeiro infectado, o flebotomíneo irá ingerir formas amastigotas e estas, dentro do vetor, sofrerão modificações no intestino para o surgimento da forma promastigota, que se multiplicarão e migrarão para a probóscide, onde ficarão até um novo repasto (CDC, 2014).

1.1.2. Tratamento

As leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas, pois os investimentos em pesquisa e desenvolvimento, geralmente, não revertem em crescimento e ampliação para a busca e desenvolvimento de novos medicamentos, testes diagnósticos e vacinas (ZUCCA, 2013). Um aspecto adicional que contribui para a manutenção desta situação se diz respeito à baixa prioridade recebida por estas doenças no âmbito das políticas em saúde publica (WERNECK et al., 2011).

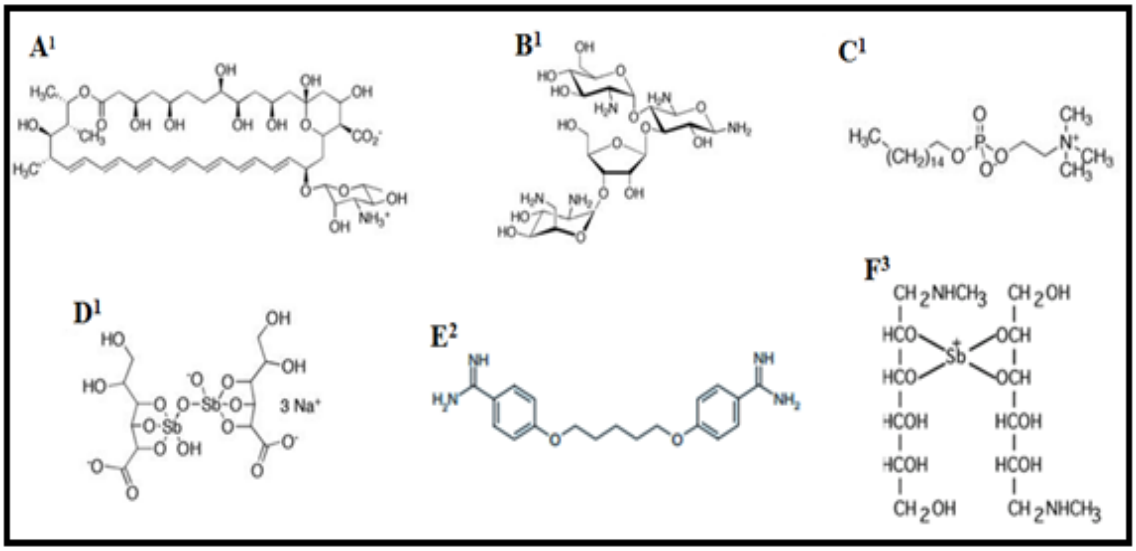
O tratamento clássico para leishmanioses requer a administração de fármacos tóxicos e pouco toleráveis (TIUMAN et al., 2011). Ao longo dos últimos 70 anos, os fármacos de primeira escolha para seu tratamento foram os antimonais pentavalentes, desenvolvidos por Gaspar Viana em 1912, disponíveis em duas formulações, antimoniato de metilglucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®) (LINDOSO et al., 2012). Apesar de terem sido desenvolvidos há décadas, ainda são utilizados como fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses (CROFT, 2011), mesmo diante de inúmeros relatos de casos de resistência a eles (TORRES, 2013; PERRY, 2013; KAZEMI-RAD, 2013; FERNANDEZ, 2012). Em termos de mecanismo de ação, o composto pentavalente pode ser reduzido a um composto trivalente no interior do macrófago (SINGH, 2014); outra possibilidade para explicar a ação destes compostos no parasito pode envolver a inibição da glicólise, ou o metabolismo da glutationa e tripanotiona (SEIFERT, 2011).

Outro fármaco que pode ser utilizado para o tratamento é a pentamidina, um antibiótico, geralmente utilizado como segunda escolha pois a utilização deste fármaco pode induzir diabetes mellitus, dependente de insulina. Seu mecanismo de ação baseia-se na entrada em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* através de um processo mediado por um transportador que reconhece diamidinas com elevada afinidade. Esse fármaco pode estar envolvido na ligação e desintegração do DNA do cinetoplasto, sendo a mitocôndria do parasito um alvo importante da pentamidina. Também pode atuar como inibidor de topoisomerase I, uma enzima envolvida na modulação de energia nuclear e DNA do cinetoplasto (COELHO et al., 2008). A anfotericina B, um fármaco originalmente antifúngico, também é utilizada como segunda escolha para o tratamento de leishmanioses por apresentar toxicidade e diferentes efeitos colaterais. Foram desenvolvidas formulações lipídicas deste fármaco, Ambisome®, Amphocil™ e Abelcit® , que se mostraram mais eficazes e menos tóxicas quando comparadas à anfotericina B. (TIUMAN et al., 2011; CROFT et al., 2006b). O mecanismo de ação da anfotericina B e suas formulações lipícidas pode estar relacionado com a inibição da ligação da *Leishmania* spp ao macrófago, consequência da ligação do fármaco com o ergosterol e, causando danos à membrana plasmática do parasito (SINGH, 2012). A aplicação dos antimoniais pentavalentes, bem como a pentamidina e anfotericina B é feita por via intravenosa ou intramuscular, necessitando que o indivíduo em tratamento seja internado (DORLO et al., 2012).

A paromomicina, um antibiótico, demonstrou-se efetivo no tratamento de LC na década de 60, em 1990 entrou em análise para o tratamento de LV, sendo registrada em 2006 para o tratamento da mesma, seu uso pode ser tópico ou parenteral (CHAWLA et al., 2011; BARRETT e CROFT, 2012; NEAL et al., 1993).

A primeira droga de uso oral para o tratamento de leishmanioses é a miltefosina, desenvolvida, no final de 1980, com finalidade antineoplásica (MOHEBALI et al., 2007; SEIFERT e CROFT, 2006; SINDERMAN et al., 2004a; SINDERMAN et al., 2004b). Foi aprovada para uso clínico em alguns países e está em uso para o tratamento de LV principalmente na Ásia e Europa. O mecanismo de ação foi identificado nos parasitos, vinculando sua atividade para apoptose e vias de sinalização, modificando células dependentes de lipídeos (DORLO, 2012). Uma limitação que ocorre para esse fármaco é sua contraindicação durante a gravidez,

devido aos efeitos teratogênicos observados em estudos pré-clínicos (SEIFERT, 2011) (Figura 9).



Fonte: 1 – Barrett e Croft, 2012
2 – Varkevisser et al., 2013
3 – Santos et al., 2008

Figura 9: Estrutura química dos fármacos **(A)** anfotericina B, **(B)** paromomicina, **(C)** miltefosina, **(D)** estibogluconato de sódio, **(E)** pentamidina e **(F)** antimoniato de metilglucamina.

Para as formas cutânea e visceral da doença o tratamento baseia-se em fármacos altamente tóxicos e caros (DESJEUX, 2004), além disso, em regiões onde existe elevado uso de antimoniais pentavalentes, já existem relatos de resistência parasitária a tais fármacos; nestas regiões já se utiliza a anfotericina B e miltefosina como fármacos de primeira escolha, porém, o problema em se utilizá-los é a possibilidade de se selecionar linhagens resistentes do parasito (TRINCONI et al., 2014).

Apesar de todos estes fatores citados anteriormente, na última década, tratamentos alternativos e novas formulações de fármacos existentes foram registrados e estão disponíveis para uso em alguns países, enquanto outros fármacos ainda estão em teste clínico tanto para LC como para a LV, como mostrado na Tabela 4 (BARRETT e CROFT, 2012).

Tabela 4: Fármacos de primeira escolha e novos tratamentos que se encontram em fase testes clínicos para o tratamento das formas visceral e cutânea causada por *Leishmania*.

Fármacos	Disponibilidade	Atua Contra	Resistência	Referência
estibogluconato de sódio (Pentostan®)	Fármaco de primeira escolha	Leishmaniose visceral e cutânea	Sim	ROYCHOUDHURY et al., 2011 / FREZARD et al., 2013
antimoniato de meglumina (Glucantime®)	Fármaco de primeira escolha	Leishmaniose visceral e cutânea	Sim	BERMAN, 1988 / HADIGI et al., 2006
anfotericina B (Fungizone®)	Fármaco de primeira escolha	Leishmaniose visceral e cutânea	Não reportado	CHATTOPADHYAY e JAFURULLA, 2011
anfotericina B Lipossomal (AmBiosome®)	Fármaco de primeira escolha	Leishmaniose visceral	Sim, porém com poucas evidencias.	CROFT et al., 2006a / BERN et al., 2006
pentamidina	Fármaco de primeira escolha	Leishmaniose cutânea	Sim	AMATO, 2006 / OLIVEIRA-NETO e MATTOS 2006
Miltefosina	Testes clínicos	Leishmaniose visceral e cutânea	Sim	AMATO, 2006 / CROFT et al., 2006a
paromomicina	Fármaco de primeira escolha	Leishmaniose visceral e cutânea	Ainda não demonstrado *in vivo*	DAVIDSON et al., 2009
sitamaquina	Testes clínicos	Leishmaniose visceral	Não	DUEÑAS-ROMERO et al., 2006
imiquimode	Testes clínicos	Leishmaniose cutânea	Não	BUATES e MATLASHEWSKI, 1999

Nos últimos anos a combinação de fármacos vem sendo utilizada e tem-se demonstrado eficaz, reduzindo o tempo de terapia, toxicidade (a partir de doses mais baixas) e diminuindo, também, a seleção de cepas mutantes resistentes; as combinações disponíveis são AmBisome® + miltefosina (dose única intravenosa + oral 7 dias, sequencial), AmBisome® + paromomicina (dose única intravenosa + 10 dias intramuscular, sequencial) e miltefosina + paromomicina (10 dias oral + 10 dias intramuscular, concomitante). Este tipo de terapia ainda não esta disponível para LV. Para pacientes que apresentam a coinfecção LV-SIDA, várias políticas já foram adotadas em relação ao tratamento, como por exemplo, o uso de antirretrovirais seguido pela administração de fármacos leishmanicidas, porém, ainda não existe tratamento efetivo definido (BARRETT e CROFT, 2012).

No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza a utilização de antimoniais pentavalentes e anfotericina B para o tratamento das leishmanioses, sendo o antimoniato de N-metil glucamina o fármaco de primeira escolha. A escolha do fármaco a ser administrado leva em consideração a faixa etária, presença de gravidez e morbidades associadas (BRASIL, 2006 e 2007).

O número limitado de fármacos disponíveis, o alto nível de efeitos colaterais, o fato de sua aplicação ser parenteral e, também, a ausência de vacina, devido a não compreensão do mecanismo imune necessário para o controle do crescimento do parasito (SINGH e SUNDAR, 2014), destacam a necessidade de se rever a eficácia dos tratamentos disponíveis, o que torna urgente a busca de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses (REVEIZ et al., 2014).

1.2. Produtos Naturais e a Busca por Novos Fármacos

Desde o início da humanidade seres humanos recorrem à natureza para satisfazer suas necessidades básicas, entre elas sua utilização para tratamento de uma ampla gama de doenças. As plantas, em particular, têm sido à base dos sistemas de medicinas tradicionais, com os registros, que datam de cerca de 2600 antes de Cristo, documentando os usos de aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas na Mesopotâmia. Entre estas substâncias estão inclusos óleos de espécies de *Cupressus sempervirens* (cipestre-italiano), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), *Commiphora* (mirra) e *Papaver somniferum* (suco de papoula), que são

utilizadas ainda hoje para o tratamento de doenças que vão desde tosses e resfriados a infecções parasitárias e inflamações (CRAGG e NEWMAN, 2013).

Pouco mais de 200 anos atrás, Friedrich Sertürner isolou a morfina, o primeiro composto puro, biologicamente ativo, derivado do ópio produzido a partir das sementes da planta *P. somniferum*. Isto iniciou a era na qual os medicamentos produzidos a partir de plantas poderiam ser purificados, estudados e administrados em doses precisas. Em meados de 1990, em torno de 80% dos fármacos disponíveis eram à base de produtos naturais (PN) ou análogos inspirados pelos mesmos, exemplos bem conhecidos de fármacos de origem natural são a ciclosporina e FK506 (agentes imunossupressores), paclitaxel e doxorubicina (agentes antitumorais), eritromicina (antibiótico) e anfotericina B (fungicida) (STROHL, 2000; CHIN et al., 2006; LI e VEDERAS, 2009).

Apesar dos grandes avanços e melhorias que os fármacos provenientes de PNs trouxeram, muitas indústrias farmacêuticas eliminaram suas áreas de pesquisa voltadas para a descoberta de novos fármacos derivados de PNs, entre as décadas de 80 e 90. Isto foi demonstrado por Newman e Cragg (2012), que entre os anos 1981 e 2010, dos 1130 compostos químicos desenvolvidos, apenas 297 são advindos de PNs ou derivados dos mesmos, representando 26,2% do total de fármacos produzidos (LI e VEDERAS, 2009; NEWMAN e CRAGG, 2012). Isto ocorreu devido a inúmeras desvantagens como dificuldade de acesso, complexidade química dos PNs e lentidão inerente de se trabalhar com os mesmos, além disso, a introdução da síntese de alto rendimento e da química combinatória, com sua promessa de uma fonte aparentemente inesgotável de compostos também contribuiu para tal declínio (HARVEY, 2008; MCCHESNEY et al., 2007). Porém, recentes avanços tecnológicos e o desenvolvimento de novos métodos, como biossíntese combinatória, genômica microbiana e processos simplificados de triagem para PNs, revolucionaram a busca e desenvolvimento de PNs e oferecem uma nova oportunidade para que estes voltem a ser uma importante fonte de novos fármacos (LAM, 2007).

O reino vegetal possui enorme quantidade de espécies e inúmeras moléculas inéditas, tornando-se, assim, importante fonte de estudo na investigação de novos recursos terapêuticos (FOGLIO et al., 2006). Os PNs e fármacos relacionados são utilizados para tratar 87% de todas as doenças humanas caracterizadas, porém,

somente 25% dos fármacos prescritos são derivados de plantas (MOO-PUC et al., 2011).

Além da flora e fauna terrestres, os organismos marinhos, em função de sua ecologia química, também apresentam uma grande diversidade de novas entidades químicas, com grande potencial a ser explorado quanto à prospecção de novos compostos. O uso de técnicas sofisticadas permitiu a coleta e exploração de tais organismos, beneficiando pesquisas com propósito farmacêutico e, desde então, mostra-se importante para a descoberta de novos agentes terapêuticos (CARDOZO et al., 2007). Apesar desse potencial, somente recentemente empresas farmacêuticas começaram a olhar para organismos marinhos como fonte de novos fármacos, devido à grande diversidade de espécies que estão disponíveis, além de sua capacidade de produzir metabólitos secundários com diferentes efeitos biológicos relevantes, incluindo atividade antitumoral, anti-inflamatória, analgésica, imunomoduladores, antialérgica, antiviral e antiparasitária (NEWMAN e CRAGG, 2004; TEMPONE et al., 2011; BLUNT et al., 2013; MAYER et al., 2013; CAAMAL-FUENTES et al., 2014). Atualmente, mais de 2.400 PNs com uma grande diversidade de estruturas químicas foram isolados, principalmente, de algas tropicais (CAAMAL-FUENTES et al., 2014).

1.2.1. Importância econômica das macroalgas

Algas são utilizadas há milhares de anos por povos de regiões costeiras em muitas áreas do mundo, especialmente na Ásia e Caribe, onde doenças parasitárias ocorrem comumente. O uso medicinal das algas é descrito na literatura chinesa “Pen Tsae Kan Mu”, datando de 2000 anos atrás, embora culturas japonesas e chinesas já as tenham utilizado desde 300 anos antes de Cristo para tratar doenças parasitárias, bem como câncer e vários problemas glandulares (MOO-PUC et al., 2008)

Uma grande variedade de medicamentos ao longo da história foi desenvolvida a partir de produtos advindos do reino vegetal e é notório que a maioria dos estudos foque em substâncias naturais provenientes das plantas superiores, principalmente devido a sua fácil acessibilidade (CARDOZO et al., 2007; CANTILLO-CIAU et al., 2010). Embora seja grande a diversidade de vida no ambiente terrestre, sabe-se que a maior biodiversidade se encontra nos oceanos, com 34 dos 36 filos existentes, fato

que pode ser facilmente compreendido já que estes cobrem mais de 70% da superfície terrestre e contém mais de 300.000 espécies da fauna e flora descritas (DONIA e HAMANN, 2003).

Entre os milhares de organismos que constituem a flora marinha, as algas são organismos simples que contêm clorofila e podem ser divididas em dois grandes grupos: as macroalgas, que ocupam a zona litorânea e incluem as algas verdes (Chlorophyta), vermelhas (Rhodophyta) e marrons (Phaeophyta); e as microalgas, encontradas na zona bentônica (próximo ao fundo oceânico) e litorânea (HOLLNAGEL et al., 1996; GRESSLER et al., 2010; GRESSLER et al., 2011). A cor característica das algas verdes se deve, principalmente, pela presença de clorofila A e B na mesma proporção encontrada nas plantas superiores. Já as algas marrons apresentam uma grande quantidade de xantofila e fucoxantina, que mascara os outros pigmentos presentes nestes organismos. Por último, as algas vermelhas apresentam uma quantidade dominante de ficoeritrina e ficociacina, mascarando outros pigmentos como a clorofila A (algas vermelhas não apresentam clorofila B), β-caroteno e xantofilas (BOLD e WYNNE, 1985).

Tanto as algas de água doce, como as de água salgada, necessitaram desenvolver mecanismos metabólicos e fisiológicos diferenciados para sobreviverem em um ambiente competitivo como o ambiente marinho. Tais características proporcionaram um grande arsenal de metabólitos secundários únicos, resultantes de diferentes vias metabólicas, que não são encontrados em plantas terrestres (CARDOZO et al., 2007; CANTILLO-CIAU et al., 2010).

A Tabela 5 mostra o uso das algas nos diferentes setores da indústria. No setor alimentício, podem servir como alimento, sendo consumidas na sua forma bruta ou como matéria-prima para geléias, queijos, vinhos, chás e sopas (RUPEREZ, 2002). Na agricultura, extratos algais são utilizados para melhorar a germinação, aumentar absorção de nutrientes por parte das plantas, prover resistência a geadas e a doenças fúngicas e bacterianas (ZODAPE, 2001). Estes organismos também são muito importantes para a indústria de produtos cosméticos, devido sua característica de revitalização natural, hidratação e a presença de aminoácidos, minerais e vitaminas que auxiliam na nutrição da pele (DHARGALKAR e PEREIRA, 2005). Podem ainda ser utilizadas para monitoramento ambiental

(STEVENSON e SMOL, 2003), bem como produção de biocombustível (MENETREZ, 2012).

Tabela 5: Uso de algumas espécies algais em diferentes setores da indústria.

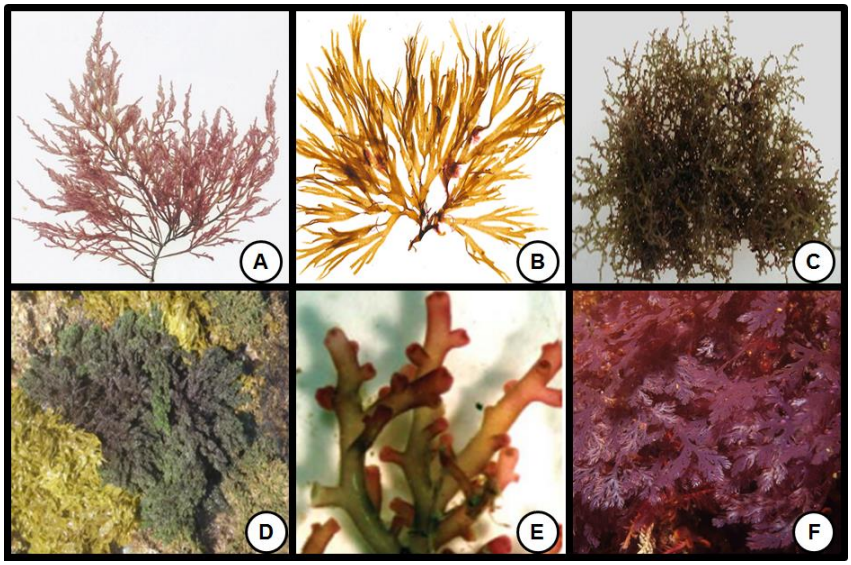
Espécie	Alimento	Alimentação animal	Uso Industrial	Medicina	Fertilizantes
Ulva fasciata	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Enteromorpha compressa	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Monostroma oxyspermum	Sim	Sim	Não	Não	Não
Cladophora fascicularis	Sim	Sim	Não	Não	Não
Chaetomorpha media	Sim	Sim	Não	Não	Sim
Codium fragile	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Caulerpa sertularioides	Sim	Sim	Não	Não	Não
Dictyota dichotoma	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Spatoglossum asperum	Não	Não	Sim	Não	Sim
Hydroclathrus clathratus	Não	Não	Sim	Não	Sim
Stoechospermum marginatum	Não	Não	Sim	Não	Sim
Colpomenia sinuosa	Não	Não	Sim	Não	Sim
Dictyopteris australis	Não	Não	Sim	Não	Sim
Padina tetrastromatica	Não	Não	Sim	Não	Sim
Sargassum cinereum	Não	Não	Sim	Sim	Sim
Sargassum ilicifolium	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
Laminaria digita	Não	Não	Sim	Sim	-
Macrocystis pyrifera	Não	Não	Sim	Sim	Sim
Porphyra vietnamensis	Sim	Sim	Não	Não	Não
Amphiroa fragilissima	Sim	Não	Não	Não	Não
Jania adhaerens	Não	Não	Não	Sim	Não
Gracillaria corticata	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Hypnea musciformis	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Centroceros clavulatum	Sim	Não	Sim	Não	Não
Laurencia papillosa	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Chondrus crispus	Sim	Não	Sim	Não	Não
Eucheuma uncinatum	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Gelidiella acerosa	Não	Não	Sim	Não	Não

Fonte: Adaptado de Dhargalkar e Pereira, 2005.

Como revisado por Torres e colaboradores (2014), atualmente, existem inúmeras iniciativas acadêmicas para identificar PNs com atividade antiparasitária provenientes de organismos marinhos.

Como os organismos marinhos, principalmente algas, entraram em foco nos últimos anos, é necessário salientar que o Brasil encontra-se em posição de destaque, por se tratar de um país que apresenta uma enorme diversidade de espécies, possuindo um litoral que se estende desde os trópicos até regiões temperadas quentes, com cerca de 800 espécies de algas marinhas conhecidas (STEIN, 2011).

Para este projeto foram escolhidas as algas brasileiras *Chondria littoralis*, *Dictyota dichotoma, Laurencia catarinense, Laurencia dendroidea, Laurencia intricata* e *Plocamium brasiliensis,* para estas espécies já existem relatos de atividade antibacteriana, antitumoral, antioxidante e antinematóide (MARTINEZ-NADAL, et al., 1963; MOHAMMED et al., 2004; MANILAL et al., 2009; LHULLIER et al., 2010; MACHADO et al., 2011; MARTINS et al., 2012) (Figura 10).



Fonte: Adaptado de STEIN, 2011.

Figura 10: Algas *C. littoralis* **(A)**, *D. dichotoma* **(B)**, *L. catarinensis* **(C)**, *L. dendroidea* **(D)**, *L. intricata* **(E)** e *P. brasiliense* **(F)**.

Também foram selecionadas as algas *Ahnfeltia aplicata*, *Sarcothalia crispata* (tetrasporofítica e carposporangia) e *Durvillaea antarctica*, todas possuindo atividade antimicrobiana relatada (DELATTRE et al., 2011; REICHELTE e BOROWITZKA, 1984). Estas algas são provenientes da região de Seno Otway, que se encontra no Estreito de Magalhães, Chile (região subantártica) sendo uma localidade rica em diversos habitats, devido à influência de diferentes massas de água provenientes dos oceanos Pacífico e Atlântico, presença de água doce de rios e geleiras e

grandes diferenças na morfologia costeira e profundidade das águas. (PANELLA *et al*., 1991). Além disso, o Chile apresenta uma flora marinha única e, nos últimos 10 anos, se tornou o maior produtor de extratos algais como fonte de ágar e alginatos (DÍAZ et al., 2012; HUOVINEN et al., 2006) (Figura 11).

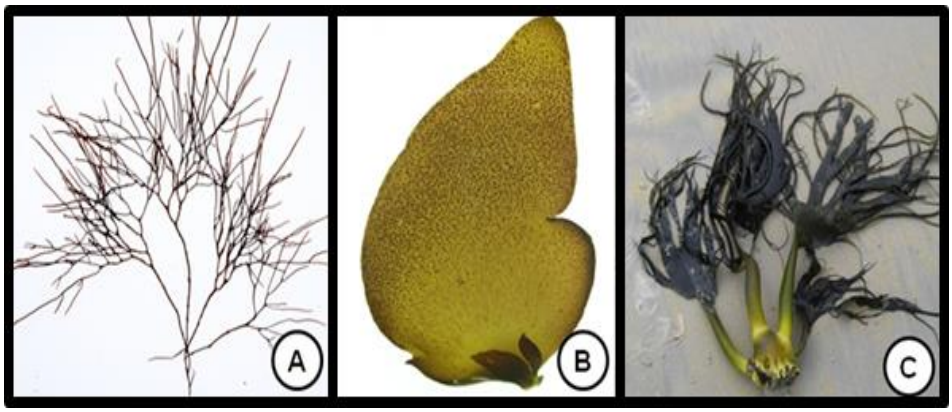


Figura 11: Algas *A. plicata* **(A)**, *S. crispata* **(B)** e *D. antarctica* **(C)**.

Outro local muito importante, em relação a presença de espécies algais pouco exploradas é o continente Antártico, sendo este o quinto maior continente do planeta Terra, com uma área de aproximadamente 14 milhões de quilômetros quadrados, sendo completamente cercado por partes dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico. A alga antártica em estudo neste projeto é a espécie *H. grandifolius* (Figura 12), ainda pouco explorada quanto ao seu potencial farmacológico. Há na literatura apenas um único relato sobre seu potencial anticancer (GAMBATO et al., 2014).

Figura 12: Alga *H. grandifolius.*

Diante do grande potencial que as algas apresentam para a produção de metabólitos secundários bioativos e, pelo fato destes compostos ainda serem pouco explorados quanto à atividade antiprotozoária, decidiu-se explorar e comparar a

ação de algas da região Antártica, subantártica e da costa brasileira, frente a formas promastigota e amastigota axênica de *L. amazonensis* e, também, avaliou-se o espectro de ação frente a formas procíclicas de *T. brucei* e macrófagos J774. A1.

Objetivos

2. Objetivos

- Obter extratos de algas de origem antárticas, subantárticas (Chile) e tropicais (Brasil) utilizando solventes de diferentes polaridades.

- Avaliar atividade leishmanicidade (CI_{50}) dos diferentes extratos frente às formas promastigotas e amastigota axênicas de *L. amazonensis*;

- Determinar citotoxicidade utilizando-se a linhagem de macrófagos J774.A1;

- Determinar o índice de seletividade (IS) calculando-se a relação CC_{50}/ CI_{50};

- Identificar os constituintes químicos presentes nos extratos ativos por **C**romatografia **L**íquida de **A**lta **E**ficiência, acoplado à **E**spectrometria de **M**assas (CLAE-EM) através da comparação dos seus tempos de retenção e espectros de massas com aqueles apresentados na literatura e/ ou bancos de dados;

- Determinar o espectro de ação dos extratos que apresentarem boa atividade leishmanicida, avaliando-se a atividade tripanocida (CI_{50}) dos mesmos frente às formas procíclicas de *Trypanosoma brucei* (Apêndice A).

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. *Linhagens Utilizadas*

- *L. amazonensis,* linhagem MPRO/BR/1972/M1841-LV-79, foi gentilmente cedida pela Prof. Dra. Beatriz Stoff da Universidade de São Paulo – USP.

- Macrófagos, linhagem celular J774.A1, foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP Araraquara.

- Formas procíclicas de *T. brucei* 427 foram utilizadas para a realização dos experimentos por serem formas não infectantes e de fácil manutenção em cultura.

3.2. *Meios de Cultura*

- *LIT (Liver Infusion Tryptose):* 5,0 g de Liver Infusion Broth (BD 226920) - 5,0 g de triptose (BD 211713) – 4,0 g de NaCl (85,55 mM) - 8,0 g de Na_2HPO_4 (7,04 mM) – 0,4 g de KCl (107,3 mM) - 2,0 g de glicose (22,2 mM) — 0,025 g de hemina (0,15 mM), água milli-Q q.s.p - 1L. Para as formas axênicas, ajustou-se o pH do meio para 5,4 e para formas promastigotas ajustou-se para 7,2, com solução de HCl 0,1 M. Dissolveu-se a hemina em 0,5 mL de trietanolamina. Os demais componentes foram dissolvidos em água miliQ. Misturar, medir o pH e, quando necessário acertou-se o pH. Esterelizou-se os meios por autoclavação a 121ºC por 15 minutos. Após resfriamento acrescentou-se, assepticamente, 100 mL de soro fetal bovino (SFB) e os antibióticos estreptomicina (100 mg/mL) e penicilina (100 mU/mL).

- *RPMI (Roswell Park Memorial Institue medium)(Gibco®)*: Para um litro de meio utilizou-se, uma ampola de meio RPMI 1640 em pó (Gibco®), 900,0 mL de água destilada, mantida sob agitação constante. Adicionou-se 2,0 g de bicarbonato de sódio (23,8 mM) e 2,38 g de tampão Hepes (9,9 mM). Acertou-se o pH para 7,2 e em seguida o meio foi filtrado utilizando filtro com membrana de 0,22 µm (Kasvi®). Por fim, adicionou-se 100 mL de SFB e os antibióticos estreptomicina (100 mg/mL) e penicilina (100 mU/mL).

- *SDM-79* (Semi-defined medium published in 1979)(BRUN E SCHONENBERGER, 1979): 7,0 g de meio essencial mínimo (MEM) – 2,0 g de meio 199 – 8 mL de aminoácidos essenciais de MEM 50x – 6 mL de aminoácidos não essenciais de MEM 100x – 1,0 g de glicose (5,5 mM) – 8,0 g de HEPES (ácido 4- (2-

hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfónico) (33,5 mM) – 5,0 g de MOPS (3-morfolino ácido propano-1-sulfonico) (23,8 mM) – 2,0 g de bicarbonato de sódio (23,8 mM) – 0,1 g de piruvato de sódio (0,9 mM) – 200 mg de DL-alanina (2,2 mM) – 100 mg de L-arginina (0,5 mM) – 300 mg de L-glutamina (2,05 mM) – 70 mg de DL-metionina (0, 46 mM) – 80 mg de L-fenilalanina (0,48 mM) – 600 mg de L-prolina (5,2 mM) – 60 mg de L-serina (0,57 mM) – 160 mg de taurina (1,27 mM) – 350 mg de L-treonina (2,9 mM) – 100 mg de L-tirosina (0,55 mM) – 10 mg de adenosina (0,03 mM) – 10 mg de guanosina (0,03 mM) – 4 mg de ácido fólico (0,009 mM) – 50 mg de D(+) hidrocloreto de glucosamina (0,27 mM) – 2 mg de ácido p-aminobenzóico (0,01 mM) – 0,2 mg de biotina (0,0008 mM) – 5 mg de hemina (0,000007 mM) – 100 mL de soro fetal bovino – 10 ml de solução penicilina/estreptomicina – 1ml de solução de gentamicina.

3.3. *Cultivo de Leishmania*

3.3.1. Formas promastigotas

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram mantidas em meio LIT suplementado com 10% de SFB a 26ºC em BOD (Fanem®). Utilizou-se culturas na fase exponencial de crescimento para os experimentos de atividade leishmanicida.

3.3.2. Formas amastigota axênica

Formas amastigotas foram obtidas a partir de cultura de formas promastigotas em fase exponencial, utilizando-se meio LIT com pH acido (5,4) (Balanco *et a*l., 1997). Para isso, transferiu-se 10 mL da cultura de formas promastigotas para tubos cônicos de 15 mL, seguido por centrifugação por 5 minutos a 157 xg (Centrifuga Excelsa Baby II, modelo 206-R, Fanem®). Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante, ressuspedeu-se o pellet em 10 mL de meio LIT, pH 5,4, e transferido para garrafas de cultura de 25 cm^2 (TPP®). A incubação para obtenção das formas amastigotas foi realizada em estufa de CO_2 a 38ºC e 5% de CO_2 (New Brunswick Scientific®). Observou-se a cultura diariamente em microscópico invertido para verificar a diferenciação total de formas promastigotas em amastigotas (~8-10 dias).

3.4. *Curva de crescimento L. amazonensis*

A curva de crescimento da *L. amazonensis* foi realizada no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/ Araraquara durante 9 dias, até chegar a fase estacionária. Partiu-se de uma cultura de $2x10^5$ de leishmanias em 5,0 mL de meio LIT, até atingir a fase estacionária. Monitorou-se a cultura diariamente, no mesmo horário, utilizando-se câmara de Neubauer.

Para construção da curva, inseriu-se os dados obtidos (n° de promastigotas x tempo de cultivo em dias) no programa Origin® 6.1 (Origin Lab Corporation) para gerar o gráfico abaixo (Figura 13).

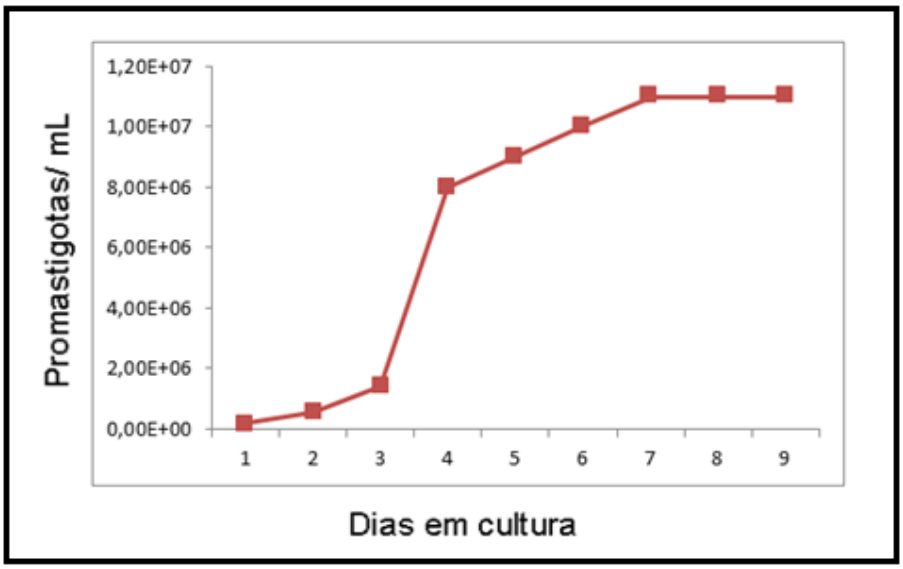


Figura 13: Curva de crescimento em meio LIT de *L. amazonensis* (■). O número de parasitos foi estimado através de contagem das células vivas em câmara de Neubauer, dia a dia, partindo-se de uma cultura $2x10^5$ células/mL.

3.5. *Cultivo de formas procíclicas de T. brucei*

Formas procíclicas de *T. brucei* foram mantidas em meio SDM-79 suplementado com 10% de SFB a 26ºC em BOD (Fanem®) com repiques diários e troca do meio, sempre que necessário, para manutenção da cultura.

3.6. *Cultivo de macrófagos J774.A1*

Macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em garrafas de cultura celular de 25 cm^2 (TPP®) em meio RPMI, e mantidos a 38°C e 5% de CO_2 (New Brunswick Scientific®). O meio foi trocado sempre que necessário. Para os repiques e experimentos, as células foram recuperadas por raspagem e mantidas em banho de gelo até o momento do uso.

3.7. *Macroalgas*

3.7.1. *Procedência do Material*

A macroalga *H. grandifolius* foi coletada em 18/12/2011 por integrantes do projeto "Biodiversidade, monitoramento, estratégias de sobrevivência e prospecção de macroalgas extremófilas da Antártica Marinha", Programa ProAntar brasileiro, MCTI/CNPq/FNDCT, Ação Transversal n° 64/2013, sendo proveniente da baía do Almirantado, próximo à base polonesa “Henryk Arctowski”, Ilha Rei George (Figura 14). As coletas foram realizadas durante o verão austral.

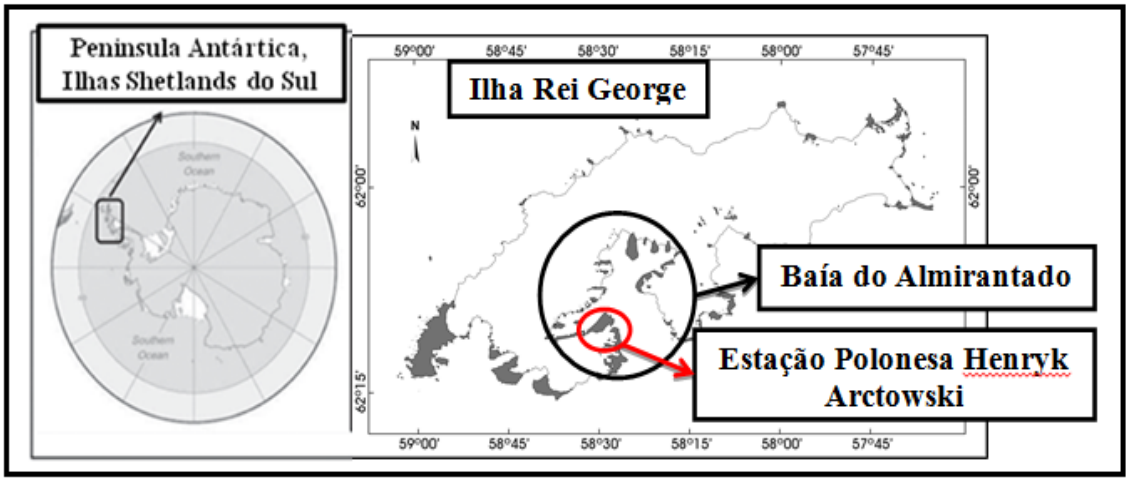


Figura 14: Localização geográfica do local da coleta da alga *H. grandifolius* nas Ilhas Shetlands do Sul, ilha Rei George, baía do Almirantado, próximo à estação polonesa “Henryk Arctowski”.

As algas tropicais oriundas do litoral do Espírito Santo (Anchieta e Guarapari) (Figura 15), *L. catarinensis* (praia de ponta dos Castelhanos), *L. dendroidea* (praia de Parati), e L. *intricata* (praia de Meaípe) foram coletadas em 01/07/2007, 30/06/2007 e 04/06/2008, respectivamente. As algas *C. littoralis* (praia de Parati)*, D. dichotoma* (praia de Bacutia) e *P. brasiliensis* (praia de Ubu), foram coletadas no período de 24 a 26 de outubro de 2011.

Fonte: Adaptado de Stein, 2011.

Figura 15: Representação gráfica do estado do Espírito Santo com destaque para as regiões de Guarapari e Anchiete, onde se encontram as praias onde foram realizadas as coletas das algas *C. littoralis, D. dichotoma, L. catarinensis, L. dendroidea, L. intricata* e *P. brasiliensis.*

As algas *A. plicata, S. crispata* (coletadas em Janeiro de 2014), e *D. antarctica,* (coletada em Janeiro de 2013) são da região de Seno Otway, localizado ao norte da península de Brunswick, Chile, por membros do laboratório do Dr. Andres Mansillas, da Universidad de Magallanes, Punta Arenas Chile (Figura 16).

Figura 16: Seno Otway, Chile, local onde foram realizadas coletas de macroalgas subantárticas *A. plicata, S. crispata* e *D. antarctica.*

3.7.2. *Material para obtenção dos extratos*

Todas as algas foram coletadas na zona de entremarés (coleta manual), limpas em água do mar, enxaguadas em água corrente, separadas em sacos plásticos com fecho hermético, identificados com o nome da espécie, local e data da coleta e congeladas em freezer -20°C para minimizar alterações nas propriedades químicas das espécies, deixando-as conservadas até o momento do uso.

3.7.3. *Obtenção de Extratos*

Extratos utilizados para os ensaios de atividade antiprotozoária e citotóxica das algas brasileiras *C.littoralis*, *D.dichotoma, L. catarinense, L.dendroidea, L.intricata* e *P. brasiliensis* foram realizados pelos alunos do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Daniel Andreguetti Xavier e Erika Mattos Stein. Extratos da alga Antártica *H. grandifolius* e das algas subantárticas *A. plicata*, *S. crispata* e *D. antarctica* foram obtidos no laboratório de Farmacognosia do professor doutor André Gonzaga dos Santos, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara UNESP.

Para a produção de extratos, as algas foram descongeladas, secas a temperatura ambiente e trituradas em gral até obtenção de um pó. Em seguida, adicionou-se 100 mL de solvente para cada grama de massa seca (pó) da alga utilizada. Realizaram-se diferentes extrações com solventes de diferentes polaridades, sequencialmente, como demonstrado na Figura 17.

Utilizou-se um sistema Soxhlet, que foi montado e lavado com éter de petróleo (150 mL) por duas horas. A extração foi realizada por 4 horas, sendo que o cartucho contendo a biomassa da macroalga permaneceu submerso no solvente *overnight* (CRESPO e YUSTY, 2006). Todos os extratos coletados foram secos em evaporador rotativo (MA 120, Marconi®).

Figura 17: Fluxograma para o procedimento de extração das algas utilizadas nos ensaios biológicos.

Utilizou-se vários tipos de solventes, com polaridades diferentes entre si (Figura 18), permitindo a obtenção de extratos contendo compostos mais polares ou mais apolares, dependendo do solvente utilizado para a extração.

Hexano < Diclorometano < Clorofórmio < Etanol < Metanol

Figura 18: Polaridade em ordem crescente dos solventes utilizados para obtenção dos extratos das diferentes algas utilizadas.

Também foram utilizadas extrações por fluídos supercríticos e subcríticos. Estes extratos foram obtidos no Centro de Pesquisa e Capacitação em Meio Ambiente (CEPEMA) em Cubatão pelo doutorando Daniel Xavier Andreguetti. Fluído supercrítico é uma substância em condições acima de sua temperatura e pressão críticas, apresentando características físico-químicas intermediárias entre o estado gasoso e líquido, podendo agir, em parte, como um solvente; quando apenas uma das condições críticas é atingida, o fluído é definido como subcrítico. A extração utilizando tais fluídos é uma alternativa viável na substituição de solventes orgânicos tóxicos, além disso, os extratos não sofrem hidrólise, oxidação, esterificação ou alteração térmica (MAUL et al., 1996).

3.7.4. *Solubilização das amostras*

Os extratos foram solubilizados com dimetilsufóxido (DMSO) (0,5 mg do extrato para 30 µL de DMSO (0,002 g/mol)). Na montagem das placas, utilizou-se apenas 3 µL da solução mãe dos extratos na presença de 97 µL da cultura de parasitos/macrófagos, fazendo com que a concentração final de DMSO para o ensaio seja de 3%, uma concentração sabidamente não tóxica para parasitos e macrófagos.

3.8. ***Ensaios biológico para determinação de atividade leishmanicidade, tripanocida e citotóxica das algas marinhas***

3.8.1. *Atividade leishmanicida*

Para a avaliação de atividade leishmanicida, as formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em garrafas de vidro (Boeco®) com 40 mL de meio LIT suplementado com 10% de SFB, sendo mantidas a 26ºC, até atingirem sua fase exponencial de crescimento (~7 dias). Já as formas amastigotas, foram obtidas a partir de cultura de formas promastigotas em fase exponencial, onde estas foram

mantidas em garrafas de cultura de 25 cm^2 (TPP®) com 15 mL de meio LIT pH 5,4, a 38ºC e 5% de CO_2, até a todas as formas promastigotas sofrerem diferencicação para formas amastigotas (~8-10 dias). Para ambos os ensaios a concentração inicial de parasito utilizado era de 1.10^7 cels/mL.

Utilizou-se placas de 96 poços (TPP®), onde pipetou-se parasitos e controles conforme a Figura 19:

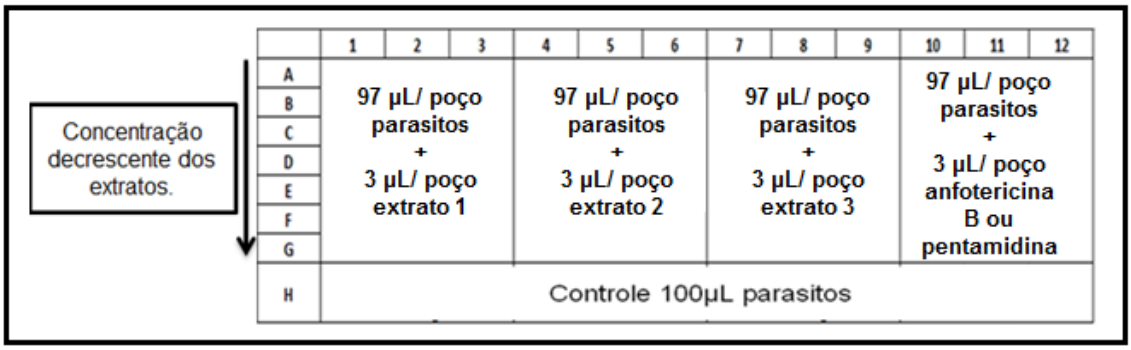


Figura 19: Esquema de montagem das placas para ensaios de atividade leishmanicida frente a formas amastigotas axênicas e promastigotas de *L. amazonensis*. Para os ensaios de avaliação de atividade, foram utilizados 97 µl/poço de uma suspensão de parasitos (concentração de 1.10^7 parasito/mL) e 3 µl/poço dos diferentes extratos em diferentes concentrações (500 µg/mL até 7,81 µg/mL para algas antárticas e subantárticas, 250 µg/mL até 3,906 µg/mL para subfrações do extrato hexânico da alga *H. grandifolius* e 100 µg/mL até 1,5625 µg/mL para algas brasileiras, em diluições seriadas, na proporção de 1:2). Como controle positivo utilizou-se parasitos incubados na presença de anfotericina B e pentamidina (100 µg/mL até 1,5625 µg/mL) e como controle negativo utilizou-se parasitos na ausência dos extratos e subfrações.

Extratos foram preparados com concentração inicial de 500 µg/mL até a final de 7,81 µg/mL, para algas antárticas e subantárticas, 250 µg/mL até 3,906 µg/mL para subfrações e de 100 µg/mL até 1,5625 µg/mL para algas brasileiras, na proporção de 1:2. Controles positivos foram utilizados com concentração inicial de 100 µg/mL até 1.5625 µg/mL.

As culturas contendo formas promastigotas e amastigotas axênicas na presença dos extratos e subfrações foram incubadas por 72 horas a 26ºC e 38ºC (5% de CO_2) respectivamente. Após o período de incubação, para a obtenção dos valores de CI_{50}, realizou-se contagem em câmara de Neubauer e sua determinação foi realizada por regressão não linear utilizando-se o software Bioestat®. Todos os ensaios foram realizados em triplicata para determinação dos desvios padrões.

3.8.2. *Atividade tripanocida*

Para a avaliação de atividade tripanocida, as formas procíclicas de *T. brucei* foram cultivadas em frasco de cultura de 25 cm^2 (TPP®) com 10 mL de meio SDM-79 suplementado com 10% de SFB sendo mantidas a 26ºC. Repiques diários e troca do meio, sempre que necessário, foi realizado para a manutenção da cultura. Quando houve necessidade, expandiu-se a cultura para frasco de cultura de 75 cm^2 (TPP®) e adicionou-se 50 mL de meio SDM-79. Utilizou-se a cultura para os ensaios quando o meio apresentava-se completamente turvo. Para este ensaio a concentração inicial de parasitos utilizado era de 1.10^6 cels/mL.

Placas de 96 poços (TPP®) foram utilizadas, onde os parasitos e controles foram pipetados conforme a Figura 20:

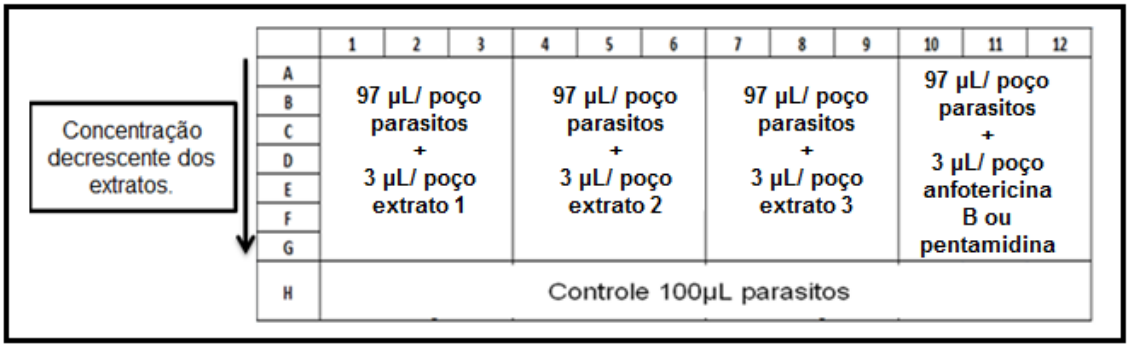


Figura 20: Esquema de montagem das placas para ensaios de atividade tripanocida frente a formas prociclicas de *T. brucei*. Para os ensaios de avaliação de atividade, foram utilizados 97 µl/poço de uma suspensão de parasitos (concentração de 1.10^7 parasito/mL) e 3 µl/poço dos diferentes extratos em diferentes concentrações (500 µg/mL até 7,81 µg/mL para algas antárticas e subantárticas e 100 µg/mL até 1,5625 µg/mL para algas brasileiras, em diluições seriadas, na proporção de 1:2). Como controle positivo utilizou-se parasitos incubados na presença de anfotericina B e pentamidina (100 µg/mL até 1,5625 µg/mL) e como controle negativo utilizou-se parasitos na ausência dos extratos.

Extratos foram preparados com concentração inicial de 500 µg/mL até a final de 7,81 µg/mL, para algas antárticas e subantárticas, na proporção de 1:2. Controles positivos foram utilizados com concentração inicial de 100 µg/mL até 1,5625 µg/mL.

Incubaram-se as culturas contendo formas promastigotas e amastigotas axênicas na presença dos extratos por 72 horas a 26ºC e 38ºC (5% de CO_2) respectivamente. Após o período de incubação, para a obtenção dos valores de CI_{50}, realizou-se contagem em câmara de Neubauer e sua determinação foi realizada por regressão não linear utilizando-se o software Bioestat®. Todos os ensaios foram realizados em triplicata para determinação dos desvios padrões.

3.8.3. *Atividade citotóxica*

Para avaliação citotóxica, os macrófagos da linhagem J774 foram cultivados em garrafas de cultura de 25 cm^2 (TPP®) com 10 mL de meio RPMI, suplementado com 10% de SFB, mantidas a 38ºC e 5% de CO_2 para seu crescimento. Após 10~15 dias de crescimento, com o fundo da garrafa preenchido por macrófagos, estes foram removidos com o auxílio de um *scraper* e transferidos para um tubo cônico de 15 mL, onde foram centrifugados a 157 xg por 5 minutos (Fanem®). O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 1 mL de meio RPMI e, em seguida, realizou-se contagem em câmara de Neubauer (10 µL cultura + 3 µL do corante azul de tripan) para ajustar a concentração de células para 4.10^5 cels/mL.

Utilizou-se placas de 96 poços (TPP®), onde pipetou-se os macrófagos e controles conforme a Figura 21:

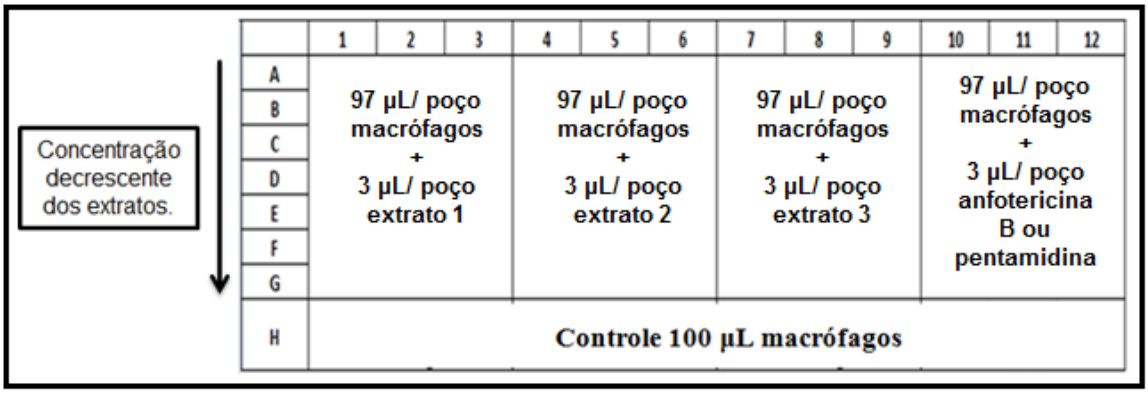


Figura 21: Esquema de montagem das placas para ensaios de citotoxicidade frente a macrófagos J774.A1. Para os ensaios de avaliação de citotoxicidade, foram utilizados 97µl/poço de uma suspensão de macrófagos (concentração de 4.10^5 células/mL) e 3 µl/poço dos diferentes extratos em diferentes concentrações (500 µg/mL até 7,81 µg/mL para algas antárticas e subantárticas, 250 µg/mL até 3,906 µg/mL para subfrações do extrato hexânico da alga *H. grandifolius* e 100 µg/mL até 1,5625 µg/mL para algas brasileiras, em diluições seriadas, na proporção de 1:2). Como controle positivo utilizou-se macrófagos incubados na presença de anfotericina B e pentamidina (100 µg/mL até 1,5625 µg/mL) e controle negativo utilizou-se macrófagos na ausência dos extratos e subfrações.

Extratos foram preparados com concentração inicial de 500 µg/mL até 7,81 µg/mL, para algas antárticas e subantárticas, 250 µg/mL até 3,906 µg/mL para subfrações e 100 µg/mLa 1,5625 µg/mL para algas brasileiras, com diluições seriadas na proporção de 1:2. Controles positivos foram utilizados com concentração inicial de 100 a 1,5625 µg/mL. Com a placa montada, incubou-se por 24 horas a 38ºC e 5% de CO_2.

Para verificar-se os valores de CC_{50}, após a incubação, utilizou-se o método colorimétrico MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio brometo]) baseado em Mosmann (1983). O principio desta metodologia baseia-se na capacidade de células viáveis em reduzir (através de reações de óxido-redução) o sal de tetrazólio solúvel em água, no produto formazan insolúvel em água (cor roxa característica do metabolismo do sal). Adicionou-se 10 µL de MTT a cada poço (concentração final de 0,025 mg/mL), e incubou-se a placa, ao abrigo de luz, por 4 horas em estufa de CO_2. Ao término desta primeira incubação, adicionou-se 100 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% + HCl 1M por poço, e realizou-se uma nova incubação de 30 minutos. No final desta segunda incubação, as placas foram lidas em leitor de microplacas (Bio-Tek Elx 800), onde a absorbância foi determinada em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados obtidos foram expressos em forma de CC_{50}, onde a determinação deste valor foi realizada por regressão não linear utilizando-se o software Bioestat. Os experimentos foram realizados em triplicata experimental para determinação do desvio padrão. Controles positivos para os ensaios foram os fármacos anfotericina B e pentamidina.

3.8.4. *Cálculo para determinação do Índice de Seletividade (IS)*

Com os resultados de CI_{50} e CC_{50} obtidos dos ensaios de atividade leishmanicidade e citotóxica, calculou-se o índice de segurança conhecido como *Indice de Seletividade* (IS) para cada uma das substâncias (LARGERON et al., 1999).

$$IS = CC_{50} / CI_{50promastigota/amastigota}$$

Índices com valores superiores a 10 sugerem que o uso da substância pode ser considerado seguro (PASSERINI, 2008).

3.9. ***Análise Química do extrato hexânico da alga H. grandifolius por CLAE***

Para identificar as substâncias presentes no extrato hexânico da alga *H. grandifolius* (extrato bioativo mais relevante, vide resultados), utilizou-se cromatógrafo modelo UFLC (Shimadzu, Japão) composto por um degaseificador DGU-20A3R, duas bombas LC-20AD, um auto-injetor SIL-20A HT, um forno de

coluna CTO-20A e controladora CBM-20A. O detector foi o espectrômetro de massa micrOTOF II Focus (Bruker, Alemanha). As condições analíticas para a análise estão especificadas na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6: Condições analíticas utilizadas para a análise química por CLAE-EM do extrato hexânico da alga *H. grandifolius.*

Corrida - CLAE-EM	
Item	**Especificação**
Coluna	Kinetex 2.6µm, C18, 50x2.1mm (Phenomenex)
Fase A	Água MiliQ + Ácido Fórmico (100:1)
Fase B	Acetonitrila +Isopropanol (50:50)
Fluxo	0,5 mL/min
Programa de Corrida	0-2 min (10%B), 2-20 min (10-75%B), 20-25 min (75%B), 25-25.1 min (10%B), 25.1-30 min (10%B)
Espectrometria de Massas	
Tipo	TOF
Massas Analisadas	50-1100 m/z
Polaridade	Positiva
Modo de Scan	MS
Tipo de Fonte	Eletrospray
Voltagem do Capilar	4500 V
Fluxo do Gás de Secagem	9L/min
Temperatura do Gás de Secagem	200ºC

Com os resultados obtidos, realizou-se busca nos bancos de dados, listados abaixo, para identificar os possíveis compostos de cada pico obtido no cromatograma.

METLIN - http://metlin.scripps.edu/metabo_search_alt2.php

PubCHEM - http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

Chebi - http://www.ebi.ac.uk/chebi/

ChemSpider - http://www.chemspider.com/

3.9.1. *Subfracionamento do extrato hexânico da alga H. grandifolius*

A partir do cromatograma obtido do extrato hexânico da alga *H. grandifolius*, realizou-se seu subfracionamento em cromatógrafo Shimadzu, com duas bombas LC-6AD, detector SPD-M10AVP, coletor FRC-10A, amostrador automático SIL-10AF, controladora SCL-10AVP e software Shimadzu CLASS-VP Versão 6.41SP1 sob as condições especificadas na Tabela 7.

Tabela 7: Condições analíticas utilizadas para o subfracionamento do extrato hexânico da alga *H. grandifolius*.

Item	Especificação
Coluna	Shim-Pack 5µm C18, 250x4.6mm (Shimadzu)
Fase A	Água MiliQ + Ácido Fórmico (100:1)
Fase B	Acetonitrila + Isopropanol (50:50)
Fluxo	1mL/min
Gradiente (minutos) [Fase B]	Programa de corrida: 0-2 min (60%B), 2-20 min (60-90%B), 20-30 min (90%B), 30-30.1 min (60%B), 30.1-40 min (60%B)
Detector	PDA
Comprimento de Onda Analisados	210-800 nm
Frequencia	1.5625 hZ

Foram realizadas 12 coletas, no período de 30 minutos. Os tempos de coleta estão representados na Tabela 8.

Tabela 8: Subfrações obtidas por CLAE-EM e tempo de coleta respectivo de cada subfração.

Subfração	Tempo de Coleta (minutos)
HSG01	8-10’
HSG02	10.01’-12’
HSG03	12.01’-14’
HSG04	14.01’-16’
HSG05	16.01’-18’
HSG06	18.01’-20’
HSG07	20.01’-22.5’
HSG08	22.51’-23.5’
HSG09	23.51’-25’
HSG10	25.01’-27.5’
HSG11	27.51’-29’
HSG12	29.01’-31’

3.10. *Análise química das subfrações do extrato hexânico da alga H. grandifolius que apresentaram atividade leishmanicida*

As 12 subfrações do extrato hexânico da alga *H. grandifolius* foram testadas frente às formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e aquelas que apresentaram os melhores resultados foram analisadas quimicamente por CLAE-EM sob as mesmas condições analíticas descritas na tabela 7.

Para as possíveis fórmulas químicas para os compostos apresentados no cromatograma o limite de erro foi ajustado para dez partes por milhão, para detectar várias fórmulas moleculares. Para a busca de possíveis compostos em bancos de dados, os cromatogramas das subfrações foram comparados com aquele obtido para o branco (isopropanol:acetonitrila [50:50]) para verificar e excluir picos que estavam presentes em ambos os cromatogramas.

Resultados e Discussão

4. *Resultados e Discussão*

Segundo a OMS, as leishmanioses estão distribuídas em 98 países nos cinco continentes, com estimativas de aproximadamente 1.3 milhões de casos novos por ano, com mais de 310 milhões de indivíduos em situação de risco; vale ainda ressaltar que apenas 600 mil casos são relatados anualmente, já que estas doenças não são de notificação compulsória (WHO, 2014a). No Brasil foram relatados 26 mil casos anuais entre 2003-2007, número pequeno quando comparado com a estimativa de 72-119 mil casos/ano. Apesar de mundialmente difundidas as leishmanioses são negligenciadas pela indústria farmacêutica e pelos governos (SULSEN et al., 2008). Portanto a busca por novos fármacos se faz urgentemente necessária.

4.1. *Obtenção de amastigotas axênicas*

Para a obtenção de formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, utilizou-se meio de cultivo em condições que mimetizam o ambiente acídico (pH 5.4) do fagolisossomo a 34ºC em estufa de CO_2 a 5%. Durante o estabelecimentodo protocolo de obtenção de formas amastigotas axênicas, após várias tentativas infrutíferas, modificamos o protocolo proposto por Balanco *et al*, (1997) e passamos a utilizar meio LIT ao invés do meio 54-UM e, pH 5,4, com uma temperatura mais elevada, correspondente a 38ºC. Assim, adotamos meio LIT e temperatura 4ºC superior, com obtenção desta forma parasitária em aproximadamente oito dias de cultivo.

4.2. *Avaliação da atividade antiprotozoária e citotóxica de extratos brutos de macroalgas antárticas, subantárticas e tropicais*

Para verificar a atividade leishmanicida, tripanocida e citotóxica, utilizou-se formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, procíclicas de *T. brucei* e macrófagos da linhagem J774.A1, respectivamente. Para obtenção dos valores de CI_{50} realizou-se contagem em câmara de Neubauer (parasitas) ou o método colorimétrico MTT (macrófagos) . Todos os ensaios foram realizados em triplicatas experimentais e mostrados na Tabela 9.

Tabela 9: Atividade biológica das algas *H. grandifolius, C. littoralis, D. dichotoma, L. catarinensis, L. dendroidea, L. intricata, P. brasiliensis, A. plicata, S. crispata* e *D. antarctica,* juntamente com os controles anfotericina B e pentamidina, frente a formas amastigotas axênicas e promastigotas de *L. amazonensis,* formas procíclicas de *T. brucei* e macrófragos J774.A1.

	Local	Extratos	CI_{50} (µg/mL) (IS) Promastigota	CI_{50}(µg/mL) (IS) Amastigota Axênica	CC_{50}(µg/mL) Macrófagos J774.A1
Himanthotallus grandifolius	*Arctowski*	***Hexânico***	112 ± 4,15 (**4,21**)	193,15 ± 5,58 (**2,44**)	472,31 ± 1,24
	Arctowski	***Etanólico***	144,5 ± 4,94 (**2,53**)	> 500 (**n.d.**)	366,5 ± 6,36
	Arctowski	***Etanólico 30%***	>500 (**n.d.**)	>500 (**n.d.**)	487,27 ± 3,88
Chondria littoralis	*Praia de Parati (ES)*	***Aquoso subcrítico***	88 ± 4,23 (**0,017**)	71,25 ± 0,35 (**0.021**)	< 1,56
Dictyota dichotoma	*Praia de Parati (ES)*	***Aquoso subcrítico***	>100 (**n.d.**)	>100 (**n.d.**)	16 ± 1,41
Laurencia catarinensis	*Ponta Castelhanos (ES)*	***Clorofórmico***	27,1 ± 0,56 (**0,4**)	>100 (**n.d.**)	11 ± 0,7
		Hexânico	3,94 ± 0,08 (**3,36**)	>100 (**n.d.**)	13,25 ± 0,35
		Metanólico	41,15 ± 0,21 (**0,46**)	>100 (**n.d.**)	19 ± 2,82
Laurencia dendroidea	*Praia de Parati (ES)*	***Clorofórmico***	17,65 ± 1,2 (**0,97**)	>100 (**n.d.**)	17,25 ± 2,19
		Hexânico	11,35 ± 0,07 (**0,34**)	>100 (**n.d.**)	3,95 ± 1,34
		Metanólico	>100 (**n.d.**)	>100 (**n.d.**)	18,45 ± 0,77
Laurencia intricata	*Praia de Meaípe (ES)*	***Metanólico***	>100 (**n.d.**)	>100 (**n.d.**)	>100
Plocamium brasiliensis	*Praia de Ubu (ES)*	***Aquoso subcrítico***	>100 (**n.d.**)	>100 (**n.d.**)	3,55 ± 0,07
		Diclorometano	19,5 ± 0,7 (**1,47**)	>100 (**n.d.**)	28,75 ± 3,18
		Hexânico	19,35 ± 0,63 (**0,43**)	74,5 ± 3,53 (**0,11**)	8,35 ± 1,48
		Metanólico	70,75 ± 1,76 (**0,022**)	>100 (**n.d.**)	< 1,56
Ahnfeltia plicata	*Seno Otway*	***Hexânico***	44,05 ± 2,05 (**1,24**)	>500 (**n.d.**)	54,9 ± 1,37
		Etanólico	147,65 ± 5,13 (**2,15**)	>500 (**n.d.**)	318,6 ± 0,94
Sarcothalia crispata (tetrasporofítica)		***Hexânico***	64,55 ± 0,35 (**1,49**)	>500 (**n.d.**)	96,5 ± 2,85
		Etanólico	377,95 ± 4,59 (**0,26**)	>500 (**n.d.**)	99,8 ± 2,16
Sarcothalia crispata (carposporangia)		***Hexânico***	103,9 ± 2,68 (**0,79**)	>500 (**n.d.**)	83,1 ± 1,76
		Etanólico	476,53 ± 7,3 (**0,26**)	>500 (**n.d.**)	125,6 ± 0,83
Durvillaea antarctica		***Hexânico***	148,5 ± 0,98 (**0,55**)	>500 (**n.d.**)	82,7 ± 1,13
		Etanólico	>500 (**n.d.**)	>500 (**n.d.**)	>500
Anfotericina B	**-**	**-**	1,45 ± 0,07 (**4,89**)	23,5 ± 2,12 (**0,3**)	7,1 ± 0,28
Pentamidina	**-**	**-**	3,22 ± 0,13 (**12,5**)	20,25 ± 1,76 (**2**)	41 ± 7,07

Nos ensaios utilizando formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis* para determinação da atividade leishmanicida dos extratos algais (Tabela 9), as macroalgas *H. grandifolius, C. littoralis* e *P. brasiliensis*, apresentaram boa atividade leishmanicida, dentre as 11 espécies avaliadas, porém, as algas brasileiras apresentaram alta toxicidade, como pode ser revelado pelos valores de SI abaixo de 1. O extrato hexânico da alga *H. grandifolius,* proveniente de Arctowski (Antártica), apresentou atividade leishmanicida frente às formas promastigotas (CI_{50} = 112 µg/mL) (Figura 22), porém, maior seletividade para o parasito (IS=4,21), sendo pouco citotóxica para macrófagos J774.A1 (Tabela 9, Figura 24). Apesar da ação deste extrato ser pelo menos 77 vezes menor que aquela apresentada pela anfotericina B, este resultado ainda é interessante, pois como se trata de um extrato bruto, o(s) princípio(s) ativo(s) responsável(is) pela atividade antipromastigota podem estar presentes em quantidades pequenas (compostos minoritários). Importante ressaltar que, para as formas amastigotas, responsável pela patogenia das leishmanioses, este extrato também apresentou ação leishmanicida (CI_{50} = 193,15 µg/mL; IS = 2,44) (Figura 23). Apesar do extrato aquoso subcrítico da alga *C. littoralis,* proveniente do litoral do Espirito Santo também ter apresentado atividade leishmanicida frente às formas promastigotas (CI_{50} = 88 µg/mL) (Figura 25), não se mostrou seletivo para o parasito, com elevada citotoxicidade, como pode ser evidenciado pelo baixo valor de IS = 0,017, ou seja, 735 vezes mais tóxico que a pentamidina. Quando ensaiada frente às formas amastigotas (CI_{50} = 71,25 µg/mL) (Figura 26), sua atividade foi potencializada em aproximadamente 1,5 vezes ao comparar com os dados obtidos para as formas promastigotas, porém, quando compara-se com os fármacos controle, sua ação foi menor em aproximadamente 3 vezes. A alta citotoxicidade para macrófagos apresentada pelo extrato aquoso subcritico de *C.littoralis* torna inviável a realização de outros experimentos envolvendo análise frente amastigotas intracelulares (análise fundamental pois mimetiza a condição do parasito encontrado no hospedeiro humano), já que estes experimentos envolvem a infecção de macrófagos. Por último o extrato hexânico da alga *P. brasiliensis*, também proveniente do litoral do Espírito Santo, apresentou atividade leishmanicida (CI_{50} = 19,35 µg/mL) (Figura 25), porém, assim como observado para a espécie *C.littoralis*, seu IS foi muito baixo (IS = 0,43), sendo este aproximadamente 28 vezes menos seletivo para o parasito quando comparado com

a pentamidina; frente às formas amastigotas, houve diminuição de sua atividade em aproximadamente 4 vezes (CI_{50} = 74,5 µg/mL) em relação aos dados obtidos para a forma promastigota (Figura 26).

A análise da Tabela 9 mostra outros resultados interessantes para as formas promastigotas do parasito, como por exemplo, o extrato etanólico da alga *H. grandifolius* (CI_{50EtOH} = 144,5 µg/mL), hexânico e etanólico das algas subantárticas *A. plicata* (CI_{50Hex} = 44,05 µg/mL; CI_{50EtOH}147,65 µg/mL), *S. crispata* (tetrasporofitica) (CI_{50Hex} = 64,55 µg/mL; CI_{50EtOH} = 377,95 µg/mL), *S. crispata* (carposporangia) (CI_{50Hex} = 83,1 µg/mL; CI_{50EtOH} = 476,54 µg/mL) e *D. antarctica* (CI_{50Hex} = 148,5 µg/mL) e a alga brasileira *L. dendroidea* ($CI_{50Clorofórmico}$ = 17,65 µg/mL; CI_{50Hex} = 11,35 µg/mL) sendo pouco efetivas para as formas amastigotas (Figuras 30, 31, 32 e 33). O mesmo pode ser verificado para o extrato hexânico da alga *L. catarinensis*, que apresentou a melhor atividade antipromastigota entre todas as algas avaliadas (CI_{50} = 3,94 µg/mL), no entanto, não apresentou atividade anti-amastigota (Figura 25). Como pode ser observado na Tabela 9, a atividade anti-amastigota foi baixa tanto para os extratos quanto para os fármacos controle anfotericina B e pentamidina quando avaliados frente às formas amastigotas axênicas. Isto pode ser devido ao baixo valor de pH do meio LIT utilizado para obtenção de formas amastigotas axênicas, o qual mimetiza o ambiente do fagolisossomo e, o(s) princípio(s) ativo(s) presente(s) no extrato podem ser lábeis em pH baixo (pH = 5,4). Assim para descartar a possibilidade do pH estar influenciando negativamente na atividade anti-amastigota, experimentos estão sendo conduzidos para obtenção de amastigotas intracelulares, cujo procedimento experimental está descrito no artigo Santos, 2013. As algas *D. dichotoma, L. intricata* e o extrato etanólico 30% da alga *H. grandifolius*, não apresentaram atividade antipromastigota/amastigota.

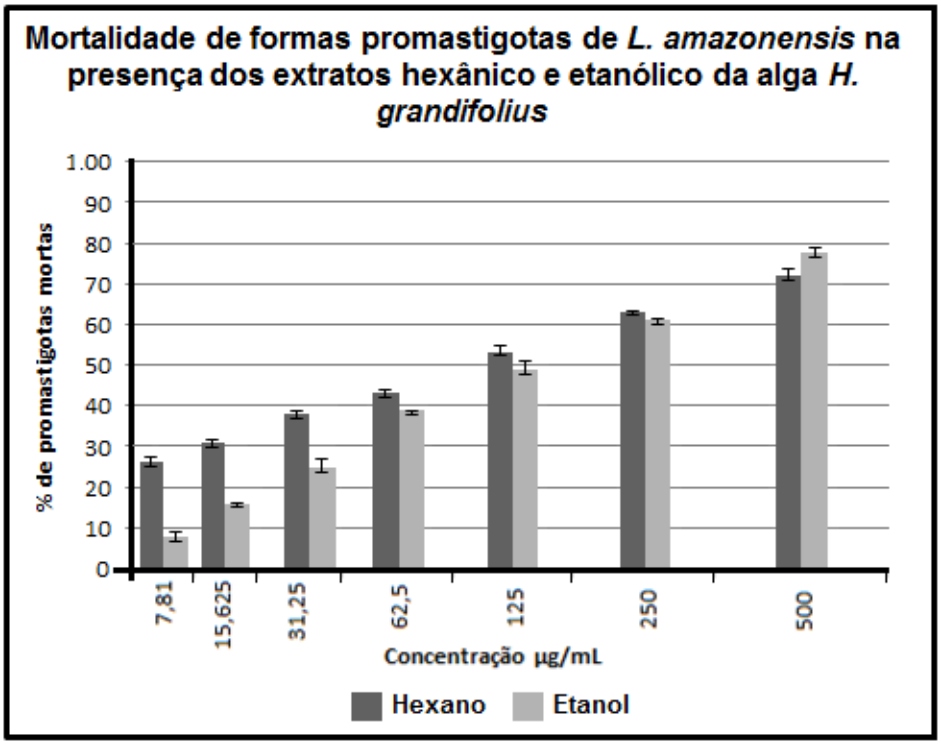


Figura 22: Mortalidade de promastigotas na presença dos extratos hexânico e etanólico da alga *H. grandifolius*. Placas de 96 poços contendo a cultura de formas promastigotas de *L. amazonensis* na presença de diferentes concentrações dos extratos (500 µg/mL a 7,8125 µg/mL) foram incubadas por 72 horas a 26ºC. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

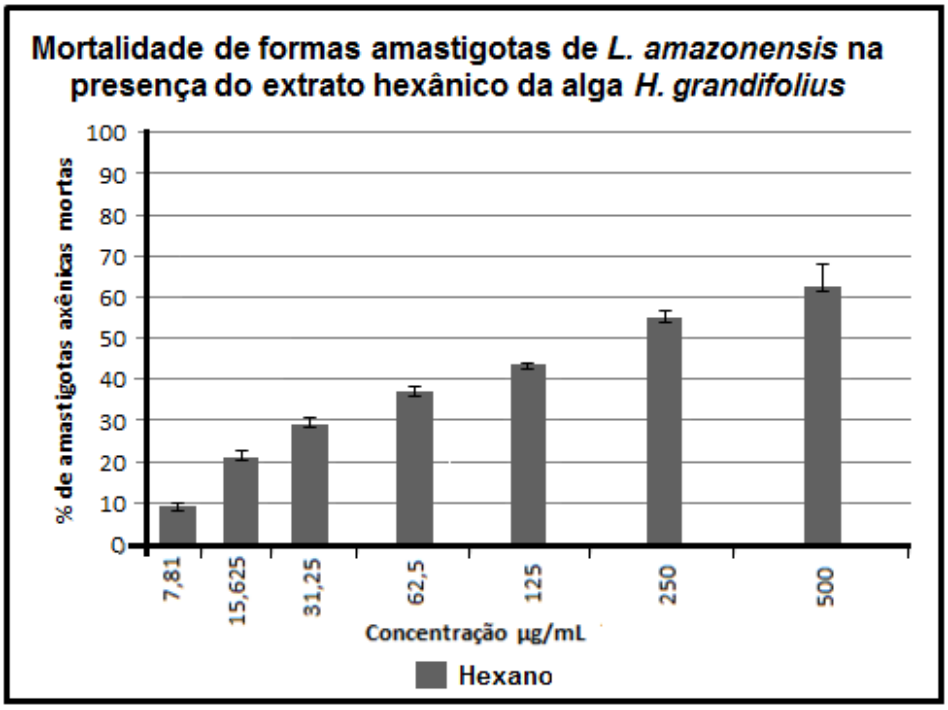


Figura 23: Mortalidade de amastigotas na presença do extrato hexânico da alga *H. grandifolius*. Formas amastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio LIT pH 5,4 a 38ºC e 5% CO_2. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações do extrato (500 µg/mL a 7,8125 µg/mL) foram incubadas por 72 horas a 38ºC e 5% CO_2. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

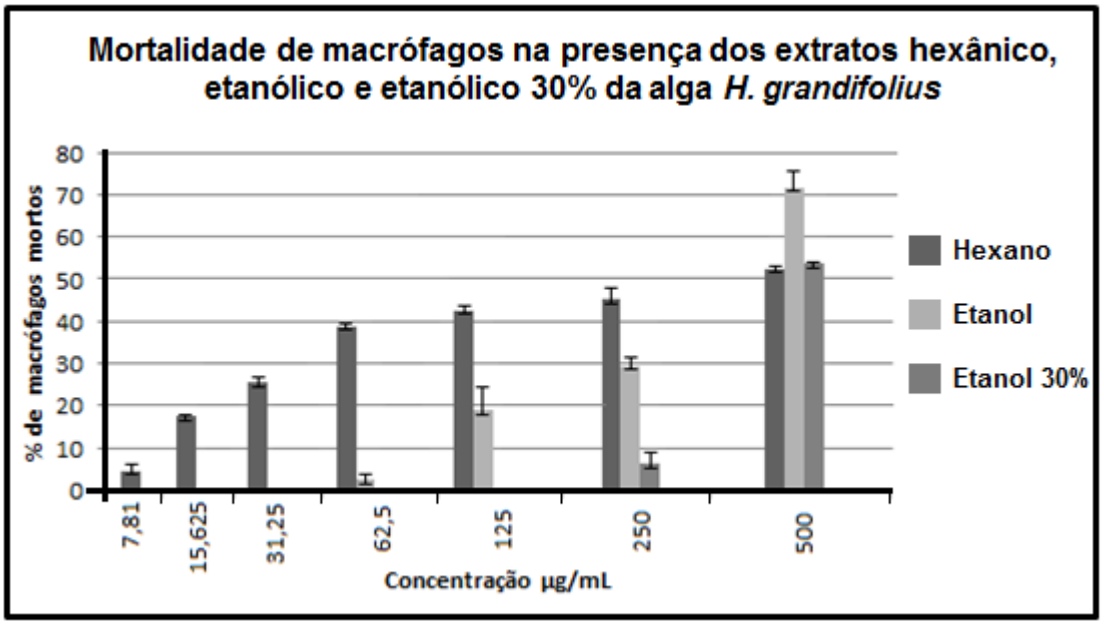


Figura 24: Mortalidade de macrófagos na presença dos extratos hexânico, etanólico e etanólico 30% da alga *H. grandifolius*. Macrófagos foram cultivados em meio RPMI a 38ºC e 5% CO_2. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (500 µg/mL a 7,8125 µg/mL) foram incubadas por 24 horas a 38ºC e 5% CO_2. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada em leitor de microplacas (Bio-Tek Elx 800), onde a absorbância foi determinada em comprimento de onda de 540 nm.

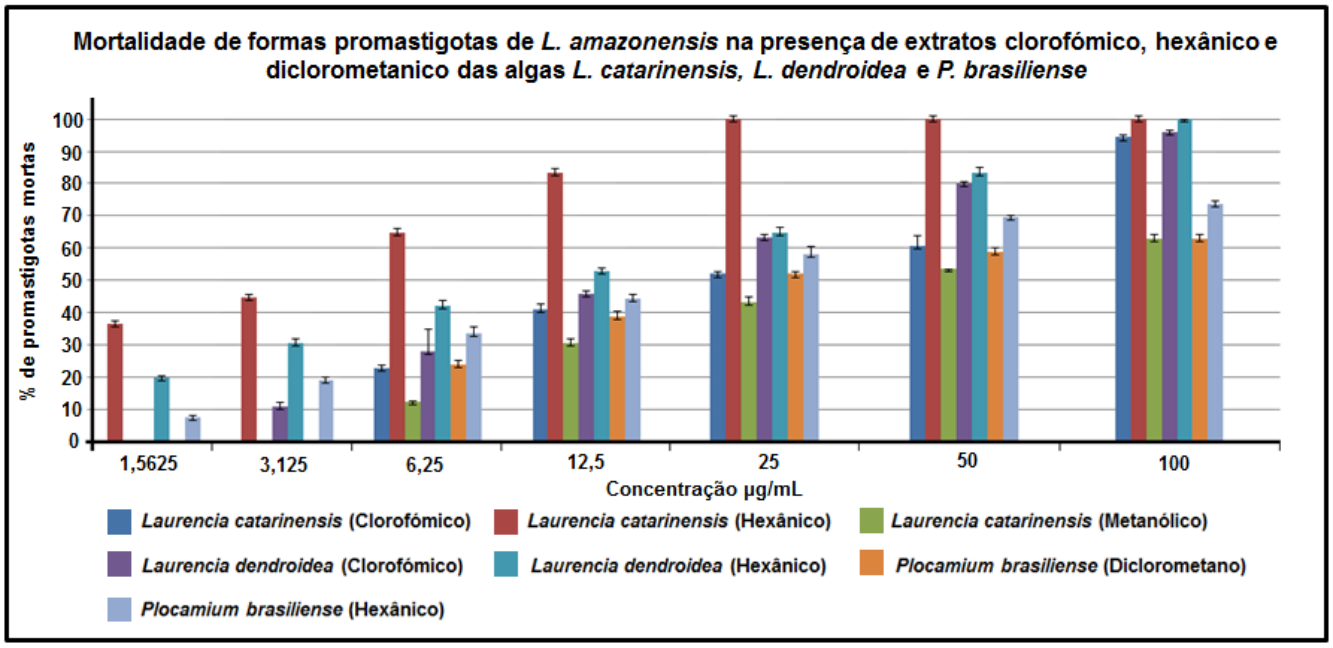


Figura 25: Mortalidade de promastigotas na presença das algas que apresentaram brasileiras cujo CI_{50} foi menor que 50 µg/mL. Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio LIT a 26ºC.Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (100 µg/mL a 1,5625 µg/mL) foram incubadas por 72 horas a 26ºC. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

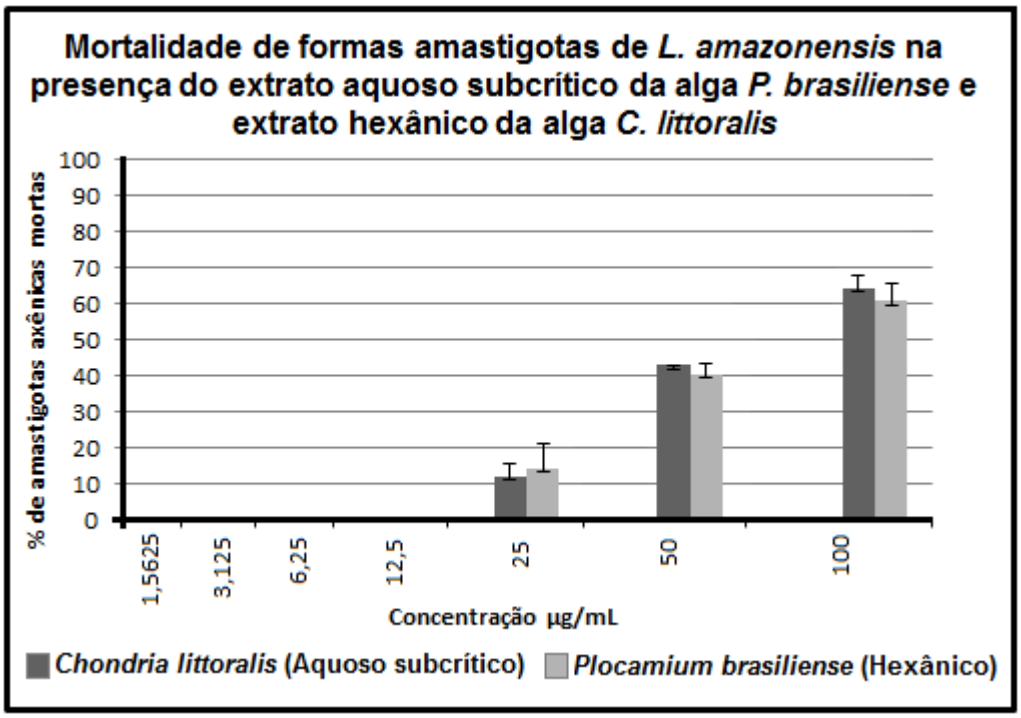


Figura 26: Mortalidade de amastigotas na presença das algas *P. brasiliense*, extrato aquoso subcrítico e *C.littoralis*, extrato hexânico. Formas amastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio LIT pH 5,4 a 38ºC e 5% CO_2. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (100 µg/mL a 1,5625 µg/mL) foram incubadas por 72 horas a 38ºC e 5% CO_2. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

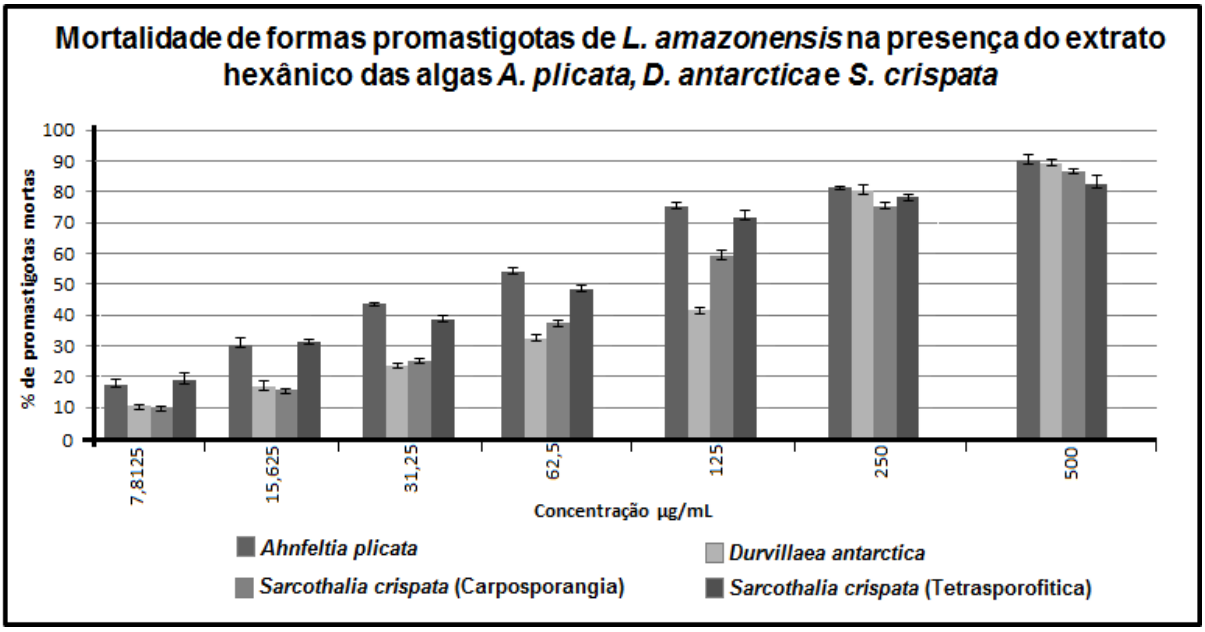


Figura 27: Mortalidade de promastigotas na presença do extrato hexânico das algas *A.plicata, D. antarctica, S.crispata*(carposporangia) e *S. crispata* (tetrasporofitica). Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio LIT a 26ºC. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (500 µg/mL a 7,8125 µg/mL) foram incubadas por 72 horas a 26ºC. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

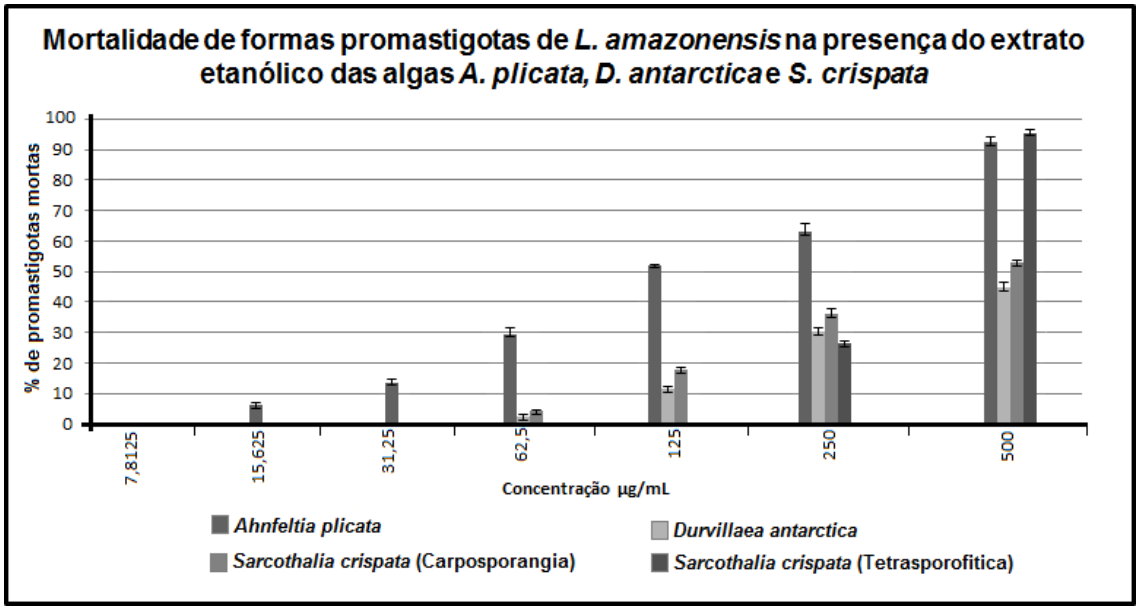


Figura 28: Mortalidade de promastigotas na presença do extrato etanólico das algas *A.plicata, D.antarctica, S.crispata*(carposporangia) e *S. crispata* (tetrasporofitica). Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio LIT a 26ºC. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (500 µg/mL a 7,8125 µg/mL) foram incubadas por 72 horas a 26ºC. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

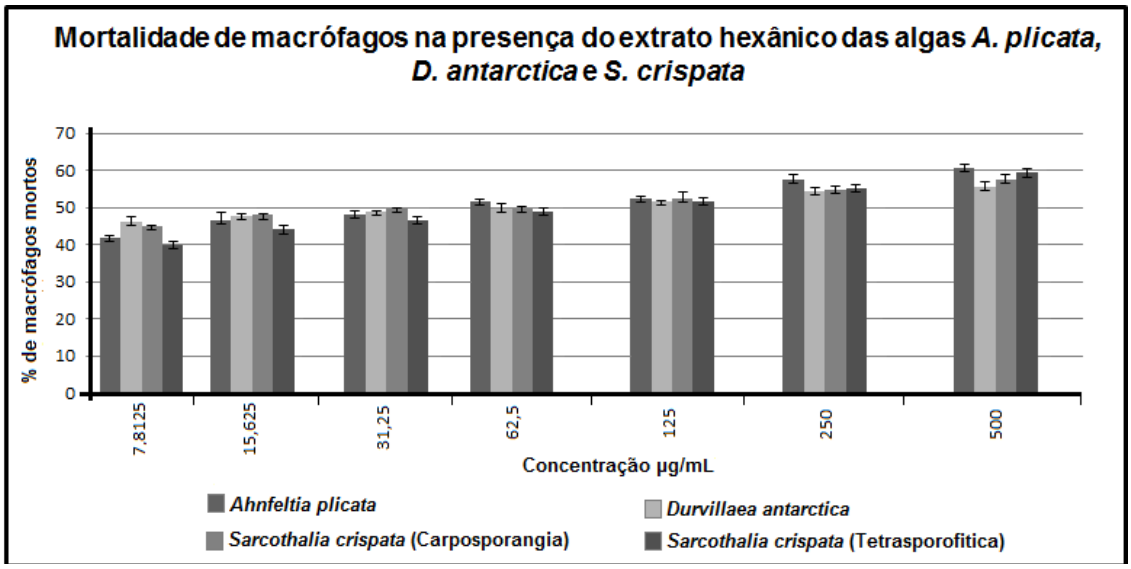


Figura 29: Mortalidade de macrófagos na presença do extrato hexânico das algas *A. plicata, D. antarctica* e *S. crispata.* Macrófagos foram cultivados em meio RPMI a 38ºC e 5% CO_2. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (500 µg/mL a 7,8125 µg/mL) foram incubadas por 24 horas a 38ºC e 5% CO_2. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada em leitor de microplacas (Bio-Tek Elx 800), na qual a absorbância foi determinada em comprimento de onda de 540 nm.

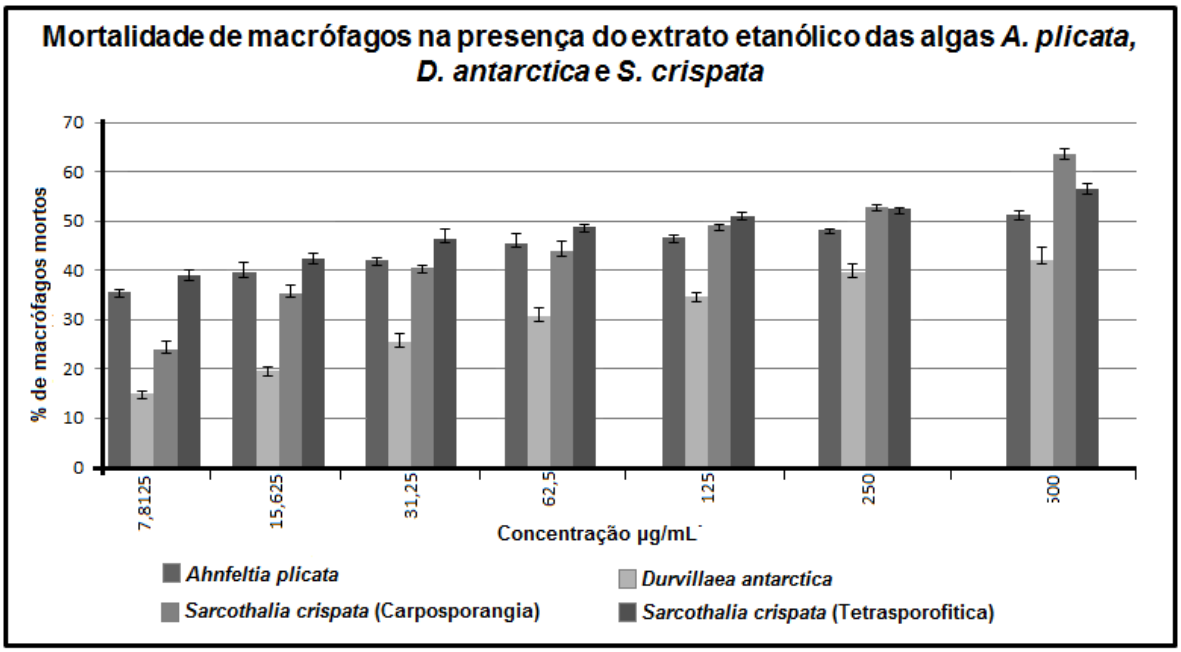


Figura 30: Mortalidade de macrófagos na presença do extrato etanólico das algas *A. plicata, D. antarctica* e *S. crispata.* Macrófagos foram cultivados em meio RPMI a 38ºC e 5% CO_2. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (500 µg/mL a 7,8125 µg/mL) foram incubadas por 24 horas a 38ºC e 5% CO_2. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada em leitor de microplacas (Bio-Tek Elx 800), na qual a absorbância foi determinada em comprimento de onda de 540 nm.

A fim de iniciar avaliação do possível espectro de ação do extrato hexânico de *H. grandifolius*, a mais promissora dentre as algas antárticas e subantárticas analisadas, procedeu-se a realização de ensaios de atividade tripanocida frente à formas procíclicas de *T. brucei*. O extrato hexânico da alga *H. grandifolius* apresentou valores de CI_{50} e IS iguais a 195,9 µg/mL e 2,41, respectivamente, indicando a existência, no extrato, de compostos que podem ser ativos tanto para leishmanias quanto para tripanossomas.

Ressalta-se que todos os ensaios realizados neste projeto foram feitos com extratos brutos das algas, ou seja, tais extratos apresentam grande quantidade de subtâncias na qual algumas destas podem inibir a ação de outras ou, também, o princípio ativo pode-se encontrar em pequena concentração (BANSEMIR et al., 2006), o que justifica, em muitos dos resultados, os elevados valores de CI_{50} quando comparados com os fármacos controles. Assim, o subfracionamento de tais extratos foi importante para enriquecer o(s) principio(s) ativo(s) responsável(is) pela atividade biológica observada. De fato, Felício *et al*., (2010) relataram que o extrato diclorometano da alga *Bostrychia tenella* apresenta baixa atividade frente a *L.*

amazonensis (CI_{50} = 234,3 µg/mL), entretanto, duas subfrações mostraram atividade 60 vezes superior à fração diclorometano (CI_{50} = 4,4 e 4,33 µg/mL).

A partir da análise dos resultados obtidos, o extrato hexânico da alga *H. grandifolius* foi selecionado para subfracionamento pois, além da interessante atividade antiprotozoária observada, existe escassa informação disponível sobre o potencial terapêutico desta macroalga antártica, já que, até o momento, há apenas um relato na literatura sobre potencial atividade anticâncer (GAMBATO et al., 2014). Assim, subfrações foram preparadas e novos ensaios de atividade leishmanicida foram efetuados para posterior avaliação química para iniciar processo de elucidação dos compostos bioativos.

4.3. *Análise Química do extrato hexânico da alga H. grandifolius por CLAE*

4.3.1. Análise Química do extrato hexânico da alga *H. grandifolius*

Os primeiros artigos envolvendo a cromatografia como uma ciência foram publicados em 1906 por Michael Tswett, um botânico russo, o qual separou algumas substâncias de extratos de plantas. Desde então, esta técnica desenvolveu-se e ampliou-se até uma forma instrumental com elevada sofisticação, inicialmente com a cromatografia gasosa (GC), posteriormente a cromatografia líquida (LC) (foco deste trabalho) e, finalmente, a cromatografia com fluido supercrítico(SFC), concebida nos anos 60, mas empregada muito tempo depois de seu desenvolvimento (MÜHLEN e LANÇAS, 2004). A cromatografia é utilizada como técnica analítica, inicialmente para a separação de substâncias coradas e, atualmente, para separar, identificar e quantificar uma grande variedade de compostos ativos (LANÇAS, 1993; MALVIYA et al., 2009).

Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, sendo uma a *fase estacionária,* que apresenta uma grande área superficial, e a outra denominada de *fase móvel,* composta por um fluído que se move através da fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (DEGANI et al., 1998).

Para identificar as substâncias presentes no extrato hexânico da alga *H. grandifolius,* utilizou-se CLAE por fase reversa.Foi realizado um gradiente, no qual a

fase móvel começa com polaridade alta e termina com baixa polaridade. Isso faz com que os compostos polares sejam eluídos primeiro e os mais apolares eluídos posteriormente (VOGEL, 2002). Para a análise, como fase estacionária, utilizou-se uma coluna Kinetex 2.6µm, C18, 50x2.1mm (Phenomenex) e, como fase móvel, utilizou-se água miliQ + ácido fórmico (100:1) e acetonitrila+ isopropanol (50:50). Quando se trabalha com amostras complexas, como extratos de algas, a separação isocrática (uso de um único solvente, com composição constante) geralmente exibe baixa resolução das substâncias eluidas com menor tempo de retenção e difícil detecção das substâncias eluidas com maior tempo de retenção, além da demora para sua eluição. Neste caso a eluição por gradiente (uso de dois ou mais solventes que podem ter sua proporção variada durante a análise) permite melhores condições de separação, otimizando a análise, diminuindo o tempo, aumentando a resolução e reproduzindo picos mais finos e simétricos (SKOOG et al., 2002).

O cromatograma do extrato hexânico da alga *H. grandifolius* obtido por CLAE-EM utilizando-se coluna de fase reversa pode ser visualizado na figura 31.

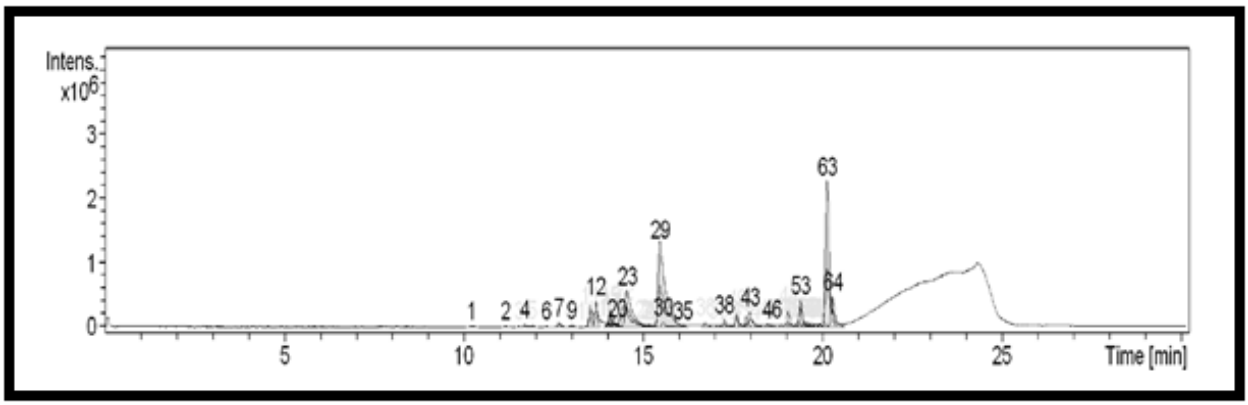


Figura 31: Cromatograma do extrato hexânico da alga *H. grandifolius,* obtido por CLAE-EM.

No cromatograma acima (Figura 31) observou-se que a maior parte dos picos se concentra em tempos de retenção de 10 a 22 minutos e, por se tratar de uma análise onde se utilizou fase reversa, os compostos que aparecem primeiro no cromatograma são mais polares do que aqueles que aparecem por último. Isto porque os picos que devem ser considerados para análise são os picos com características Gaussianas, ou seja, aqueles que não são muito largos e que não apresentem “cauda de arrasto”. Após fracionamento, com as informações disponibilizadas para cada pico, realizou-se a pesquisa em diferentes bancos de dados (Material e Métodos, item 3.9).

Diferentes compostos foram identificados, bem como suas estruturas químicas. Estes compostos são preditos e, muitos deles, podem não corresponder a metabólitos de algas, podendo ser, por exemplo, contaminantes presentes nas amostras; assim, fez-se necessária análise cuidadosa na literatura para correlacionar os compostos identificados como sendo, de fato, metabólitos de algas. Além disso, atividades farmacológicas já descritas na literatura foram úteis para discussão da atividade antiprotozoária obtida. Esta busca preliminar revelou presença de compostos interessantes, como por exemplo, C17 Sphinganine, pico 4, o qual apresenta atividade antifúngica; Torcitabine e 3'-Deoxycytidine, pico 31, apresentam atividade antiviral e inibitória de síntese de DNA, respectivamente; 4,4'-(1,12-Dodecanediyl)bis(5-ethyl-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-one), pico 64, o qual possui atividade antitumoral frente a diferentes linhagens de células. Como trabalhamos com uma espécie praticamente inexplorada, em termos químicos e, visando um contexto de identificação de substâncias um pouco diferente, realizou-se o subfracionamento do extrato hexânico e avaliou-se sua atividade leishmanicida. Neste sentido, o estudo prosseguiu com a análise de 12 subfrações oriundas do extrato hexânico *H. grandifolius*, HSG01 a HSG12, coletadas em diferentes tempos de retenção (Tabela 10).

4.4. *Avaliação da atividade leishmanicida e citotóxica das subfrações da alga H. grandifolius*

O extrato hexânico da alga *H. grandifolius* (Figura 31) foi subfracionada, obtendo-se 12 subfrações (Tabela 8, Material e Métodos). A atividade leishmanicida e citotoxicidade foi determinada como descrito anteriormente e os dados estão mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: Atividade biológica do extrato bruto e subfrações alga *H. grandifolius* juntamente com os controles anfotericina B e pentamidina, frente a formas amastigotas axênicas e promastigotas (CI_{50}) de *L. amazonensis* e macrófragos J774.A1 (CC_{50}).

	Local	Extrato	Subfração	CI_{50} (µg/mL) (IS) Promastigota	CI_{50} (µg/mL) (IS) Amastigota Axênica	CC_{50} (µg/mL) Macrófagos J774.A1
Himanthotallus grandifolius	*Arctowski*	***Hexânico Bruto***	**-**	112 ± 4,15 (**4,21**)	193,15 ± 5,58 (**2,44**)	472,31 ± 1,24
	Arctowski	***Hexânico***	*HGS01*	>250 (**1,00**)	>250 (**1,00**)	>250
	Arctowski	***Hexânico***	*HGS02*	>250 (**1,00**)	>250 (**1,00**)	>250
	Arctowski	***Hexânico***	*HGS03*	>250 (**1,00**)	>250 (**1,00**)	>250
	Arctowski	***Hexânico***	*HGS04*	83,75 ± 1,76 (**2,98**)	213,5 ± 0,70 (**1,17**)	>250
	Arctowski	***Hexânico***	*HGS05*	>250 (**1,00**)	225,25 ± 0,35 (**1,10**)	>250
	Arctowski	***Hexânico***	*HGS06*	224,50 ± 2,82 (**1,11**)	199,85 ± 0,91 (**1,25**)	>250
	Arctowski	***Hexânico***	*HGS07*	182,15 ± 0,21 (**1,37**)	244,5 ± 2,12 (**1,02**)	>250
	Arctowski	***Hexânico***	*HGS08*	98,15 ± 0,21 (**2,54**)	249,35 ± 0,91 (**1,00**)	>250
	Arctowski	***Hexânico***	*HGS09*	>250 (**1,00**)	115,65 ± 0,21 (**2,16**)	>250
	Arctowski	***Hexânico***	*HGS10*	246,15 ± 0,22 (**1,01**)	>250 (**1,00**)	>250
	Arctowski	***Hexânico***	*HGS11*	22,55 ± 0,25 (**11,08**)	>250 (**1,00**)	>250
	Arctowski	***Hexânico***	*HGS12*	42,95 ± 0,07 (**5,82**)	>250 (**1,00**)	>250
Anfotericina B	**-**	**-**	**-**	1,45 ± 0,07 (**4,89**)	23,5 ± 2,12 (**0,3**)	7,1 ± 0,28
Pentamidina	**-**	**-**	**-**	3,22 ± 0,13 (**12,5**)	20,25 ± 1,76 (**2**)	41 ± 7,07

As subfrações HGS11 e HGS12 (Figuras 32 e 33) apresentaram atividade pelo menos três vezes superior ao extrato hexânico (CI_{50} = 22,55 e 42,95 µg/mL, respectivamente). A subfração mais ativa, HSG11, mostrou-se mais seletiva para o parasito, como pode ser observado pelo valor de IS obtido, (IS=11,08), ou seja, esta subfração é pelo menos 2,26 vezes mais seletiva para o parasito do que a anfotericina B, um fármaco já utilizado no tratamento das leishmanioses. Além disto, esta fração foi 2,63 vezes mais seletiva para o parasito quando comparada com seu extrato bruto. Outra fração que também merece destaque é a HSG12, que é pelo menos 1,19 e 1,38 vezes mais seletiva para o parasito do que a anfotericina B e o extrato bruto desta alga, respectivamente.

Extratos brutos são misturas complexas de compostos e, com o auxílio do subfracionamento por CLAE-EM, foi possível simplificar a mistura de compostos, reduzindo interferências e aumentando a concentração de produtos minoritários. Porém em outros casos, como descrito por Stengel e colaboradores (2011), a bioatividade do extrato pode ser proveniente do sinergismo entre alguns compostos presentes no extrato e, quando se aplicam técnicas de separação e purificação, suas subfrações podem perder sua atividade, o que pode ser o caso das subfrações HGS01, 02, 03, 05 e 09 que tiveram suas atividades reduzidas em aproximadamente 2,23 quando comparadas com o extrato hexânico bruto (KOEHN e CARTER 2005; BANSEMIR et al., 2006; STENGEL et al., 2011).

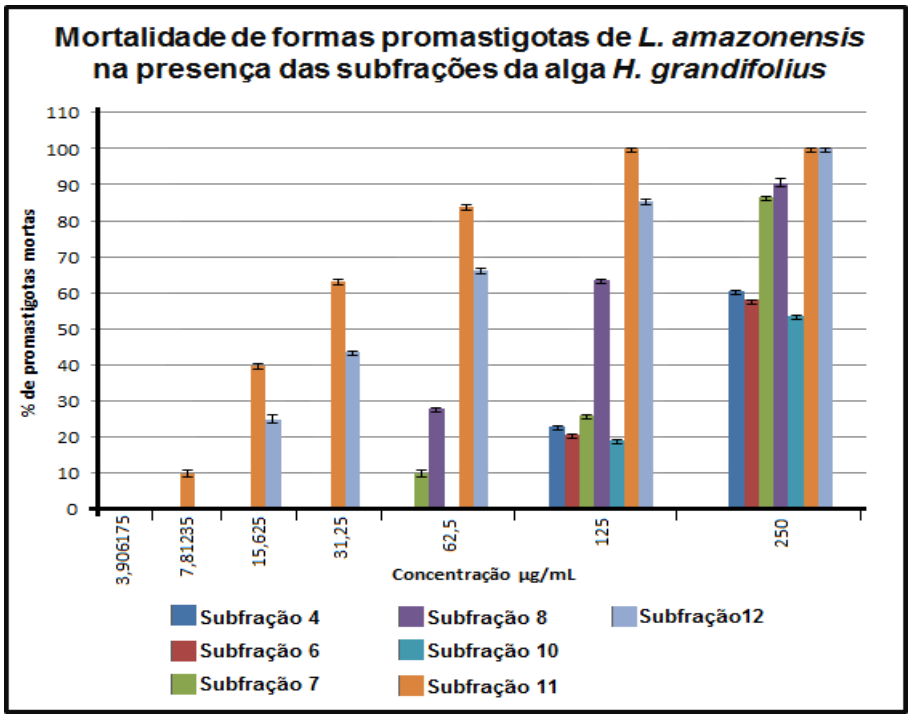


Figura 32: Mortalidade de promastigotas na presença das subfrações do extrato hexânico da alga *H. grandifolius*. Formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio LIT a 26ºC. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (250 µg/mL a 3,906174 µg/mL) foram incubadas por 72 horas a 26ºC. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

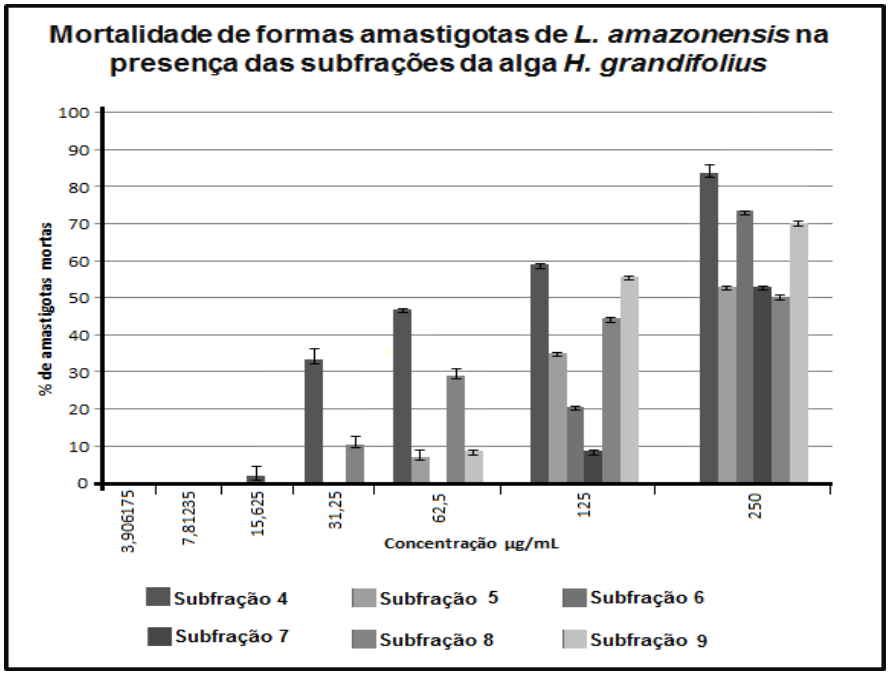


Figura 33: Mortalidade de promastigotas na presença das subfrações do extrato hexânico da alga *H. grandifolius*. Formas amastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio LIT pH 5,4 a 38ºC e 5% CO_2. Placas de 96 poços contendo a cultura na presença de diferentes concentrações dos extratos (250 µg/mL a 3,906175 µg/mL) foram incubadas por 72 horas a 38ºC e 5% CO_2. A porcentagem de citotoxicidade foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

4.5. Análise Química das subfrações do extrato hexânico da alga *H. grandifolius*

As subfrações HSG11 e HSG12 foram selecionadas para análise química para identificação de potenciais compostos envolvidos na atividade leishmanicida apresentada. O cromatograma das duas subfrações estão mostrados nas figuras 34 e 35.

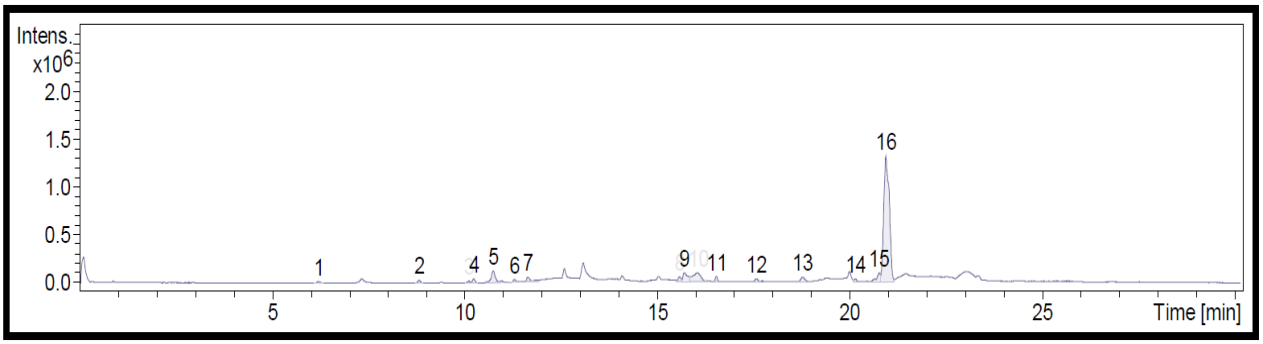


Figura 34: Cromatograma da subfração HSG11 do extrato hexânico da alga *H. grandifolius,* obtido por CLAE-EM.

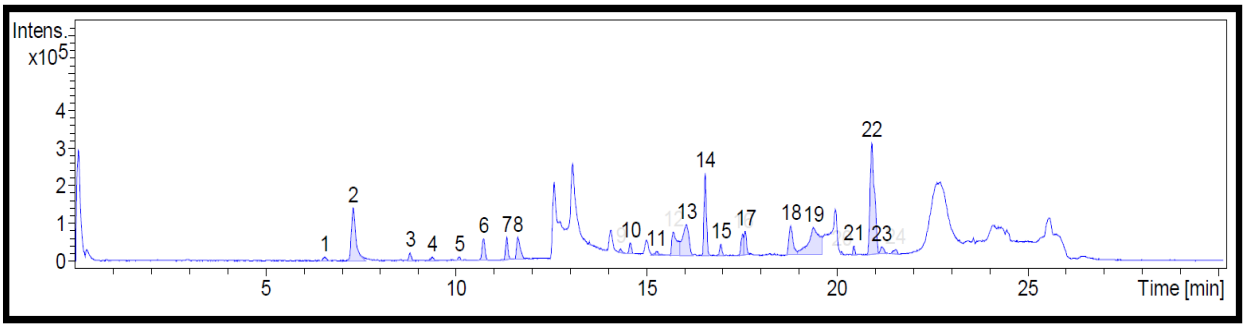


Figura 35: Cromatograma da subfração HSG12 do extrato hexânico da alga *H. grandifolius,* obtido por CLAE-EM.

Como era esperado, os cromatogramas acima, apresentaram menor número de picos quando comparados ao cromatograma do extrato bruto hexânico (Figura 31). Informações adicionais sobre cada pico de ambos os cromatogramas encontram-se nos anexos A e B.

O cromatograma da subfração HSG11 (Figura 34) revelou um pico de maior intensidade, aqui denominado pico 16. Pesquisa realizada nos bancos de dados Metlin, PubChem, Chemspider e Chebi, mostrou que o pico 16 corresponde ao ácido graxo 13E-Docosenamide (Δppm = 1), encontrado em microalgas do gênero *Symbiodinium* (PARKINSON e BAUMS, 2014), porém, ainda não existem relatos de potencial atividade biológica para o mesmo (Figura 36).

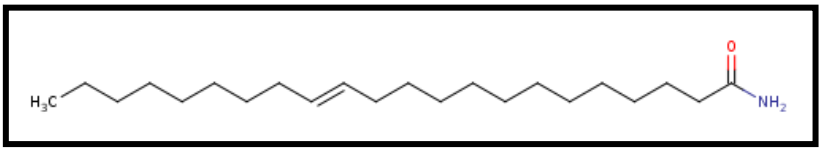


Figura 36: Estrutura química do composto 13E-Docosenamide

Encontrou-se ainda o triterpeno Roxburghiadiol B (Δppm = 0,9), com fórmula $C_{29}H_{48}O_2$ e massa 429. 3725, referente ao pico 15, o qual possui atividade anti-inflamatória, antiviral, anticâncer e moderada atividade hipoglicemiante (JANAKI et al., 1999); além disso, nosso grupo de pesquisa já identificou outros triterpenos, maytenina e pristimerina, oriundas da planta terrestre *Maytenus ilicifolia*, com atividade leishmanicida (SANTOS, 2013); além disso, este também pode corresponder ao 25-hydroxysarcosterol (Δppm = 0,9), que já foi descrito nas espécies de coral *Sarcophyton glaucum* e *Sinularia mayi* (KOBAYASHI, 1994; WANG et al., 2013). Para o pico de número 13, com massa 413.2662 e fórmula $C_{24}H_{37}NaO_4$, encontrou-se o provável composto Apocolato de Sódio (Δppm = 1), que apresenta atividade bactericida frente a linhagens de *Pneumococcus* (DOWNIE et al., 1931; SMITH, 1939).

Análise do cromatograma da subfração HSG12 (Figura 35), encontrou-se 23 picos, sendo o pico 22 o de maior intensidade. Comparando os cromatogramas e as informações químicas obtidas para ambas as subfrações, verificou-se que o pico de número 16 da subfração HSG11, e o pico número 22 da subfração HSG12, apresentam mesmo tempo de retenção, a mesma fórmula química e o mesmo peso molecular provável, portanto, o pico de número 22 da subfração HSG12 também é referente ao composto 13E-Docosenamide.

Como as duas subfrações foram coletadas com um milésimo de segundos de diferença entre elas, é possível que a subfração HSG12 tenha adquirido uma pequena porção da subfração HSG11, o que justificaria a presença do composto 13E-Docosenamide em ambas as frações. Além disso, como se pode verificar nos cromatogramas, a intensidade do pico referente ao composto na subfração HSG11 é aproximadamente 10 vezes maior que aquela encontrada para o pico da subfração HSG12, o que corrobora com o achado para o ensaio biológico para estas subfrações, já que a subfração 11 apresentou CI_{50} de 22,55 μg/mL frente à forma promastigota de *L. amazonensis,* enquanto a subfração 12 apresentou atividade aproximadamente duas vezes inferior (CI_{50} = 42,95 μg/mL), ou seja, na subfração 11 o composto encontra-se em maior concentração.

Ainda, destaca-se o o provável composto 3-Ethyl-5-methoxy-N-{4-[4-(2-methylphenyl)-1-piperidinyl]cyclohexyl}-1H-indole-2-carboxamide (Δppm = 1) para o pico 17, com fórmula $C_{30}H_{49}N_3O_2$ e massa 474.3134, que apresenta atividade contra *Plasmodium falcioparum* (GAMO et al., 2010).

Além destes compostos citados acima, nos Apêndices B e C encontram-se os demais compostos identificados, bem como suas estruturas químicas, que apresentam a mesma massa e fórmula química para cada um dos picos de ambos os cromatogramas.

Para confirmar se o composto responsável pela ação leishmanicida das subfrações é, realmente, o 13E-Docosenamide, será necessário novo fracionamento das subfrações, seguido de fragmentação. Além disso, essa subfração será testada frente a formas amastigotas intracelulares, para avaliar se a atividade anti-amastigota será potencializada, pois em pH baixo (5.4) (caso do ensaio com amastigotas axênicas), é possível que este composto esteja passando por algumas modificações químicas como demonstrado na figura 37, a amida pode estar sofrendo protonação, ou hidrólise (Figura 37).

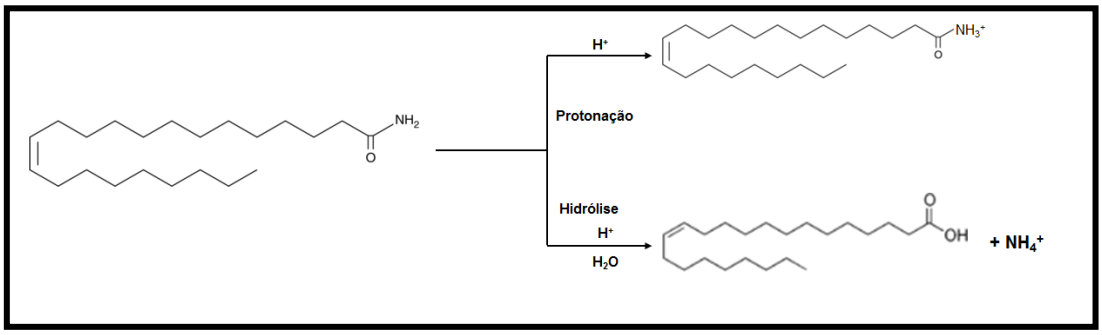


Figura 37: Reação de protonação e hidrólise, bem como os compostos resultantes, que 13E-Docosenamide por estar sofrendo no ambiente acídico no qual o ensaio de amastigota axênica foi realizado.

Nos ensaios com formas amastigotas axênicas, o meio utilizado para este ensaio possui pH ácido (5,4), por tal motivo, imaginamos que o composto 13E-Docosenamide possa sofrer modificações como protonação ou hidrólise, fazendo com que este perca sua ação frente as formas amastigotasaxênicas de *L. amazonensis.* Por tal motivo, o ensaio com formas amastigotas intracelulares é essencial para determinar se esta molécula apresenta ação anti-amastigota.

Conclusões

5. Conclusão

Foram avaliados 24 extratos de algas provenientes do continente Antártico, do Chile e também do literol brasileiro, bem como algumas subfrações do extrato hexânico da alga *H. grandifolius*, contra formas promastigotas, amastigotas de *L. amazonensis*, formas prociclicas de *T. brucei* e macrófagos da linhagem J774.A1.

Dezoito extratos apresentaram atividade leishmanicida, mesmo que em alguns casos esta possa ter sido inferior àquela apresentada pelos fármacos controles.

Nos ensaios para avaliação de citotoxicidade em macrófagos J774.A1, onze extratos foram menos citotóxicos do que os controle anfotericina B e pentamidina.

Sete extratos apresentaram atividade tripanocida frente à formas prociclicas de *T. brucei.*

Pautado em parâmetros de IS e, também, no quesito de ineditismo, o extrato hexânico da alga *H. grandifolius* foi selecionado para análise química e subfracionamento. Do extrato bruto foram obtidas 12 subfrações que foram ensaiadas frente à formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* bem como macrófagos J774.A1. Os resultados encontrados para estes ensaios são muito interessantes e importantes, pois corroboram com o descrito por Gambato e colaboradores (2014).

A subfração HSG11 obtida a partir do extrato hexânico da alga *H. grandifolius* apresentou uma melhora na ação leishmanicida de 4,96 e com seletivada 2,63 vezes maior para o parasito quando comparada com o extrato bruto desta mesma alga.

A subfração HSG12 apresentou uma melhora de 2,6 vezes na ação leishmanicida e foi 1,32 vezes mais seletiva para o parasito quando comparada com o extrato bruto desta mesma alga.

As subfrações HSG11 e HSG12 foram 6,09 vezes menos citotóxicas do que a anfotericina B e a pentamidina, fármacos utilizados no tratamento de leishmanioses.

Os indices de seletividade (IS) para as subfrações HSG11 e HSG 12 foram de 11,08 e 5,82, respectivamente, e para a anfotericina B e pentamidina foi de 4,89 e 12,5, respectivamente porém, ressalta-se que a pentamidina é um fármaco tóxico.

A análise química das subfrações HSG11 e HSG12 associada a busca em diferentes bancos de dados de compostos nos permitiu identificar um compostos em comum para ambas as subfrações.

O composto identificado é denominado 13E-Docosenamide, e com os resultados obtidos nos ensaios biológicos e com a análise química, acreditamos que este composto é o provável responsável pela ação leishmanida do extrato. Mas não se tem certeza de que esta é realmente a molécula.

Ressalta-se que não existem relatos na literatura da ação desta alga ou deste composto como possíveis agentes terapêuticos para o tratamento de leishmanioses.

Em vista dos resultados obtidos para as subfrações da alga *H. grandifolius,* também se faz importante o subfracionamento das outras algas avaliadas neste estudo, pois somente foram avaliados seus extratos brutos.

Perspectívas

6.Perspectivas

Isolar o pico das subfraçõs que apresenta o composto 13E-Docosenamide e realizar sua confirmação por fragmentação.

Com a confirmação da molécula, realizar estudos farmacocinéticos.Para isso será necessário desenvolver um método bioanalítico para quantificação do fármaco no fluído biológico proposto. Após o desenvolvimento e validação, segundo as normas do FDA e ANVISA, do método bioanalítico, será iniciada a etapa de estudo de estabilidade. Nestes ensaios são preparados meios que simulam o fluido gástrico, intestinal e o plasma, para saber se a molécula é estável sob estas condições.

Para o estudo, a via de administração do fármaco será por via intraperitoneal. O fármaco será administrado na dose em que foram realizados os ensaios de atividade (obedecendo os limites de quantificação do método bioanalítico e as extrapolações nos casos em que o ensaio de atividade tenha sido feito em outro modelo animal) e amostras de sangue serão coletadas em tempos pré-estabelecidos. Após as coletas, as amostras serão quantificadas através do método bioanalítico e a concentração plasmática do fármaco será determinada em cada tempo. Através do gráfico de concentração plasmática versus tempo será possível calcular os parâmetros farmacocinética do fármaco.

Realizar ensaios de amastigota intracelular para aquelas algas que apresentaram elevado valor de CI_{50} para as formas amastigotas axênicas.

Para as algas que apresentaram boa ação frente as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, realizar ensaio de atividade tripanocida frente às formas procíclicas de *T. brucei*.

Referências

Referências

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0035671

AMATO, V. S. Tratamento da Leishmaniose tegumentar Americana. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 3, p. 2-6, 2006.

BALANCO, J. M. F. et al. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. **Parasitology**, v. 116, p. 103-113, 1997.

BANSEMIR, A. et al. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Aquaculture**, v. 252, p. 79-84, 2006.

BARRET, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**, v. 104, p. 175-196, 2012.

BATES, P. A. Transmission o Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Internation Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1097-1106, 2007.

BERMAN, J. D. Chemotherapy of Leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, p. 560-586, 1988.

BERN, C. et al. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. **Reviews of Anti-Infective Agents**, v. 43, p. 917-924, 2006.

BERNARDES FILHO, F. et al. Occurrence of two autochthonous cases of American cutaneous leishmaniasis in the neighborhood of Caju, city of Rio de Janeiro, Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 5, p. 848-850, 2014.

BHARGAVA, P.; SINGH R. Developments in diagnosis and antileishmanial drugs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2012, 2012. doi: dx.doi.org/10.1155/2012/626838.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 30, p. 237-323, 2013.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal of Parasitology**, v. 28, p. 121-134, 1998.

BOLD, H. C.; WYNNE, M. J. **Introduction to the algae structure and reproduction**. 2nd ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1985.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 2. ed. Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. Brasília, DF, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. AIDS e DST. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, DF, v. 1, n. 1, 2013. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55559/_p_boletim_2013_internet_pdf_p__51315.pdf >. Acesso em: 10 ago. 2014.

BRUN, R.; BLUM, J. Human african trypanosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 261-273, 2012.

BUATES, S.; MATLASHEWSKI, G. Treatment of experimental Leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, p. 1485-1494, 1999.

BURZA, S. et al. Post kala-azar dermal leishmaniasis following treatment with 20 mg/kg liposomal amphotericin B (Ambisome) for primary visceral leishmaniasis in Nihar, India. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, 2014. doi:0.1371/journal.pntd.0002611

CAAMAL-FUENTES, E. et al. Bioprospecting of brown seaweed (Ochrophyta) from the Yucatan Peninsula: cytotocix, antiproliferative, and antiprotozoal activities. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 1009-1017, 2014.

CANTILLO-CIAU, Z. et al. The tropical brown alga *Lobophora variegata*: a source of antiprotozoal compounds. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1292-1304, 2010.

CARDOZO, K. H. M. et al. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part C**: Toxicology & Pharmacology, v. 146, p. 60-78, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Leishmaniasis**: biology. 2014a. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em: 03 set. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **African trypanosomiasis**: biology. 2014b. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html>. Acesso em: 03 set. 2014.

CHATTOPADHYAY, A.; JAFURULLA, M. D. A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 416, p. 7-12, 2011.

CHAWLA, B. et al. Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin – susceptible – resistant *Leishmania donovani*. **PLoS One**, v. 6, p. 1-12, 2011.

CHIN, Y. et al. Drug discovery from natural sources. **Aaps Journal**, v. 8, p. E239-E253, 2006.

COELHO, A. C. et al. Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. **Experimental Parasitology**, v. 120, p. 98-102, 2008.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

CRESPO, M. O. P.; YUSTY, M. A. L. Comparison of supercritical fluid extraction and soxhlet extraction for the determination of aliphatic hydrocarbons in seaweed samples. **Ecotoxicology and Environment Safety**, v. 64, p. 400-405, 2006.

CROFT, S. L. et al. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 111-126, 2006a.

CROFT, S. L. et al. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 399-410, 2006b.

CRUZ, I. et al. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 357-388, 2006.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by Leishmania. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p. 132-141, 2002.

CUPOLILLO, E. et al. Revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology Today**, v. 16, p. 142-143, 2000.

DAVIDSON, R. N. et al. Paromomycin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 653-660, 2009.

DEGANI, A. L. G. et al. Cromatografia: um breve ensaio. **Atualidades em Química**, v. 7, p. 21-25, 1998.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, p. 3-15, 2003.

DHARGALKAR, V. K.; PEREIRA, N. Seaweed: promising plant of the millenium. **Science and Culture**, v. 71, p. 60-66, 2005.

DÍAZ, O. et al. Total and inorganic arsenic concentrations in different species of economically important algae harvested from coastal zones of Chile. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 744-749, 2012.

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

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2576-2597, 2012.

DOUVOYIANNIS, M. et al. Cutaneous leishmaniasis in North Dakota. **Clinical Infecitous Diseases**, v. 59, p. 73-75, 2014.

DOWNIE, A. E. et al. The bile solubility of pneumococcus, with special reference to the chemical structure of various bile-salts. **The British Journal of Experimental Pathology**, v. 12, p. 1-9, 1931.

FEASEY, N. et al. Neglected tropical diseases. **British Journal Bulletin**, v. 93, p. 179-200, 2010.

FELÍCIO, R. de et al. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 763-769, 2010.

FERNÁNDEZ, O. et al. Novel approach to *in vitro* drug susceptibility assessment of clinical strains of *Leishmania* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p. 2207-2211, 2012.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **MultiCiência**, v. 7, p. 1-8, 2006.

FRAGA, J. et al. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 238-245, 2010.

FREARSON, J. A. et al. N-myristoyltransferase inhibitors as new leads to treat sleeping sickness. **Nature**, v. 464, p. 728-734, 2010.

FREILE-PELEGRIN, Y. et al. Antileishmanial properties of tropical marine algae extracts. **Fitoterapia**, v. 79, p. 374-377, 2008.

FRÉZARD, F. et al. Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action. **Reviews in Inorganic Chemistry**, v. 33, p. 1-12, 2013.

GAMBATO, G. et al. Brown algae *Himantothallus grandifolius* (Desmarestiales, Phaephyceae) suppresses proliferation and promotes apoptosis-mediated cell death in tumor cells. **Advances in Biological Chemistry**, v. 4, p. 98-108, 2014.

GAMO, F. J. et al. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. **Nature**, v. 465, p. 305-310, 2010.

GOMES, C. M. et al. Mucocutaneous leishmaniasis: accuracy and molecular validation of noninvasive procedures in *L. (V.) braziliensis*-endemic area. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, p. 413-418, 2014.

GRESSLER, V. et al. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four brazilian red algae species. **Food Chemistry**, v. 120, p. 585-590, 2010.

GRESSLER, V. et al. Sesquiterpenes from the essential oil of *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta): isolation, biological activities and distribution among seaweeds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 248-254, 2011.

HADIGHI, R. et al. Unresponsiveness to glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasite. **PLoS Medicine**, v. 3, 2006. doi:10.1371/journal.pmed.0030162.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 894-901, 2008.

HILTENSPERGER, G. et al. synthesis and structure-activity relationships of new quinolone-type molecules against *Trypanosoma brucei*. **Journal of Medical Chemistry**, v. 55, p. 2538-2548, 2012.

HOLLNAGEL, H. C. et al. The effect of light on the biosynthesis of β-carotene and superoxide dismutase activity in the photosynthetic alga *Gonyaulax polyedra*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 105-111, 1996.

HOLMES, P. Tsetse-transmitted trypanosomes- their biology, disease impact and control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 11-14, 2013.

HUOVINEN, P. et al. A five-year study of solar ultraviolet radiation in southern Chile (39ºS): potential impact on physiology of coastal marine algae? **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, p. 515-522, 2006.

JANAKI, S. et al. Anti-inflammatory activity of *Aglia roxburghiana* var. beddomei extract and triterpenes roxburghiadiol A and B. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 45-51, 1999.

KARAGIANNIS-VOULES, D. A. et al. Bayesian geostatistical modeling of leishmaniasis incidence in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 7, 2013. doi:10.1371/journal.pntd.0002213.

KAZEMI-RAD, E. et al. Identification of antimony resistance markers in *Leishmania tropica* field isolates through a cDNA-AFLP approach. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 344-349, 2013.

KENNEDY, P. G. E. An alternative form of melarsoprol in sleeping sickness. **Trend in Parasitology**, v. 28, p. 307-310, 2012.

KOBAYASHI, M. Marine sterols. 27. 25-Jydroxy derivative of sarcosterol, a novel marine sterol with a 23-methyl and a 17(20)*E*-double bound, from the soft coral *Sinularia mayi*. **Steroids**, v. 59, p. 27-29, 1994.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature**, v. 4, p. 206-220, 2005.

KUEPFER, I. et al. Safety and efficacy of the 10-day melarsoprol schedule for the treatment of second stare rhodesiense sleeping sickness. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, e1695, 2012. doi:10.1371/journal.pntd.0001695.

LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 15, p. 279-289, 2007.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 254 p.

LARGERON, M. et al. Synthesis and *in vitro* evaluation of new 8-amino-1,4-benzoxazine derivatives as neuroprotective antioxidants. **Journal of Medical Chemistry**, v. 42, p. 5043-5052, 1999.

LHULLIER, C. et al. Cytotoxic halogenated metabolites from the brazilian red alga *Laurencia catarinensis*. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 27-32, 2010.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of na era or na endless frontier? **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.

LINDOSO, J. A. L. et al. Review of the current tratments for leishmaniases. **Reasearch and Reports in Tropical Medicina**, v. 3, p. 69-77, 2011.

MACHADO, F. L. da S. et al. Antileishmanial sesquiterpenes from the brazilian red alga *Laurencia dendroidea*. **Planta Medica**, v. 77, p. 733-735, 2011.

MALVIYA, R. et al. High performance liquid chromatography: a short review. **Journal of Global Pharma Technology**, v. 2, p. 22-26, 2010.

MALVY, D.; CHAPPUIS, F. Sleeping sickness. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 986-996, 2011.

MANILAL, A. et al. Biopotentials of seaweeds collected from southwest coast of India. **Journal of Marine Science and Technology**, v. 17, p. 67-73, 2009.

MARTINEZ-NADAL, N. G. et al. Sarganin and chonalgin, new antibiotic substances from marine algae from Puerto Rico. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 161, p. 68-72, 1963.

MARTINS, C. D. L. et al. Antioxidant properties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 1179-1187, 2012.

MAUL, A. A. et al. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, p. 185-200, 1996.

MAYER, A. M. S. et al. Marine pharmacology in 2009-2011: marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Marine Drugs**, v. 11, p. 2510-2573, 2013.

McCHESNEY, J. D. et al. Plant natural products: back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2015-2022, 2007.

MELO, F. R. M. de et al. Epidemiological patterns of mortality due to visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection in Brazil, 2000-2011. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Advance Acess**, v. 6, p. 338-347, 2014.

MENETREZ, M. Y. An overview of algae biofuel production and potential environmental impact. **Environmental Science and Technology**, v. 13, p. 7073-7085, 2012.

MOHAMMED, K. A. et al. Laurenditerpenol, a new diterpene from the tropical marine alga *Laurencia intricata* that potently inhibits HIF-1 mediated hypoxic signaling in breast tumor cells**. Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2002-2007, 2004.

MOHEBALI, M. et al. Comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for the treatiment of zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) by a randomized clinical trial in Iran. **Acta Tropica**, v. 103, p. 33-40, 2007.

MOO-PUC, R.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRIN, Y. Enhanced antitumoral activity of extracts derived from cultures *Udotea flabellum* (Chlorophyta). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011. doi:dx.doi.org/10.1155/2011/969275.

MOO-PUC, R. et al. Evaluation of selected tropical seaweeds for in vitro anti-trichomonalactivity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 92-97, 2008.

MOORE, A. C. Prospects for improving African trypanosomiasis chemotherapy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, p. 1793-1795, 2005.
MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 56, p. 55-63, 1983.

MÜHLEN, C.; LANÇAS, F. M. Cromatografia unificada. **Química Nova**, v. 27, p. 747-753, 2004.

NEAL, R. A. et al. Aminosidine ointments for the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicina & Hygiene**, v. 88, p. 223-225, 1993.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1216-1238, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NJOROGE, M. et al. Recent approaches to chemical discovery and development against malaria and the neglected tropical diseases human African trypanosomiasis and schistosomiasis. **Chemical Reviews**, 2014. doi: 10.1021/cr500098f.

OKUMURA, Y. et al. A case of mucocutaneous leishmaniasis diagnosed by serology. **The Journal of Demartology**, v. 41, p. 739-742, 2014.

OLIVEIRA NETO, M. P. de; MATTOS, M. S. Sucessful therapuetic response of resistant cases of mucocutaneous leishmaniasis to a very low dose of antimony. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 376-378, 2006.

PANELLA, S. et al. A preliminary contribution to understanding the hydrological characteristics of the Strait of Magellan: Austral spring 1989. **Bollettino di Geofisica Teorica e Applicata**, v. 9, p. 107-126, 1991.

PARKINSON, J. E.; BAUMS, I. B. The extended phenotypes of marine symbioses: ecological and evolutionary consequences of intraspecific genetic diversity in coral-algal associations. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014. doi: 10.3389/fmicb.2014.00445.

PASSERINI, G. **Avaliação do potencial tripanocida de substâncias extraídas da família Piperaceae em formas epimostigotas de *Trypanosoma cruzi***. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

PATOLE, S. et al. Multiple relapses of visceral leishmaniasis in a patient with HIV in India: a treatment challenge. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 24, p. 204-206, 2014.

PERRY, M. R. et al. Chronic exposure to arsenic in drinking water can lead to resistance to antimonial drugs in a mouse model of visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 19932-19937, 2013.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 147-154, 2014.

REICHELT, J. L.; BOROWITZKA, M. A. Antimicrobial activity from marine algae: results of a large-scale screening programme. In: BIRD, C. J.; RAGAN, M. A. (Ed.). **Eleventh international seaweed symposium**. Dordrecht: Springer Netherçands, 1984. p. 158-168. (Development in hidrobiology, v. 22).

REVEIZ, L. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. **PLoS One**, v. 8, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0061843

ROYCHOUDHURY, J. et al. Therapy with sodium stibogluconate in stearylamine-bearing liposomes confers cure against SSG-resistant *Leishmania donovani* in BALB/c mice. **PLoS One**, v. 6, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0017376.

RUPEREZ, P. Mineral contente of edible marine seaweeds. **Food Chemistry**, v. 79, p. 23-26, 2002.

SABINA, H. et al. Antileishmanial activity in the crude extract of various seaweed from the coast of Karachi, Pakistan. **Pakistan Journal ok Botany**, v. 37, p. 163-168, 2005.

SANTOS, D. O. et al. Leishmaniasis treatment - a challeng that remains: a review. **Parasitology Reasearch**, v. 103, p. 1-10, 2008.

SANTOS, V. A. F. F. M. dos et al. Antiprotozoal activity of quinonemethide triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, v. 18, p. 1053-1062, 2013.

SEIFERT, K. Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 31-39, 2011.

SEIFERT, K.; CROFT, L. *In vitro* and *in vivo* interations between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrobial Agentes Chemotherapy**, v. 50, p. 73-79, 2006.

SIMARRO, P. P. et al. Update on field use of the available drugs for the chemotherapy for human African trypanosomiasis. **Parasitology**, v. 139, p. 842-846, 2012.

SINDERMANN, H. et al. Miltefosine (Impavido®): the first oral treatment against leishmaniasis. **Medical Microbiology Immunology**, v. 193, p. 173-180, 2004a.

SINDERMANN, H. et al. Oral miltefosine for leishmaniasis and immunocompromised patients: compassionate use in 39 patients with HIV infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 1520-1523, 2004b.

SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prosprects. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1-9, 2014.

SINGH, N. et al. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, p. 485-497, 2012.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J.; NIEMAN, T. **Príncipios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SMITH, W. The action of bile salts on viruses. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 49, p. 557-571, 1939.

SOUSA-GOMES, M. L. de et al. Coinfecção *Leishmania*-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 4, p. 519-526, 2011.

SPÄTH, G. F. et al. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of Leishmania major infections in mammalian hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 9536-9541, 2003.

STEIN, E. M. **Avaliação das atividades biológicas e composição química dos extratos de algas vermelhas do gênero *Laurencia***. 2011. 167 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

STENGEL, D. B. et al. Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 483-501, 2011.

STEVENSON, R. J.; SMOL, J. P. Use of algae in environmental assessments. In: WEHR, J. D.; SHEATH, R. G. (Ed.). **Freshwater algae in North America**: classification and ecology. San Diego: Academic Press, 2003. p. 775-804.

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

SULSEN, V. P. et al. Trypanocidal and leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 2415-2419, 2008.

TEMPONE, A. G. et al. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. **Planta Medica**, v. 77, p. 572-585, 2011.

THUITA, J. K. et al. Pharmacology of DB844, and orally active aza analogue of pafuramidine, in a monkey model of second stage human African trypanosomiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, 2012. doi:10.1371/journal.pntd.0001734.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. e525-e532, 2011.

TORRES, D. C. et al. Assessment of drug resistance related genes as candidate markers for treatment outcome prediction of cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 126, p. 132-141, 2013.

TORRES, F. A. E. et al. New drugs with antiprotozoa activity from algae: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 265-276, 2014.

TRINCONI, C. T. et al. Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 2608-2613, 2014.

VARKEVISSER, R. et al. Structure-activity relationships of pentamidine-affected ion channel trafficking and dofetilide mediated rescue. **British Journal of Pharmacology**, v. 269, p. 1322-1334, 2013.

VOGEL, A. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 462 p.

VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C. et al. Antiprotozoal activities of organic extracts from French marine seaweeds. **Marine Drugs**, v. 9, p. 922-933, 2011.

WANG, Z. et al. Bioactive polyoxygenated steroids from the south China sea soft coral, *Sarcophyton* sp. **Marine Drugs**, v. 11, p. 775-787, 2013.

WENGERT, O. et al. Human African trypanosomiasis with 7-year incubation period: clinical laboratory and neuroimaging findings. **Parasitology International**, v. 63, p. 557-560, 2014.

WENZLER, T. Pharmacokinetics, *Trypanosoma brucei gambiense* efficacy, and time of drug action of db829, a preclinical candidate for treatment of second-stage human African trypanosomiasis. **Antimocricals Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 5330-5343, 2013.

WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, p. 644-645, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Recommendations of the informal consultation on issues for clinical product development for human African trypanosomiasis**. Geneva, Switzerland, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the Leishmaniasis**. 2010. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf>. Acesso em: 29 abr. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 01 set. 2014a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis and HIV coinfection**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/>. Acesso em: 02 set. 2014b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness)**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>. Acesso em: 04 set. 2014c.

ZODAPE, S. T. Seaweeds as a biofertilizer. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 60, p. 378-382, 2001.

ZUCCA, M. et al. New chemotherapeutic strategies against Malaria, Leishmaniasis and Trypanosomiases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 502-526, 2013.

Anexos

8. Anexos

8.1. Anexo A: Análise química por CLAE-EM da subfração HSG11 do extrato hexânico da alga *H. grandifolius*.

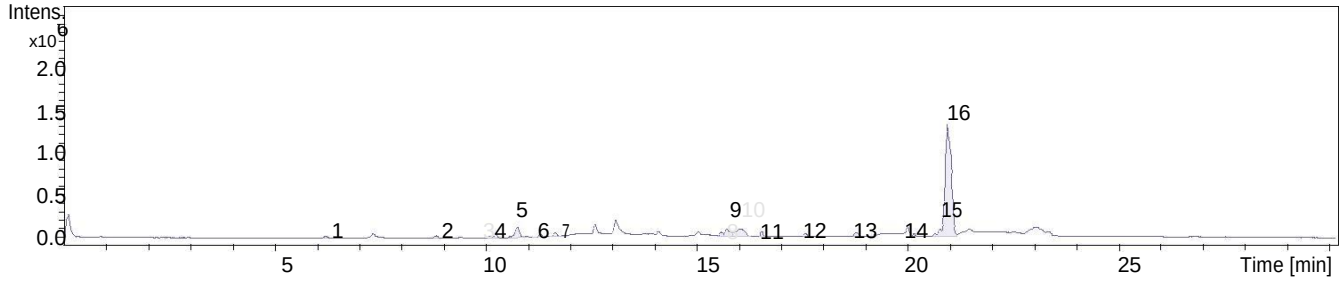
Compound Mass Spectrum Deconvolution Report

Analysis Info

		Acquisition Date	10/22/2014 4:28:10 PM	
Analysis Name	D:\Data\LabAlgas\Data\2014_10_22-Araraquara\Fracao11-Hex_1-14_01_639.d			
Method	tune_low_LC_200-500uLmin.m	Operator	BDAL@DE	
Sample Name	Fracao11-Hex	Instrument	micrOTOF	213750.10403
Comment				

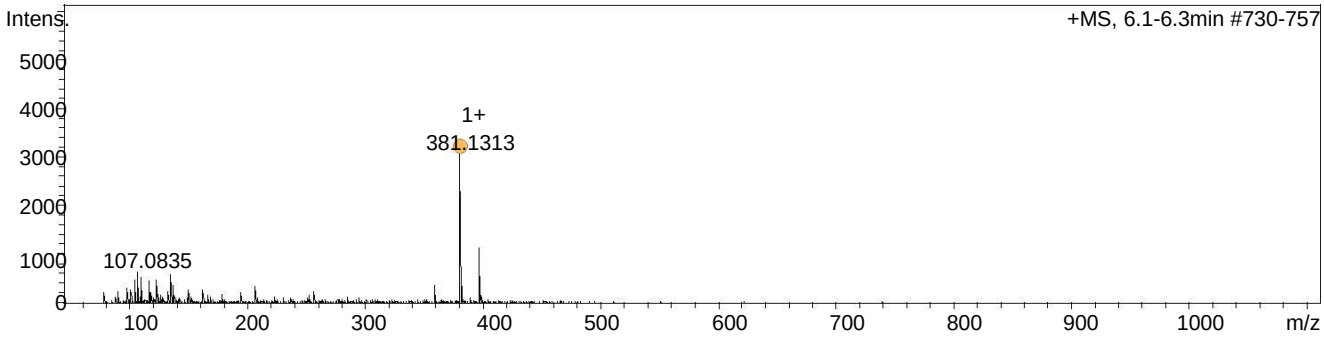
Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	4.0 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1100 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



#	RT [min]	Area	S/N
1	6.2	76466	13.0
2	8.8	116654	24.7
3	10.1	79677	17.2
4	10.2	189721	37.7
5	10.7	924148	118.0
6	11.3	118368	25.0
7	11.6	334746	45.6
8	15.6	278048	44.4
9	15.7	735624	84.6
10	16.1	1318185	82.3
11	16.5	195821	50.3
12	17.6	174655	29.9
13	18.8	325621	45.7
14	20.1	118700	25.7
15	20.8	560891	83.4
16	20.9	13167811	1223.9

Cmpd 1, 6.2 min



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance	
A	381.1312	381.3771	[M + H]+	3052	100.00
B	397.1059	397.4452	[M + H]+	1128	36.96

C	938.6260	938.8960	[M + H]+	583	19.09

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
381.1313	1+	381.1313	381.1312
382.1335	1+	382.1335	382.1345
383.1416	1+	383.1416	383.1378

Molecular Mass ([M + H]+): 381.1312 Std. Deviation: 0.00221783

Average Mass ([M + H]+): 381.3771

Component B Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
397.1055	1+	397.1055	397.1059
398.1124	1+	398.1124	398.1093
399.1102	1+	399.1102	399.1126

Molecular Mass ([M + H]+): 397.1059 Std. Deviation: 0.00226565

Average Mass ([M + H]+): 397.4452

Component C Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
134.9580	7+	938.6621	134.9528
135.0821	7+	939.5312	135.0961

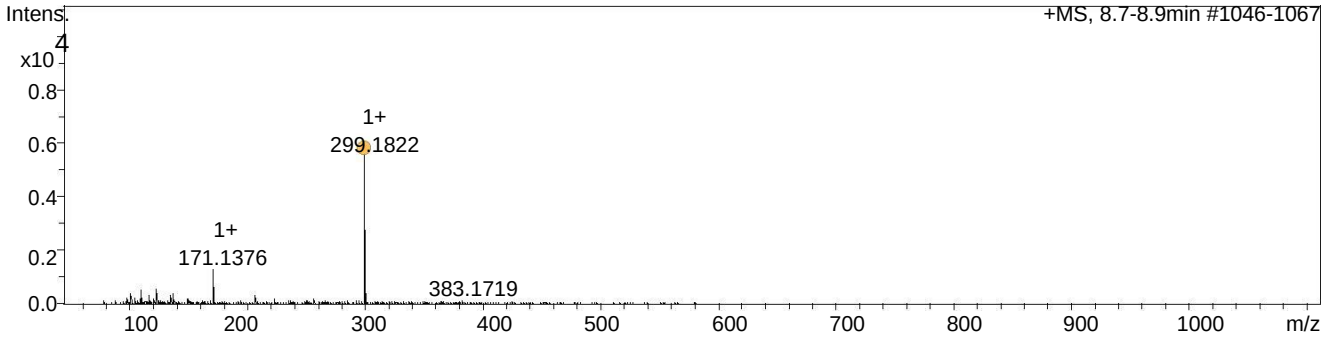
Molecular Mass ([M + H]+): 938.6260 Std. Deviation: 0.0739544

Average Mass ([M + H]+): 938.8960

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
381.131265	1	C19H13N10	100.00	381.131917	0.7	1.7	4.1	18.5	even	ok
	2	C18H17N6O4	83.33	381.130579	0.7	1.8	13.1	13.5	even	ok
	1	C19H13N10	100.00	381.131917	0.7	1.7	4.1	18.5	even	ok
	2	C18H17N6O4	83.33	381.130579	0.7	1.8	13.1	13.5	even	ok
	1	C21H18N4NaO2	89.43	381.132197	0.9	2.4	2.0	14.5	even	ok
	2	C20H22NaO6	100.00	381.130859	-0.4	-1.1	10.9	9.5	even	ok
	3	C17H14N10Na	43.01	381.129511	-1.8	-4.6	13.6	15.5	even	ok
	1	C18H22KN4O3	100.00	381.132349	-1.1	-2.8	36.6	9.5	even	ok
	2	C14H18KN10O	67.59	381.129663	-1.6	-4.2	39.0	10.5	even	ok

Cmpd 2, 8.8 min

Compound Mass Spectrum Deconvolution Report



Component	Molecular Mass	Molecule		Absolute Abundance	Relative Abundance
A	299.1824	299.3197	[M + H]+	5529	100.00
B	171.1384	171.2323	[M + H]+	1309	23.68

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
299.1822	1+	299.1822	299.1824
300.1866	1+	300.1866	300.1857

Molecular Mass ([M + H]+): 299.1824 Std. Deviation: 0.000652496

Average Mass ([M + H]+): 299.3197

Component B Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
171.1376	1+	171.1376	171.1384
172.1489	1+	172.1489	172.1417

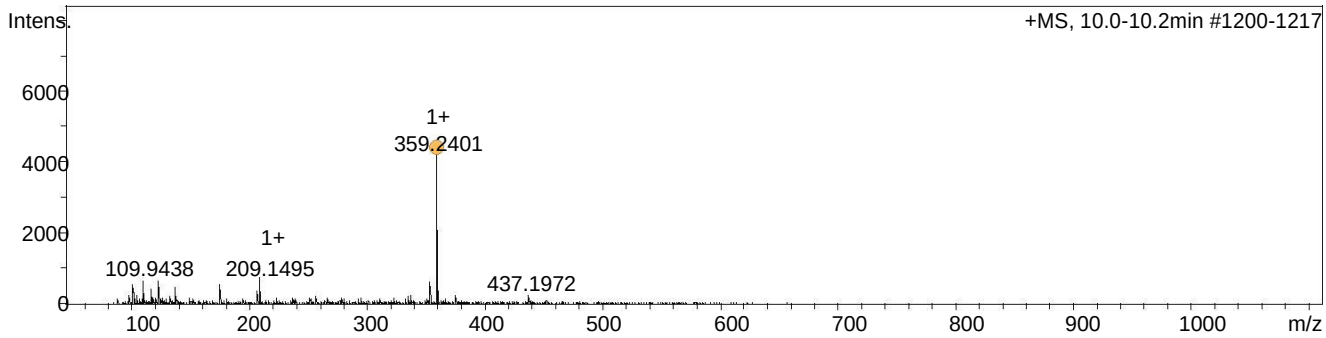
Molecular Mass ([M + H]+): 171.1384 Std. Deviation: 0.00512877

Average Mass ([M + H]+): 171.2323

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
299.182245	1	C12H23N6O3	100.00	299.182615	-0.4	-1.2	10.3	4.5	even	ok
	1	C12H23N6O3	100.00	299.182615	-0.4	-1.2	10.3	4.5	even	ok
	1	C14H28NaO5	100.00	299.182895	0.6	2.2	12.6	0.5	even	ok

Cmpd 3, 10.1 min

Compound Mass Spectrum Deconvolution Report



Component	Molecular Mass	Molecule		Absolute Abundance	Relative Abundance
A	359.2396	359.4486	[M + H]+	4189	100.00
B	209.1494	209.2864	[M + H]+	772	18.43
C	123.0825	123.2234	[M + H]+	654	15.60
D	354.2798	354.4362	[M + H]+	612	14.61

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
359.2401	1+	359.2401	359.2396
360.2423	1+	360.2423	360.2430
361.2343	1+	361.2343	361.2463

Molecular Mass ([M + H]+): 359.2396 Std. Deviation: 0.00693241

Average Mass ([M + H]+): 359.4486

Component B Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
209.1495	1+	209.1495	209.1494
210.1523	1+	210.1523	210.1528

Molecular Mass ([M + H]+): 209.1494 Std. Deviation: 0.000363248

Average Mass ([M + H]+): 209.2864

Component C Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
123.0827	1+	123.0827	123.0825
124.0848	1+	124.0848	124.0859

Molecular Mass ([M + H]+): 123.0825 Std. Deviation: 0.00074858

Average Mass ([M + H]+): 123.2234

Component D Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
354.2828	1+	354.2828	354.2798

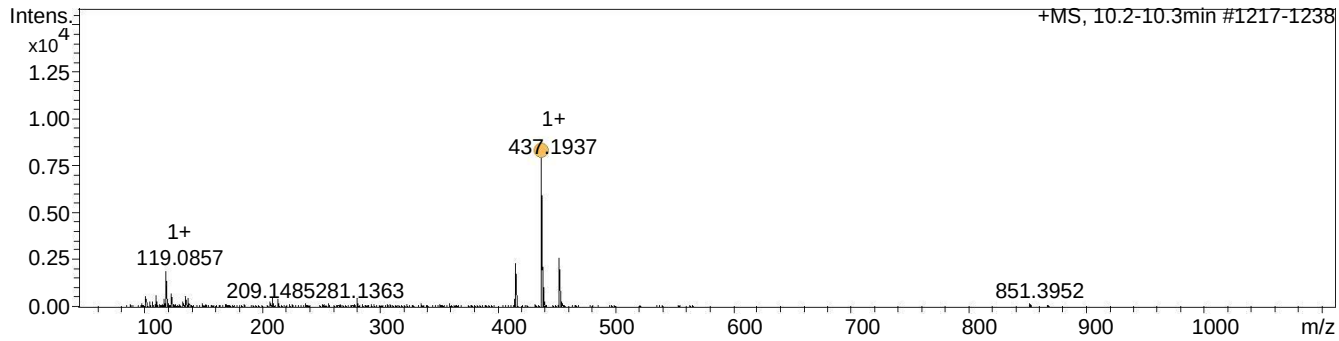
355.2668 1+ 355.2668 355.2831

Molecular Mass ([M + H]+): 354.2798 Std. Deviation: 0.0117361

Average Mass ([M + H]+): 354.4362

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
359.240117	1	C15H31N6O4	100.00	359.240130	-0.0	-0.0	3.9	3.5	even	ok
	2	C16H27N10	42.81	359.241467	1.4	3.8	12.7	8.5	even	ok
	1	C15H31N6O4	100.00	359.240130	-0.0	-0.0	3.9	3.5	even	ok
	2	C16H27N10	42.81	359.241467	1.4	3.8	12.7	8.5	even	ok
	1	C14H28N10Na	100.00	359.239062	-1.1	-2.9	7.9	5.5	even	ok
	2	C18H32N4NaO2	63.82	359.241747	-1.6	-4.5	12.5	4.5	even	ok
	1	C11H32KN10O	100.00	359.239214	-0.9	-2.5	32.8	0.5	even	ok

Cmpd 4, 10.2 min



Component	Molecular Mass	Molecule		Absolute Abundance	Relative Abundance
A	437.1936	437.4794	[M + H]+	7889	100.00
B	453.1684	453.5208	[M + H]+	2625	33.27
C	415.2119	415.5088	[M + H]+	2307	29.24
D	119.0854	119.4896	[M + H]+	1893	24.00

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
437.1937	1+	437.1937	437.1936
438.1961	1+	438.1961	438.1969
439.2025	1+	439.2025	439.2003

Molecular Mass ([M + H]+): 437.1936 Std. Deviation: 0.00135506

Average Mass ([M + H]+): 437.4794

Component B Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
453.1682	1+	453.1682	453.1684
454.1717	1+	454.1717	454.1717
455.1760	1+	455.1760	455.1750

Molecular Mass ([M + H]+): 453.1684 Std. Deviation: 0.000557335

Average Mass ([M + H]+): 453.5208

Component C Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
415.2118	1+	415.2118	415.2119
416.2162	1+	416.2162	416.2153
417.2178	1+	417.2178	417.2186

Molecular Mass ([M + H]+): 415.2119 Std. Deviation: 0.000697098

Average Mass ([M + H]+): 415.5088

Component D Detail

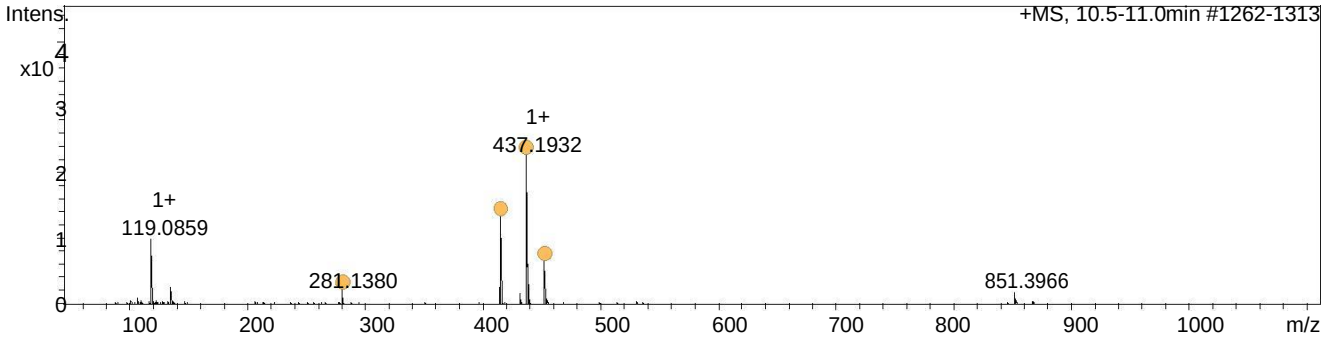
Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
119.0857	1+	119.0857	119.0854
120.0904	1+	120.0904	120.0888
121.0929	1+	121.0929	121.0921
122.0865	1+	122.0865	122.0955

Molecular Mass ([M + H]+): 119.0854 Std. Deviation: 0.00454918

Average Mass ([M + H]+): 119.4896

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
437.193716	1	C22H25N6O4	100.00	437.193180	0.5	1.2	7.0	13.5	even	ok
	2	C26H29O6	34.75	437.195865	2.1	4.9	8.7	12.5	even	ok
	3	C23H21N10	81.49	437.194517	0.8	1.8	10.8	18.5	even	ok
	4	C21H29N2O8	37.28	437.191842	-1.9	-4.3	16.0	8.5	even	ok
	1	C22H25N6O4	100.00	437.193180	0.5	1.2	7.0	13.5	even	ok
	2	C26H29O6	34.75	437.195865	2.1	4.9	8.7	12.5	even	ok
	3	C23H21N10	81.49	437.194517	0.8	1.8	10.8	18.5	even	ok
	4	C21H29N2O8	37.28	437.191842	-1.9	-4.3	16.0	8.5	even	ok
	1	C24H30NaO6	100.00	437.193459	0.3	0.6	5.4	9.5	even	ok
	2	C25H26N4NaO2	60.15	437.194797	1.1	2.5	10.2	14.5	even	ok
	3	C21H22N10Na	42.29	437.192111	1.6	3.7	11.3	15.5	even	ok
	1	C18H26KN10O	55.99	437.192264	1.5	3.3	31.4	10.5	even	ok
	2	C22H30KN4O3	64.31	437.194949	1.2	2.8	31.4	9.5	even	ok
	3	C21H34KO7	100.00	437.193612	-0.1	-0.2	36.8	4.5	even	ok

Cmpd 5, 10.7 min



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

A	437.1931	437.4833	[M + H]+	22614	100.00
B	415.2112	415.5053	[M + H]+	13276	58.71
C	119.0856	119.2756	[M + H]+	9908	43.81
D	453.1674	453.5737	[M + H]+	6484	28.67
E	135.0807	135.3175	[M + H]+	2548	11.27

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
437.1932	1+	437.1932	437.1931
438.1964	1+	438.1964	438.1965
439.1987	1+	439.1987	439.1998
440.2026	1+	440.2026	440.2032

Molecular Mass ([M + H]+): 437.1931 Std. Deviation: 0.000650933

Average Mass ([M + H]+): 437.4833

Component B Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
415.2113	1+	415.2113	415.2112
416.2145	1+	416.2145	416.2146
417.2172	1+	417.2172	417.2179
418.2164	1+	418.2164	418.2213

Molecular Mass ([M + H]+): 415.2112 Std. Deviation: 0.00243957

Average Mass ([M + H]+): 415.5053

Component C Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
119.0859	1+	119.0859	119.0856
120.0890	1+	120.0890	120.0890
121.0930	1+	121.0930	121.0923
122.0840	1+	122.0840	122.0957

Molecular Mass ([M + H]+): 119.0856 Std. Deviation: 0.00586584

Average Mass ([M + H]+): 119.2756

Component D Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
453.1679	1+	453.1679	453.1674
454.1705	1+	454.1705	454.1708
455.1720	1+	455.1720	455.1741
456.1722	1+	456.1722	456.1775

Molecular Mass ([M + H]+): 453.1674 Std. Deviation: 0.0028517

Average Mass ([M + H]+): 453.5737

Component E Detail

Actual	Charge	Isotopic	Predicted

Compound Mass Spectrum Deconvolution Report

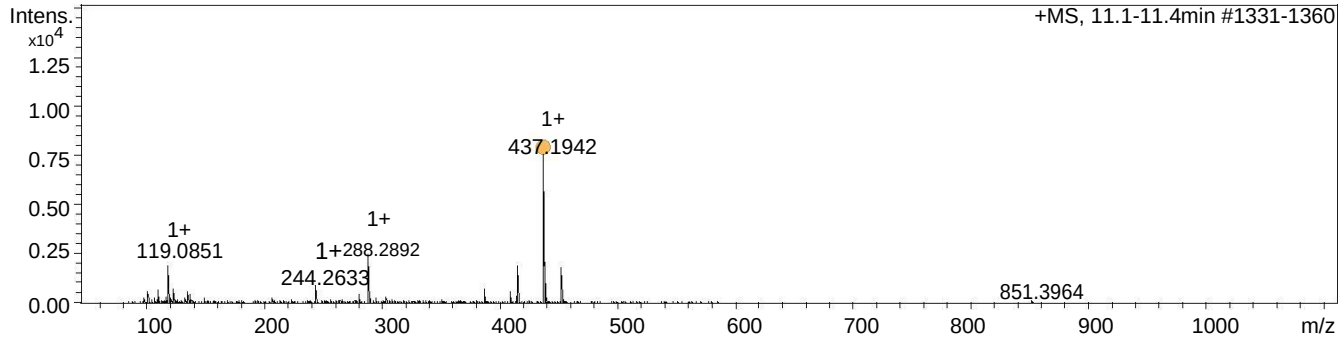
Peak		Mass([M + H]+)	Peak
135.0812	1+	135.0812	135.0807
136.0825	1+	136.0825	136.0840
137.0831	1+	137.0831	137.0874

Molecular Mass ([M + H]+): 135.0807 Std. Deviation: 0.00260317

Average Mass ([M + H]+): 135.3175

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
119.085892	1	C9H11	100.00	119.085527	-0.4	-3.1	11.5	4.5	even	ok
	1	C9H11	100.00	119.085527	-0.4	-3.1	11.5	4.5	even	ok
281.138041	1	C15H21O5	100.00	281.138350	0.3	1.1	17.3	5.5	even	ok
	1	C15H21O5	100.00	281.138350	0.3	1.1	17.3	5.5	even	ok
	1	C14H18N4NaO	100.00	281.137282	0.8	2.7	22.0	7.5	even	ok
	1	C11H22KN4O2	100.00	281.137434	-0.6	-2.2	20.2	2.5	even	ok
415.211324	1	C20H32KN4O3	100.00	415.210599	0.7	1.7	29.4	6.5	even	ok
	2	C19H36KO7	35.33	415.209262	2.1	5.0	36.4	1.5	even	ok
	1	C20H32KN4O3	100.00	415.210599	0.7	1.7	29.4	6.5	even	ok
	2	C19H36KO7	35.33	415.209262	2.1	5.0	36.4	1.5	even	ok
	1	C23H28N4NaO2	100.00	415.210447	-0.9	-2.1	8.7	11.5	even	ok
	1	C20H32KN4O3	100.00	415.210599	0.7	1.7	29.4	6.5	even	ok
	2	C19H36KO7	35.33	415.209262	2.1	5.0	36.4	1.5	even	ok
437.193223	1	C22H25N6O4	100.00	437.193180	-0.0	-0.1	3.8	13.5	even	ok
	2	C23H21N10	47.09	437.194517	-1.3	-3.0	10.1	18.5	even	ok
	3	C21H29N2O8	41.18	437.191842	-1.4	-3.2	14.2	8.5	even	ok
	1	C22H25N6O4	100.00	437.193180	-0.0	-0.1	3.8	13.5	even	ok
	2	C23H21N10	47.09	437.194517	-1.3	-3.0	10.1	18.5	even	ok
	3	C21H29N2O8	41.18	437.191842	-1.4	-3.2	14.2	8.5	even	ok
	1	C24H30NaO6	100.00	437.193459	0.2	0.5	2.0	9.5	even	ok
	2	C21H22N10Na	43.23	437.192111	1.1	2.5	7.9	15.5	even	ok
	3	C25H26N4NaO2	41.43	437.194797	1.6	3.6	10.0	14.5	even	ok
	1	C18H26KN10O	86.16	437.192264	-1.0	-2.2	32.3	10.5	even	ok
	2	C22H30KN4O3	52.22	437.194949	-1.7	-3.9	32.9	9.5	even	ok
	3	C21H34KO7	100.00	437.193612	0.4	0.9	37.9	4.5	even	ok
453.167852	1	C24H30KO6	100.00	453.167397	0.5	1.0	3.1	9.5	even	ok
	2	C21H22KN10	42.77	453.166049	-1.8	-4.0	5.8	15.5	even	ok
	3	C25H26KN4O2	67.41	453.168734	-0.9	-1.9	12.9	14.5	even	ok
	1	C24H30KO6	100.00	453.167397	0.5	1.0	3.1	9.5	even	ok
	2	C21H22KN10	42.77	453.166049	-1.8	-4.0	5.8	15.5	even	ok
	3	C25H26KN4O2	67.41	453.168734	-0.9	-1.9	12.9	14.5	even	ok
	1	C27H26NaO5	100.00	453.167245	0.6	1.3	37.6	14.5	even	ok
	1	C24H30KO6	100.00	453.167397	0.5	1.0	3.1	9.5	even	ok
	2	C21H22KN10	42.77	453.166049	-1.8	-4.0	5.8	15.5	even	ok
	3	C25H26KN4O2	67.41	453.168734	-0.9	-1.9	12.9	14.5	even	ok

Cmpd 6, 11.3 min



	Mass			Abundance	Abundance
A	437.1939	437.4877	[M + H]+	7507	100.00
B	288.2892	288.4657	[M + H]+	2453	32.68
C	415.2117	415.5225	[M + H]+	1918	25.55
D	119.0851	119.1740	[M + H]+	1898	25.28
E	453.1709	453.5262	[M + H]+	1847	24.61
F	244.2633	244.4037	[M + H]+	940	12.52

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
437.1942	1+	437.1942	437.1939
438.1956	1+	438.1956	438.1972
439.2034	1+	439.2034	439.2006

Molecular Mass ([M + H]+): 437.1939 Std. Deviation: 0.00187273

Average Mass ([M + H]+): 437.4877

Component B Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
288.2892	1+	288.2892	288.2892
289.2921	1+	289.2921	289.2925

Molecular Mass ([M + H]+): 288.2892 Std. Deviation: 0.000264861

Average Mass ([M + H]+): 288.4657

Component C Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
415.2117	1+	415.2117	415.2117
416.2152	1+	416.2152	416.2151
417.2177	1+	417.2177	417.2184

Molecular Mass ([M + H]+): 415.2117 Std. Deviation: 0.000395139

Average Mass ([M + H]+): 415.5225

Component D Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
119.0851	1+	119.0851	119.0851
120.0889	1+	120.0889	120.0885

Molecular Mass ([M + H]+): 119.0851 Std. Deviation: 0.000311549

Average Mass ([M + H]+): 119.1740

Component E Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
453.1708	1+	453.1708	453.1709

454.1738	1+	454.1738	454.1743
455.1793	1+	455.1793	455.1776

Molecular Mass ([M + H]+): 453.1709 Std. Deviation: 0.00101338

Average Mass ([M + H]+): 453.5262

Component F Detail

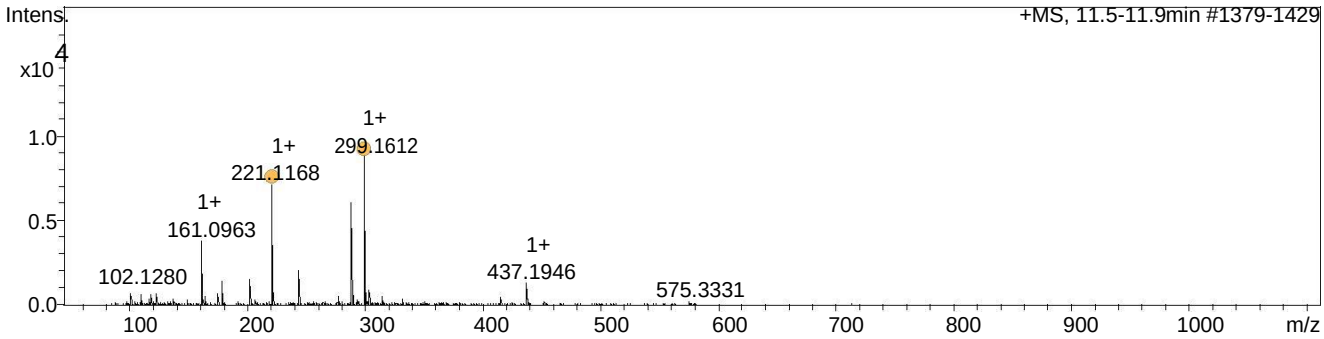
Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
244.2633	1+	244.2633	244.2633
245.2668	1+	245.2668	245.2667

Molecular Mass ([M + H]+): 244.2633 Std. Deviation: 8.8072e-005

Average Mass ([M + H]+): 244.4037

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
437.194161	1	C26H29O6	48.98	437.195865	1.7	3.9	5.3	12.5	even	ok
	2	C23H21N10	100.00	437.194517	-0.4	-0.8	9.0	18.5	even	ok
	3	C22H25N6O4	70.39	437.193180	1.0	2.2	10.7	13.5	even	ok
	1	C26H29O6	48.98	437.195865	1.7	3.9	5.3	12.5	even	ok
	2	C23H21N10	100.00	437.194517	-0.4	-0.8	9.0	18.5	even	ok
	3	C22H25N6O4	70.39	437.193180	1.0	2.2	10.7	13.5	even	ok
	1	C25H26N4NaO2	100.00	437.194797	0.6	1.5	7.6	14.5	even	ok
	2	C24H30NaO6	94.05	437.193459	0.7	1.6	9.2	9.5	even	ok
	3	C21H22N10Na	35.63	437.192111	-2.0	-4.7	14.7	15.5	even	ok
	1	C22H30KN4O3	100.00	437.194949	-0.8	-1.8	31.6	9.5	even	ok
	2	C18H26KN10O	47.38	437.192264	-1.9	-4.3	33.3	10.5	even	ok
	3	C21H34KO7	95.15	437.193612	-0.5	-1.3	38.2	4.5	even	ok

Cmpd 7, 11.6 min



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance	
A	299.1612	299.3194	[M + H]+	8765	100.00
B	221.1162	221.2900	[M + H]+	7141	81.47
C	288.2893	288.4912	[M + H]+	6092	69.50
D	161.0959	161.2604	[M + H]+	3776	43.08
E	244.2625	244.4077	[M + H]+	2039	23.27
F	203.1067	203.2068	[M + H]+	1503	17.15
G	179.1042	179.3721	[M + H]+	1463	16.69
H	437.1952	437.5592	[M + H]+	1306	14.91
I	304.2822	304.4724	[M + H]+	950	10.84

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
299.1612	1+	299.1612	299.1612
300.1643	1+	300.1643	300.1645

Molecular Mass ([M + H]+): 299.1612 Std. Deviation: 0.000113952

Average Mass ([M + H]+): 299.3194

Component B Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
221.1168	1+	221.1168	221.1162
222.1210	1+	222.1210	222.1195
223.0923	1+	223.0923	223.1229

Molecular Mass ([M + H]+): 221.1162 Std. Deviation: 0.017676

Average Mass ([M + H]+): 221.2900

Component C Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
288.2896	1+	288.2896	288.2893
289.2915	1+	289.2915	289.2927
290.2943	1+	290.2943	290.2960

Molecular Mass ([M + H]+): 288.2893 Std. Deviation: 0.00119886

Average Mass ([M + H]+): 288.4912

Component D Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
161.0963	1+	161.0963	161.0959
162.0989	1+	162.0989	162.0992
163.0903	1+	163.0903	163.1026

Molecular Mass ([M + H]+): 161.0959 Std. Deviation: 0.00709886

Average Mass ([M + H]+): 161.2604

Component E Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
244.2625	1+	244.2625	244.2625
245.2658	1+	245.2658	245.2659

Molecular Mass ([M + H]+): 244.2625 Std. Deviation: 2.11538e-005

Average Mass ([M + H]+): 244.4077

Component F Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak

203.1068	1+	203.1068	203.1067
204.1097	1+	204.1097	204.1101

Molecular Mass ([M + H]+): 203.1067 Std. Deviation: 0.000249451

Average Mass ([M + H]+): 203.2068

Component G Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
179.1060	1+	179.1060	179.1042
180.1099	1+	180.1099	180.1076
181.0925	1+	181.0925	181.1109

Molecular Mass ([M + H]+): 179.1042 Std. Deviation: 0.0107585

Average Mass ([M + H]+): 179.3721

Component H Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
437.1946	1+	437.1946	437.1952
438.1976	1+	438.1976	438.1986
439.2105	1+	439.2105	439.2019

Molecular Mass ([M + H]+): 437.1952 Std. Deviation: 0.0050116

Average Mass ([M + H]+): 437.5592

Component I Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
304.2843	1+	304.2843	304.2822
305.2767	1+	305.2767	305.2856

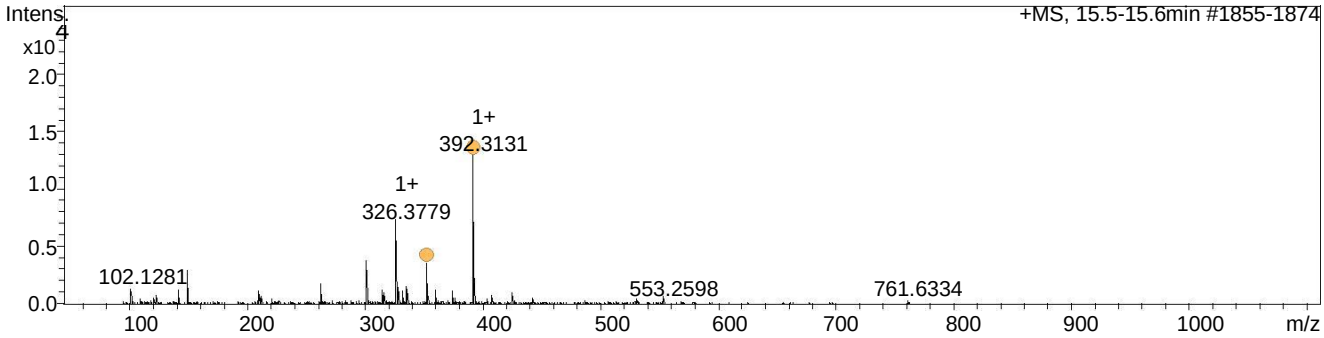
Molecular Mass ([M + H]+): 304.2822 Std. Deviation: 0.00642445

Average Mass ([M + H]+): 304.4724

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
221.116843	1	C9H18KN4	100.00	221.116305	0.5	2.4	30.4	2.5	even	ok
	1	C9H18KN4	100.00	221.116305	0.5	2.4	30.4	2.5	even	ok
	1	C9H18KN4	100.00	221.116305	0.5	2.4	30.4	2.5	even	ok
299.161189	1	C15H19N6O	100.00	299.161486	-0.3	-1.0	10.7	9.5	even	ok
	2	C14H23N2O5	57.83	299.160148	-1.0	-3.5	19.1	4.5	even	ok
	1	C15H19N6O	100.00	299.161486	-0.3	-1.0	10.7	9.5	even	ok
	2	C14H23N2O5	57.83	299.160148	-1.0	-3.5	19.1	4.5	even	ok
	1	C17H24NaO3	100.00	299.161765	0.6	1.9	13.2	5.5	even	ok

Cmpd 8, 15.6 min

Compound Mass Spectrum Deconvolution Report



Component	Molecular Mass	Molecule		Absolute Abundance	Relative Abundance
A	392.3125	392.5755	[M + H]+	12924	100.00
B	326.3777	326.6287	[M + H]+	7363	56.97
C	352.3202	352.6040	[M + H]+	3621	28.01
D	262.1739	262.4190	[M + H]+	1834	14.19
E	335.3033	335.9393	[M + H]+	1534	11.87
F	329.1729	329.4384	[M + H]+	1448	11.20

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
392.3131	1+	392.3131	392.3125
393.3145	1+	393.3145	393.3159
394.3140	1+	394.3140	394.3192

Molecular Mass ([M + H]+): 392.3125 Std. Deviation: 0.00315293

Average Mass ([M + H]+): 392.5755

Component B Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
326.3779	1+	326.3779	326.3777
327.3811	1+	327.3811	327.3810
328.3762	1+	328.3762	328.3844

Molecular Mass ([M + H]+): 326.3777 Std. Deviation: 0.00470679

Average Mass ([M + H]+): 326.6287

Component C Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
352.3208	1+	352.3208	352.3202
353.3224	1+	353.3224	353.3235
354.3208	1+	354.3208	354.3269

Molecular Mass ([M + H]+): 352.3202 Std. Deviation: 0.00358371

Average Mass ([M + H]+): 352.6040

Component D Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
262.1766	1+	262.1766	262.1739
263.1631	1+	263.1631	263.1772
264.1816	1+	264.1816	264.1806

Molecular Mass ([M + H]+): 262.1739 Std. Deviation: 0.0083157

Average Mass ([M + H]+): 262.4190

Component E Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
335.2913	1+	335.2913	335.3033
336.3181	1+	336.3181	336.3066
337.3181	1+	337.3181	337.3100

Molecular Mass ([M + H]+): 335.3033 Std. Deviation: 0.0106746

Average Mass ([M + H]+): 335.9393

Component F Detail

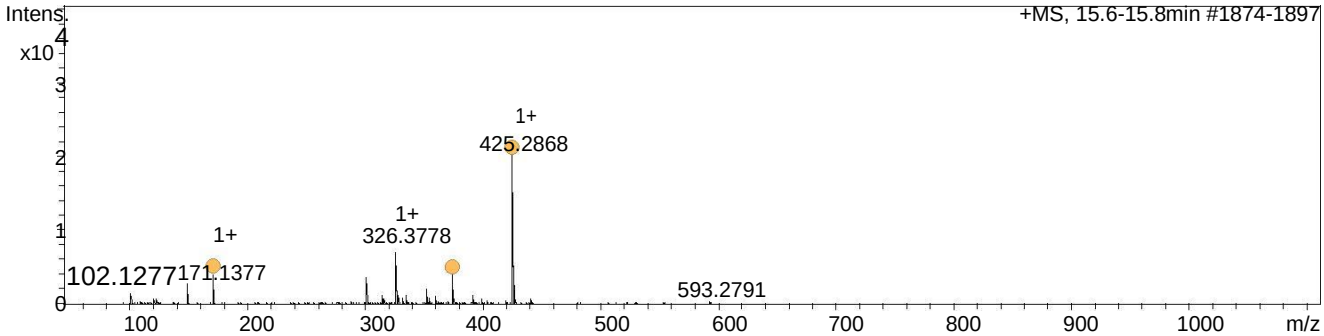
Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
329.1718	1+	329.1718	329.1729
330.1755	1+	330.1755	330.1762
331.1984	1+	331.1984	331.1796

Molecular Mass ([M + H]+): 329.1729 Std. Deviation: 0.0108705

Average Mass ([M + H]+): 329.4384

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
352.320808	1	C19H41N3NaO	-1.#J	350.314184	0.6	1.7	n.a.	0.5	even	ok
392.313119	1	C20H38N7O	100.00	392.313235	0.1	0.3	9.0	5.5	even	ok
	2	C19H42N3O5	52.94	392.311898	-1.2	-3.1	12.8	0.5	even	ok
	1	C20H38N7O	100.00	392.313235	0.1	0.3	9.0	5.5	even	ok
	2	C19H42N3O5	52.94	392.311898	-1.2	-3.1	12.8	0.5	even	ok
	1	C22H43NNaO3	100.00	392.313515	-0.4	-1.0	6.1	1.5	even	ok
	1	C20H43KN5	100.00	392.315005	-1.9	-4.8	28.3	1.5	even	ok

Cmpd 9, 15.7 min



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

A	425.2867	425.5870	[M + H]+	20148	100.00
B	326.3776	326.6230	[M + H]+	6933	34.41
C	171.1377	171.2442	[M + H]+	4076	20.23
D	374.3021	374.7332	[M + H]+	4002	19.86
E	352.3203	352.5317	[M + H]+	2108	10.46

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
425.2868	1+	425.2868	425.2867
426.2912	1+	426.2912	426.2900
427.2909	1+	427.2909	427.2934
428.2849	1+	428.2849	428.2967
429.2616	1+	429.2616	429.3001

Molecular Mass ([M + H]+): 425.2867 Std. Deviation: 0.0180196

Average Mass ([M + H]+): 425.5870

Component B Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
326.3778	1+	326.3778	326.3776
327.3810	1+	327.3810	327.3809
328.3749	1+	328.3749	328.3843

Molecular Mass ([M + H]+): 326.3776 Std. Deviation: 0.00539915

Average Mass ([M + H]+): 326.6230

Component C Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
171.1377	1+	171.1377	171.1377
172.1408	1+	172.1408	172.1410

Molecular Mass ([M + H]+): 171.1377 Std. Deviation: 0.000149151

Average Mass ([M + H]+): 171.2442

Component D Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
374.3029	1+	374.3029	374.3021
375.3046	1+	375.3046	375.3054
376.3122	1+	376.3122	376.3088
377.3003	1+	377.3003	377.3121

Molecular Mass ([M + H]+): 374.3021 Std. Deviation: 0.00619549

Average Mass ([M + H]+): 374.7332

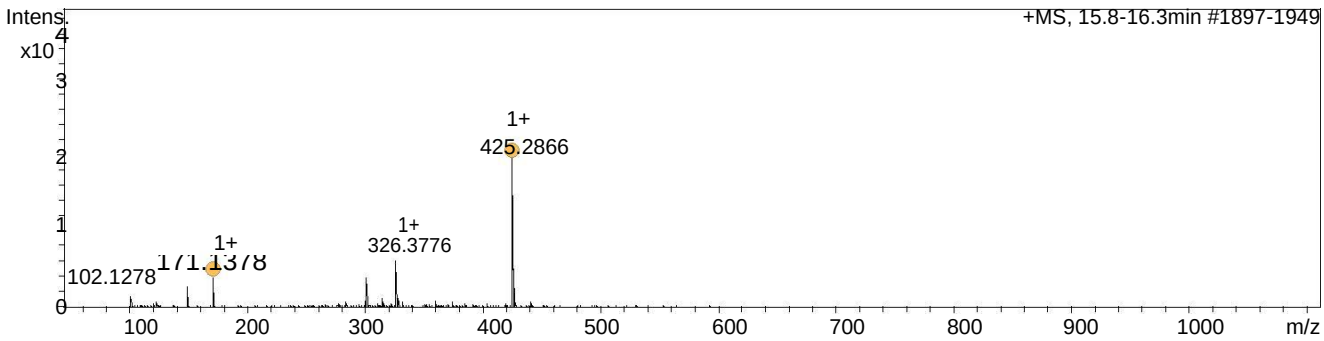
Component E Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak

```
352.3211      1+          352.3211      352.3203
353.3207      1+          353.3207      353.3237
Molecular Mass ([M + H]+): 352.3203      Std. Deviation: 0.00221479
Average Mass ([M + H]+): 352.5317
```

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
171.137680	1	C10H19O2	100.00	171.137956	-0.3	-1.6	7.2	1.5	even	ok
	1	C10H19O2	100.00	171.137956	-0.3	-1.6	7.2	1.5	even	ok
374.302920	1	C22H41NNaO2	100.00	374.302950	-0.0	-0.1	25.4	2.5	even	ok
425.286836	1	C20H37N6O4	100.00	425.287080	-0.2	-0.6	7.2	5.5	even	ok
	2	C21H33N10	34.50	425.288418	-1.6	-3.7	9.1	10.5	even	ok
	3	C19H41N2O8	52.89	425.285743	-1.1	-2.6	17.7	0.5	even	ok
	1	C20H37N6O4	100.00	425.287080	-0.2	-0.6	7.2	5.5	even	ok
	2	C21H33N10	34.50	425.288418	-1.6	-3.7	9.1	10.5	even	ok
	3	C19H41N2O8	52.89	425.285743	-1.1	-2.6	17.7	0.5	even	ok
	1	C22H42NaO6	100.00	425.287360	-0.5	-1.2	5.7	1.5	even	ok
	2	C23H38N4NaO2	43.12	425.288697	1.9	4.4	7.3	6.5	even	ok
	3	C19H34N10Na	58.84	425.286012	-0.8	-1.9	10.6	7.5	even	ok
	1	C20H42KN4O3	43.73	425.288849	2.0	4.7	32.3	1.5	even	ok
	2	C16H38KN10O	100.00	425.286164	0.7	1.6	33.3	2.5	even	ok

Cmpd 10, 16.1 min




```
Component  Molecular      Molecule      Absolute   Relative
           Mass                        Abundance  Abundance
 A            425.2865      425.5743  [M + H]+        19549     100.00
 B            326.3775      326.6201  [M + H]+         6033      30.86
 C            171.1378      171.2456  [M + H]+         3948      20.19

Component A Detail
      Actual     Charge   Isotopic     Predicted
      Peak                Mass([M + H]+)  Peak
    425.2866     1+          425.2866      425.2865
    426.2903     1+          426.2903      426.2899
    427.2910     1+          427.2910      427.2932
    428.2878     1+          428.2878      428.2966
    Molecular Mass ([M + H]+): 425.2865      Std. Deviation: 0.00453937
    Average Mass ([M + H]+): 425.5743

Component B Detail
```

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
326.3776	1+	326.3776	326.3775
327.3814	1+	327.3814	327.3809
328.3761	1+	328.3761	328.3842

Molecular Mass ([M + H]+): 326.3775 Std. Deviation: 0.00466974

Average Mass ([M + H]+): 326.6201

Component C Detail

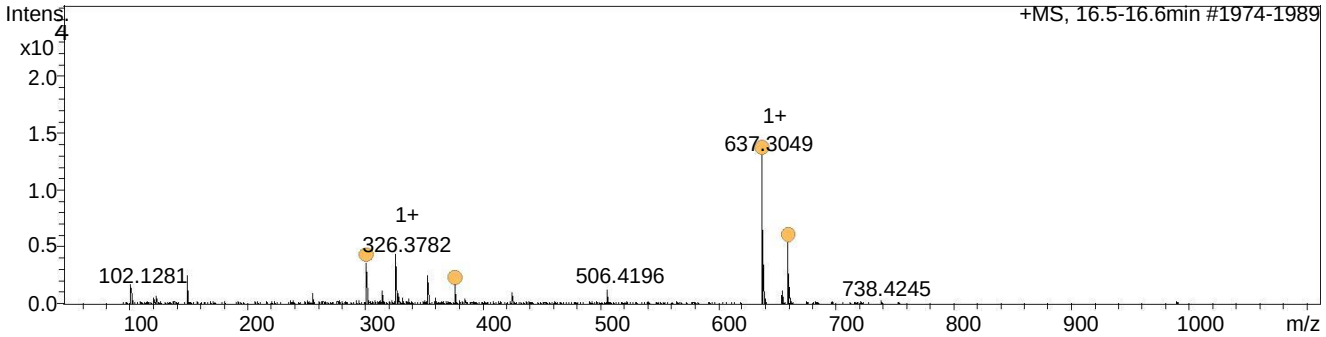
Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
171.1378	1+	171.1378	171.1378
172.1410	1+	172.1410	172.1412

Molecular Mass ([M + H]+): 171.1378 Std. Deviation: 9.7561e-005

Average Mass ([M + H]+): 171.2456

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
171.137842	1	C10H19O2	100.00	171.137956	0.1	0.7	7.7	1.5	even	ok
	1	C10H19O2	100.00	171.137956	0.1	0.7	7.7	1.5	even	ok
425.286615	1	C21H33N10	34.94	425.288418	-1.8	-4.2	7.7	10.5	even	ok
	2	C20H37N6O4	100.00	425.287080	-0.5	-1.1	9.5	5.5	even	ok
	3	C19H41N2O8	65.70	425.285743	0.9	2.1	20.2	0.5	even	ok
	1	C21H33N10	34.94	425.288418	-1.8	-4.2	7.7	10.5	even	ok
	2	C20H37N6O4	100.00	425.287080	-0.5	-1.1	9.5	5.5	even	ok
	3	C19H41N2O8	65.70	425.285743	0.9	2.1	20.2	0.5	even	ok
	1	C23H38N4NaO2	43.75	425.288697	-2.1	-4.9	5.8	6.5	even	ok
	2	C22H42NaO6	100.00	425.287360	-0.7	-1.8	8.1	1.5	even	ok
	3	C19H34N10Na	74.08	425.286012	-0.6	-1.4	12.7	7.5	even	ok
	4	C18H38N6NaO4	25.87	425.284674	1.9	4.6	23.2	2.5	even	ok
	1	C16H38KN10O	100.00	425.286164	-0.5	-1.1	34.4	2.5	even	ok

Cmpd 11, 16.5 min



Component	Molecular Mass	Molecule		Absolute Abundance	Relative Abundance
A	637.3055	637.7011	[M + H]+	13044	100.00
B	659.2877	659.7441	[M + H]+	5459	41.85
C	326.3782	326.6250	[M + H]+	4423	33.91
D	353.2655	353.5559	[M + H]+	2449	18.78
E	376.3144	376.5329	[M + H]+	1673	12.83

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
637.3049	1+	637.3049	637.3055
638.3101	1+	638.3101	638.3088
639.3114	1+	639.3114	639.3121
640.3229	1+	640.3229	640.3155

Molecular Mass ([M + H]+): 637.3055 Std. Deviation: 0.00381315

Average Mass ([M + H]+): 637.7011

Component B Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
659.2875	1+	659.2875	659.2877
660.2902	1+	660.2902	660.2910
661.2969	1+	661.2969	661.2943
662.3045	1+	662.3045	662.2977

Molecular Mass ([M + H]+): 659.2877 Std. Deviation: 0.00364494

Average Mass ([M + H]+): 659.7441

Component C Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
326.3782	1+	326.3782	326.3782
327.3821	1+	327.3821	327.3815
328.3786	1+	328.3786	328.3849

Molecular Mass ([M + H]+): 326.3782 Std. Deviation: 0.00365835

Average Mass ([M + H]+): 326.6250

Component D Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
353.2642	1+	353.2642	353.2655
354.2850	1+	354.2850	354.2688
355.2359	1+	355.2359	355.2721

Molecular Mass ([M + H]+): 353.2655 Std. Deviation: 0.02294

Average Mass ([M + H]+): 353.5559

Component E Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
376.3179	1+	376.3179	376.3144
377.3055	1+	377.3055	377.3178

Molecular Mass ([M + H]+): 376.3144 Std. Deviation: 0.00903296

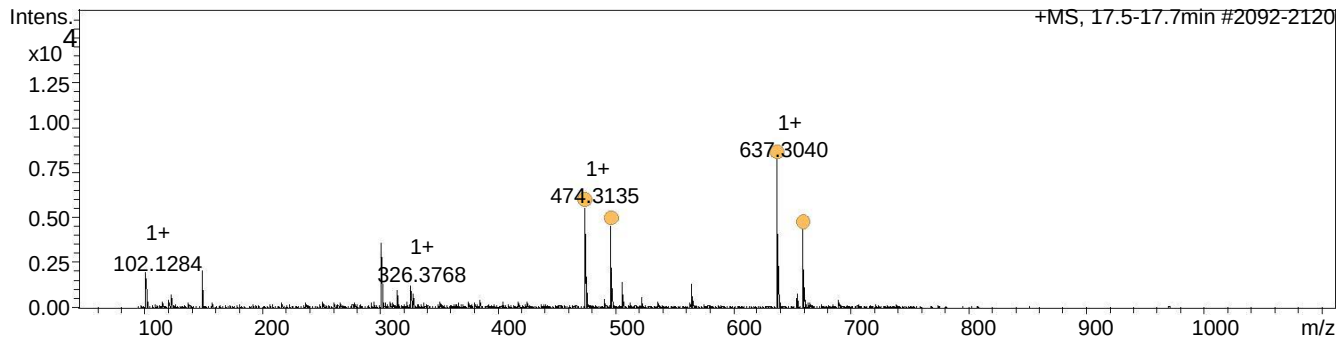
Average Mass ([M + H]+): 376.5329

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
301.134849	1	C19H15N4	n.a.	299.129123	0.2	0.6	n.a.	14.5	even	ok
	2	C7H19N6O7	n.a.	299.130973	0.3	1.1	n.a.	1.5	even	ok
	3	C8H21N4O8	n.a.	301.135390	0.5	1.8	n.a.	0.5	even	ok
	4	C5H13N14O2	n.a.	301.134042	-0.8	-2.7	n.a.	6.5	even	ok
	5	C8H15N10O3	n.a.	299.132311	1.0	3.4	n.a.	6.5	even	ok
	6	C18H19O4	n.a.	299.127786	-1.1	-3.5	n.a.	9.5	even	ok
	7	C12H14N9O	n.a.	300.131583	-1.1	-3.8	n.a.	10.5	even	ok
	8	C20H17N2O	n.a.	301.133540	-1.3	-4.3	n.a.	13.5	even	ok
376.317850	1	C22H43NNaO2	100.00	376.318600	-0.7	-2.0	26.3	1.5	even	ok
637.304900	1	C30H45N4O11	18.85	637.307935	3.0	4.8	4.5	10.5	even	ok
	2	C27H37N14O5	54.76	637.306587	-1.7	-2.6	8.0	16.5	even	ok
	3	C28H33N18O	16.92	637.307924	3.0	4.7	11.1	21.5	even	ok
	4	C29H49O15	46.80	637.306597	-1.7	-2.7	15.8	5.5	even	ok
	5	C26H41N10O9	100.00	637.305249	-0.3	-0.5	16.7	11.5	even	ok
	6	C23H33N20O3	67.40	637.303901	-1.0	-1.6	19.7	17.5	even	ok
	7	C25H45N6O13	56.62	637.303912	-1.0	-1.6	27.7	6.5	even	ok
	8	C22H37N16O7	21.32	637.302564	2.3	3.7	29.2	12.5	even	ok
	9	C37H41N4O6	12.21	637.302061	2.8	4.5	33.9	19.5	even	ok
	10	C24H49N2O17	16.72	637.302575	2.3	3.6	39.1	1.5	even	ok
	1	C30H45N4O11	18.85	637.307935	3.0	4.8	4.5	10.5	even	ok
	2	C27H37N14O5	54.76	637.306587	-1.7	-2.6	8.0	16.5	even	ok
	3	C28H33N18O	16.92	637.307924	3.0	4.7	11.1	21.5	even	ok
	4	C29H49O15	46.80	637.306597	-1.7	-2.7	15.8	5.5	even	ok
	5	C26H41N10O9	100.00	637.305249	-0.3	-0.5	16.7	11.5	even	ok
	6	C23H33N20O3	67.40	637.303901	-1.0	-1.6	19.7	17.5	even	ok
	7	C25H45N6O13	56.62	637.303912	-1.0	-1.6	27.7	6.5	even	ok
	8	C22H37N16O7	21.32	637.302564	2.3	3.7	29.2	12.5	even	ok
	9	C37H41N4O6	12.21	637.302061	2.8	4.5	33.9	19.5	even	ok
	10	C24H49N2O17	16.72	637.302575	2.3	3.6	39.1	1.5	even	ok
	1	C29H42N8NaO7	47.55	637.306866	-2.0	-3.1	5.8	12.5	even	ok
	2	C26H34N18NaO	100.00	637.305518	-0.6	-1.0	11.4	18.5	even	ok
	3	C28H46N4NaO11	91.87	637.305529	0.6	1.0	15.4	7.5	even	ok
	4	C25H38N14NaO5	83.56	637.304181	0.7	1.1	17.8	13.5	even	ok
	5	C27H50NaO15	68.96	637.304192	0.7	1.1	26.8	2.5	even	ok
	6	C24H42N10NaO9	28.23	637.302844	-2.1	-3.2	27.9	8.5	even	ok
	1	C23H38KN18O2	100.00	637.305671	-0.8	-1.2	26.4	13.5	even	ok
	2	C26H46KN8O8	36.85	637.307019	-2.1	-3.3	31.2	7.5	even	ok
	3	C22H42KN14O6	91.73	637.304333	-0.6	-0.9	34.2	8.5	even	ok
	4	C19H34KN24	39.85	637.302985	1.9	3.0	34.3	14.5	even	ok
	5	C25H50KN4O12	74.04	637.305681	-0.8	-1.2	38.2	2.5	even	ok
659.287468	1	C25H36KN18O2	25.55	659.290021	2.6	3.9	16.6	16.5	even	ok
	2	C21H32KN24	100.00	659.287335	0.1	0.2	25.0	17.5	even	ok
	3	C24H40KN14O6	55.50	659.288683	1.2	1.8	26.5	11.5	even	ok
	4	C35H40KN8O3	32.13	659.285495	-2.0	-3.0	27.7	19.5	even	ok
	5	C27H48KN4O12	19.25	659.290031	2.6	3.9	29.0	5.5	even	ok
	6	C20H36KN20O4	37.80	659.285998	1.5	2.2	35.5	12.5	even	ok
	7	C23H44KN10O10	75.35	659.287346	-0.1	-0.2	36.7	6.5	even	ok
	8	C26H52KO16	40.55	659.288694	1.2	1.9	38.7	0.5	even	ok
	9	C39H44KN2O5	53.28	659.288181	-0.7	-1.1	39.4	18.5	even	ok
	1	C25H36KN18O2	25.55	659.290021	2.6	3.9	16.6	16.5	even	ok
	2	C21H32KN24	100.00	659.287335	0.1	0.2	25.0	17.5	even	ok
	3	C24H40KN14O6	55.50	659.288683	1.2	1.8	26.5	11.5	even	ok
	4	C35H40KN8O3	32.13	659.285495	-2.0	-3.0	27.7	19.5	even	ok
	5	C27H48KN4O12	19.25	659.290031	2.6	3.9	29.0	5.5	even	ok
	6	C20H36KN20O4	37.80	659.285998	1.5	2.2	35.5	12.5	even	ok
	7	C23H44KN10O10	75.35	659.287346	-0.1	-0.2	36.7	6.5	even	ok
	8	C26H52KO16	40.55	659.288694	1.2	1.9	38.7	0.5	even	ok
	9	C39H44KN2O5	53.28	659.288181	-0.7	-1.1	39.4	18.5	even	ok
	1	C30H44N4NaO11	33.95	659.289879	-2.4	-3.7	23.1	10.5	even	ok
	2	C28H32N18NaO	32.37	659.289868	-2.4	-3.6	25.6	21.5	even	ok
	3	C27H36N14NaO5	78.52	659.288531	-1.1	-1.6	28.3	16.5	even	ok
	4	C29H48NaO15	73.14	659.288542	-1.1	-1.6	31.0	5.5	even	ok

Compound Mass Spectrum Deconvolution Report

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
	5	C26H40N10NaO9	100.00	659.287194	-0.3	-0.4	34.9	11.5	even	ok
	6	C38H36N8NaO2	30.70	659.285343	-2.1	-3.2	36.8	24.5	even	ok
	7	C23H32N20NaO3	41.60	659.285846	-1.6	-2.5	39.3	17.5	even	ok
	1	C25H36KN18O2	25.55	659.290021	2.6	3.9	16.6	16.5	even	ok
	2	C21H32KN24	100.00	659.287335	0.1	0.2	25.0	17.5	even	ok
	3	C24H40KN14O6	55.50	659.288683	1.2	1.8	26.5	11.5	even	ok
	4	C35H40KN8O3	32.13	659.285495	-2.0	-3.0	27.7	19.5	even	ok
	5	C27H48KN4O12	19.25	659.290031	2.6	3.9	29.0	5.5	even	ok
	6	C20H36KN20O4	37.80	659.285998	1.5	2.2	35.5	12.5	even	ok
	7	C23H44KN10O10	75.35	659.287346	-0.1	-0.2	36.7	6.5	even	ok
	8	C26H52KO16	40.55	659.288694	1.2	1.9	38.7	0.5	even	ok
	9	C39H44KN2O5	53.28	659.288181	-0.7	-1.1	39.4	18.5	even	ok

Cmpd 12, 17.6 min



Component	Molecular Mass	Molecule		Absolute Abundance	Relative Abundance
A	637.3047	637.7143	[M + H]+	8223	100.00
B	474.3142	474.6850	[M + H]+	5544	67.43
C	496.2948	496.6805	[M + H]+	4585	55.76
D	659.2868	659.6809	[M + H]+	4347	52.87
E	102.1283	102.1987	[M + H]+	1995	24.26
F	506.4154	506.7868	[M + H]+	1431	17.40
G	564.4587	564.8627	[M + H]+	1354	16.47
H	326.3767	326.5724	[M + H]+	1257	15.29
I	315.1567	315.5009	[M + H]+	1018	12.38

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
637.3040	1+	637.3040	637.3047
638.3083	1+	638.3083	638.3081
639.3176	1+	639.3176	639.3114
640.3215	1+	640.3215	640.3147

Molecular Mass ([M + H]+): 637.3047 Std. Deviation: 0.00458007

Average Mass ([M + H]+): 637.7143

Component B Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
474.3135	1+	474.3135	474.3142
475.3166	1+	475.3166	475.3175

476.3247	1+	476.3247	476.3208
477.3466	1+	477.3466	477.3242

Molecular Mass ([M + H]+): 474.3142 Std. Deviation: 0.0114059

Average Mass ([M + H]+): 474.6850

Component C Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
496.2949	1+	496.2949	496.2948
497.3010	1+	497.3010	497.2982
498.3077	1+	498.3077	498.3015
499.2662	1+	499.2662	499.3049

Molecular Mass ([M + H]+): 496.2948 Std. Deviation: 0.0196198

Average Mass ([M + H]+): 496.6805

Component D Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
659.2866	1+	659.2866	659.2868
660.2896	1+	660.2896	660.2901
661.2964	1+	661.2964	661.2935

Molecular Mass ([M + H]+): 659.2868 Std. Deviation: 0.0017258

Average Mass ([M + H]+): 659.6809

Component E Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
102.1284	1+	102.1284	102.1283
103.1302	1+	103.1302	103.1316

Molecular Mass ([M + H]+): 102.1283 Std. Deviation: 0.00102908

Average Mass ([M + H]+): 102.1987

Component F Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
506.4195	1+	506.4195	506.4154
507.4132	1+	507.4132	507.4187
508.3977	1+	508.3977	508.4221

Molecular Mass ([M + H]+): 506.4154 Std. Deviation: 0.0146051

Average Mass ([M + H]+): 506.7868

Component G Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
564.4602	1+	564.4602	564.4587
565.4610	1+	565.4610	565.4621

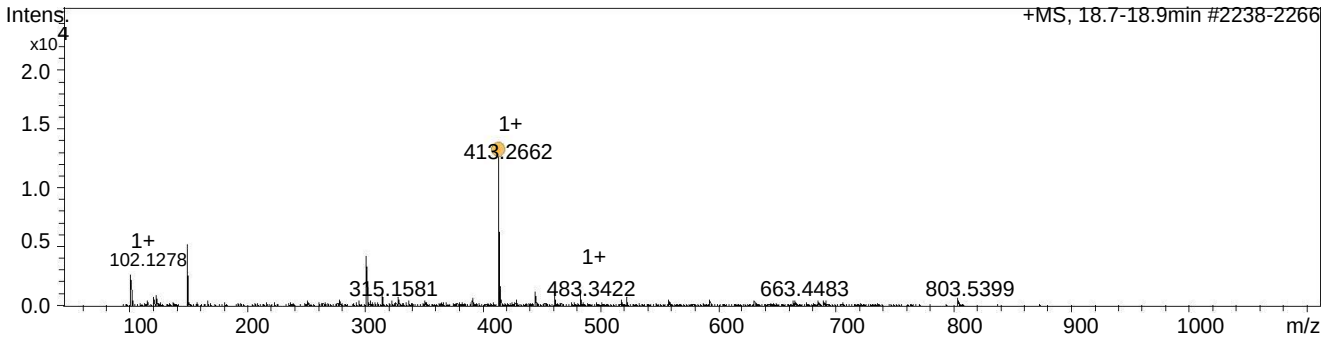
```
566.4551     1+           566.4551       566.4654
Molecular Mass ([M + H]+): 564.4587      Std. Deviation: 0.00603962
Average Mass ([M + H]+): 564.8627

Component H Detail
  Actual     Charge   Isotopic     Predicted
  Peak                Mass([M + H]+)   Peak
326.3768     1+           326.3768       326.3767
327.3796     1+           327.3796       327.3800
Molecular Mass ([M + H]+): 326.3767      Std. Deviation: 0.000278968
Average Mass ([M + H]+): 326.5724

Component I Detail
  Actual     Charge   Isotopic     Predicted
  Peak                Mass([M + H]+)   Peak
315.1578     1+           315.1578       315.1567
316.1633     1+           316.1633       316.1600
317.1499     1+           317.1499       317.1634
Molecular Mass ([M + H]+): 315.1567      Std. Deviation: 0.00804123
Average Mass ([M + H]+): 315.5009
```

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
474.313510	1	C30H45KNO	100.00	474.313273	-0.2	-0.5	34.8	8.5	even	ok
	1	C30H45KNO	100.00	474.313273	-0.2	-0.5	34.8	8.5	even	ok
	1	C33H41NNa	100.00	474.313121	0.4	0.8	31.2	13.5	even	ok
	2	C21H45N3NaO7	50.17	474.314971	-1.5	-3.1	34.8	0.5	even	ok
	3	C18H37N13NaO	70.26	474.313624	0.1	0.2	38.4	6.5	even	ok
	1	C30H45KNO	100.00	474.313273	-0.2	-0.5	34.8	8.5	even	ok
496.294921	1	C27H43KN3O3	100.00	496.293600	-1.3	-2.7	31.0	7.5	even	ok
	1	C27H43KN3O3	100.00	496.293600	-1.3	-2.7	31.0	7.5	even	ok
	1	C30H39N3NaO2	100.00	496.293448	1.5	3.0	15.8	12.5	even	ok
	1	C27H43KN3O3	100.00	496.293600	-1.3	-2.7	31.0	7.5	even	ok
637.303958	1	C27H37N14O5	25.69	637.306587	2.6	4.1	18.0	16.5	even	ok
	2	C37H41N4O6	43.03	637.302061	1.9	3.0	21.8	19.5	even	ok
	3	C29H49O15	20.18	637.306597	2.6	4.1	28.4	5.5	even	ok
	4	C26H41N10O9	55.37	637.305249	-1.3	-2.0	28.9	11.5	even	ok
	5	C23H33N20O3	100.00	637.303901	-0.1	-0.1	30.6	17.5	even	ok
	6	C38H37N8O2	74.80	637.303399	0.6	0.9	33.2	24.5	even	ok
	1	C27H37N14O5	25.69	637.306587	2.6	4.1	18.0	16.5	even	ok
	2	C37H41N4O6	43.03	637.302061	1.9	3.0	21.8	19.5	even	ok
	3	C29H49O15	20.18	637.306597	2.6	4.1	28.4	5.5	even	ok
	4	C26H41N10O9	55.37	637.305249	-1.3	-2.0	28.9	11.5	even	ok
	5	C23H33N20O3	100.00	637.303901	-0.1	-0.1	30.6	17.5	even	ok
	6	C38H37N8O2	74.80	637.303399	0.6	0.9	33.2	24.5	even	ok
	1	C29H42N8NaO7	21.16	637.306866	-2.9	-4.6	16.7	12.5	even	ok
	2	C26H34N18NaO	59.81	637.305518	-1.6	-2.4	19.3	18.5	even	ok
	3	C36H38N8NaO2	17.98	637.300993	-3.0	-4.7	21.8	21.5	even	ok
	4	C28H46N4NaO11	48.98	637.305529	-1.6	-2.5	27.9	7.5	even	ok
	5	C25H38N14NaO5	100.00	637.304181	-0.2	-0.3	29.2	13.5	even	ok
	6	C40H42N2NaO4	85.82	637.303679	0.3	0.4	34.4	20.5	even	ok
	7	C27H50NaO15	76.78	637.304192	0.2	0.4	39.4	2.5	even	ok
	8	C24H42N10NaO9	47.91	637.302844	-1.1	-1.7	40.1	8.5	even	ok
	1	C33H42KN8O3	41.45	637.301145	-2.8	-4.4	33.5	16.5	even	ok
	2	C23H38KN18O2	100.00	637.305671	-1.7	-2.7	34.2	13.5	even	ok

Compound Mass Spectrum Deconvolution Report

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
	3	C26H46KN8O8	29.05	637.307019	-3.1	-4.8	38.1	7.5	even	ok
659.286646	1	C21H32KN24	100.00	659.287335	0.7	1.0	22.0	17.5	even	ok
	2	C24H40KN14O6	39.37	659.288683	-2.0	-3.1	25.2	11.5	even	ok
	3	C20H36KN20O4	82.92	659.285998	0.6	1.0	31.0	12.5	even	ok
	4	C23H44KN10O10	75.99	659.287346	0.7	1.1	33.4	6.5	even	ok
	5	C34H44KN4O7	22.28	659.284158	-2.5	-3.8	33.5	14.5	even	ok
	6	C26H52KO16	29.50	659.288694	-2.0	-3.1	36.6	0.5	even	ok
	7	C35H40KN8O3	50.18	659.285495	-1.2	-1.7	39.7	19.5	even	ok
	1	C21H32KN24	100.00	659.287335	0.7	1.0	22.0	17.5	even	ok
	2	C24H40KN14O6	39.37	659.288683	-2.0	-3.1	25.2	11.5	even	ok
	3	C20H36KN20O4	82.92	659.285998	0.6	1.0	31.0	12.5	even	ok
	4	C23H44KN10O10	75.99	659.287346	0.7	1.1	33.4	6.5	even	ok
	5	C34H44KN4O7	22.28	659.284158	-2.5	-3.8	33.5	14.5	even	ok
	6	C26H52KO16	29.50	659.288694	-2.0	-3.1	36.6	0.5	even	ok
	7	C35H40KN8O3	50.18	659.285495	-1.2	-1.7	39.7	19.5	even	ok
	1	C30H44N4NaO11	16.62	659.289879	3.2	4.9	16.3	10.5	even	ok
	2	C27H36N14NaO5	49.22	659.288531	-1.9	-2.9	21.0	16.5	even	ok
	3	C28H32N18NaO	14.98	659.289868	3.2	4.9	21.8	21.5	even	ok
	4	C29H48NaO15	47.17	659.288542	-1.9	-2.9	22.6	5.5	even	ok
	5	C26H40N10NaO9	100.00	659.287194	-0.5	-0.8	25.9	11.5	even	ok
	6	C23H32N20NaO3	79.38	659.285846	-0.8	-1.2	30.1	17.5	even	ok
	7	C37H40N4NaO6	19.69	659.284006	2.6	4.0	33.7	19.5	even	ok
	8	C25H44N6NaO13	72.35	659.285856	-0.8	-1.2	34.1	6.5	even	ok
	9	C22H36N16NaO7	27.44	659.284508	2.1	3.2	37.2	12.5	even	ok
	1	C21H32KN24	100.00	659.287335	0.7	1.0	22.0	17.5	even	ok
	2	C24H40KN14O6	39.37	659.288683	-2.0	-3.1	25.2	11.5	even	ok
	3	C20H36KN20O4	82.92	659.285998	0.6	1.0	31.0	12.5	even	ok
	4	C23H44KN10O10	75.99	659.287346	0.7	1.1	33.4	6.5	even	ok
	5	C34H44KN4O7	22.28	659.284158	-2.5	-3.8	33.5	14.5	even	ok
	6	C26H52KO16	29.50	659.288694	-2.0	-3.1	36.6	0.5	even	ok
	7	C35H40KN8O3	50.18	659.285495	-1.2	-1.7	39.7	19.5	even	ok

Cmpd 13, 18.8 min



Component	Molecular Mass	Molecule		Absolute Abundance	Relative Abundance
A	413.2659	413.5425	[M + H]+	12587	100.00
B	102.1278	102.1890	[M + H]+	2570	20.42
C	483.3419	483.9945	[M + H]+	1268	10.07
D	461.3565	461.8242	[M + H]+	1260	10.01

Component A Detail

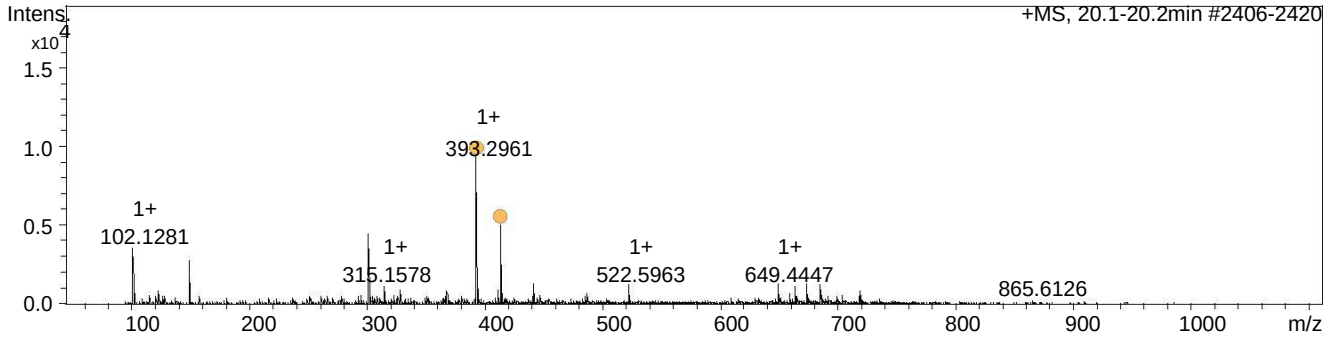
Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
413.2662	1+	413.2662	413.2659
414.2692	1+	414.2692	414.2692

```
415.2667     1+           415.2667       415.2726
Molecular Mass ([M + H]+): 413.2659      Std. Deviation: 0.00341434
Average Mass ([M + H]+): 413.5425

Component B Detail
  Actual     Charge   Isotopic     Predicted
  Peak                Mass([M + H]+)   Peak
102.1278     1+           102.1278       102.1278
103.1310     1+           103.1310       103.1311
Molecular Mass ([M + H]+): 102.1278      Std. Deviation: 5.37141e-005
Average Mass ([M + H]+): 102.1890

Component C Detail
  Actual     Charge   Isotopic     Predicted
  Peak                Mass([M + H]+)   Peak
483.3422     1+           483.3422       483.3419
484.3437     1+           484.3437       484.3453
485.3475     1+           485.3475       485.3486
486.3585     1+           486.3585       486.3519
Molecular Mass ([M + H]+): 483.3419      Std. Deviation: 0.00343752
Average Mass ([M + H]+): 483.9945

Component D Detail
  Actual     Charge   Isotopic     Predicted
  Peak                Mass([M + H]+)   Peak
461.3595     1+           461.3595       461.3565
462.3643     1+           462.3643       462.3598
463.3402     1+           463.3402       463.3632
Molecular Mass ([M + H]+): 461.3565      Std. Deviation: 0.0136242
Average Mass ([M + H]+): 461.8242
```

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
413.266216	1	C21H31N8O	0.00	411.261534	-0.6	-1.4	n.a.	10.5	even	ok
	2	C22H33N6O2	100.00	413.265951	-0.3	-0.6	6.4	9.5	even	ok
	3	C21H37N2O6	42.67	413.264613	-1.6	-3.9	12.0	4.5	even	ok
	1	C21H31N8O	0.00	411.261534	-0.6	-1.4	n.a.	10.5	even	ok
	2	C22H33N6O2	100.00	413.265951	-0.3	-0.6	6.4	9.5	even	ok
	3	C21H37N2O6	42.67	413.264613	-1.6	-3.9	12.0	4.5	even	ok
	1	C19H32N8NaO	0.00	411.259128	1.9	4.7	n.a.	7.5	even	ok
	2	C24H38NaO4	100.00	413.266230	0.0	0.0	4.8	5.5	even	ok
	3	C25H34N4Na	42.18	413.267568	1.4	3.3	14.2	10.5	even	ok
	1	C17H37KN7O2	0.00	410.264032	0.5	1.3	n.a.	2.5	even	ok
	2	C22H38KN4O	53.60	413.267720	1.5	3.6	30.3	5.5	even	ok
	3	C21H42KO5	100.00	413.266383	0.2	0.4	34.3	0.5	even	ok

Cmpd 14, 20.1 min

Compound Mass Spectrum Deconvolution Report



Component	Molecular Mass	Molecule		Absolute Abundance	Relative Abundance
A	393.2960	393.5353	[M + H]+	9402	100.00
B	413.2654	413.5401	[M + H]+	5059	53.80
C	102.1280	102.1970	[M + H]+	3573	38.00
D	441.2927	441.6717	[M + H]+	1324	14.08
E	649.4448	650.1866	[M + H]+	1303	13.85
F	673.4513	674.2153	[M + H]+	1296	13.78
G	522.5952	522.9912	[M + H]+	1266	13.47
H	685.4440	686.1856	[M + H]+	1248	13.27
I	663.4580	664.3614	[M + H]+	1170	12.45
J	315.1573	315.5240	[M + H]+	1142	12.15

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
393.2961	1+	393.2961	393.2960
394.3009	1+	394.3009	394.2993
395.2917	1+	395.2917	395.3027

Molecular Mass ([M + H]+): 393.2960 Std. Deviation: 0.00642264

Average Mass ([M + H]+): 393.5353

Component B Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
413.2660	1+	413.2660	413.2654
414.2693	1+	414.2693	414.2687
415.2560	1+	415.2560	415.2721

Molecular Mass ([M + H]+): 413.2654 Std. Deviation: 0.0092512

Average Mass ([M + H]+): 413.5401

Component C Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
102.1281	1+	102.1281	102.1280
103.1305	1+	103.1305	103.1314

Molecular Mass ([M + H]+): 102.1280 Std. Deviation: 0.000614473

Average Mass ([M + H]+): 102.1970

Component D Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
441.2910	1+	441.2910	441.2927
442.2994	1+	442.2994	442.2960
443.3052	1+	443.3052	443.2993

Molecular Mass ([M + H]+): 441.2927 Std. Deviation: 0.00405314

Average Mass ([M + H]+): 441.6717

Component E Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
649.4447	1+	649.4447	649.4448
650.4459	1+	650.4459	650.4482
651.4521	1+	651.4521	651.4515
652.4625	1+	652.4625	652.4548

Molecular Mass ([M + H]+): 649.4448 Std. Deviation: 0.0040311

Average Mass ([M + H]+): 650.1866

Component F Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
673.4462	1+	673.4462	673.4513
674.4521	1+	674.4521	674.4547
675.4715	1+	675.4715	675.4580
676.4782	1+	676.4782	676.4614

Molecular Mass ([M + H]+): 673.4513 Std. Deviation: 0.0112012

Average Mass ([M + H]+): 674.2153

Component G Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
522.5963	1+	522.5963	522.5952
523.5977	1+	523.5977	523.5986
524.5932	1+	524.5932	524.6019

Molecular Mass ([M + H]+): 522.5952 Std. Deviation: 0.00510396

Average Mass ([M + H]+): 522.9912

Component H Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
685.4373	1+	685.4373	685.4440
686.4460	1+	686.4460	686.4473
687.4652	1+	687.4652	687.4506
688.4805	1+	688.4805	688.4540

Molecular Mass ([M + H]+): 685.4440 Std. Deviation: 0.0155078

Average Mass ([M + H]+): 686.1856

Component I Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
663.4570	1+	663.4570	663.4580
664.4603	1+	664.4603	664.4614
665.4659	1+	665.4659	665.4647
666.4739	1+	666.4739	666.4681

Molecular Mass ([M + H]+): 663.4580 Std. Deviation: 0.00306338

Average Mass ([M + H]+): 664.3614

Component J Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
315.1578	1+	315.1578	315.1573
316.1616	1+	316.1616	316.1607
317.1595	1+	317.1595	317.1640

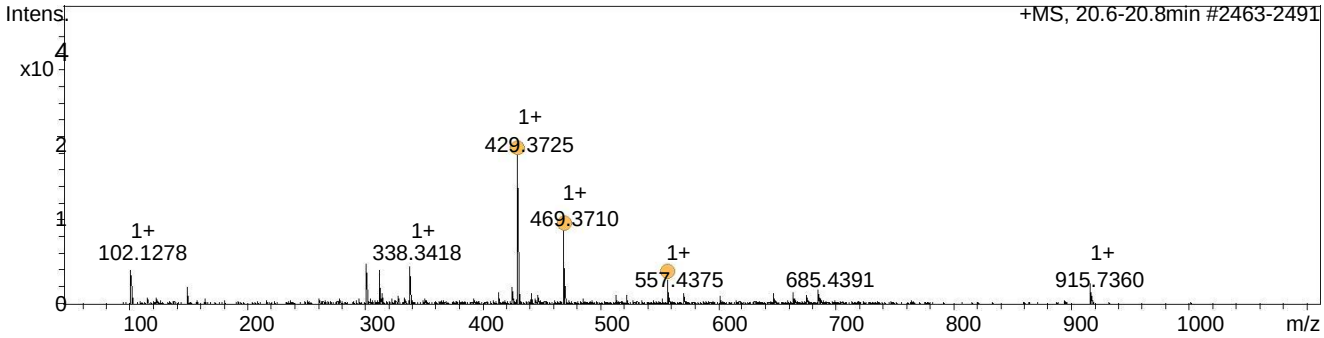
Molecular Mass ([M + H]+): 315.1573 Std. Deviation: 0.00265713

Average Mass ([M + H]+): 315.5240

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
393.296140	1	C19H41N2O6	100.00	393.295913	0.2	0.6	4.6	0.5	even	ok
	2	C16H33N12	41.96	393.294566	-1.6	-4.0	11.3	6.5	even	ok
	3	C20H37N6O2	50.37	393.297251	-1.1	-2.8	17.0	5.5	even	ok
	1	C19H41N2O6	100.00	393.295913	0.2	0.6	4.6	0.5	even	ok
	2	C16H33N12	41.96	393.294566	-1.6	-4.0	11.3	6.5	even	ok
	3	C20H37N6O2	50.37	393.297251	-1.1	-2.8	17.0	5.5	even	ok
	1	C18H38N6NaO2	100.00	393.294845	1.3	3.3	9.2	2.5	even	ok
	2	C22H42NaO4	84.56	393.297531	1.4	3.5	14.8	1.5	even	ok
413.265997	1	C17H37KN7O2	0.00	410.264032	0.3	0.8	n.a.	2.5	even	ok
	2	C22H38KN4O	50.59	413.267720	-1.7	-4.2	30.7	5.5	even	ok
	3	C21H42KO5	100.00	413.266383	0.4	0.9	34.6	0.5	even	ok
	1	C17H37KN7O2	0.00	410.264032	0.3	0.8	n.a.	2.5	even	ok
	2	C22H38KN4O	50.59	413.267720	-1.7	-4.2	30.7	5.5	even	ok
	3	C21H42KO5	100.00	413.266383	0.4	0.9	34.6	0.5	even	ok
	1	C19H32N8NaO	0.00	411.259128	1.7	4.2	n.a.	7.5	even	ok
	2	C24H38NaO4	100.00	413.266230	0.2	0.6	4.6	5.5	even	ok
	3	C25H34N4Na	39.67	413.267568	-1.6	-3.8	14.5	10.5	even	ok
	1	C17H37KN7O2	0.00	410.264032	0.3	0.8	n.a.	2.5	even	ok
	2	C22H38KN4O	50.59	413.267720	-1.7	-4.2	30.7	5.5	even	ok
	3	C21H42KO5	100.00	413.266383	0.4	0.9	34.6	0.5	even	ok

Cmpd 15, 20.8 min

Compound Mass Spectrum Deconvolution Report



Component	Molecular Mass	Molecule		Absolute Abundance	Relative Abundance
A	429.3722	429.7271	[M + H]+	17700	100.00
B	469.3704	469.7397	[M + H]+	8690	49.10
C	338.3409	338.7324	[M + H]+	4503	25.44
D	102.1278	102.2052	[M + H]+	4034	22.79
E	312.3246	312.5525	[M + H]+	4032	22.78
F	557.4365	557.9385	[M + H]+	2995	16.92
G	915.7364	916.3786	[M + H]+	2401	13.57
H	425.3534	425.8873	[M + H]+	1976	11.16

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
429.3725	1+	429.3725	429.3722
430.3759	1+	430.3759	430.3756
431.3750	1+	431.3750	431.3789
432.3679	1+	432.3679	432.3823

Molecular Mass ([M + H]+): 429.3722 Std. Deviation: 0.00745361

Average Mass ([M + H]+): 429.7271

Component B Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
469.3710	1+	469.3710	469.3704
470.3744	1+	470.3744	470.3737
471.3700	1+	471.3700	471.3771
472.3629	1+	472.3629	472.3804

Molecular Mass ([M + H]+): 469.3704 Std. Deviation: 0.00947964

Average Mass ([M + H]+): 469.7397

Component C Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
338.3418	1+	338.3418	338.3409
339.3401	1+	339.3401	339.3442
340.3530	1+	340.3530	340.3476
341.3366	1+	341.3366	341.3509

Molecular Mass ([M + H]+): 338.3409 Std. Deviation: 0.00790621

Average Mass ([M + H]+): 338.7324

Component D Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
102.1278	1+	102.1278	102.1278
103.1307	1+	103.1307	103.1311

Molecular Mass ([M + H]+): 102.1278 Std. Deviation: 0.000286467

Average Mass ([M + H]+): 102.2052

Component E Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
312.3260	1+	312.3260	312.3246
313.3229	1+	313.3229	313.3279
314.3204	1+	314.3204	314.3313

Molecular Mass ([M + H]+): 312.3246 Std. Deviation: 0.00692796

Average Mass ([M + H]+): 312.5525

Component F Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
557.4375	1+	557.4375	557.4365
558.4388	1+	558.4388	558.4398
559.4408	1+	559.4408	559.4432
560.4401	1+	560.4401	560.4465

Molecular Mass ([M + H]+): 557.4365 Std. Deviation: 0.00352932

Average Mass ([M + H]+): 557.9385

Component G Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
915.7360	1+	915.7360	915.7364
916.7417	1+	916.7417	916.7397
917.7424	1+	917.7424	917.7431
918.7349	1+	918.7349	918.7464

Molecular Mass ([M + H]+): 915.7364 Std. Deviation: 0.00587253

Average Mass ([M + H]+): 916.3786

Component H Detail

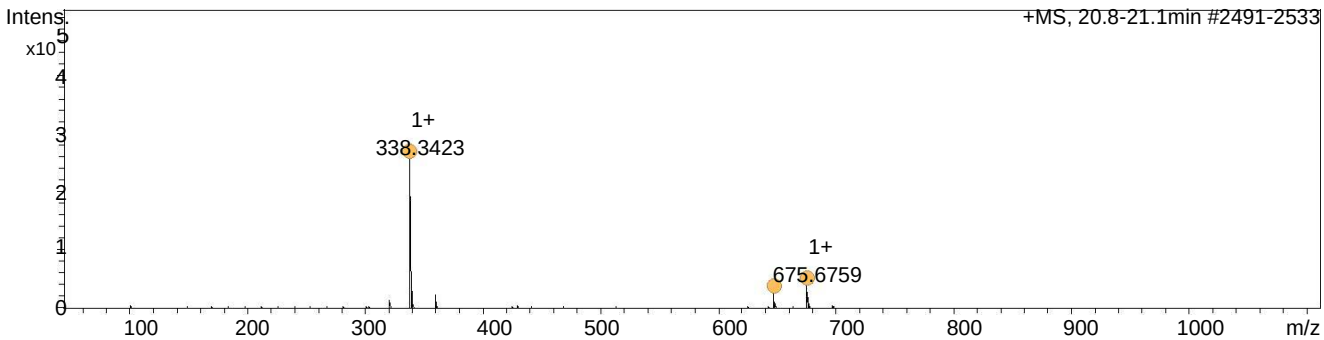
Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
425.3572	1+	425.3572	425.3534
426.3594	1+	426.3594	426.3567
427.3377	1+	427.3377	427.3600
428.3486	1+	428.3486	428.3634

Molecular Mass ([M + H]+): 425.3534 Std. Deviation: 0.0135889

Average Mass ([M + H]+): 425.8873

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
429.372515	1	C29H49O2	100.00	429.372707	-0.2	-0.4	8.9	5.5	even	ok
	1	C29H49O2	100.00	429.372707	-0.2	-0.4	8.9	5.5	even	ok
469.370972	1	C18H44N12NaO	0.00	467.365325	1.2	2.5	n.a.	2.5	even	ok
	2	C23H50N4NaO4	100.00	469.372427	-1.5	-3.1	33.2	0.5	even	ok
557.437535	1	C31H58N4NaO3	100.00	557.440112	2.6	4.6	37.7	4.5	even	ok

Cmpd 16, 20.9 min



Component	Molecular Mass	Molecule		Absolute Abundance	Relative Abundance
A	338.3423	338.5987	[M + H]+	255054	100.00
B	675.6759	676.1678	[M + H]+	38310	15.02

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
338.3423	1+	338.3423	338.3423
339.3455	1+	339.3455	339.3457
340.3497	1+	340.3497	340.3490
341.3523	1+	341.3523	341.3523

Molecular Mass ([M + H]+): 338.3423 Std. Deviation: 0.000372829

Average Mass ([M + H]+): 338.5987

Component B Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
675.6759	1+	675.6759	675.6759
676.6793	1+	676.6793	676.6792
677.6823	1+	677.6823	677.6825
678.6826	1+	678.6826	678.6859

Molecular Mass ([M + H]+): 675.6759 Std. Deviation: 0.00162789

Average Mass ([M + H]+): 676.1678

Compound Mass Spectrum Deconvolution Report

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e^- Conf	N-Rule
338.342339	1	C21H42N3	0.00	336.337325	-1.2	-3.7	n.a.	2.5	even	ok
	2	C22H44NO	100.00	338.341741	0.6	1.8	2.6	1.5	even	ok
	1	C21H42N3	0.00	336.337325	-1.2	-3.7	n.a.	2.5	even	ok
	2	C22H44NO	100.00	338.341741	0.6	1.8	2.6	1.5	even	ok
647.485194	1	C39H67O7	15.92	647.488131	2.9	4.5	8.0	6.5	even	ok
	2	C35H63N6O5	100.00	647.485446	0.3	0.4	8.6	7.5	even	ok
	3	C36H59N10O	45.16	647.486783	1.6	2.5	11.2	12.5	even	ok
	4	C34H67N2O9	55.26	647.484108	-1.1	-1.7	17.1	2.5	even	ok
	5	C31H59N12O3	19.57	647.482760	2.4	3.8	20.6	8.5	even	ok
	1	C39H67O7	15.92	647.488131	2.9	4.5	8.0	6.5	even	ok
	2	C35H63N6O5	100.00	647.485446	0.3	0.4	8.6	7.5	even	ok
	3	C36H59N10O	45.16	647.486783	1.6	2.5	11.2	12.5	even	ok
	4	C34H67N2O9	55.26	647.484108	-1.1	-1.7	17.1	2.5	even	ok
	5	C31H59N12O3	19.57	647.482760	2.4	3.8	20.6	8.5	even	ok
	1	C37H68NaO7	100.00	647.485725	-0.5	-0.8	6.2	3.5	even	ok
	2	C38H64N4NaO3	41.15	647.487063	1.9	2.9	10.2	8.5	even	ok
	3	C34H60N10NaO	77.49	647.484377	-0.8	-1.3	12.1	9.5	even	ok
	4	C33H64N6NaO5	28.03	647.483040	-2.2	-3.3	18.6	4.5	even	ok
	1	C31H64KN10O2	100.00	647.484529	0.7	1.0	25.5	4.5	even	ok
	2	C35H68KN4O4	41.22	647.487215	-2.0	-3.1	26.5	3.5	even	ok
675.675919	1	C47H88Na	100.00	675.677824	1.9	2.8	16.1	3.5	even	ok

8.2. Anexo B: Análise química por CLAE-EM da subfração HSG12 do extrato hexânico da alga *H. grandifolius*.

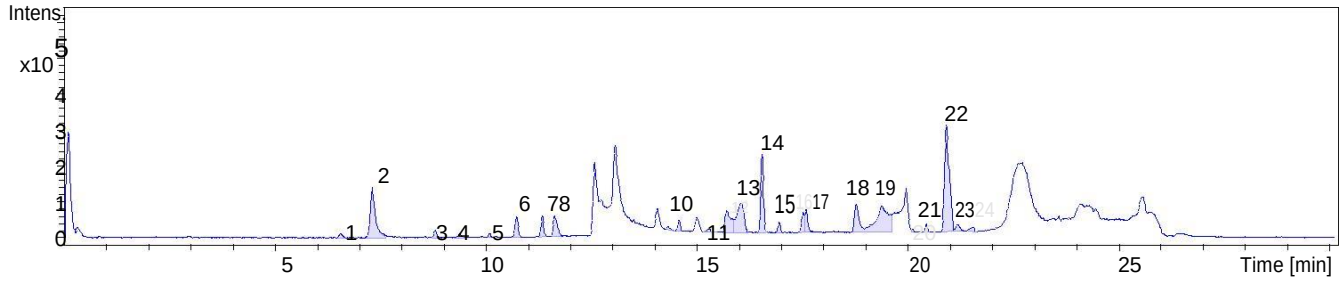
Compound Mass Spectrum Deconvolution Report

Analysis Info

		Acquisition Date	10/23/2014 9:32:20 AM
Analysis Name	D:\Data\LabAlgas\Data\2014_10_22-Araraquara\Fracao12-Hex_1-13_02_643.d		
Method	tune_low_LC_200-500uLmin.m	Operator	BDAL@DE
Sample Name	Fracao12-Hex	Instrument	micrOTOF 213750.10403
Comment			

Acquisition Parameter

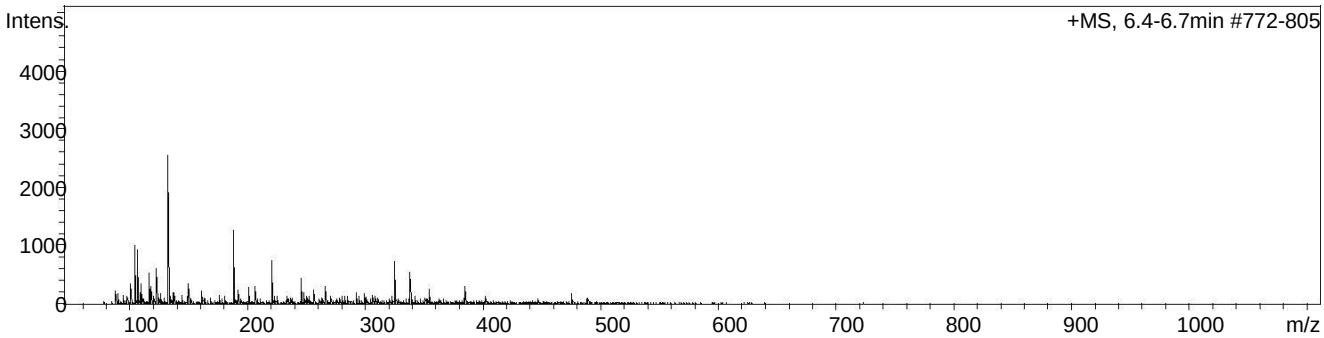
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	4.0 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	8.0 l/min
Scan End	1100 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Waste



#	RT [min]	Area	S/N
1	6.6	62195	10.0
2	7.3	1156646	138.9
3	8.8	86415	20.1
4	9.4	51535	9.4
5	10.1	43570	10.6
6	10.7	306530	57.0
7	11.3	249259	58.1
8	11.6	384398	56.3
9	14.3	42880	9.9
10	14.6	131026	28.9
11	15.3	50169	9.7
12	15.7	608657	61.4
13	16.0	951653	81.9
14	16.5	953401	217.6
15	16.9	119691	29.6
16	17.5	241182	54.7
17	17.6	280030	61.2
18	18.8	576686	76.2
19	19.4	1479970	71.3
20	20.1	17380	7.8
21	20.4	77903	22.8
22	20.9	2358258	294.5
23	21.2	125612	18.0
24	21.5	80446	12.2

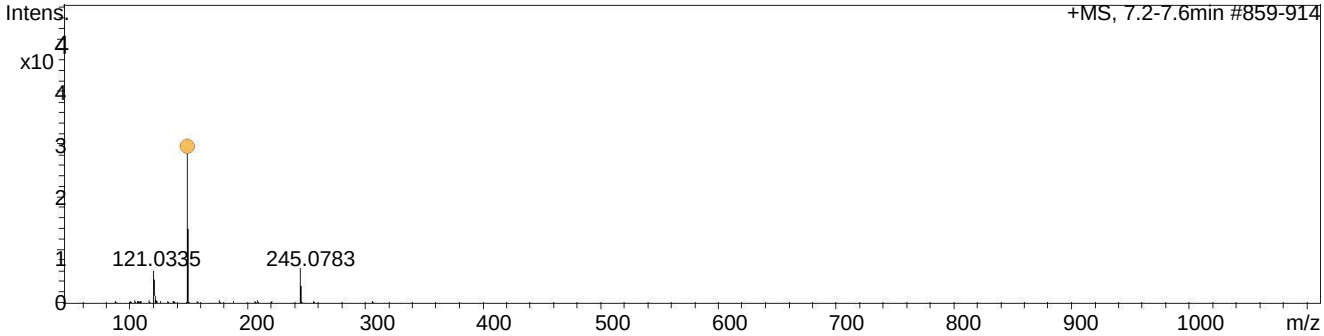
Cmpd 1, 6.6 min

Compound Mass Spectrum Deconvolution Report



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

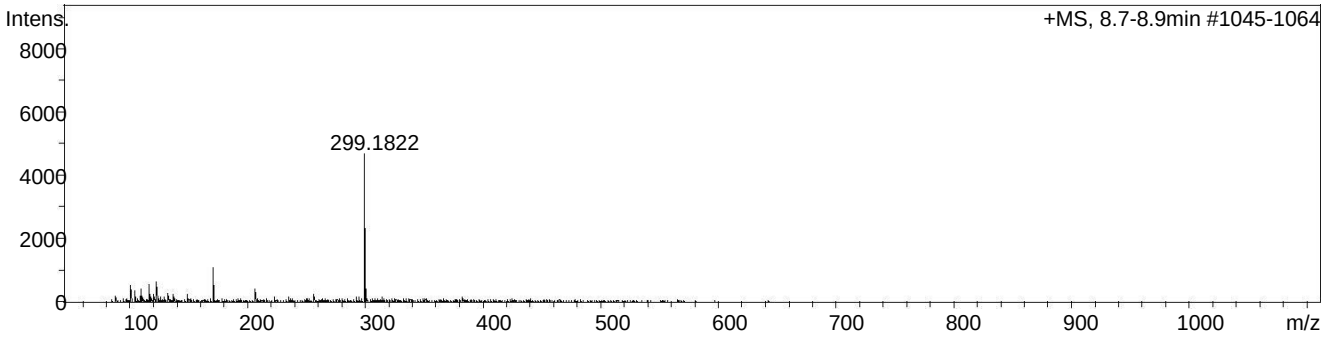
Cmpd 2, 7.3 min



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

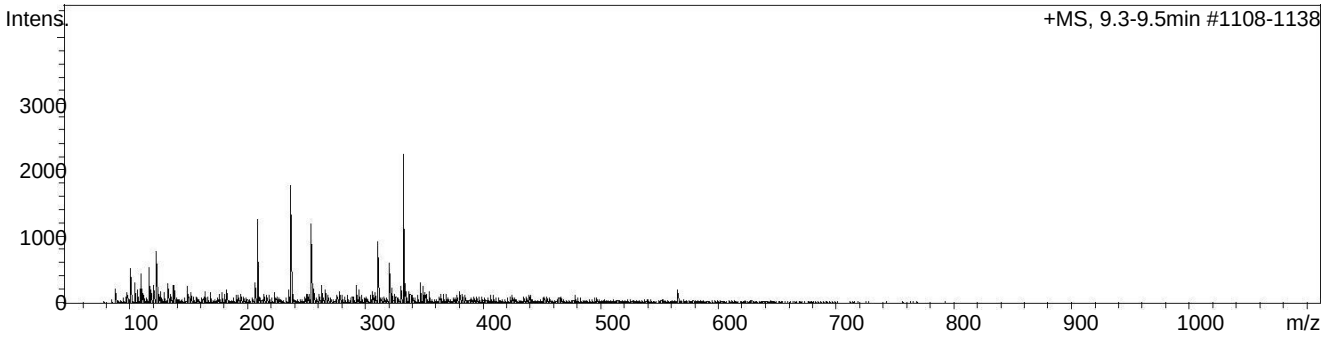
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
149.024028	1	C8H5O3	n.a.	149.023320	-0.7	-4.7	n.a.	6.5	even	ok

Cmpd 3, 8.8 min



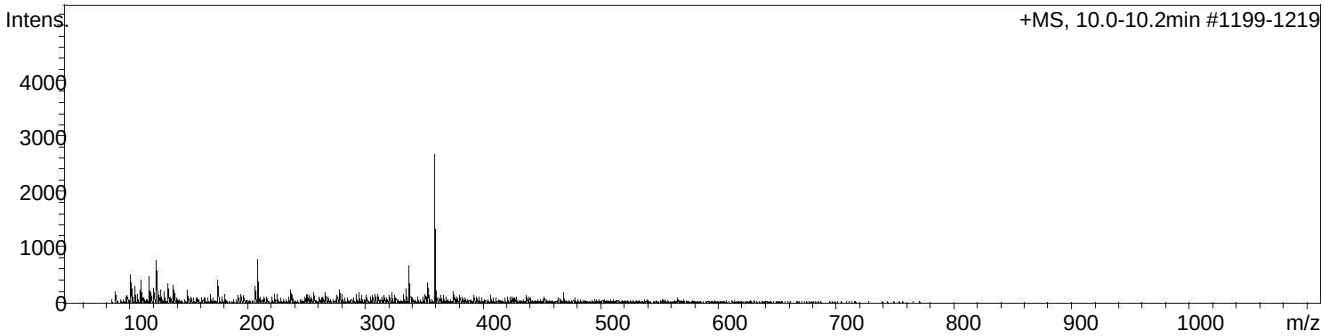
Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

Cmpd 4, 9.4 min



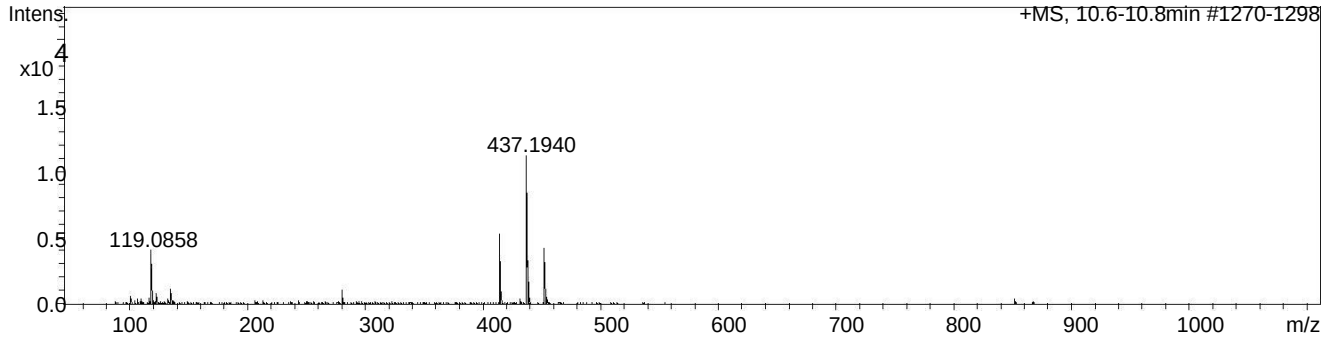
Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

Cmpd 5, 10.1 min



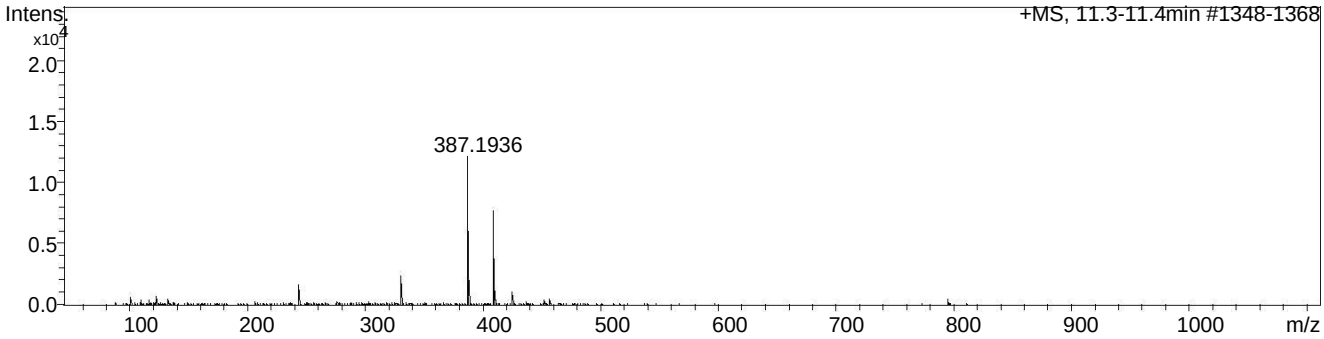
Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

Cmpd 6, 10.7 min



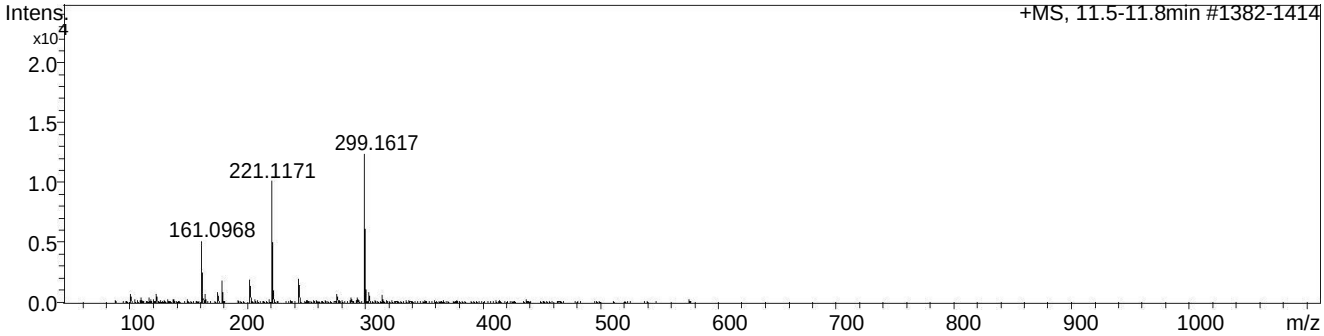
Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

Cmpd 7, 11.3 min



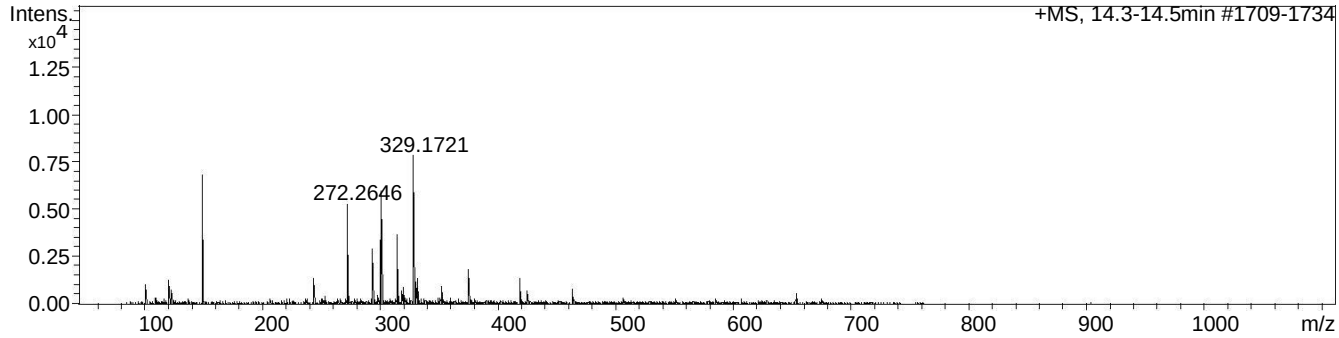
Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

Cmpd 8, 11.6 min



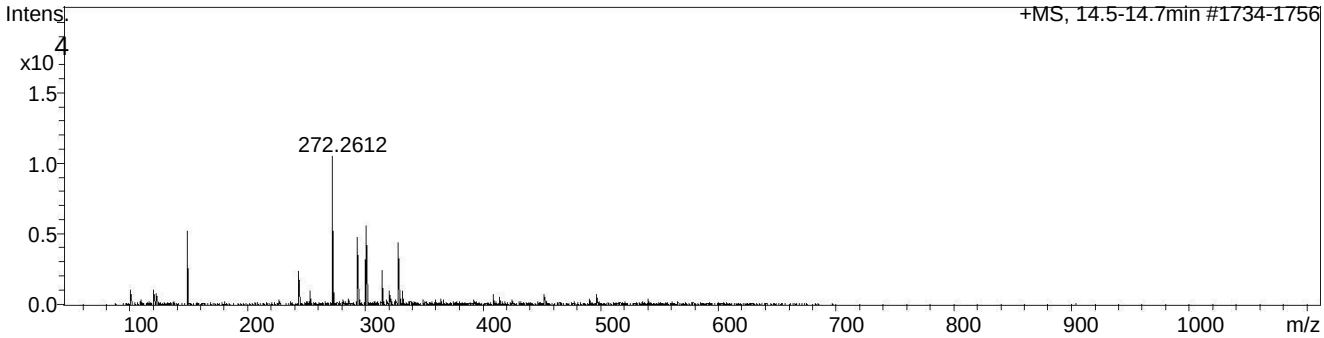
Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

Cmpd 9, 14.3 min



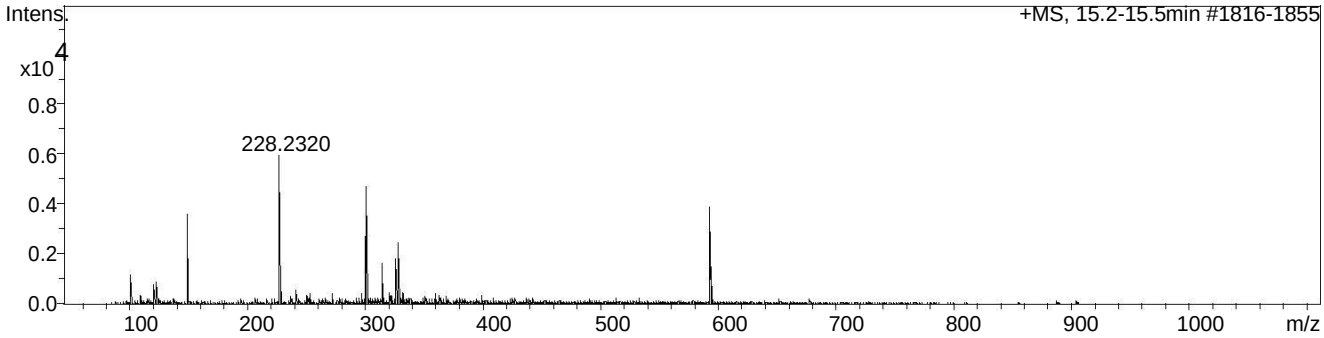
Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

Cmpd 10, 14.6 min



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

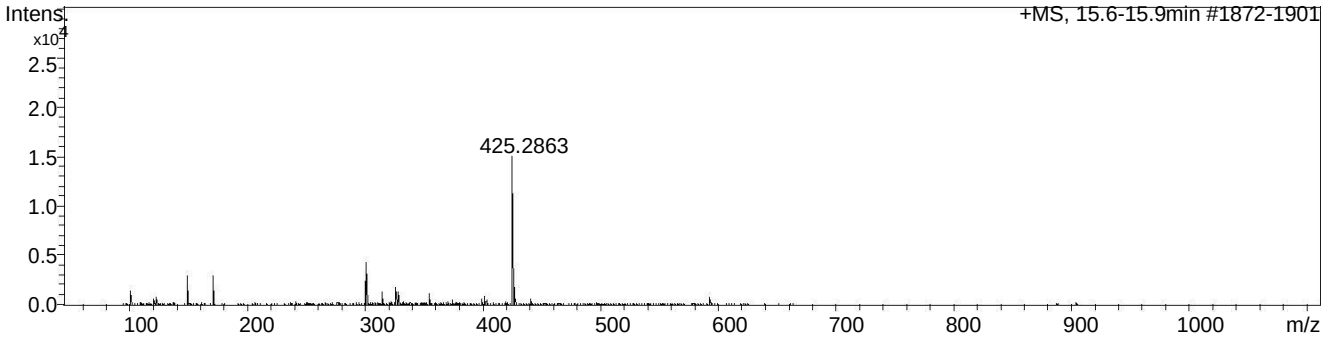
Cmpd 11, 15.3 min



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

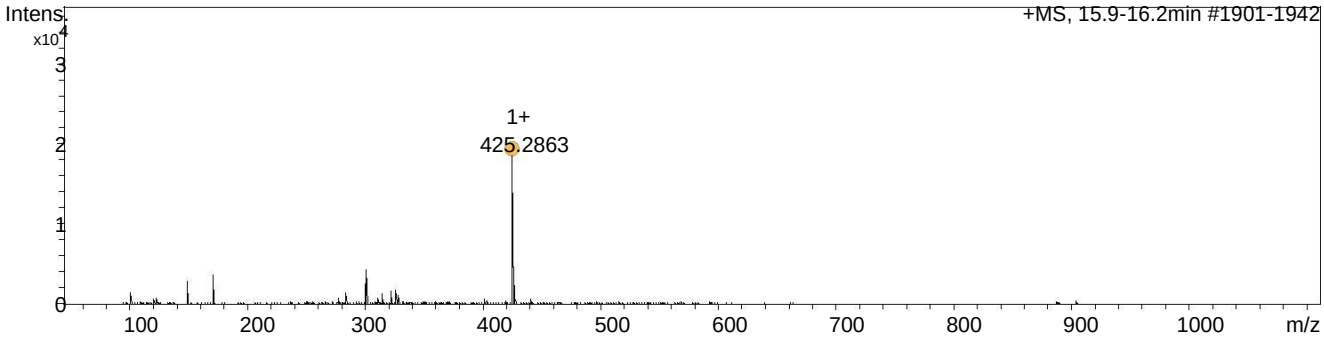
Compound Mass Spectrum Deconvolution Report

Cmpd 12, 15.7 min



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

Cmpd 13, 16.0 min



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance
A	425.2863	425.4864 [M + H]+	18460	100.00

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
425.2863	1+	425.2863	425.2863
426.2896	1+	426.2896	426.2897

Molecular Mass ([M + H]+): 425.2863 Std. Deviation: 2.58939e-005

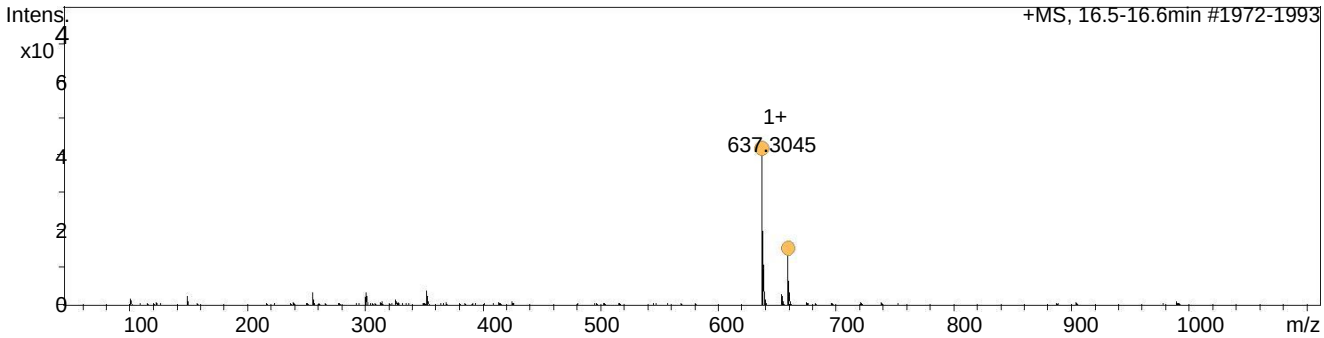
Average Mass ([M + H]+): 425.4864

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
425.286331	1	C20H37N6O4	100.00	425.287080	-0.7	-1.8	18.7	5.5	even	ok
	2	C21H33N10	38.57	425.288418	-2.1	-4.9	22.5	10.5	even	ok
	3	C16H33N12O2	43.25	425.284395	1.9	4.6	22.6	6.5	even	ok
	4	C19H41N2O8	95.48	425.285743	-0.6	-1.4	24.6	0.5	even	ok
	1	C20H37N6O4	100.00	425.287080	-0.7	-1.8	18.7	5.5	even	ok
	2	C21H33N10	38.57	425.288418	-2.1	-4.9	22.5	10.5	even	ok

Compound Mass Spectrum Deconvolution Report

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
	3	C16H33N12O2	43.25	425.284395	1.9	4.6	22.6	6.5	even	ok
	4	C19H41N2O8	95.48	425.285743	-0.6	-1.4	24.6	0.5	even	ok
	1	C19H34N10Na	100.00	425.286012	-0.3	-0.8	16.9	7.5	even	ok
	2	C22H42NaO6	64.02	425.287360	-1.0	-2.4	20.8	1.5	even	ok
	3	C18H38N6NaO4	40.06	425.284674	-1.7	-3.9	24.0	2.5	even	ok

Cmpd 14, 16.5 min



Component	Molecular Mass	Molecule		Absolute Abundance	Relative Abundance
A	637.3045	637.5735	[M + H]+	39673	100.00
B	659.2866	659.5604	[M + H]+	13051	32.90

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
637.3045	1+	637.3045	637.3045
638.3080	1+	638.3080	638.3079

Molecular Mass ([M + H]+): 637.3045 Std. Deviation: 0.00011301

Average Mass ([M + H]+): 637.5735

Component B Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
659.2868	1+	659.2868	659.2866
660.2895	1+	660.2895	660.2900

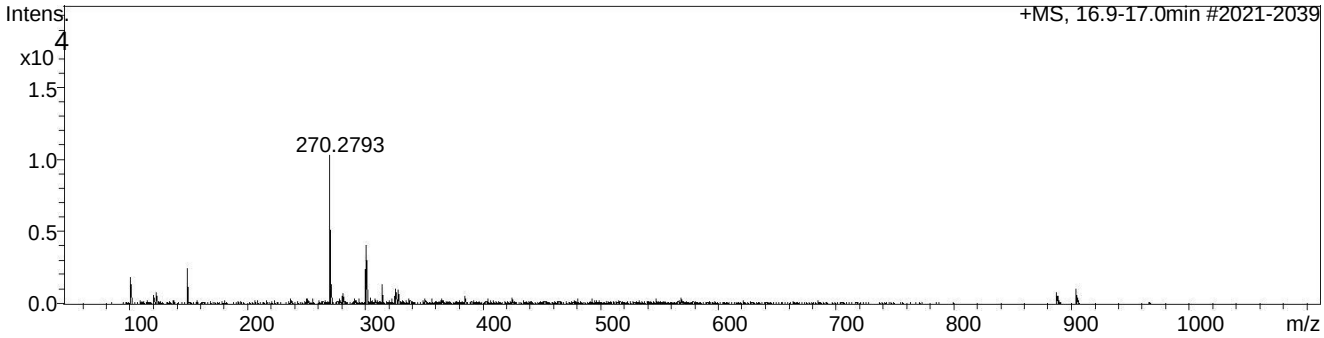
Molecular Mass ([M + H]+): 659.2866 Std. Deviation: 0.000321911

Average Mass ([M + H]+): 659.5604

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
637.304457	1	C23H33N20O3	100.00	637.303901	-0.6	-0.9	35.3	17.5	even	ok
	2	C27H37N14O5	35.90	637.306587	2.1	3.3	36.2	16.5	even	ok
	1	C23H33N20O3	100.00	637.303901	-0.6	-0.9	35.3	17.5	even	ok
	2	C27H37N14O5	35.90	637.306587	2.1	3.3	36.2	16.5	even	ok
	1	C26H34N18NaO	75.60	637.305518	1.1	1.7	32.2	18.5	even	ok
	2	C25H38N14NaO5	100.00	637.304181	0.3	0.4	36.9	13.5	even	ok
	3	C29H42N8NaO7	24.73	637.306866	-2.4	-3.8	38.3	12.5	even	ok
	4	C21H34N20NaO3	14.34	637.301496	-3.0	-4.6	40.0	14.5	even	ok
659.286779	1	C28H32N18NaO	20.60	659.289868	3.1	4.7	35.2	21.5	even	ok

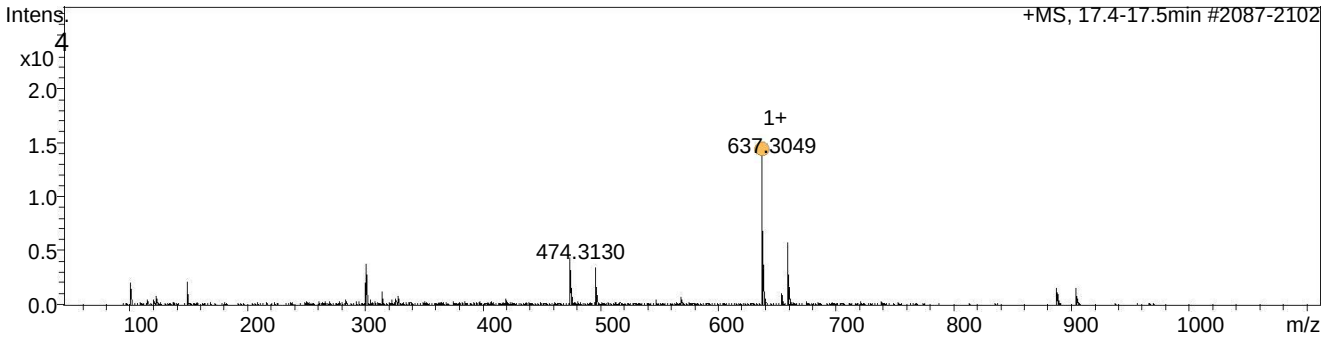
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
	2	C27H36N14NaO5	60.33	659.288531	1.8	2.7	37.5	16.5	even	ok
	3	C23H32N20NaO3	100.00	659.285846	-0.9	-1.4	38.0	17.5	even	ok

Cmpd 15, 16.9 min



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

Cmpd 16, 17.5 min



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance
A	637.3051	637.5748 [M + H]+	13710	100.00

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
637.3049	1+	637.3049	637.3051
638.3091	1+	638.3091	638.3085

Molecular Mass ([M + H]+): 637.3051 Std. Deviation: 0.00045685

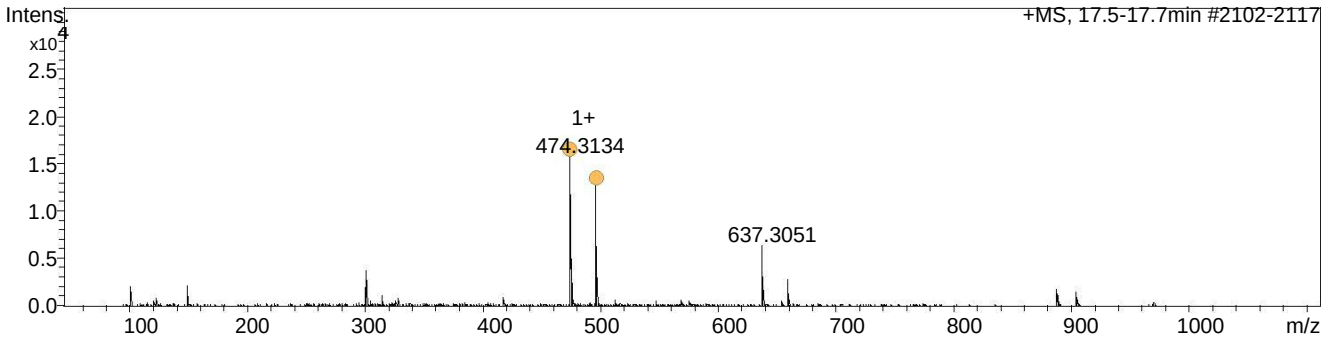
Average Mass ([M + H]+): 637.5748

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
637.304908	1	C28H33N18O	21.64	637.307924	3.0	4.7	35.3	21.5	even	ok
	2	C23H33N20O3	100.00	637.303901	-1.0	-1.6	35.7	17.5	even	ok
	3	C27H37N14O5	64.18	637.306587	-1.7	-2.6	36.3	16.5	even	ok

Compound Mass Spectrum Deconvolution Report

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
	1	C28H33N18O	21.64	637.307924	3.0	4.7	35.3	21.5	even	ok
	2	C23H33N20O3	100.00	637.303901	-1.0	-1.6	35.7	17.5	even	ok
	3	C27H37N14O5	64.18	637.306587	-1.7	-2.6	36.3	16.5	even	ok
	1	C26H34N18NaO	100.00	637.305518	0.6	1.0	32.3	18.5	even	ok
	2	C25H38N14NaO5	82.91	637.304181	0.7	1.1	37.3	13.5	even	ok
	3	C29H42N8NaO7	36.76	637.306866	-2.0	-3.1	38.4	12.5	even	ok

Cmpd 17, 17.6 min



Component	Molecular Mass	Molecule		Absolute Abundance	Relative Abundance
A	474.3133	474.5584	[M + H]+	15685	100.00
B	496.2950	496.5391	[M + H]+	12671	80.79

Component A Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
474.3134	1+	474.3134	474.3133
475.3163	1+	475.3163	475.3166

Molecular Mass ([M + H]+): 474.3133 Std. Deviation: 0.00024811

Average Mass ([M + H]+): 474.5584

Component B Detail

Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
496.2951	1+	496.2951	496.2950
497.2980	1+	497.2980	497.2984

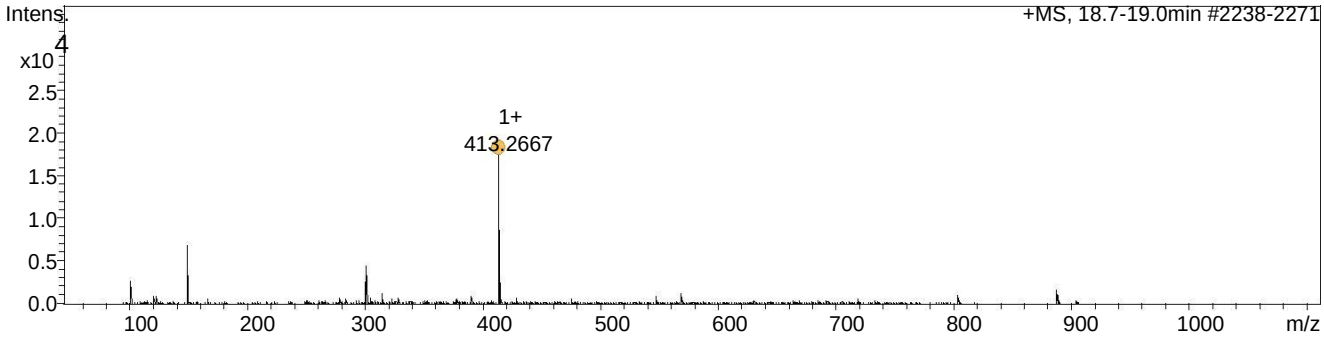
Molecular Mass ([M + H]+): 496.2950 Std. Deviation: 0.000294611

Average Mass ([M + H]+): 496.5391

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
474.313405	1	C30H40N3O2	100.00	474.311504	-1.9	-4.0	31.7	12.5	even	ok
	1	C30H40N3O2	100.00	474.311504	-1.9	-4.0	31.7	12.5	even	ok
	1	C33H41NNa	100.00	474.313121	-0.3	-0.6	38.8	13.5	even	ok
496.295145	1	C30H39N3NaO2	100.00	496.293448	-1.7	-3.4	31.9	12.5	even	ok

Cmpd 18, 18.8 min

Compound Mass Spectrum Deconvolution Report



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance
A	413.2666	413.4852 [M + H]+	17376	100.00

Component A Detail

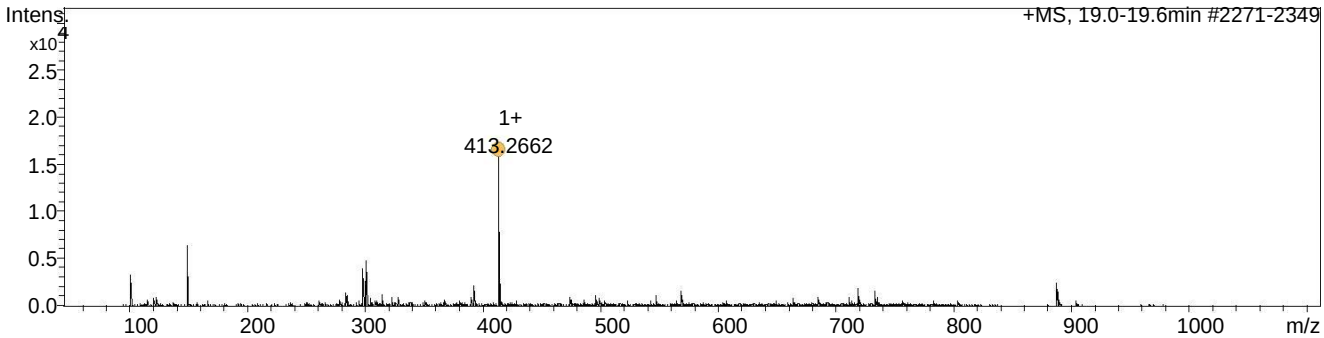
Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
413.2667	1+	413.2667	413.2666
414.2696	1+	414.2696	414.2700

Molecular Mass ([M + H]+): 413.2666 Std. Deviation: 0.000296309

Average Mass ([M + H]+): 413.4852

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
413.266748	1	C22H33N6O2	100.00	413.265951	0.8	1.9	20.2	9.5	even	ok
	2	C26H37O4	45.53	413.268636	-1.9	-4.6	24.5	8.5	even	ok
	1	C22H33N6O2	100.00	413.265951	0.8	1.9	20.2	9.5	even	ok
	2	C26H37O4	45.53	413.268636	-1.9	-4.6	24.5	8.5	even	ok
	1	C25H34N4Na	88.14	413.267568	0.8	2.0	20.9	10.5	even	ok
	2	C24H38NaO4	100.00	413.266230	-0.5	-1.3	22.2	5.5	even	ok

Cmpd 19, 19.4 min



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance
A	413.2661	413.4874 [M + H]+	15724	100.00

Component A Detail

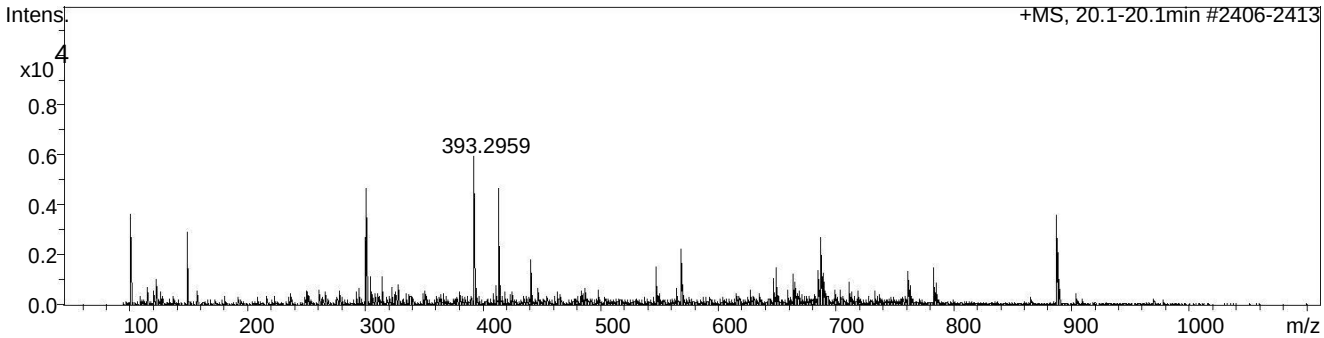
Actual	Charge	Isotopic	Predicted

Compound Mass Spectrum Deconvolution Report

```
  Peak                  Mass([M + H]+)  Peak
413.2662      1+            413.2662      413.2661
414.2693      1+            414.2693      414.2694
Molecular Mass ([M + H]+): 413.2661      Std. Deviation: 0.000140487
Average Mass ([M + H]+): 413.4874
```

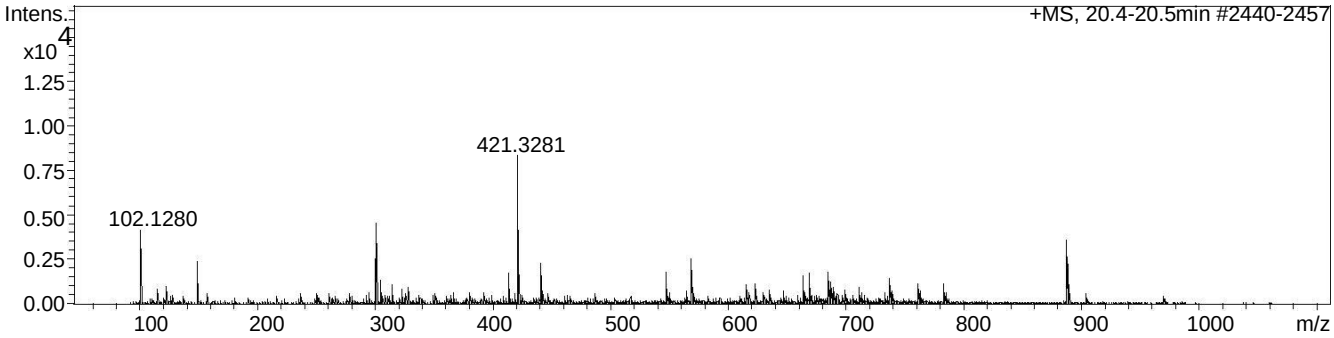
Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
413.266158	1	C22H33N6O2	100.00	413.265951	0.2	0.5	21.1	9.5	even	ok
	2	C21H37N2O6	39.89	413.264613	1.5	3.7	29.2	4.5	even	ok
	1	C22H33N6O2	100.00	413.265951	0.2	0.5	21.1	9.5	even	ok
	2	C21H37N2O6	39.89	413.264613	1.5	3.7	29.2	4.5	even	ok
	1	C25H34N4Na	52.30	413.267568	-1.4	-3.4	20.4	10.5	even	ok
	2	C24H38NaO4	100.00	413.266230	0.1	0.2	22.9	5.5	even	ok

Cmpd 20, 20.1 min



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

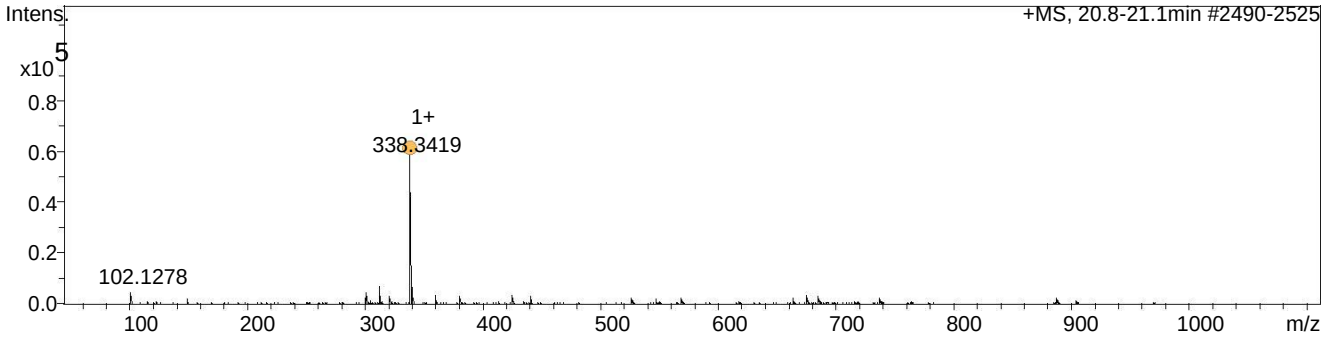
Cmpd 21, 20.4 min



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

Cmpd 22, 20.9 min

Compound Mass Spectrum Deconvolution Report



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance
A	338.3418	338.5324 [M + H]+	58164	100.00

Component A Detail

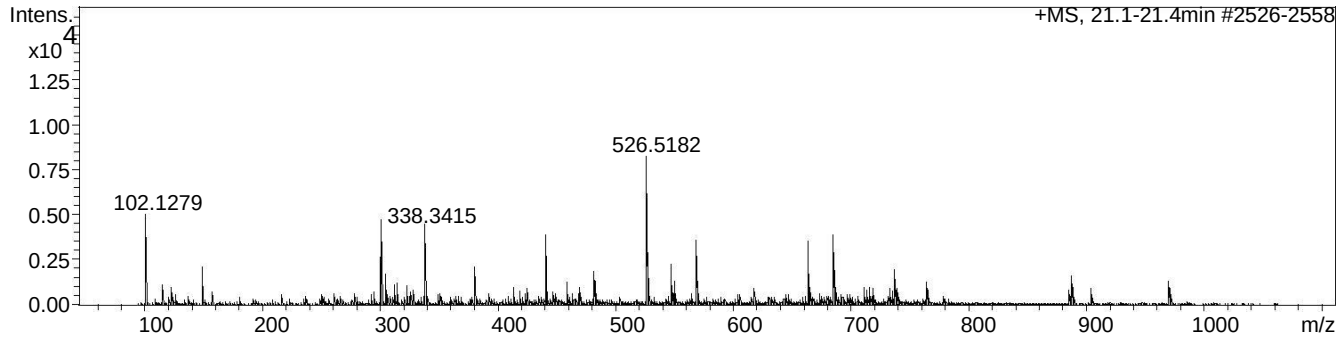
Actual Peak	Charge	Isotopic Mass([M + H]+)	Predicted Peak
338.3419	1+	338.3419	338.3418
339.3448	1+	339.3448	339.3451

Molecular Mass ([M + H]+): 338.3418 Std. Deviation: 0.00027161

Average Mass ([M + H]+): 338.5324

Meas. m/z	#	Ion Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
338.341875	1	C22H44NO	100.00	338.341741	0.1	0.4	19.4	1.5	even	ok
	1	C22H44NO	100.00	338.341741	0.1	0.4	19.4	1.5	even	ok

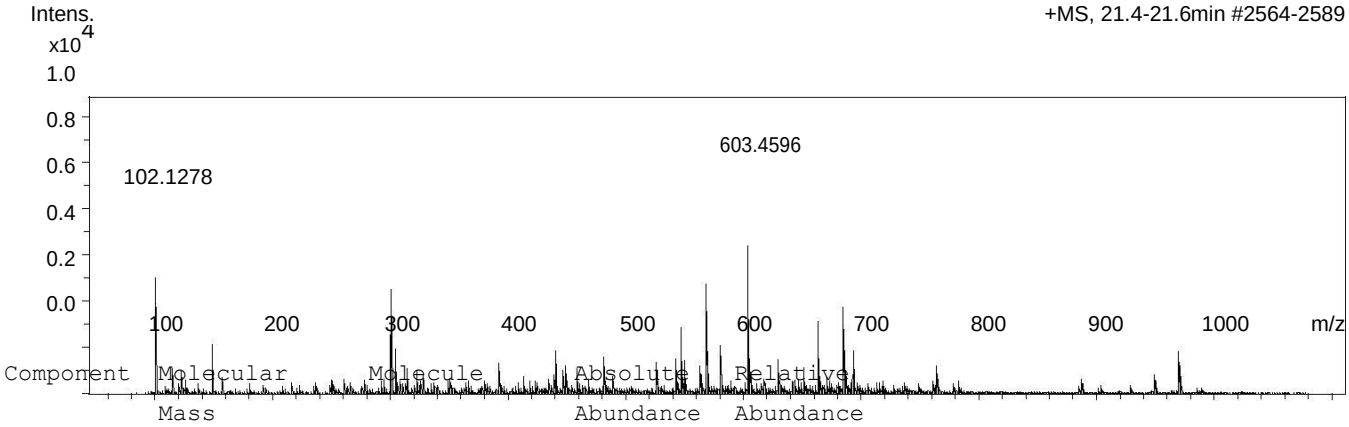
Cmpd 23, 21.2 min



Component	Molecular Mass	Molecule	Absolute Abundance	Relative Abundance

Cmpd 24, 21.5 min

Compound Mass Spectrum Deconvolution Report



Apêndices

9.1. Apêndice A: Tripanossomíase Africana ou Doença do Sono

É causada por um protozoário extracelular do gênero *Trypanosoma*, e duas subespécies deste parasito são responsáveis pela forma humana desta doença, sendo eles o *T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense* (MOORE, 2005; SIMARRO et al., 2012). É endêmica em 36 países da África Subsaariana (Figura 38), onde o *T. b. gambiense* é o agente causador da infecção crônica em 24 países, sendo responsável por mais de 90% de todos os casos reportados (MOORE et al., 2005; MALVY e CHAPPUIS, 2011) enquanto o *T. b. rhodesiense* provoca infecção aguda na África Oriental sendo responsável por cerca de 5% dos casos notificados (MALVY e CHAPPUIS, 2011).

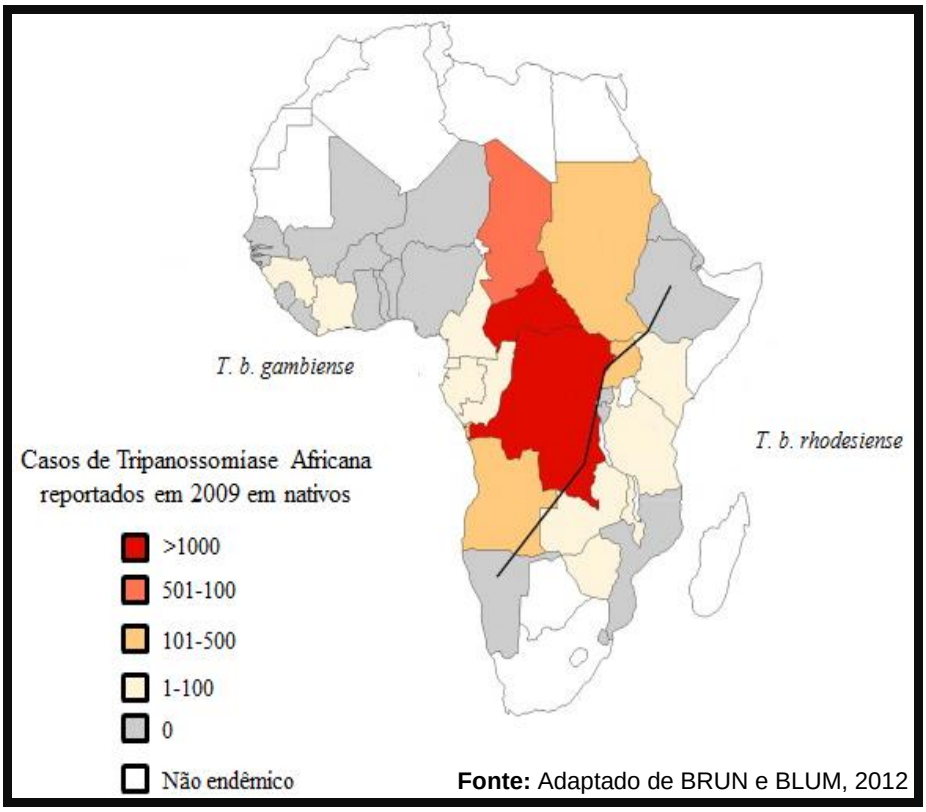


Figura 38: Distribuição dos casos de Tripanossomiase Africana no continente africano no ano de 2009.

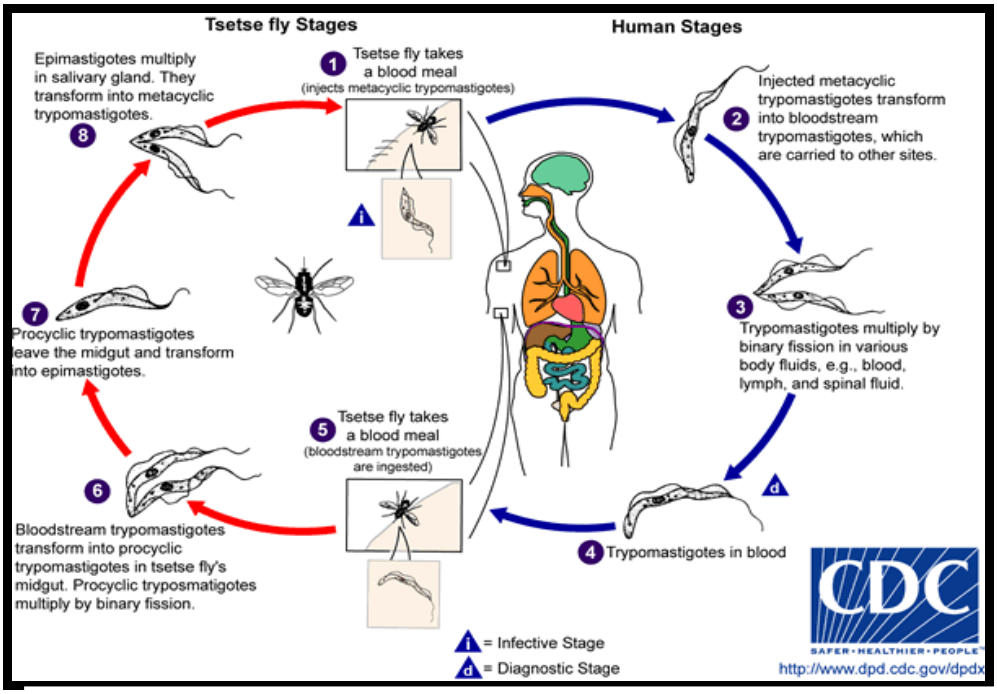
De acordo com a OMS, em 1995 estimava-se que 60 milhões de pessoas estavam em risco e que poderiam surgir 300 mil novos casos por ano na África, com menos de 30 mil casos diagnosticados e tratados. Já em 2009, o número de novos casos caiu para menos de 10 mil pela primeira vez em 50 anos e esta tendência se manteve em 2012, com 7216 casos reportados. O declino no número de novos casos de tripanossomíase africana relatado ao

longo dos anos se deve ao fato de que a OMS estabeleceu inúmeras parcerias com industrias farmacêuticas além de criar vários programas de controle e vigilância (WHO, 2014c).

A sintomatologia para a tripanossomíase africana pode ser variada, porém, existem dois estágios clínicos que podem ser facilmente reconhecidos durante a infecção: no primeiro estágio ou estágio hemolinfático, o parasito está presente na corrente sanguínea e se multiplica no tecido linfático. Quando o parasito ultrapassa a barreira sangue-cérebro, o paciente progride para o segundo estágio da doença denominado meningoencefálico (WENGERT et al., 2014).

Ciclo de Vida

Durante seu ciclo de vida o *T. brucei* é transmitido por dois hospedeiros diferentes, a mosca Tse-Tse (gênero *Glossina*) sendo o vetor e os mamíferos sendo o hospedeiro definitivo (Figura 39).



Fonte: CDCb, http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html. Acessado em: 03/09/2014

Figura 39: Ciclo de vida do parasito *T. brucei* no vetor vertebrado e invertebrado (mosca Tse-Tse).

Durante o repasto sanguineo, a mosca infectada regurgita formas tripomastigotas metaciclicas no hospedeiro. O parasito entra no sistema

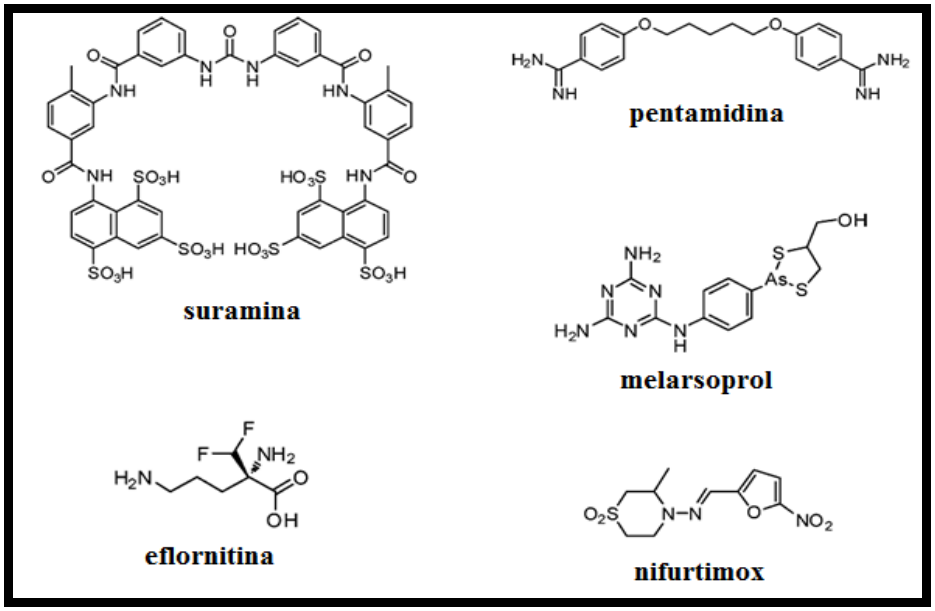
linfático e passa para a corrente sanguinea; dentro do hospedeiro, se transforma em tripomastigotas sanguineas, sendo levadas para todo o corpo, continuando sua replicação por fissão binária.

Em novo repasto sanguíneo em um mamífero infectado, a mosca ingere as formas sanguíneas, que sofrerão outras modificações para se tornarem aptas para uma nova infecção. O ciclo no vetor dura proximadamente três semanas (CDC, 2014b).

Tratamento

O tratamento contra doenças transmitidas por tripanosomatídeos evoluiu desde a descoberta histórica de Paul Ehrlich em 1904, que foi o primeiro a prover informações úteis sobre a terapia de tais doenças, utilizando-se de diferentes tipos de corantes de naftaleno e demonstrando que estes apresentavam atividade tripanocida. Porém, o tratamento para a tripanossomíase africana ainda é precário, com eficácia e padrões de segurança inaceitáveis, particularmente quando esta alcança seu estágio tardio, quando o parasito infecta o sistema nervoso central, além de serem altamente tóxicos e com alto custo. Outro problema proveniente do tratamento é o fato de todos os medicamentos necessitarem administração parenteral, tornando-se um problema para sua administração em áreas rurais (FREARSON et al., 2010; WENZLER et al., 2013).

Em humanos o tratamento baseia-se em quatro fármacos que são altamente tóxicos, sendo estes a suramina, a pentamidina e o melarsoprol, que foram desenvolvidos a 50 anos e, também, a eflornitina, registrada em 1981. Um quinto fármaco, denominado nifurtimox, utilizado no tratamento da doença de Chagas na América do Sul, vem sendo administrada com sucesso em combinação com os outros quatro fármacos citados anteriormente (Figura 40) (HOLMES, 2013). A pentamidina e a suramina são, normalmente, utilizadas para o tratamento da primeira fase de ambas as formas da doença, já o melarsoprol é utilizado na segunda fase em ambas as formas da doença e a eflornitina é usada apenas na segunda fase das infecções por *T. b. gambiense*, uma vez que esta demonstrou-se ineficaz contra *T. b. rhodesiense* (WHO, 2014c).



Fonte: HILTENSPERGER et al., 2012

Figura 40: Estrutura química dos fármacos suramina, eflortina, pentamidina, melarsoprol e nifurtimos, utilizados no tratamento da tripanossomíase africana.

Após o término do tratamento o paciente não pode ser considerado curado, pois pode haver reincidência, principalmente para pacientes que se encontram no estágio tardio da doença. Para determinar falhas no tratamento ou confirmar a cura, os pacientes devem ser acompanhados por dois anos após o término do tratamento, realizando exames parasitológicos no fim do tratamento e a cada seis meses até completar-se dois anos após a conclusão da terapia (WHO, 2007).

Ainda assim, nenhuma destas drogas demonstrou-se ser ótima escolha para o tratamento, por tal motivo, a busca por novas terapias mais seguras para ambas às formas da doença é de grande importância (KUEPFER et al., 2012; KENNEDY, 2012; THUITA et al., 2012).

Resultados para o ensaio de atividade tripanocida:

Tabela 11: Atividade biológica das algas *H. grandifolius, C. littoralis, D. dichotoma, L. catarinensis, L. dendroidea, L. intricata, P. brasiliensis, A. plicata, S. crispata* e *D. antarctica,* juntamente com os controles anfotericina B e pentamidina, frente a formas prócíclicas de *T. brucei* e macrófragos J774.A1 (CC_{50}).

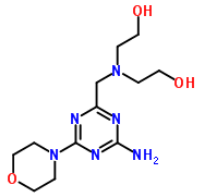
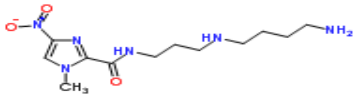
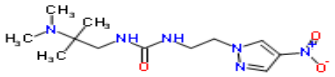
	Local	Extratos	CI_{50} (µg/mL) (IS) *T. brucei*	CC_{50}(µg/mL) Macrófagos J774.A1
Himanthotallus grandifolius	*Arctowski*	***Hexânico***	195,9 ± 3,67 (**2,41**)	472,31 ± 1,24
	Arctowski	***Etanólico***	300,15 ± 2,41 (**1,22**)	366,5 ± 6,36
	Arctowski	***Etanólico 30%***	>500 (**n.d.**)	487,27 ± 3,88
Chondrialittoralis	*Praia de Parati (ES)*	***Aquoso subcrítico***	**n.d.**	< 1,56
Dictyotadichotoma	*Praia de Parati (ES)*	***Aquoso subcrítico***	**n.d.**	16 ± 1,41
Laurenciacatarinensis	*Ponta Castelhanos (ES)*	***Clorofórmico***	**n.d.**	11 ± 0,7
		Hexânico	**n.d.**	13,25 ± 0,35
		Metanólico	**n.d.**	19 ± 2,82
Laurenciadendroidea	*Praia de Parati (ES)*	***Clorofórmico***	**n.d.**	17,25 ± 2,19
		Hexânico	**n.d.**	3,95 ± 1,34
		Metanólico	**n.d.**	18,45 ± 0,77
Laurenciaintricata	*Praia de Meaípe (ES)*	***Metanólico***	**n.d.**	>100
Plocamium brasiliensis	*Praia de Ubu (ES)*	***Aquoso subcrítico***	**n.d.**	3,55 ± 0,07
		Diclorometano	**n.d.**	28,75 ± 3,18
		Hexânico	**n.d.**	8,35 ± 1,48
		Metanólico	**n.d.**	< 1,56
Ahnfeltiaplicata	*Seno Otway*	***Hexânico***	29,55 ± 2,05 (**1,85**)	54,9 ± 1,37
		Etanólico	310,65 ± 5,44 (**1,02**)	318,6 ± 0,94
Sarcothaliacrispata (tetrasporofítica)		***Hexânico***	20,15 ± 1,63 (**4,78**)	96,5 ± 2,85
		Etanólico	>500 (**n.d.**)	99,8 ± 2,16
Sarcothaliacrispata (carposporangia)		***Hexânico***	34,5 ± 1,83 (**2,40**)	83,1 ± 1,76
		Etanólico	>500 (**n.d.**)	125,6 ± 0,83
Durvillaeaantarctica		***Hexânico***	56,6 ± 1,65 (**1,46**)	82,7 ± 1,13
		Etanólico	**n.d.**	>500
Anfotericina B	**-**	**-**	**n.d.**	7,1 ± 0,28
Pentamidina	**-**	**-**	2,19 ± 1,21 (18,72)	41 ± 7,07

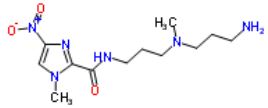
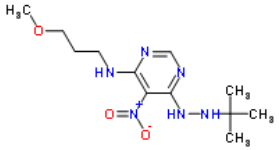
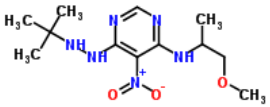
9.2. Apêndice B: Tabelas de possíveis compostos para a subfração HSG11 do extrato hexânico da alga *H. grandifolius.*

Tabela 1: Possíveis compostos para o pico de número 1, com massa 381.1312 do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica 11 da alga *H. grandifolius.*

Fórmula e Massa	Composto	Estrutura
$C_{19}H_{12}N_{10}$ 381.1312	-	-
$C_{20}H_{21}NaO_6$ 381.1312	-	-
$C_{18}H_{21}KN_4O_3$ 381.1312	-	-

Tabela 2: Possíveis compostos para o pico de número 2, com massa 299.1822 do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica 11 da alga *H. grandifolius.*

Fórmula e Massa	Composto	Estrutura
	2,2'-({[4-Amino-6-(4-morpholinyl)-1,3,5-triazin-2-yl]methyl}imino)diethanol	
$C_{12}H_{22}N_6O_3$ **299.1822** **(Δppm = 1.002)**	N-{3-[(4-Aminobutyl)amino]propyl}-1-methyl-4-nitro-1H-imidazole-2-carboxamide	
	1-[2-(Dimethylamino)-2-methylpropyl]-3-[2-(4-nitro-1H-pyrazol-1-yl)ethyl]urea	

$C_{12}H_{22}N_6O_3$ 299.1822 (Δppm = 1.002)	N-{3-[(3-Aminopropyl)(methyl)amino]propyl}-1-methyl-4-nitro-1H-imidazole-2-carboxamide	
	2-(Ethyl{6-[2-(2-methyl-2-propanyl)hydrazino]-5-nitro-4-pyrimidinyl}amino)ethanol	
	N-(3-Methoxypropyl)-6-[2-(2-methyl-2-propanyl)hydrazino]-5-nitro-4-pyrimidinamine	
	6-(2-tert-Butylhydrazino)-N-(1-methoxypropan-2-yl)-5-nitropyrimidin-4-amine	

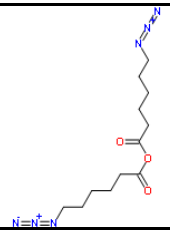
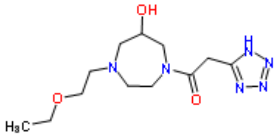
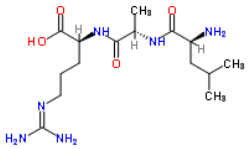
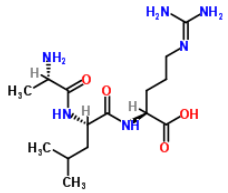
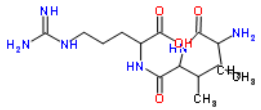
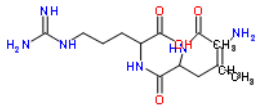
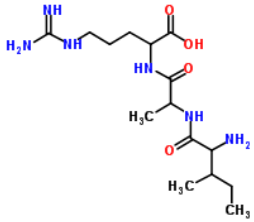
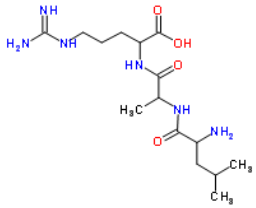
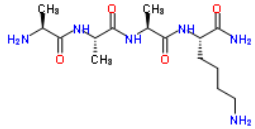
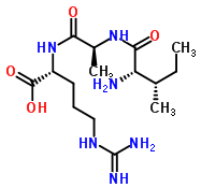
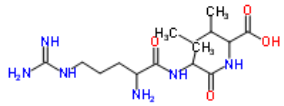
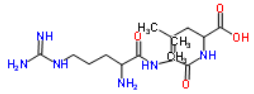
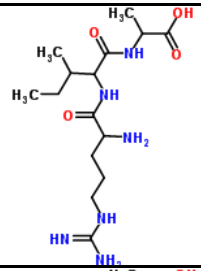
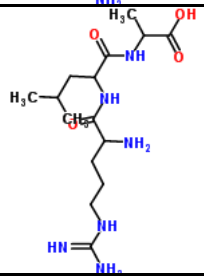
$C_{12}H_{22}N_6O_3$ **299.1822** **(Δppm = 1.002)**	6-Azidohexanoic anhydride	
	1-[4-(2-Ethoxyethyl)-6-hydroxy-1,4-diazepan-1-yl]-2-(1H-tetrazol-5-yl)ethanone	
$C_{14}H_{27}NaO_5$ **299.1822**	-	-

Tabela 3: Possíveis compostos para o pico de número 3, com massa 359.2401 do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica 11 da alga *H. grandifolius.*

Fórmula e Massa	Composto	Estrutura
$C_{15}H_{30}N_6O_4$ **359.2401** **(Δppm = 1.002)**	L-Leucyl-L-alanyl-N^5-(diaminomethylene)-L-ornithine	
	L-Alanyl-L-leucyl-N^5-(diaminomethylene)-L-ornithine	
	ala-ile-arg	
	ala-leu-arg	

$C_{15}H_{30}N_6O_4$ 359.2401 (Δppm = 1.002)	2-[2-[(2-amino-3-methyl-pentanoyl)amino]propanoylamino]-5-guanidino-pentanoic acid	
	2-[2-[(2-amino-4-methyl-pentanoyl)amino]propanoylamino]-5-guanidino-pentanoic acid	
	L-Alanyl-L-alanyl-L-alanyl-L-lysinamide	
	L-Isoleucyl-L-alanyl-D-arginine	

$C_{15}H_{30}N_6O_4$ 359.2401 (Δppm = 1.002)	Arginylalanylisoleucine	
	Arginylalanylleucine	
	Arginylisoleucylalanine	
	Arginylleucylalanine	

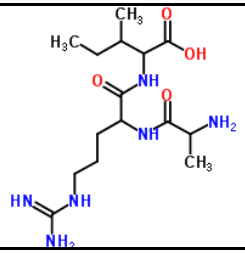
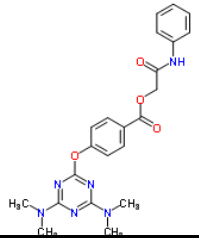
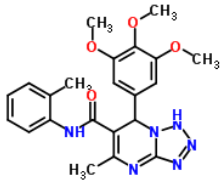
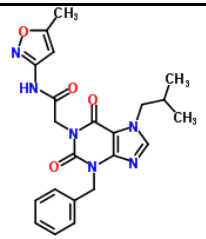
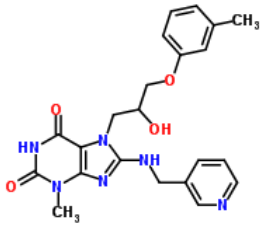
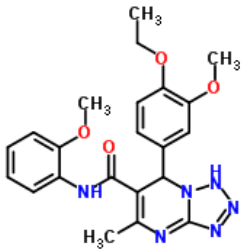
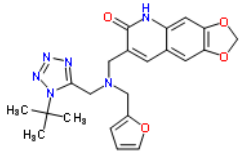
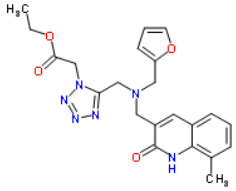
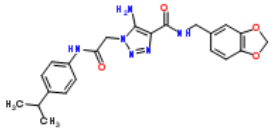
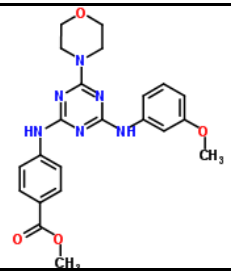
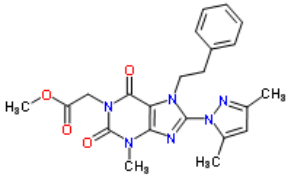
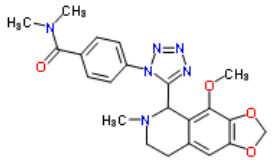
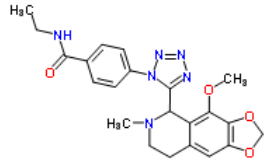
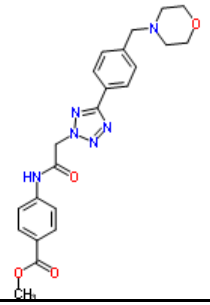
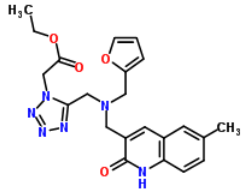
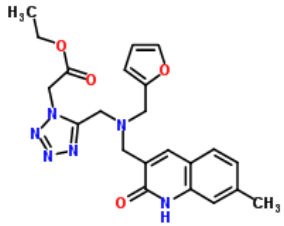
$C_{15}H_{30}N_6O_4$ **359.2401** **(Δppm = 1.002)**	Alanylarginylisoleucine	
$C_{14}H_{27}N_{10}Na$ **359.2401**	-	-
$C_{11}H_{31}KN_{10}O$ **359.2401**	-	-

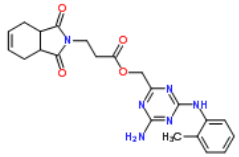
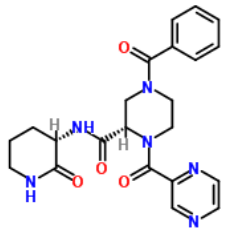
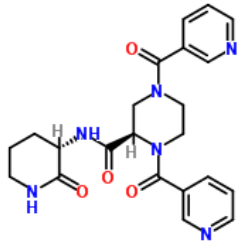
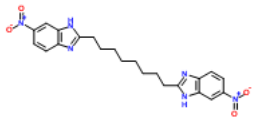
Tabela 4: Possíveis compostos para o pico de número 4 e 5, com massa 437.1937 do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica 11 da alga *H. grandifolius.*

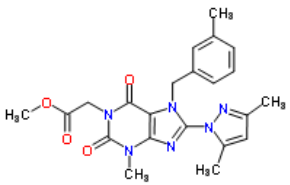
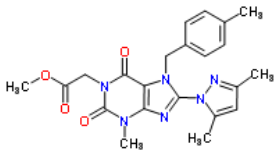
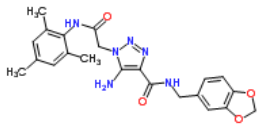
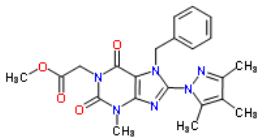
Fórmula e Massa	Composto	Estrutura
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ **437.1937** **(Δppm = 1.001)**	2-Anilino-2-oxoethyl 4-{[4,6-bis(dimethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]oxy}benzoate	
	5-Methyl-N-(2-methylphenyl)-7-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-1,7-dihydrotetrazolo[1,5-a]pyrimidine-6-carboxamide	
	2-(3-Benzyl-7-isobutyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-1-yl)-N-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)acetamide	
	7-[2-Hydroxy-3-(3-methylphenoxy)propyl]-3-methyl-8-[(3-pyridinylmethyl)amino]-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione	

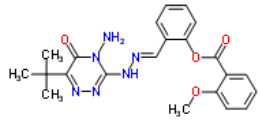
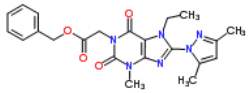
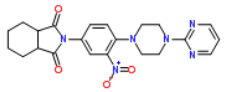
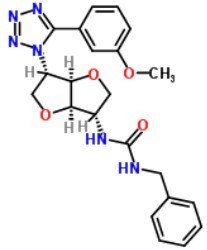
	7-(4-Ethoxy-3-methoxyphenyl)-N-(2-methoxyphenyl)-5-methyl-1,7-dihydrotetrazolo[1,5-a]pyrimidine-6-carboxamide	
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	**7-{[(2-Furylmethyl){[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]methyl}amino]methyl}[1,3]dioxolo[4,5-g]quinolin-6-ol**	
	Ethyl [5-({(2-furylmethyl)[(8-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-3-quinolinyl)methyl]amino}methyl)-1H-tetrazol-1-yl]acetate	
	5-Amino-N-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-1-{2-[(4-isopropylphenyl)amino]-2-oxoethyl}-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide	

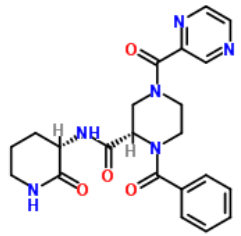
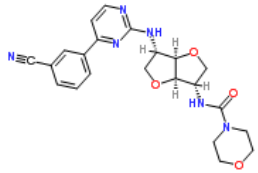
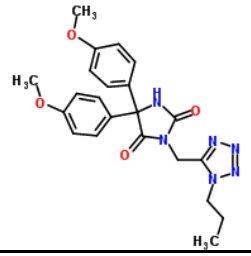
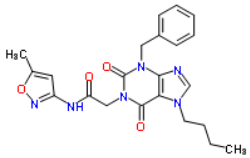
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	Methyl 4-({4-[(3-methoxyphenyl)amino]-6-(4-morpholinyl)-1,3,5-triazin-2-yl}amino)benzoate	
	Methyl [8-(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)-3-methyl-2,6-dioxo-7-(2-phenylethyl)-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-1-yl]acetate	
	Ethyl 5-amino-1-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,5-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-yl]-1H-pyrazole-4-carboxylate	
	4-[5-(4-Methoxy-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydro[1,3]dioxolo[4,5-g]isoquinolin-5-yl)-1H-tetrazol-1-yl]-N,N-dimethylbenzamide	

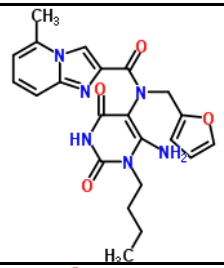
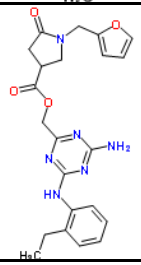
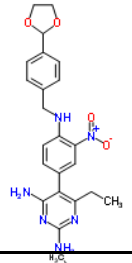
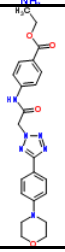
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	N-Ethyl-4-[5-(4-methoxy-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydro[1,3]dioxolo[4,5-g]isoquinolin-5-yl)-1H-tetrazol-1-yl]benzamide	
	Methyl 4-[({5-[4-(4-morpholinylmethyl)phenyl]-2H-tetrazol-2-yl}acetyl)amino]benzoate	
	Ethyl [5-({(2-furylmethyl)[(6-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-3-quinolinyl)methyl]amino}methyl)-1H-tetrazol-1-yl]acetate	
	Ethyl [5-({(2-furylmethyl)[(7-methyl-2-oxo-1,2-dihydro-3-quinolinyl)methyl]amino}methyl)-1H-tetrazol-1-yl]acetate	

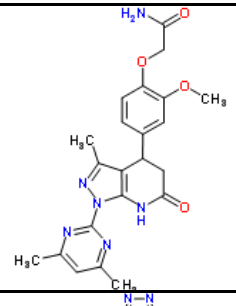
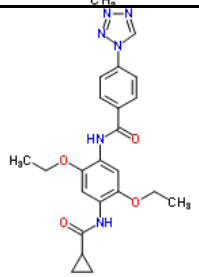
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	{4-Amino-6-[(2-methylphenyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl}methyl 3-(1,3-dioxo-1,3,3a,4,7,7a-hexahydro-2H-isoindol-2-yl)propanoate	
	(2S)-4-Benzoyl-N-[(3S)-2-oxo-3-piperidinyl]-1-(2-pyrazinylcarbonyl)-2-piperazinecarboxamide	
	(2R)-N-[(3S)-2-Oxo-3-piperidinyl]-1,4-bis(3-pyridinylcarbonyl)-2-piperazinecarboxamide	
	2,2'-(1,8-Octanediyl)bis(6-nitro-1H-benzimidazole)	

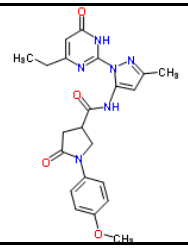
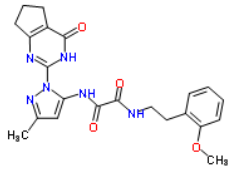
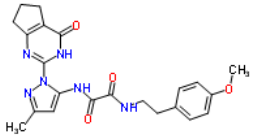
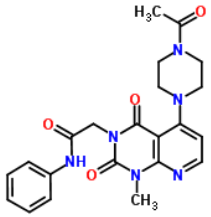
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	Methyl [8-(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)-3-methyl-7-(3-methylbenzyl)-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-1-yl]acetate	
	Methyl [8-(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)-3-methyl-7-(4-methylbenzyl)-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-1-yl]acetate	
	5-Amino-N-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-1-[2-(mesitylamino)-2-oxoethyl]-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide	
	Methyl [7-benzyl-3-methyl-2,6-dioxo-8-(3,4,5-trimethyl-1H-pyrazol-1-yl)-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-1-yl]acetate	

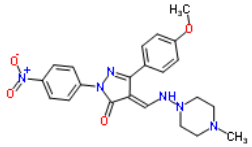
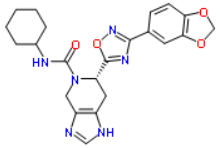
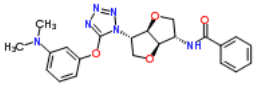
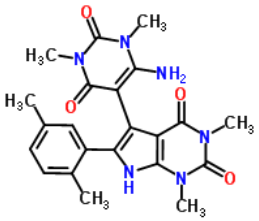
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	2-[(E)-{[4-Amino-6-(2-methyl-2-propanyl)-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-triazin-3-yl]hydrazono}methyl]phenyl 2-methoxybenzoate	
	Benzyl [8-(3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)-7-ethyl-3-methyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-1-yl]acetate	
	2-{3-Nitro-4-[4-(2-pyrimidinyl)-1-piperazinyl]phenyl}hexahydro-1H-isoindole-1,3(2H)-dione	
	1,4:3,6-Dianhydro-2-[(benzylcarbamoyl)amino]-2,5-dideoxy-5-[5-(3-methoxyphenyl)-1H-tetrazol-1-yl]-L-iditol	

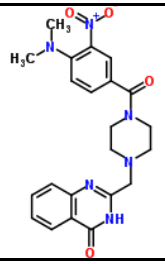
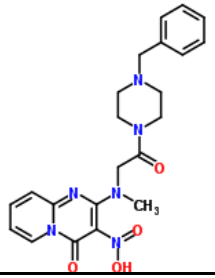
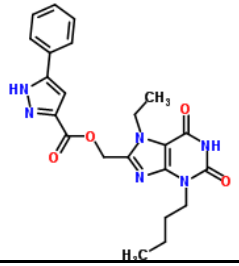
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	(2S)-1-Benzoyl-N-[(3S)-2-oxo-3-piperidinyl]-4-(2-pyrazinylcarbonyl)-2-piperazinecarboxamide	
	1,4:3,6-Dianhydro-2-{[4-(3-cyanophenyl)-2-pyrimidinyl]amino}-2,5-dideoxy-5-[(4-morpholinylcarbonyl)amino]-L-iditol	
	5,5-Bis(4-methoxyphenyl)-3-[(1-propyl-1H-tetrazol-5-yl)methyl]-2,4-imidazolidinedione	
	2-(3-Benzyl-7-butyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-1-yl)-N-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)acetamide	

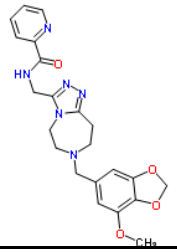
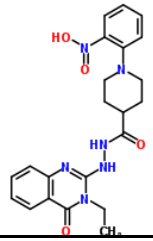
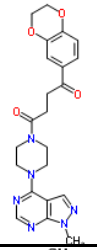
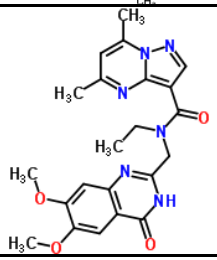
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	N-(6-Amino-1-butyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-5-pyrimidinyl)-N-(2-furylmethyl)-5-methylimidazo[1,2-a]pyridine-2-carboxamide	
	{4-Amino-6-[(2-ethylphenyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl}methyl 1-(2-furylmethyl)-5-oxo-3-pyrrolidinecarboxylate	
	5-(4-{[4-(1,3-Dioxolan-2-yl)benzyl]amino}-3-nitrophenyl)-6-ethyl-2,4-pyrimidinediamine	
	Ethyl 4-[({5-[4-(4-morpholinyl)phenyl]-2H-tetrazol-2-yl}acetyl)amino]benzoate	

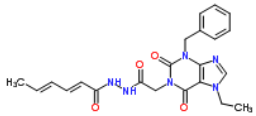
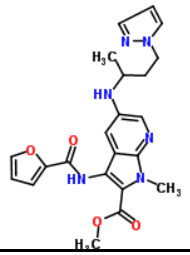
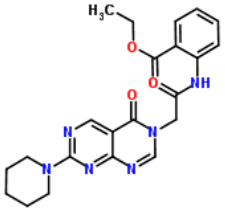
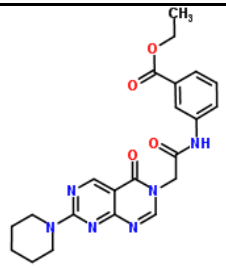
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ **437.1937** **(Δppm = 1.001)**	2-{4-[1-(4,6-Dimethyl-2-pyrimidinyl)-3-methyl-6-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-4-yl]-2-methoxyphenoxy}acetamide	
	N-{4-[(Cyclopropylcarbonyl)amino]-2,5-diethoxyphenyl}-4-(1H-tetrazol-1-yl)benzamide	
	7-(3-Ethoxy-4-methoxyphenyl)-N-(2-methoxyphenyl)-5-methyl-1,7-dihydrotetrazolo[1,5-a]pyrimidine-6-carboxamide	
	5-(6-Amino-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-5-pyrimidinyl)-6-(2,4-dimethylphenyl)-1,3-dimethyl-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-2,4(3H,7H)-dione	

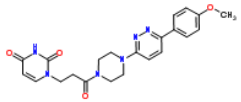
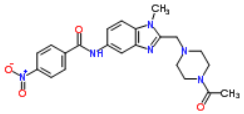
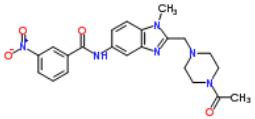
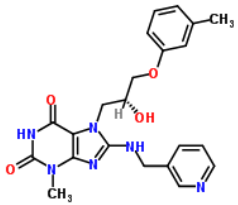
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	N-[1-(4-Ethyl-6-oxo-1,6-dihydro-2-pyrimidinyl)-3-methyl-1H-pyrazol-5-yl]-1-(4-methoxyphenyl)-5-oxo-3-pyrrolidinecarboxamide	
	N-[2-(2-Methoxyphenyl)ethyl]-N'-[3-methyl-1-(4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-2-yl)-1H-pyrazol-5-yl]ethanediamide	
	N-[2-(4-Methoxyphenyl)ethyl]-N'-[3-methyl-1-(4-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1H-cyclopenta[d]pyrimidin-2-yl)-1H-pyrazol-5-yl]ethanediamide	
	2-[5-(4-Acetyl-1-piperazinyl)-1-methyl-2,4-dioxo-1,4-dihydropyrido[2,3-d]pyrimidin-3(2H)-yl]-N-phenylacetamide	

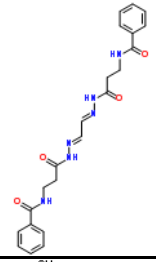
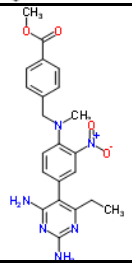
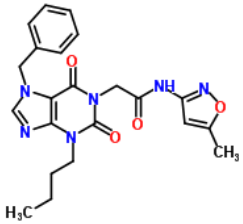
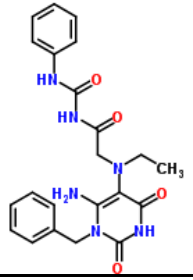
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	(4E)-5-(4-Methoxyphenyl)-4-{[(4-methyl-1-piperazinyl)amino]methylene}-2-(4-nitrophenyl)-2,4-dihydro-3H-pyrazol-3-one	
	(6S)-6-[3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-N-cyclohexyl-1,4,6,7-tetrahydro-5H-imidazo[4,5-c]pyridine-5-carboxamide	
	1,4:3,6-Dianhydro-2-(benzoylamino)-2,5-dideoxy-5-{5-[3-(dimethylamino)phenoxy]-1H-tetrazol-1-yl}-L-iditol	
	5-(6-Amino-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-5-pyrimidinyl)-6-(2,5-dimethylphenyl)-1,3-dimethyl-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-2,4(3H,7H)-dione	

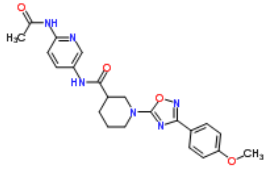
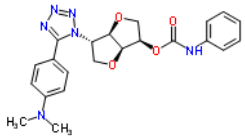
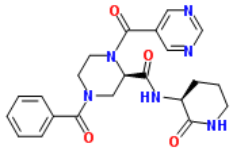
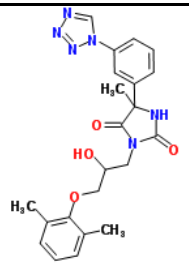
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	2-({4-[4-(Dimethylamino)-3-nitrobenzoyl]-1-piperazinyl}methyl)-4(1H)-quinazolinone	
	5-(6-Amino-1,3-dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-5-pyrimidinyl)-6-(3,4-dimethylphenyl)-1,3-dimethyl-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-2,4(3H,7H)-dione	
	2-{[2-(4-Benzyl-1-piperazinyl)-2-oxoethyl](methyl)amino}-3-nitro-4H-pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one	
	(3-Butyl-7-ethyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)methyl 5-phenyl-1H-pyrazole-3-carboxylate	

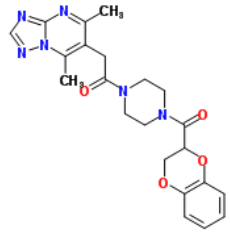
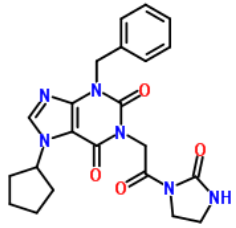
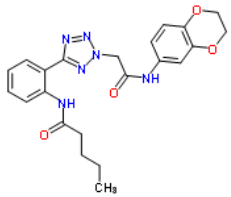
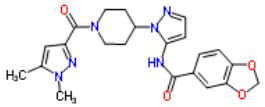
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ **437.1937** **(Δppm = 1.001)**	N-({7-[(7-Methoxy-1,3-benzodioxol-5-yl)methyl]-6,7,8,9-tetrahydro-5H-[1,2,4]triazolo[4,3-d][1,4]diazepin-3-yl}methyl)-2-pyridinecarboxamide	
	N'-[(2E)-3-Ethyl-4-oxo-3,4-dihydro-2(1H)-quinazolinylidene]-1-(2-nitrophenyl)-4-piperidinecarbohydrazide	
	1-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-4-[4-(1-methyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl)-1-piperazinyl]-1,4-butanedione	
	N-[(6,7-Dimethoxy-4-oxo-1,4-dihydro-2-quinazolinyl)methyl]-N-ethyl-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamide	

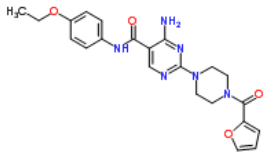
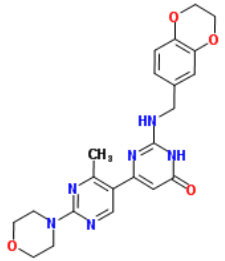
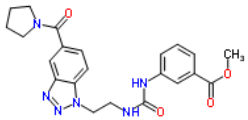
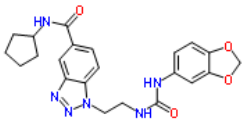
	(2E,4E)-N'-[(3-Benzyl-7-ethyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-1-yl)acetyl]-2,4-hexadienehydrazide	
	Methyl 3-(2-furoylamino)-1-methyl-5-{[4-(1H-pyrazol-1-yl)-2-butanyl]amino}-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-2-carboxylate	
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	Ethyl 2-({[4-oxo-7-(1-piperidinyl)pyrimido[4,5-d]pyrimidin-3(4H)-yl]acetyl}amino)benzoate	
	Ethyl 3-({[4-oxo-7-(1-piperidinyl)pyrimido[4,5-d]pyrimidin-3(4H)-yl]acetyl}amino)benzoate	

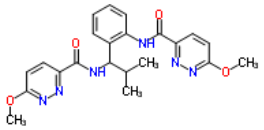
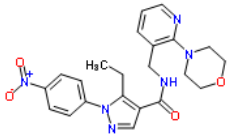
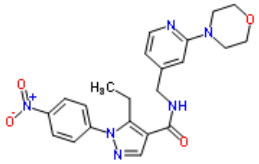
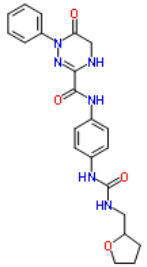
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ **437.1937** **(Δppm = 1.001)**	1-[3-[4-[6-(4-methoxyphenyl)pyridazin-3-yl]piperazin-1-yl]-3-oxo-propyl]pyrimidine-2,4-dione	
	N-{2-[(4-Acetyl-1-piperazinyl)methyl]-1-methyl-1H-benzimidazol-5-yl}-4-nitrobenzamide	
	N-{2-[(4-Acetyl-1-piperazinyl)methyl]-1-methyl-1H-benzimidazol-5-yl}-3-nitrobenzamide	
	7-[(2R)-2-Hydroxy-3-(3-methylphenoxy)propyl]-3-methyl-8-[(3-pyridinylmethyl)amino]-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione	

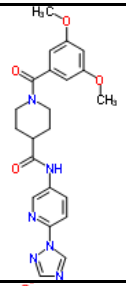
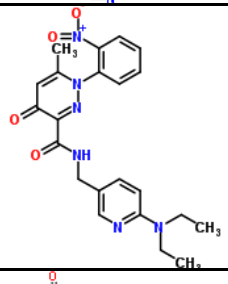
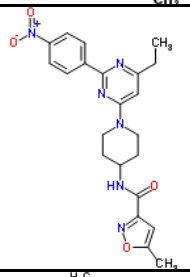
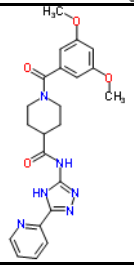
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	N,N'-{(1E,2E)-1,2-Ethanediylidenebis[(2E)-1-hydrazinyl-2-ylidene(3-oxo-3,1-propanediyl)]}dibenzamide (non-preferred name)	
	Methyl 4-({[4-(2,4-diamino-6-ethyl-5-pyrimidinyl)-2-nitrophenyl](methyl)amino}methyl)benzoate	
	2-(7-Benzyl-3-butyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-1-yl)-N-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)acetamide	
	N^2-(6-Amino-1-benzyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-5-pyrimidinyl)-N^2-ethyl-N-(phenylcarbamoyl)glycinamide	

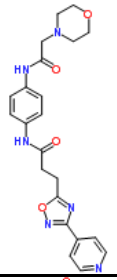
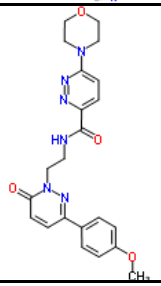
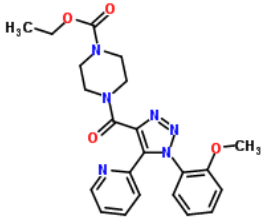
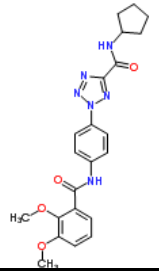
	N-(6-Acetamido-3-pyridinyl)-1-[3-(4-methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-3-piperidinecarboxamide	
	1,4:3,6-Dianhydro-2-deoxy-2-{5-[4-(dimethylamino)phenyl]-1H-tetrazol-1-yl}-5-O-(phenylcarbamoyl)-D-glucito	
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ **437.1937** **(Δppm = 1.001)**	(2R)-4-Benzoyl-N-[(3S)-2-oxo-3-piperidinyl]-1-(5-pyrimidinylcarbonyl)-2-piperazinecarboxamide	
	3-[3-(2,6-Dimethylphenoxy)-2-hydroxypropyl]-5-methyl-5-[3-(1H-tetrazol-1-yl)phenyl]-2,4-imidazolidinedione	

$C_{22}H_{24}N_6O_4$ **437.1937** **(Δppm = 1.001)**	1-[4-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-2-ylcarbonyl)-1-piperazinyl]-2-(5,7-dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-6-yl)ethanone	
	3-Benzyl-7-cyclopentyl-1-[2-oxo-2-(2-oxo-1-imidazolidinyl)ethyl]-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione	
	N-(2-{2-[2-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-ylamino)-2-oxoethyl]-2H-tetrazol-5-yl}phenyl)pentanamide	
	N-(1-{1-[(1,5-Dimethyl-1H-pyrazol-3-yl)carbonyl]-4-piperidinyl}-1H-pyrazol-5-yl)-1,3-benzodioxole-5-carboxamide	

$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	4-Amino-N-(4-ethoxyphenyl)-2-[4-(2-furoyl)-1-piperazinyl]-5-pyrimidinecarboxamide	
	2-[(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-ylmethyl)amino]-4'-methyl-2'-(4-morpholinyl)-4,5'-bipyrimidin-6(1H)-one	
	Methyl 3-[({2-[5-(1-pyrrolidinylcarbonyl)-1H-benzotriazol-1-yl]ethyl}carbamoyl)amino]benzoate	
	1-{2-[(1,3-Benzodioxol-5-ylcarbamoyl)amino]ethyl}-N-cyclopentyl-1H-benzotriazole-5-carboxamide	

	6-Methoxy-N-[2-(1-{[(6-methoxy-3-pyridazinyl)carbonyl]amino}-2-methylpropyl)phenyl]-3-pyridazinecarboxamide	
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	**5-Ethyl-N-{[2-(4-morpholinyl)-3-pyridinyl]methyl}-1-(4-nitrophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxamide**	
	5-Ethyl-N-{[2-(4-morpholinyl)-4-pyridinyl]methyl}-1-(4-nitrophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxamide	
	6-Oxo-1-phenyl-N-(4-{[(tetrahydro-2-furanylmethyl)carbamoyl]amino}phenyl)-1,4,5,6-tetrahydro-1,2,4-triazine-3-carboxamide	

$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	1-(3,5-Dimethoxybenzoyl)-N-[6-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-3-pyridinyl]-4-piperidinecarboxamide	
	N-{[6-(Diethylamino)-3-pyridinyl]methyl}-6-methyl-1-(2-nitrophenyl)-4-oxo-1,4-dihydro-3-pyridazinecarboxamide	
	N-{1-[6-Ethyl-2-(4-nitrophenyl)-4-pyrimidinyl]-4-piperidinyl}-5-methyl-1,2-oxazole-3-carboxamide	
	1-(3,5-Dimethoxybenzoyl)-N-[5-(2-pyridinyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl]-4-piperidinecarboxamide	

$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	N-{4-[(4-Morpholinylacetyl)amino]phenyl}-3-[3-(4-pyridinyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]propanamide	
	N-{2-[3-(4-Methoxyphenyl)-6-oxo-1(6H)-pyridazinyl]ethyl}-6-(4-morpholinyl)-3-pyridazinecarboxamide	
	Ethyl 4-{[1-(2-methoxyphenyl)-5-(2-pyridinyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]carbonyl}-1-piperazinecarboxylate	
	N-Cyclopentyl-2-{4-[(2,3-dimethoxybenzoyl)amino]phenyl}-2H-tetrazole-5-carboxamide	

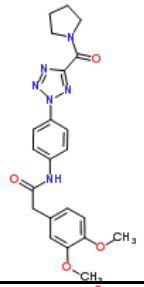
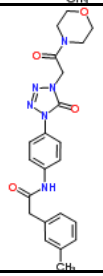
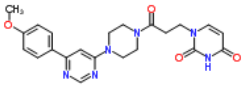
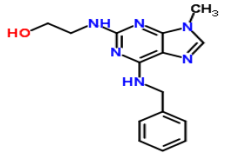
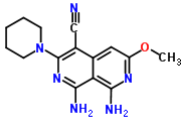
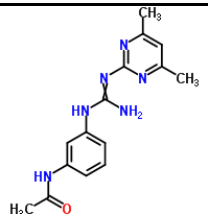
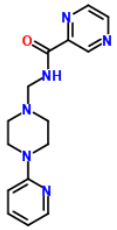
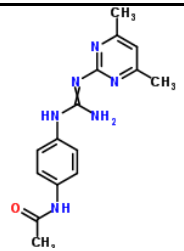
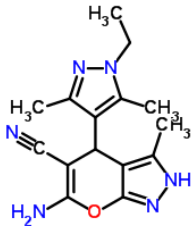
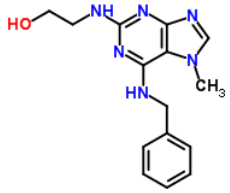
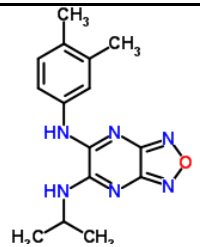
$C_{22}H_{24}N_6O_4$ 437.1937 (Δppm = 1.001)	2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-N-{4-[5-(1-pyrrolidinylcarbonyl)-2H-tetrazol-2-yl]phenyl}acetamide	
	2-(3-Methylphenyl)-N-(4-{4-[2-(4-morpholinyl)-2-oxoethyl]-5-oxo-4,5-dihydro-1H-tetrazol-1-yl}phenyl)acetamide	
	1-(3-{4-[6-(4-Methoxyphenyl)-4-pyrimidinyl]-1-piperazinyl}-3-oxopropyl)-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione	
$C_{24}H_{29}NaO_6$ 437.1937	-	-
$C_{21}H_{33}KO_7$ 437.1937	-	-

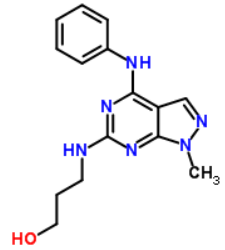
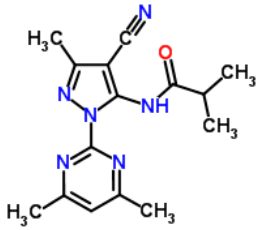
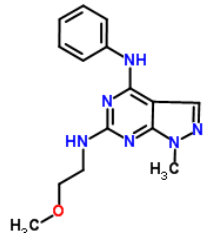
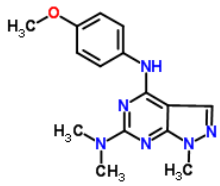
Tabela 5: Possíveis compostos para o pico de número 6, com massa 437.1941 do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica 11 da alga *H. grandifolius.*

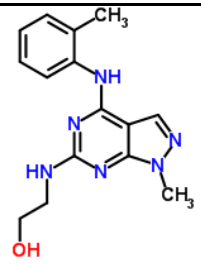
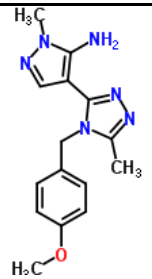
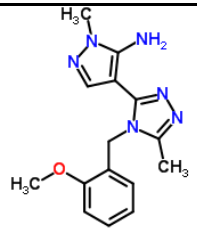
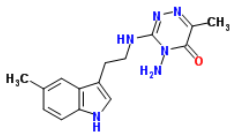
Fórmula e Massa	Composto	Estrutura
$C_{23}H_{20}N_{10}$ **437.1941**	-	-
$C_{25}H_{25}N_4NaO_2$ **437.1941**	-	-
$C_{22}H_{29}KN_4O_3$ **437.1941**	-	-

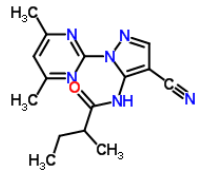
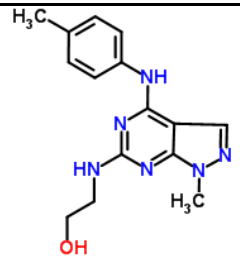
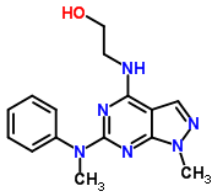
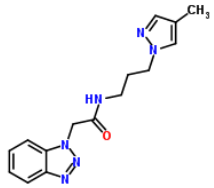
Tabela 6: Possíveis compostos para o pico de número 7, com massa 299.1611 do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica 11 da alga *H. grandifolius.*

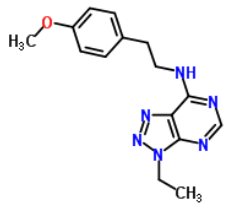
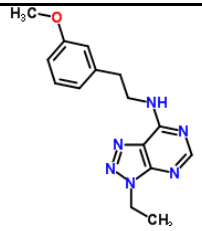
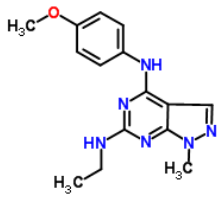
Fórmula e Massa	Composto	Estrutura
	2-{[6-(benzylamino)-9-methyl-9h-purin-2-yl]amino}ethanol	
	1,8-Diamino-6-methoxy-3-(1-piperidinyl)-2,7-naphthyridine-4-carbonitrile	
$C_{15}H_{18}N_6O$ 299.1611 (Δppm = 1.003)	N-{3-[N'-(4,6-Dimethyl-2-pyrimidinyl)carbamimidamido]phenyl}acetamide	
	N-{[4-(2-Pyridinyl)-1-piperazinyl]methyl}-2-pyrazinecarboxamide	

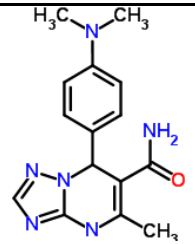
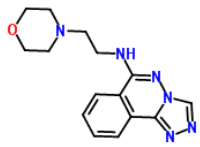
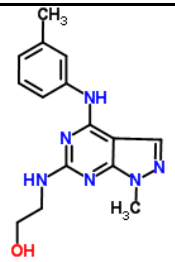
$C_{15}H_{18}N_6O$ 299.1611 (Δppm = 1.003)	N-{4-[N1-(4,6-Dimethyl-2-pyrimidinyl)carbamimidamido]phenyl}acetamide	
	6-amino-4-(1-ethyl-3,5-dimethyl-1H-pyrazol-4-yl)-3-methyl-1,4-dihydropyrano[2,3-c]pyrazole-5-carbonitrile	
	2-{[6-(Benzylamino)-7-methyl-7H-purin-2-yl]amino}ethano	
	N-(3,4-Dimethylphenyl)-N'-isopropyl[1,2,5]oxadiazolo[3,4-b]pyrazine-5,6-diamine	

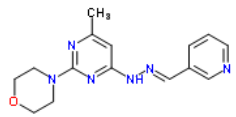
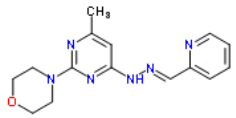
$C_{15}H_{18}N_6O$ 299.1611 (Δppm = 1.003)	3-[(4-Anilino-1-methyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl)amino]-1-propanol	
	N-[4-cyano-2-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)-5-methyl-pyrazol-3-yl]-2-methyl-propanamide	
	N^6-(2-Methoxyethyl)-1-methyl-N^4-phenyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-4,6-diamine	
	N^4-(4-Methoxyphenyl)-N^6,N^6,1-trimethyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-4,6-diamine	

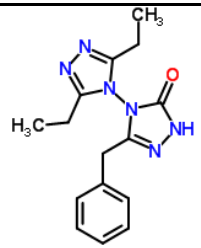
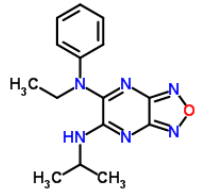
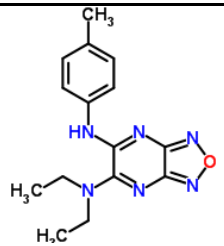
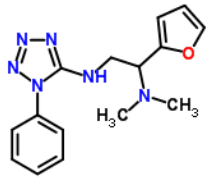
$C_{15}H_{18}N_6O$ 299.1611 (Δppm = 1.003)	2-({1-Methyl-4-[(2-methylphenyl)amino]-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl}amino)ethanol	
	4-[4-(4-methoxybenzyl)-5-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl]-1-methyl-1H-pyrazol-5-amine	
	4-[4-(2-methoxybenzyl)-5-methyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl]-1-methyl-1H-pyrazol-5-amine	
	4-Amino-6-methyl-3-{[2-(5-methyl-1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-1,2,4-triazin-5(4H)-one	

$C_{15}H_{18}N_6O$ 299.1611 (Δppm = 1.003)	N-[4-Cyano-1-(4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl)-1H-pyrazol-5-yl]-2-methylbutanamide	
	2-({1-Methyl-4-[(4-methylphenyl)amino]-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl}amino)ethanol	
	2-({1-Methyl-6-[methyl(phenyl)amino]-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-yl}amino)ethanol	
	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N-[3-(4-methyl-1H-pyrazol-1-yl)propyl]acetamide	

$C_{15}H_{18}N_6O$ **299.1611** **(Δppm = 1.003)**	3-Ethyl-N-[2-(2-methoxyphenyl)ethyl]-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7-amine	
	3-Ethyl-N-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7-amine	
	3-Ethyl-N-[2-(3-methoxyphenyl)ethyl]-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7-amine	
	N^6-Ethyl-N^4-(4-methoxyphenyl)-1-methyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-4,6-diamine	

$C_{15}H_{18}N_6O$ 299.1611 (Δppm = 1.003)	7-[4-(Dimethylamino)phenyl]-5-methyl-1,7-dihydro[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine-6-carboxamide	
	N-[2-(4-Morpholinyl)ethyl][1,2,4]triazolo[3,4-a]phthalazin-6-amine	
	2-({1-Methyl-4-[(3-methylphenyl)amino]-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-6-yl}amino)ethanol	
	9-(1-Ethyl-5-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-5,6,7,9-tetrahydro[1,2,4]triazolo[5,1-b]quinazolin-8(1H)-one	

$C_{15}H_{18}N_6O$ **299.1611** **(Δppm = 1.003)**	6,6-Dimethyl-9-(1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)-5,6,7,9-tetrahydro[1,2,4]triazolo[5,1-b]quinazolin-8(1H)-one	
	1,2-Diamino-N-sec-butyl-1H-pyrrolo[2,3-b]quinoxaline-3-carboxamide	
	4-{4-Methyl-6-[(2E)-2-(3-pyridinylmethylene)hydrazino]-2-pyrimidinyl}morpholine	
	4-{4-Methyl-6-[(2E)-2-(2-pyridinylmethylene)hydrazino]-2-pyrimidinyl}morpholine	

$C_{15}H_{18}N_6O$ **299.1611** **(Δppm = 1.003)**	5-Benzyl-3',5'-diethyl-4,4'-bi-1,2,4-triazol-3(2H)-one	
	N-Ethyl-N'-isopropyl-N-phenyl[1,2,5]oxadiazolo[3,4-b]pyrazine-5,6-diamine	
	N,N-Diethyl-N'-(4-methylphenyl)[1,2,5]oxadiazolo[3,4-b]pyrazine-5,6-diamine	
	1-(2-Furyl)-N^1,N^1-dimethyl-N^2-(1-phenyl-1H-tetrazol-5-yl)-1,2-ethanediamine	

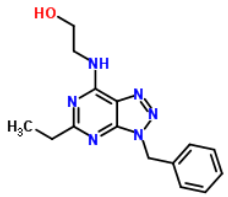
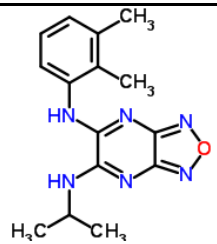
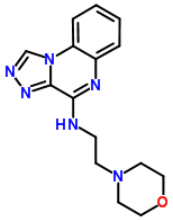
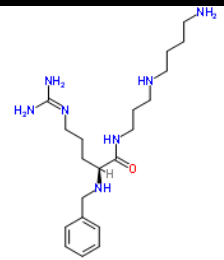
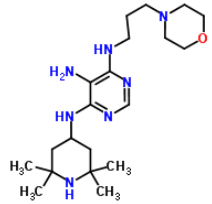
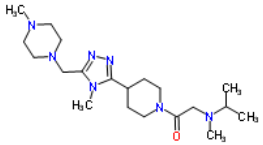
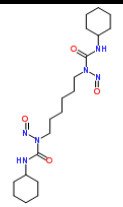
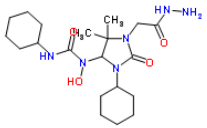
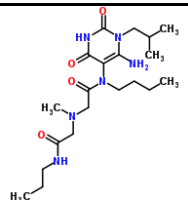
	2-[(3-Benzyl-5-ethyl-3H-[1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7-yl)amino]ethanol	
	N-(2,3-Dimethylphenyl)-N'-isopropyl[1,2,5]oxadiazolo[3,4-b]pyrazine-5,6-diamine	
	N-[2-(4-Morpholinyl)ethyl][1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalin-4-amine	
$C_{17}H_{23}NaO_3$ 299.1611	-	-

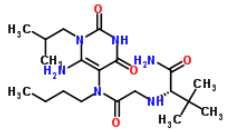
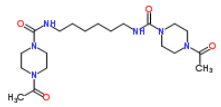
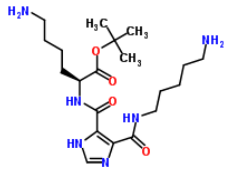
Tabela 7: Possíveis compostos para o pico de número 8, com massa 392.3131 do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica 11 da alga *H. grandifolius.*

Fórmula e Massa	Composto	Estrutura
$C_{20}H_{37}N_7O$ **392.3131** **(Δppm = 1.002)**	N-{3-[(4-Aminobutyl)amino]propyl}-N^2-benzyl-N^5-(diaminomethylene)-L-ornithinamide	
	N^4-[3-(4-Morpholinyl)propyl]-N^6-(2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinyl)-4,5,6-pyrimidinetriamine	
	2-[Isopropyl(methyl)amino]-1-(4-{4-methyl-5-[(4-methyl-1-piperazinyl)methyl]-4H-1,2,4-triazol-3-yl}-1-piperidinyl)ethanone	
$C_{22}H_{42}NNaO_3$ **392.3131**	-	-

$C_{20}H_{42}KN_5$ **392.3131**	-	-

Tabela 8: Possíveis compostos para o pico de número 9 e 10, com massa 425.2868 do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica 11 da alga *H. grandifolius.*

Fórmula e Massa	Composto	Estrutura
	1,1'-(1,6-Hexanediyl)bis(3-cyclohexyl-1-nitrosourea)	
$C_{20}H_{36}N_6O_4$ **425.2868** **(Δppm = 1.001)**	3-Cyclohexyl-1-[3-cyclohexyl-1-(2-hydrazino-2-oxoethyl)-5,5-dimethyl-2-oxo-4-imidazolidinyl]-1-hydroxyurea	
	N-(6-Amino-1-isobutyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-5-pyrimidinyl)-N-butyl-2-{methyl[2-oxo-2-(propylamino)ethyl]amino}acetamide	

	N^2-{2-[(6-Amino-1-isobutyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-5-pyrimidinyl)(butyl)amino]-2-oxoethyl}-3-methyl-L-valinamide	
	N,N'-1,6-Hexanediylbis(4-acetyl-1-piperazinecarboxamide)	
$C_{20}H_{36}N_6O_4$ **425.2868** **(Δppm = 1.001)**	2-Methyl-2-propanyl N^2-({4-[(5-aminopentyl)carbamoyl]-1H-imidazol-5-yl}carbonyl)-L-lysinate	
	1-({(6S,7S)-9-[(2R)-1-Hydroxy-2-propanyl]-7-methyl-10-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13-octahydro-4H-[1,2,3]triazolo[5,1-c][1,4,9]oxadiazacyclododecin-6-yl}methyl)-3-isopropyl-1-methylurea	

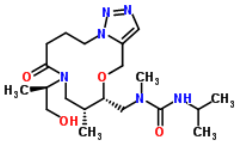
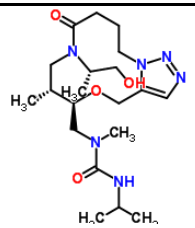
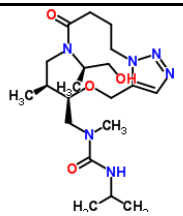
$C_{20}H_{36}N_6O_4$ 425.2868 (Δppm = 1.001)	1-({(6S,7R)-9-[(2R)-1-Hydroxy-2-propanyl]-7-methyl-10-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13-octahydro-4H-[1,2,3]triazolo[5,1-c][1,4,9]oxadiazacyclododecin-6-yl}methyl)-3-isopropyl-1-methylurea	
	1-({(6R,7R)-9-[(2S)-1-Hydroxy-2-propanyl]-7-methyl-10-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13-octahydro-4H-[1,2,3]triazolo[5,1-c][1,4,9]oxadiazacyclododecin-6-yl}methyl)-3-isopropyl-1-methylurea	
	1-({(6R,7S)-9-[(2R)-1-Hydroxy-2-propanyl]-7-methyl-10-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13-octahydro-4H-[1,2,3]triazolo[5,1-c][1,4,9]oxadiazacyclododecin-6-yl}methyl)-3-isopropyl-1-methylurea	
$C_{22}H_{41}NaO_6$ 425.2868	-	-
$C_{16}H_{37}KN_{10}O$ 425.2868	-	-

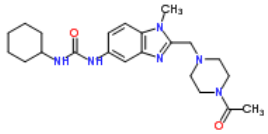
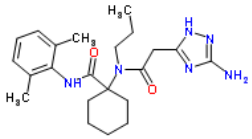
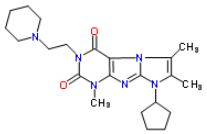
Tabela 9: Possíveis compostos para o pico de número 11, com massa 637.3049 do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica 11 da alga *H. grandifolius.*

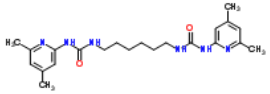
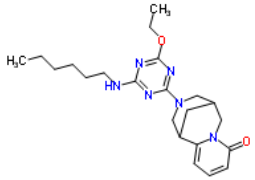
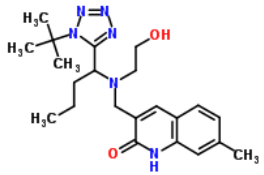
Fórmula e Massa	Composto	Estrutura
$C_{26}H_{40}N_{10}O_9$ **637.3049**	-	-
$C_{26}H_{33}N_{18}NaO$ **637.3049**	-	-
$C_{23}H_{37}KN_{18}O_2$ **637.3049**	-	-

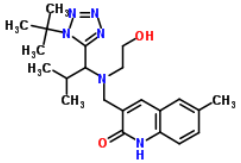
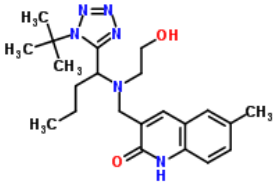
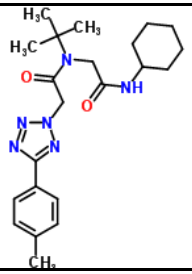
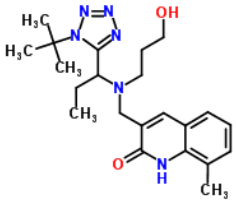
Tabela 10: Possíveis compostos para o pico de número 12, com massa 637.3039 do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica 11 da alga *H. grandifolius.*

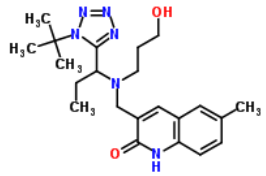
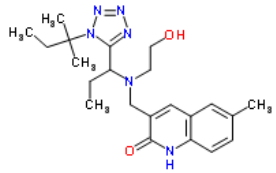
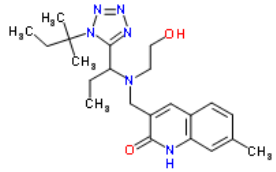
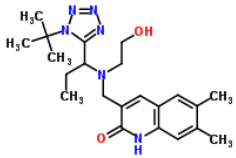
Fórmula e Massa	Composto	Estrutura
$C_{23}H_{32}N_{20}O_3$ 637.3039	-	-
$C_{25}H_{37}N_{14}NaO_5$ 637.3039	-	-
$C_{23}H_{37}KN_{18}O_2$ 637.3049	-	-

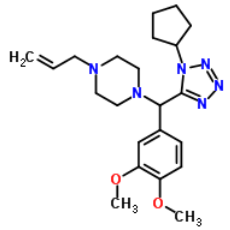
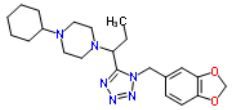
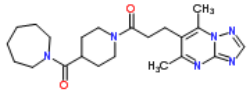
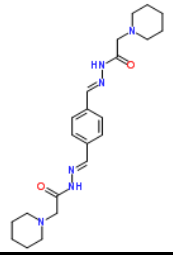
Tabela 11: Possíveis compostos para o pico de número 13, com massa 413.2662 do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica 11 da alga *H. grandifolius.*

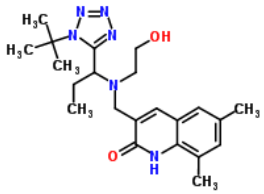
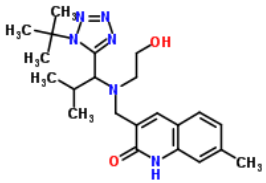
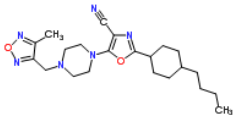
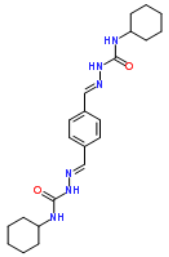
Fórmula e Massa	Composto	Estrutura
$C_{22}H_{32}N_6O_2$ **413.2662** **(Δppm = 1.001)**	1-{2-[(4-Acetyl-1-piperazinyl)methyl]-1-methyl-1H-benzimidazol-5-yl}-3-cyclohexylurea	
	1-{[(5-Amino-1H-1,2,4-triazol-3-yl)acetyl](propyl)amino}-N-(2,6-dimethylphenyl)cyclohexanecarboxamide	
	8-Cyclopentyl-1,6,7-trimethyl-3-[2-(1-piperidinyl)ethyl]-1H-imidazo[2,1-f]purine-2,4(3H,8H)-dione	

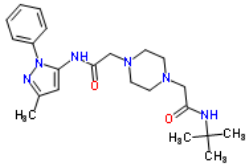
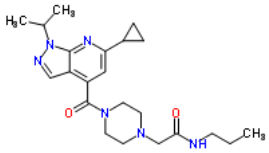
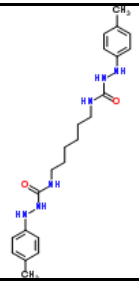
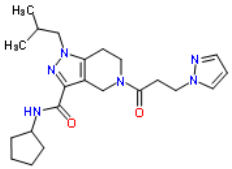
	1,1'-(1,6-Hexanediyl)bis[3-(4,6-dimethyl-2-pyridinyl)urea]	
	8-Cyclohexyl-1,7-dimethyl-3-[2-(1-piperidinyl)ethyl]-1H-imidazo[2,1-f]purine-2,4(3H,8H)-dione	
$C_{22}H_{32}N_6O_2$ 413.2662 (Δppm = 1.001)	11-[4-Ethoxy-6-(hexylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]-7,11-diazatricyclo[7.3.1.0^{2,7}]trideca-2,4-dien-6-one	
	3-{[(2-Hydroxyethyl){1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]butyl}amino]methyl}-7-methyl-2(1H)-quinolinone	

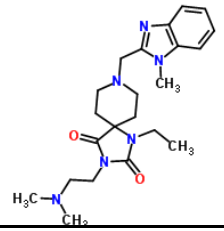
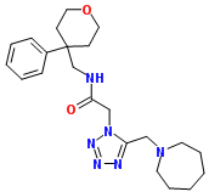
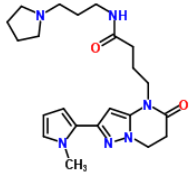
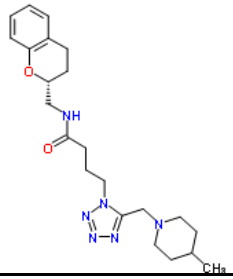
$C_{22}H_{32}N_6O_2$ **413.2662** **(Δppm = 1.001)**	3-{[(2-Hydroxyethyl){2-methyl-1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-6-methyl-2(1H)-quinolinone	
	3-{[(2-Hydroxyethyl){1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]butyl}amino]methyl}-6-methyl-2(1H)-quinolinone	
	N-Cyclohexyl-N^2-{[5-(4-methylphenyl)-2H-tetrazol-2-yl]acetyl}-N^2-(2-methyl-2-propanyl)glycinamide	
	3-{[(3-Hydroxypropyl){1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-8-methyl-2(1H)-quinolinone	

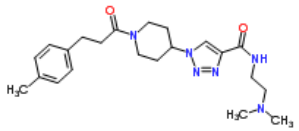
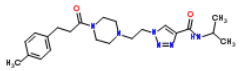
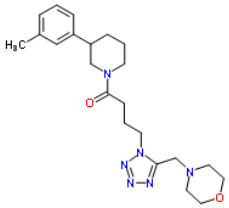
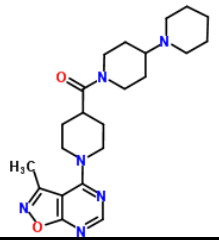
$C_{22}H_{32}N_6O_2$ 413.2662 (Δppm = 1.001)	3-{[(3-Hydroxypropyl){1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-6-methyl-2(1H)-quinolinone	
	3-{[(2-Hydroxyethyl){1-[1-(2-methyl-2-butanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-6-methyl-2(1H)-quinolinone	
	3-{[(2-Hydroxyethyl){1-[1-(2-methyl-2-butanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-7-methyl-2(1H)-quinolinone	
	3-{[(2-Hydroxyethyl){1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-6,7-dimethyl-2(1H)-quinolinone	

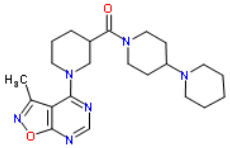
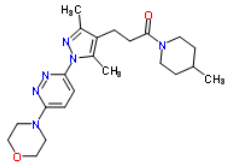
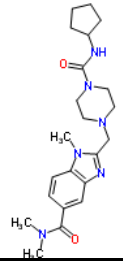
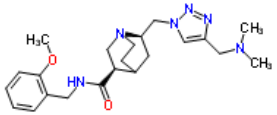
$C_{22}H_{32}N_6O_2$ 413.2662 (Δppm = 1.001)	1-Allyl-4-[(1-cyclopentyl-1H-tetrazol-5-yl)(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]piperazine	
	1-{1-[1-(1,3-Benzodioxol-5-ylmethyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}-4-cyclohexylpiperazine	
	1-[4-(1-Azepanylcarbonyl)-1-piperidinyl]-3-(5,7-dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-6-yl)-1-propanone	
	N',N''-[1,4-Phenylenedi(E)methylylidene]bis[2-(1-piperidinyl)acetohydrazide]	

$C_{22}H_{32}N_6O_2$ 413.2662 (Δppm = 1.001)	3-{[(2-Hydroxyethyl){1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-6,8-dimethyl-2(1H)-quinolinone	
	3-{[(2-Hydroxyethyl){2-methyl-1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-7-methyl-2(1H)-quinolinone	
	2-(4-Butylcyclohexyl)-5-{4-[(4-methyl-1,2,5-oxadiazol-3-yl)methyl]-1-piperazinyl}-1,3-oxazole-4-carbonitrile	
	(2E,2'E)-2,2'-[1,4-Phenylenedi(E)methylylidene]bis(N-cyclohexylhydrazinecarboxamide)	

	2-(4-{2-[(3-Methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-yl)amino]-2-oxoethyl}-1-piperazinyl)-N-(2-methyl-2-propanyl)acetamide	
	2-{4-[(6-Cyclopropyl-1-isopropyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-4-yl)carbonyl]-1-piperazinyl}-N-propylacetamide	
$C_{22}H_{32}N_6O_2$ 413.2662 (Δppm = 1.001)	N,N'-1,6-Hexanediylbis[2-(4-methylphenyl)hydrazinecarboxamide]	
	N-Cyclopentyl-1-isobutyl-5-[3-(1H-pyrazol-1-yl)propanoyl]-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[4,3-c]pyridine-3-carboxamide	

$C_{22}H_{32}N_6O_2$ 413.2662 (Δppm = 1.001)	3-[2-(Dimethylamino)ethyl]-1-ethyl-8-[(1-methyl-1H-benzimidazol-2-yl)methyl]-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione	
	2-[5-(1-Azepanylmethyl)-1H-tetrazol-1-yl]-N-[(4-phenyltetrahydro-2H-pyran-4-yl)methyl]acetamide	
	4-[2-(1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)-5-oxo-6,7-dihydropyrazolo[1,5-a]pyrimidin-4(5H)-yl]-N-[3-(1-pyrrolidinyl)propyl]butanamide	
	N-[(2R)-3,4-Dihydro-2H-chromen-2-ylmethyl]-4-{5-[(4-methyl-1-piperidinyl)methyl]-1H-tetrazol-1-yl}butanamide	

	N-[2-(Dimethylamino)ethyl]-1-{1-[3-(4-methylphenyl)propanoyl]-4-piperidinyl}-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide	
	N-Isopropyl-1-(2-{4-[3-(4-methylphenyl)propanoyl]-1-piperazinyl}ethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide	
$C_{22}H_{32}N_6O_2$ **413.2662** **(Δppm = 1.001)**	1-[3-(3-Methylphenyl)-1-piperidinyl]-4-[5-(4-morpholinylmethyl)-1H-tetrazol-1-yl]-1-butanone	
	1,4'-Bipiperidin-1'-yl[1-(3-methyl[1,2]oxazolo[5,4-d]pyrimidin-4-yl)-4-piperidinyl]methanone	

$C_{22}H_{32}N_6O_2$ **413.2662** **(Δppm = 1.001)**	1,4'-Bipiperidin-1'-yl[1-(3-methyl[1,2]oxazolo[5,4-d]pyrimidin-4-yl)-3-piperidinyl]methanone	
	3-{3,5-Dimethyl-1-[6-(4-morpholinyl)-3-pyridazinyl]-1H-pyrazol-4-yl}-1-(4-methyl-1-piperidinyl)-1-propanone	
	2-{[4-(Cyclopentylcarbamoyl)-1-piperazinyl]methyl}-N,N,1-trimethyl-1H-benzimidazole-5-carboxamide	
	(3R,6R)-6-({4-[(Dimethylamino)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}methyl)-N-(2-methoxybenzyl)quinuclidine-3-carboxamide	

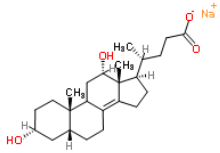
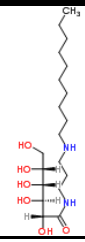
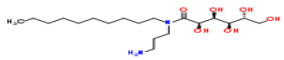
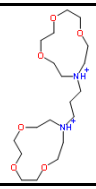
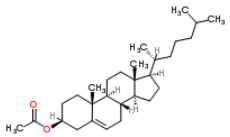
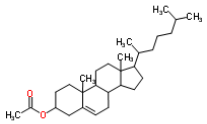
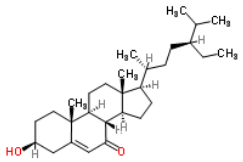
$C_{24}H_{37}NaO_4$ **413.2662**	Sodium apocholate	
$C_{21}H_{41}KO_5$ **413.2662**	-	-

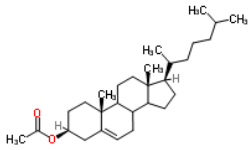
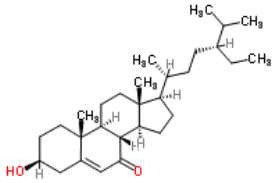
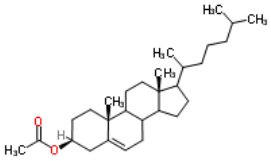
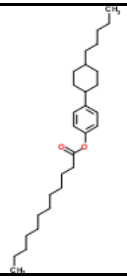
Tabela 12: Possíveis compostos para o pico de número 14, com massa 393.2961 do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica 11 da alga *H. grandifolius.*

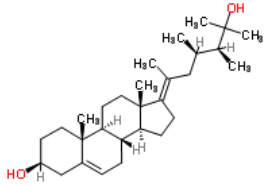
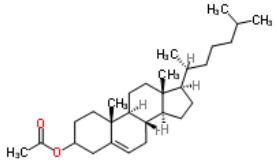
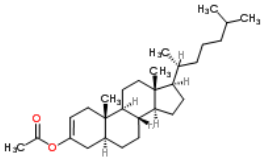
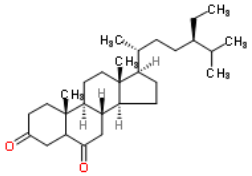
Fórmula e Massa	Composto	Estrutura
$C_{19}H_{40}N_2O_6$ **393.2961** **(Δppm = 1.002)**	N-[3-(decylamino)propyl]-D-gluconamide	
	N-(3-aminopropyl)-N-decyl-D-gluconamide	
	10,10'-(1,3-Propanediyl)bis(1,4,7-trioxa-10-azoniacyclododecane)	

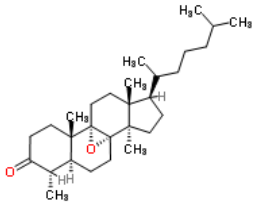
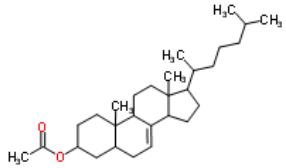
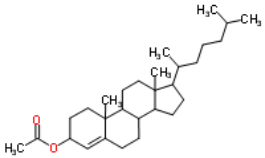
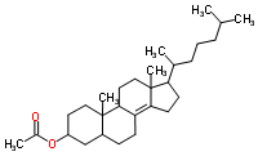
$C_{18}H_{37}N_6NaO_2$ 393.2961	-	-

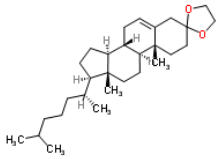
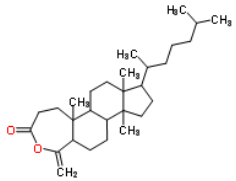
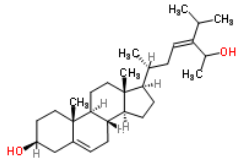
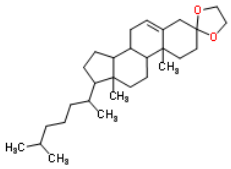
Tabela 13: Possíveis compostos para o pico de número 15, com massa 429.3725 do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica 11 da alga *H. grandifolius.*

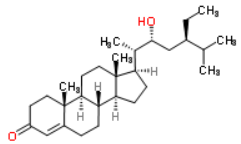
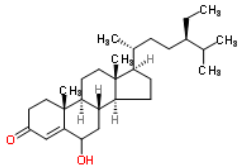
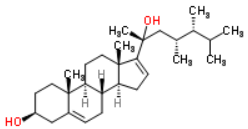
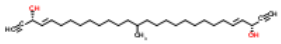
Fórmula e Massa	Composto	Estrutura
$C_{29}H_{48}O_2$ 429.3725 (Δppm = 1.001)	Cholesterin acetate	
	3-Cholesteryl acetate	
	(3β)-3-hydroxystigmast-5-en-7-one	

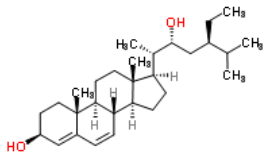
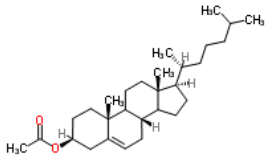
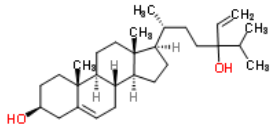
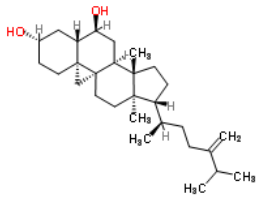
$C_{29}H_{48}O_2$ 429.3725 (Δppm = 1.001)	Cholesteryl acetate	
	(3β,24S)-3-Hydroxystigmast-5-en-7-one	
	5A-Cholesten-3B-ol, acetate	
	4-(4-Pentylcyclohexyl)phenyl laurate	

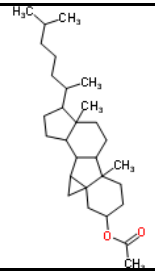
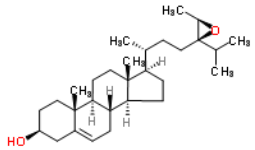
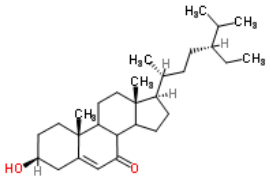
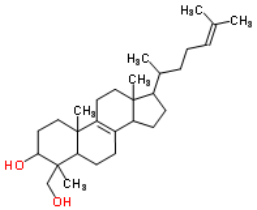
$C_{29}H_{48}O_2$ **429.3725** **(Δppm = 1.001)**	25-Hydroxysarcosterol	
	Cholest-5-en-3-yl acetate	
	(5α)-Cholest-2-en-3-yl acetate	
	Stigmastane-3,6-dione	

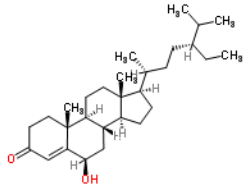
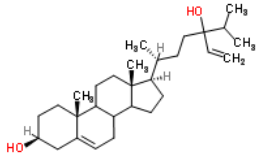
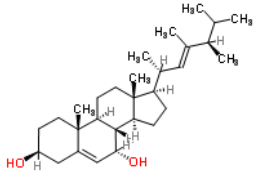
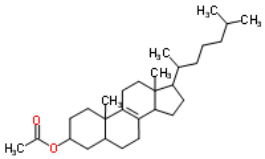
$C_{29}H_{48}O_2$ **429.3725** **(Δppm = 1.001)**	(4α,5α ,8α)-4,14-Dimethyl-8,9-epoxycholestan-3-one	
	Cholest-7-en-3-ol acetate	
	Cholest-4-en-3-yl acetate	
	Cholest-8(14)-en-3-yl acetate	

$C_{29}H_{48}O_2$ **429.3725** **(Δppm = 1.001)**	(8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-Dimethyl-17-[(2R)-6-methylheptan-2-yl]-1,2,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydrospiro[cyclopenta[a]phenanthrene-3,2'-[1,3]dioxolane]	
	5a,7a,10a-Trimethyl-1-methylene-8-(6-methyl-2-heptanyl)hexadecahydro-3H-cyclopenta[5,6]naphtho[2,1-c]oxepin-3-one	
	3,28-dihyfroxy-24ethylcholesta-5,23-dien	
	10,13-Dimethyl-17-(6-methyl-2-heptanyl)-1,2,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydrospiro[cyclopenta[a]phenanthrene-3,2'-[1,3]dioxolane]	

$C_{29}H_{48}O_2$ 429.3725 (Δppm = 1.001)	(22R)-22-Hydroxystigmast-4-en-3-one	
	6-Hydroxystigmast-4-en-3-one	
	(3β,20R,23R)-23-Methylergosta-5,16-diene-3,20-diol	
	(3R,4E,24E,26R)-14-Methyl-4,24-octacosadiene-1,27-diyne-3,26-diol	

$C_{29}H_{48}O_2$ 429.3725 (Δppm = 1.001)	Stigmasta-4,6-diene-3,22-diol, (3β,22R)-	
	(3β,9ξ,14ξ)-Cholest-5-en-3-yl acetate	
	(3β,24ξ)-stigmasta-5,28-diene-3,24-diol	
	Roxburghiadiol B	

$C_{29}H_{48}O_2$ 429.3725 (Δppm = 1.001)	5,7-Cyclocholestan-3-yl acetate	
	(24R,28R)-Fucosterol epoxide	
	3§-hydroxy-24S-ethylcholest-5-en-7-one	
	4-(Hydroxymethyl)-4-methylcholesta-8,24-dien-3-ol	

	(6β)-6-Hydroxystigmast-4-en-3-one	
	5,28-stigmastadien-3§,24-diol	
$C_{29}H_{48}O_2$ 429.3725 (Δppm = 1.001)	(3β,7α,22E)-23-Methylergosta-5,22-diene-3,7-diol	
	Cholest-8-en-3-yl acetate	

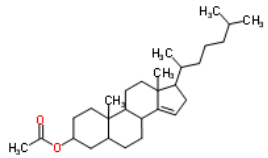
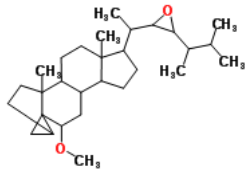
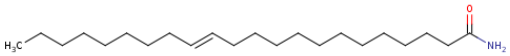
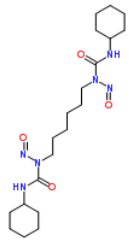
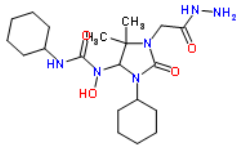
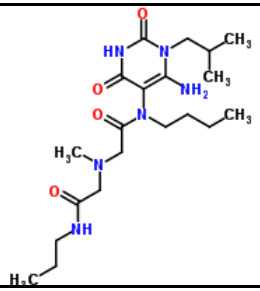
$C_{29}H_{48}O_2$ **429.3725** **(Δppm = 1.001)**	Cholest-14-en-3-yl acetate	
	6-(1-[3-(1,2-Dimethylpropyl)-2-oxiranyl]ethyl)-3a,5a-dimethylhexadecahydrocyclopenta[a]cyclopropa[2,3]cyclopenta[1,2-f]naphthalen-10-yl methyl ether	

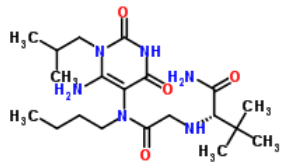
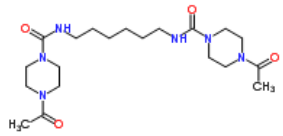
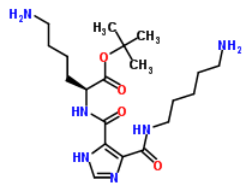
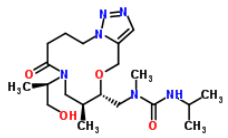
Tabela 14: Possíveis compostos para o pico de número 16, com massa 338.3423 do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica 11 da alga *H. grandifolius.*

Fórmula e Massa	Composto	Estrutura
$C_{22}H_{43}NO$ **338.3423** **(Δppm = 1.002)**	13E-Docosenamide	

9.3. Apêndice C: Tabelas de possíveis compostos para a subfração HSG12 do extrato hexânico da alga *H. grandifolius.*

Tabela 1: Possíveis compostos para o pico de número 13, com massa 425.2863 e fórmula $C_{20}H_{36}N_6O_4$ do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica da alga *H. grandifolius.*

Pico	Composto	Estrutura
$C_{20}H_{36}N_6O_4$ 425.2863 (Δppm = 1.001)	1,1'-(1,6-Hexanediyl)bis(3-cyclohexyl-1-nitrosourea)	
	3-Cyclohexyl-1-[3-cyclohexyl-1-(2-hydrazino-2-oxoethyl)-5,5-dimethyl-2-oxo-4-imidazolidinyl]-1-hydroxyurea	
	N-(6-Amino-1-isobutyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-5-pyrimidinyl)-N-butyl-2-{methyl[2-oxo-2-(propylamino)ethyl]amino}acetamide	

	N^2-{2-[(6-Amino-1-isobutyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-5-pyrimidinyl)(butyl)amino]-2-oxoethyl}-3-methyl-L-valinamide	
	N,N'-1,6-Hexanediylbis(4-acetyl-1-piperazinecarboxamide)	
$C_{20}H_{36}N_6O_4$ **425.2863** **(Δppm = 1.001)**	2-Methyl-2-propanyl N^2-({4-[(5-aminopentyl)carbamoyl]-1H-imidazol-5-yl}carbonyl)-L-lysinate	
	1-({(6S,7S)-9-[(2R)-1-Hydroxy-2-propanyl]-7-methyl-10-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13-octahydro-4H-[1,2,3]triazolo[5,1-c][1,4,9]oxadiazacyclododecin-6-yl}methyl)-3-isopropyl-1-methylurea	

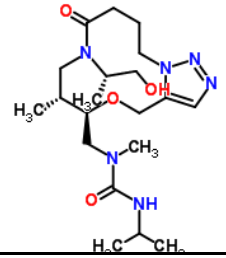
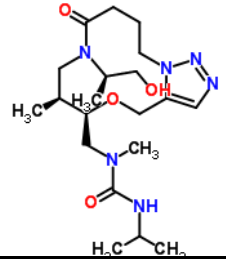
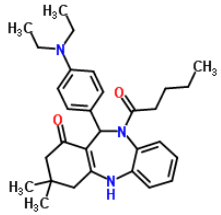
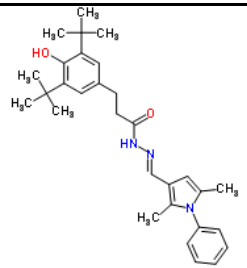
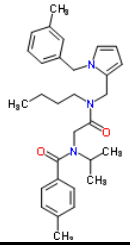
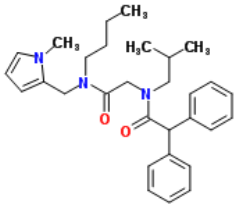
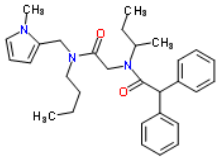
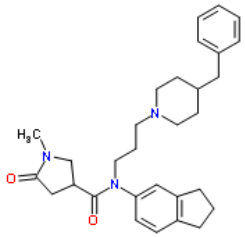
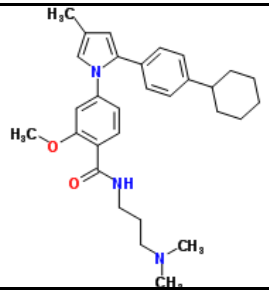
$C_{20}H_{36}N_6O_4$ **425.2863** **(Δppm = 1.001)**	1-({(6S,7R)-9-[(2R)-1-Hydroxy-2-propanyl]-7-methyl-10-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13-octahydro-4H-[1,2,3]triazolo[5,1-c][1,4,9]oxadiazacyclododecin-6-yl}methyl)-3-isopropyl-1-methylurea	
	1-({(6R,7R)-9-[(2S)-1-Hydroxy-2-propanyl]-7-methyl-10-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13-octahydro-4H-[1,2,3]triazolo[5,1-c][1,4,9]oxadiazacyclododecin-6-yl}methyl)-3-isopropyl-1-methylurea	
	1-({(6R,7S)-9-[(2R)-1-Hydroxy-2-propanyl]-7-methyl-10-oxo-6,7,8,9,10,11,12,13-octahydro-4H-[1,2,3]triazolo[5,1-c][1,4,9]oxadiazacyclododecin-6-yl}methyl)-3-isopropyl-1-methylurea	

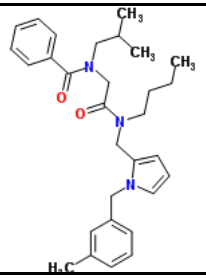
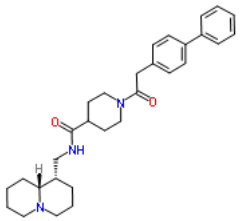
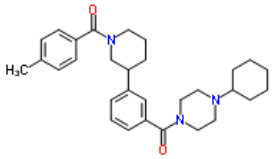
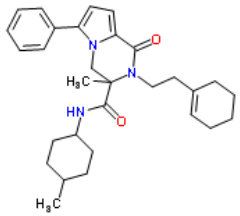
Tabela 2: Possíveis compostos para o pico de número 14 e 16, com massa 637.3044 e fórmula $C_{23}H_{32}N_{20}O_3$ do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica da alga *H. grandifolius.*

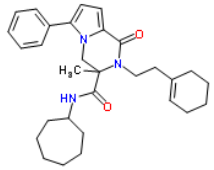
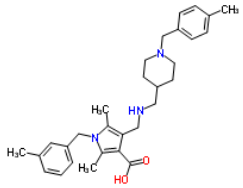
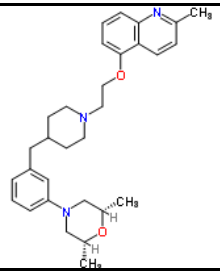
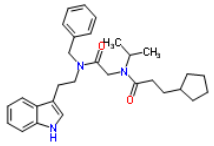
Pico	Composto	Estrutura
$C_{23}H_{32}N_{20}O_3$ 637.3044	-	-

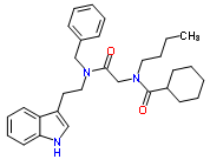
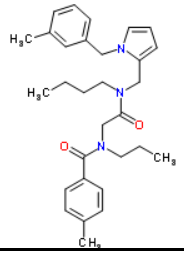
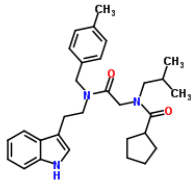
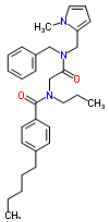
Tabela 3: Possíveis compostos para o pico de número 17, com massa 474.3134 e fórmula $C_{30}H_{40}N_3O_2$ do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica da alga *H. grandifolius.*

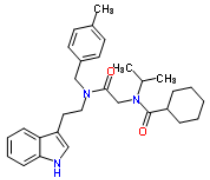
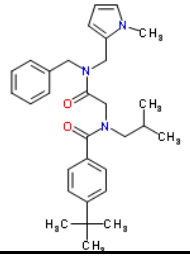
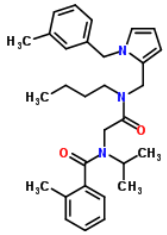
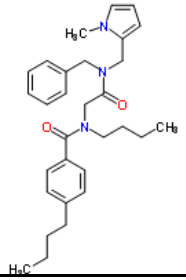
Pico	Composto	Estrutura
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	11-[4-(diethylamino)phenyl]-3,3-dimethyl-10-pentanoyl-2,3,4,5,10,11-hexahydro-1H-dibenzo[b,e][1,4]diazepin-1-one	
	N'-[(E)-(2,5-Dimethyl-1-phenyl-1H-pyrrol-3-yl)methylene]-3-[4-hydroxy-3,5-bis(2-methyl-2-propanyl)phenyl]propanehydrazide	
	N-[2-(Butyl{[1-(3-methylbenzyl)-1H-pyrrol-2-yl]methyl}amino)-2-oxoethyl]-N-isopropyl-4-methylbenzamide	

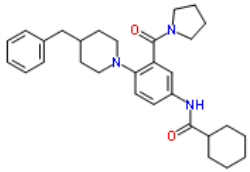
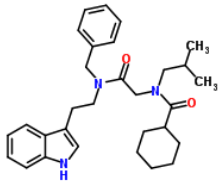
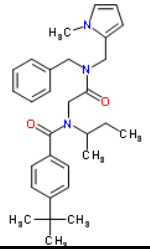
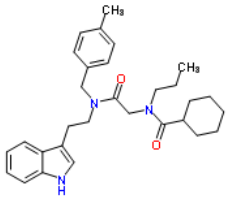
	N-Butyl-N^2-(diphenylacetyl)-N^2-isobutyl-N-[(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)methyl]glycinamide	
	N-Butyl-N^2-sec-butyl-N^2-(diphenylacetyl)-N-[(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)methyl]glycinamide	
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	N-[3-(4-Benzylpiperidin-1-yl)propyl]-N-(2,3-dihydro-1H-inden-5-yl)-1-methyl-5-oxopyrrolidine-3-carboxamide	
	4-[2-(4-Cyclohexylphenyl)-4-methyl-1H-pyrrol-1-yl]-N-[3-(dimethylamino)propyl]-2-methoxybenzamide	

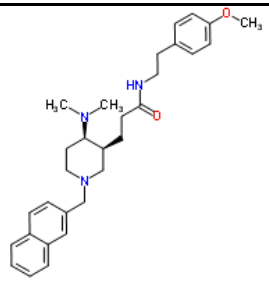
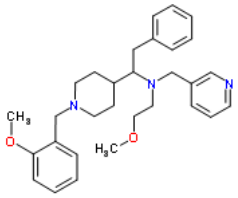
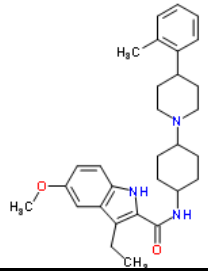
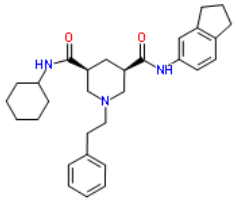
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	N-[2-(Butyl{[1-(3-methylbenzyl)-1H-pyrrol-2-yl]methyl}amino)-2-oxoethyl]-N-isobutylbenzamide	
	1-(4-Biphenylylacetyl)-N-[(1S,9aR)-octahydro-2H-quinolizin-1-ylmethyl]-4-piperidinecarboxamide	
	(4-Cyclohexyl-1-piperazinyl){3-[1-(4-methylbenzoyl)-3-piperidinyl]phenyl}methanone	
	2-[2-(1-Cyclohexen-1-yl)ethyl]-3-methyl-N-(4-methylcyclohexyl)-1-oxo-6-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-3-carboxamide	

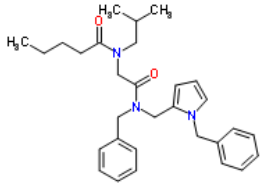
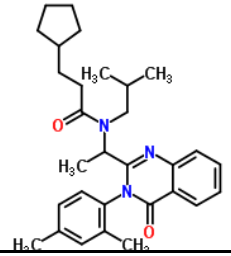
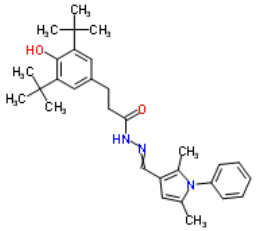
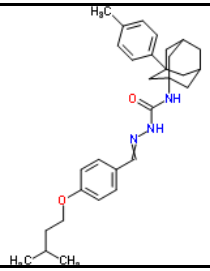
	N-Cycloheptyl-2-[2-(1-cyclohexen-1-yl)ethyl]-3-methyl-1-oxo-6-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-3-carboxamide	
	2,5-Dimethyl-1-(3-methylbenzyl)-4-[({[1-(4-methylbenzyl)-4-piperidinyl]methyl}amino)methyl]-1H-pyrrole-3-carboxylic acid	
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	5-[2-(4-{3-[(2R,6S)-2,6-Dimethyl-4-morpholinyl]benzyl}-1-piperidinyl)ethoxy]-2-methylquinoline	
	N-(2-{Benzyl[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-3-cyclopentyl-N-isopropylpropanamide	

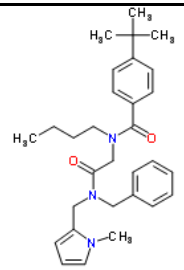
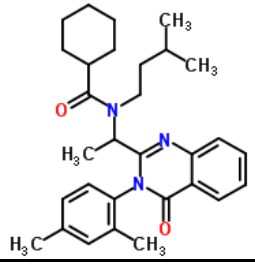
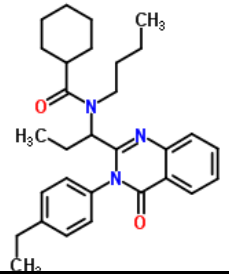
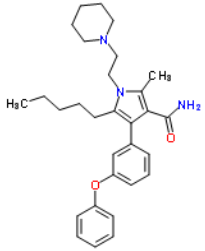
	N-(2-{Benzyl[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-N-butylcyclohexanecarboxamide	
	N-[2-(Butyl{[1-(3-methylbenzyl)-1H-pyrrol-2-yl]methyl}amino)-2-oxoethyl]-4-methyl-N-propylbenzamide	
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	N-(2-{[2-(1H-Indol-3-yl)ethyl](4-methylbenzyl)amino}-2-oxoethyl)-N-isobutylcyclopentanecarboxamide	
	N-(2-{Benzyl[(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)methyl]amino}-2-oxoethyl)-4-pentyl-N-propylbenzamide	

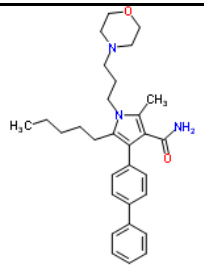
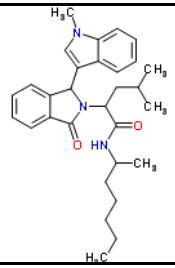
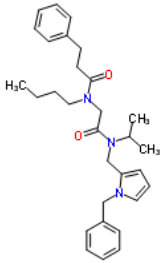
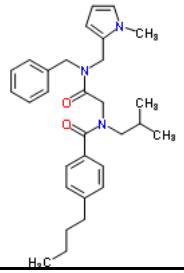
	N-(2-{[2-(1H-Indol-3-yl)ethyl](4-methylbenzyl)amino}-2-oxoethyl)-N-isopropylcyclohexanecarboxamide	
	N-(2-{Benzyl[(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)methyl]amino}-2-oxoethyl)-N-isobutyl-4-(2-methyl-2-propanyl)benzamide	
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	N-[2-(Butyl{[1-(3-methylbenzyl)-1H-pyrrol-2-yl]methyl}amino)-2-oxoethyl]-N-isopropyl-2-methylbenzamide	
	N-(2-{Benzyl[(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)methyl]amino}-2-oxoethyl)-N,4-dibutylbenzamide	

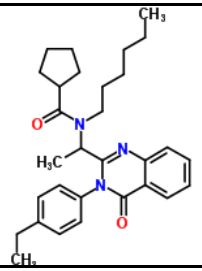
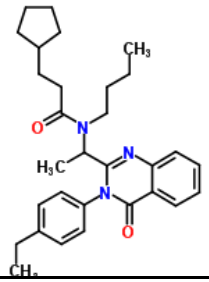
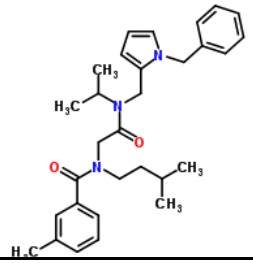
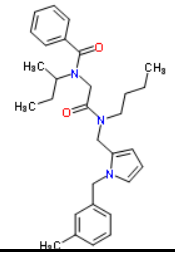
	N-[4-(4-Benzyl-1-piperidinyl)-3-(1-pyrrolidinylcarbonyl)phenyl]cyclohexanecarboxamide	
	N-(2-{Benzyl[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-N-isobutylcyclohexanecarboxamide	
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	N-[2-[benzyl-[(1-methylpyrrol-2-yl)methyl]amino]-2-oxo-ethyl]-4-tert-butyl-N-sec-butyl-benzamide	
	N-(2-{[2-(1H-Indol-3-yl)ethyl](4-methylbenzyl)amino}-2-oxoethyl)-N-propylcyclohexanecarboxamide	

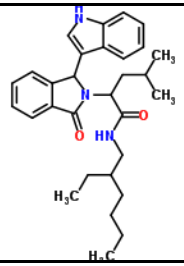
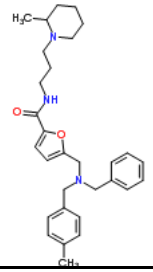
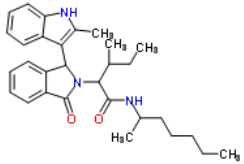
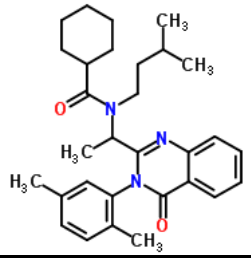
	3-[(3S,4R)-4-(Dimethylamino)-1-(2-naphthylmethyl)-3-piperidinyl]-N-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]propanamide	
	1-[1-(2-Methoxybenzyl)-4-piperidinyl]-N-(2-methoxyethyl)-2-phenyl-N-(3-pyridinylmethyl)ethanamine	
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	3-Ethyl-5-methoxy-N-{4-[4-(2-methylphenyl)-1-piperidinyl]cyclohexyl}-1H-indole-2-carboxamide	
	(3S,5R)-N-Cyclohexyl-N'-(2,3-dihydro-1H-inden-5-yl)-1-(2-phenylethyl)-3,5-piperidinedicarboxamide	

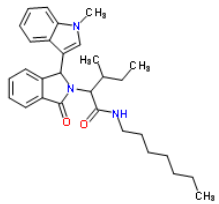
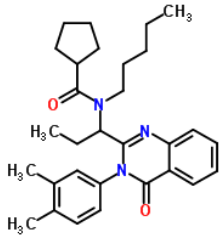
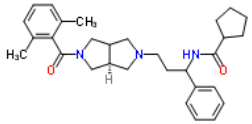
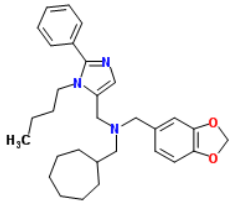
	N-(2-{Benzyl[(1-benzyl-1H-pyrrol-2-yl)methyl]amino}-2-oxoethyl)-N-isobutylpentanamide	
	3-Cyclopentyl-N-{1-[3-(2,4-dimethylphenyl)-4-oxo-3,4-dihydro-2-quinazolinyl]ethyl}-N-isobutylpropanamide	
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	N'-[(2,5-Dimethyl-1-phenyl-1H-pyrrol-3-yl)methylene]-3-[4-hydroxy-3,5-bis(2-methyl-2-propanyl)phenyl]propanehydrazide	
	2-[4-(3-Methylbutoxy)benzylidene]-N-[3-(4-methylphenyl)adamantan-1-yl]hydrazinecarboxamide	

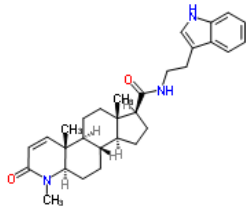
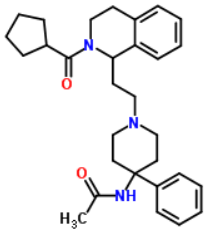
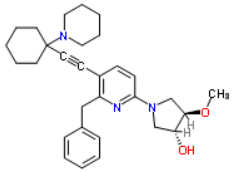
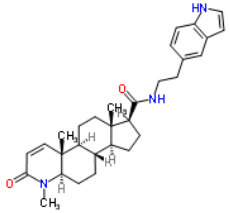
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	N-(2-{Benzyl[(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)methyl]amino}-2-oxoethyl)-N-butyl-4-(2-methyl-2-propanyl)benzamide	
	N-{1-[3-(2,4-Dimethylphenyl)-4-oxo-3,4-dihydro-2-quinazolinyl]ethyl}-N-(3-methylbutyl)cyclohexanecarboxamide	
	N-Butyl-N-{1-[3-(4-ethylphenyl)-4-oxo-3,4-dihydro-2-quinazolinyl]propyl}cyclohexanecarboxamide	
	2-Methyl-5-pentyl-4-(3-phenoxyphenyl)-1-[2-(1-piperidinyl)ethyl]-1H-pyrrole-3-carboxamide	

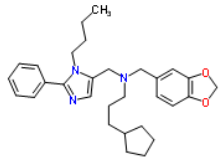
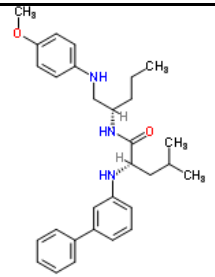
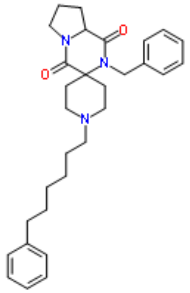
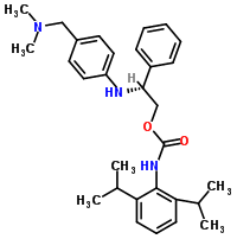
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	4-(4-Biphenylyl)-2-methyl-1-[3-(4-morpholinyl)propyl]-5-pentyl-1H-pyrrole-3-carboxamide	
	N-(2-Heptanyl)-4-methyl-2-[1-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-3-oxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl]pentanamide	
	N-(2-{[(1-Benzyl-1H-pyrrol-2-yl)methyl](isopropyl)amino}-2-oxoethyl)-N-butyl-3-phenylpropanamide	
	N-(2-{Benzyl[(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)methyl]amino}-2-oxoethyl)-4-butyl-N-isobutylbenzamide	

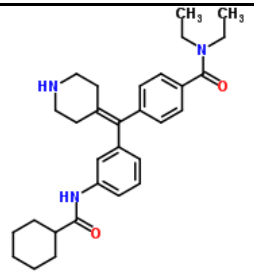
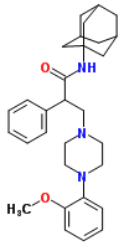
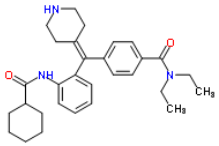
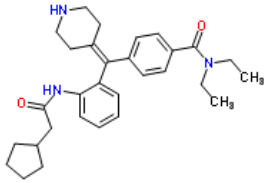
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	N-{1-[3-(4-Ethylphenyl)-4-oxo-3,4-dihydro-2-quinazolinyl]ethyl}-N-hexylcyclopentanecarboxamide	
	N-Butyl-3-cyclopentyl-N-{1-[3-(4-ethylphenyl)-4-oxo-3,4-dihydro-2-quinazolinyl]ethyl}propanamide	
	N-(2-{[(1-Benzyl-1H-pyrrol-2-yl)methyl](isopropyl)amino}-2-oxoethyl)-3-methyl-N-(3-methylbutyl)benzamide	
	N-sec-Butyl-N-[2-(butyl{[1-(3-methylbenzyl)-1H-pyrrol-2-yl]methyl}amino)-2-oxoethyl]benzamide	

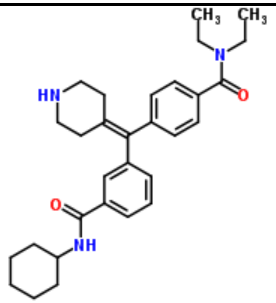
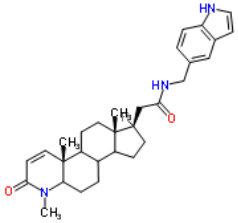
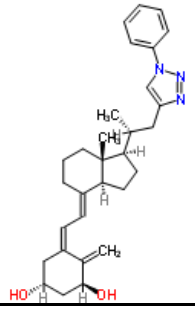
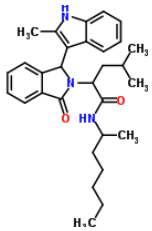
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	N-(2-Ethylhexyl)-2-[1-(1H-indol-3-yl)-3-oxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl]-4-methylpentanamide	
	5-{[Benzyl(4-methylbenzyl)amino]methyl}-N-[3-(2-methyl-1-piperidinyl)propyl]-2-furamide	
	N-(2-Heptanyl)-3-methyl-2-[1-(2-methyl-1H-indol-3-yl)-3-oxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl]pentanamide	
	N-{1-[3-(2,5-Dimethylphenyl)-4-oxo-3,4-dihydro-2-quinazolinyl]ethyl}-N-(3-methylbutyl)cyclohexanecarboxamide	

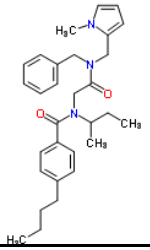
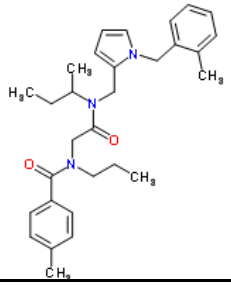
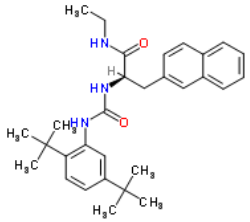
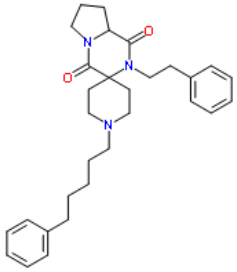
	N-Heptyl-3-methyl-2-[1-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-3-oxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl]pentanamide	
	N-{1-[3-(3,4-Dimethylphenyl)-4-oxo-3,4-dihydro-2-quinazolinyl]propyl}-N-pentylcyclopentanecarboxamide	
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	N-{3-[(3aS)-5-(2,6-Dimethylbenzoyl)hexahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl]-1-phenylpropyl}cyclopentanecarboxamide	
	1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-N-[(1-butyl-2-phenyl-1H-imidazol-5-yl)methyl]-N-(cycloheptylmethyl)methanamine	

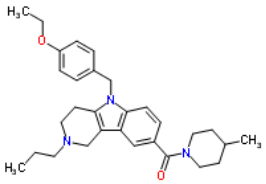
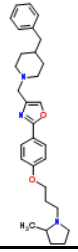
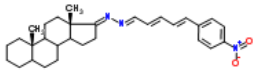
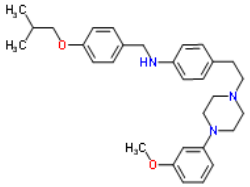
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	(4aR,4bS,6aS,7S,9aS,9bS,11aR)-N-[2-(1H-Indol-3-yl)ethyl]-1,4a,6a-trimethyl-2-oxo-2,4a,4b,5,6,6a,7,8,9,9a,9b,10,11,11a-tetradecahydro-1H-indeno[5,4-f]quinoline-7-carboxamide	
	N-(1-{2-[2-(Cyclopentylcarbonyl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-isoquinolinyl]ethyl}-4-phenyl-4-piperidinyl)acetamide	
	(3R,4R)-1-(6-Benzyl-5-{[1-(1-piperidinyl)cyclohexyl]ethynyl}-2-pyridinyl)-4-methoxy-3-pyrrolidinol	
	(4aR,4bS,6aS,7S,9aS,9bS,11aR)-N-[2-(1H-Indol-5-yl)ethyl]-1,4a,6a-trimethyl-2-oxo-2,4a,4b,5,6,6a,7,8,9,9a,9b,10,11,11a-tetradecahydro-1H-indeno[5,4-f]quinoline-7-carboxamide	

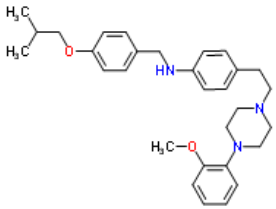
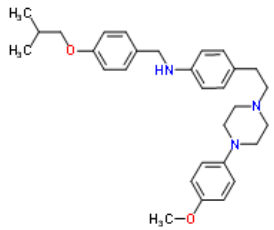
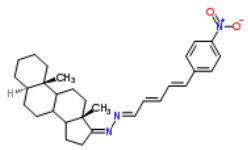
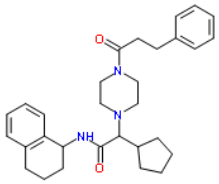
	N-(1,3-Benzodioxol-5-ylmethyl)-N-[(1-butyl-2-phenyl-1H-imidazol-5-yl)methyl]-3-cyclopentyl-1-propanamine	
	N^2-3-Biphenylyl-N-{(2S)-1-[(4-methoxyphenyl)amino]-2-pentanyl}-L-leucinamide	
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	2'-Benzyl-1-(6-phenylhexyl)tetrahydrospiro[piperidine-4,3'-pyrrolo[1,2-a]pyrazine]-1',4'(2'H)-dione	
	(2R)-2-({4-[(Dimethylamino)methyl]phenyl}amino)-2-phenylethyl (2,6-diisopropylphenyl)carbamate	

	4-[{3-[(Cyclohexylcarbonyl)amino]phenyl}(4-piperidinylidene)methyl]-N,N-diethylbenzamide	
	N-(Adamantan-1-yl)-3-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]-2-phenylpropanamide	
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	4-[{2-[(Cyclohexylcarbonyl)amino]phenyl}(4-piperidinylidene)methyl]-N,N-diethylbenzamide	
	4-[{2-[(Cyclopentylacetyl)amino]phenyl}(4-piperidinylidene)methyl]-N,N-diethylbenzamide	

	4-{[3-(Cyclohexylcarbamoyl)phenyl](4-piperidinylidene)methyl}-N,N-diethylbenzamide	
	N-(1H-Indol-5-ylmethyl)-2-[(4aR,6aR,7R)-1,4a,6a-trimethyl-2-oxo-2,4a,4b,5,6,6a,7,8,9,9a,9b,10,11,11a-tetradecahydro-1H-indeno[5,4-f]quinolin-7-yl]acetamide	
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	(1R,3S,5Z)-4-Methylene-5-[(2E)-2-{(1R,3aS,7aR)-7a-methyl-1-[(2R)-1-(1-phenyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2-propanyl]octahydro-4H-inden-4-ylidene}ethylidene]-1,3-cyclohexanediol	
	N-(2-Heptanyl)-4-methyl-2-[1-(2-methyl-1H-indol-3-yl)-3-oxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl]pentanamide	

$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	N-(2-{Benzyl[(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)methyl]amino}-2-oxoethyl)-4-butyl-N-sec-butylbenzamide	
	N-[2-(sec-Butyl{[1-(2-methylbenzyl)-1H-pyrrol-2-yl]methyl}amino)-2-oxoethyl]-4-methyl-N-propylbenzamide	
	N^2-{[2,5-Bis(2-methyl-2-propanyl)phenyl]carbamoyl}-N-ethyl-3-(2-naphthyl)-D-alaninamide	
	2'-(2-Phenylethyl)-1-(5-phenylpentyl)tetrahydrospiro[piperidine-4,3'-pyrrolo[1,2-a]pyrazine]-1',4'(2'H)-dione	

$C_{30}H_{49}N_3O_2$ 474.3134 (Δppm = 0.980)	[5-(4-Ethoxybenzyl)-2-propyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-pyrido[4,3-b]indol-8-yl](4-methyl-1-piperidinyl)methanone	
	4-Benzyl-1-[(2-{4-[3-(2-methyl-1-pyrrolidinyl)propoxy]phenyl}-1,3-oxazol-4-yl)methyl]piperidine	
	(8ξ,9ξ,14ξ,17E)-17-{(2E)-[(2E,4E)-5-(4-Nitrophenyl)-2,4-pentadien-1-ylidene]hydrazono}androstane	
	N-(4-Isobutoxybenzyl)-4-{2-[4-(3-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl}aniline	

$C_{30}H_{49}N_3O_2$ **474.3134** **(Δppm = 0.980)**	N-(4-Isobutoxybenzyl)-4-{2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl}aniline	
	N-(4-Isobutoxybenzyl)-4-{2-[4-(4-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl}aniline	
	(5α,8ξ,9ξ,14ξ,17Z)-17-{(2E)-[(2E,4E)-5-(4-Nitrophenyl)-2,4-pentadien-1-ylidene]hydrazono}androstane	
	2-Cyclopentyl-2-[4-(3-phenylpropanoyl)-1-piperazinyl]-N-(1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl)acetamide	

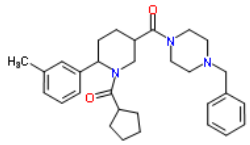
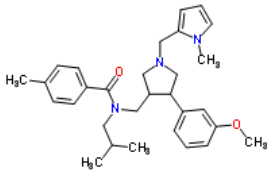
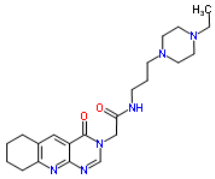
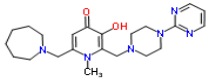
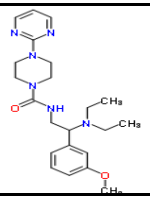
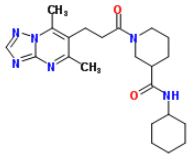
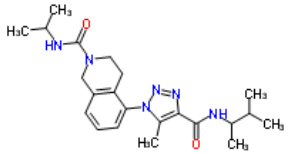
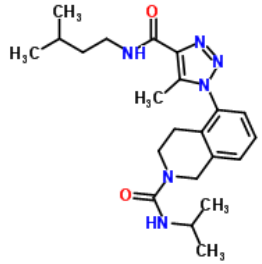
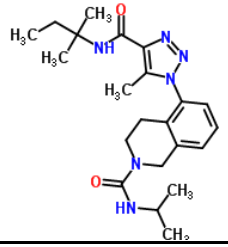
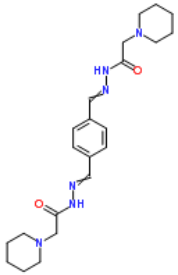
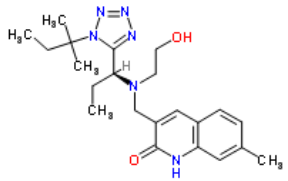
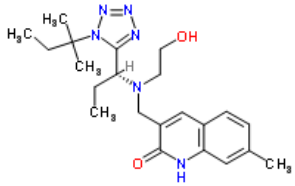
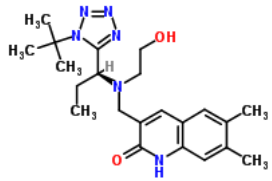
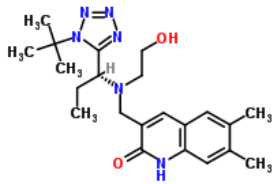
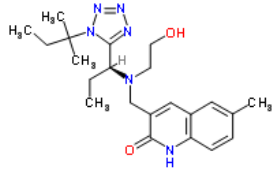
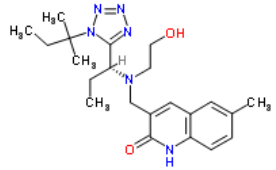
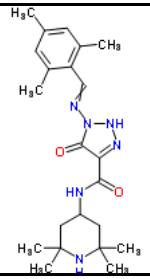
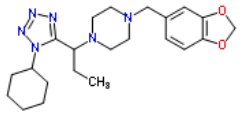
	(4-Benzyl-1-piperazinyl)[1-(cyclopentylcarbonyl)-6-(3-methylphenyl)-3-piperidinyl]methanone	
$C_{30}H_{49}N_3O_2$ **474.3134** **(Δppm = 0.980)**	N-Isobutyl-N-({4-(3-methoxyphenyl)-1-[(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)methyl]-3-pyrrolidinyl}methyl)-4-methylbenzamide	

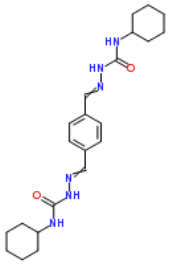
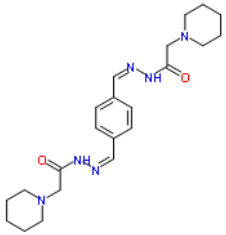
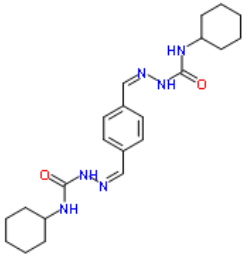
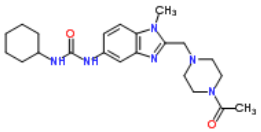
Tabela 4: Possíveis compostos para o pico de número 18 e 19, com massa 413.2667 e fórmula $C_{22}H_{32}N_6O_2$ do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica da alga *H. grandifolius.*

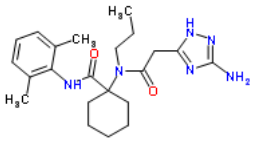
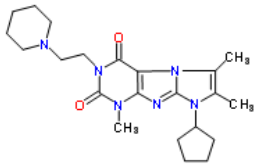
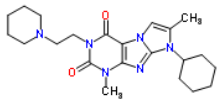
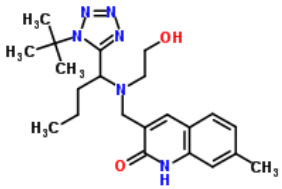
Pico	Composto	Estrutura
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	N-[3-(4-Ethyl-1-piperazinyl)propyl]-2-(4-oxo-6,7,8,9-tetrahydropyrimido[4,5-b]quinolin-3(4H)-yl)acetamide	
	6-(1-Azepanylmethyl)-3-hydroxy-1-methyl-2-{[4-(2-pyrimidinyl)-1-piperazinyl]methyl}-4(1H)-pyridinone	
	N-[2-(Diethylamino)-2-(3-methoxyphenyl)ethyl]-4-(2-pyrimidinyl)-1-piperazinecarboxamide	
	N-Cyclohexyl-1-[3-(5,7-dimethyl[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-6-yl)propanoyl]-3-piperidinecarboxamide	

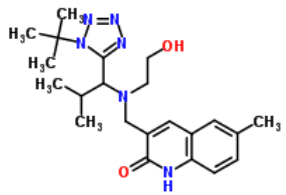
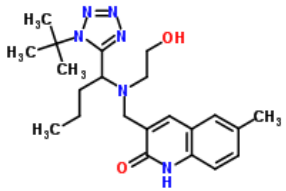
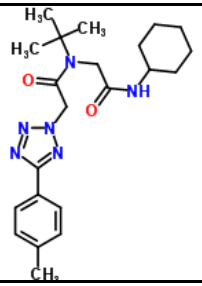
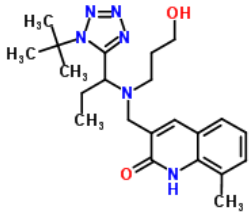
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	N-Isopropyl-5-{5-methyl-4-[(3-methyl-2-butanyl)carbamoyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}-3,4-dihydro-2(1H)-isoquinolinecarboxamide	
	N-Isopropyl-5-{5-methyl-4-[(3-methylbutyl)carbamoyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}-3,4-dihydro-2(1H)-isoquinolinecarboxamide	
	N-Isopropyl-5-{5-methyl-4-[(2-methyl-2-butanyl)carbamoyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}-3,4-dihydro-2(1H)-isoquinolinecarboxamide	
	N',N''-(1,4-Phenylenedimethylylidene)bis[2-(1-piperidinyl)acetohydrazide]	

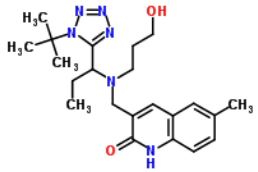
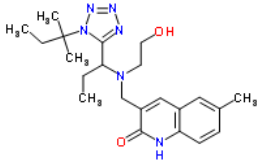
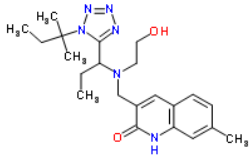
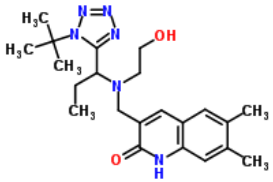
	3-{[(2-Hydroxyethyl){(1S)-1-[1-(2-methyl-2-butanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-7-methyl-2(1H)-quinolinone	
	3-{[(2-Hydroxyethyl){(1R)-1-[1-(2-methyl-2-butanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-7-methyl-2(1H)-quinolinone	
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	3-{[(2-Hydroxyethyl){(1S)-1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-6,7-dimethyl-2(1H)-quinolinone	
	3-{[(2-Hydroxyethyl){(1R)-1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-6,7-dimethyl-2(1H)-quinolinone	

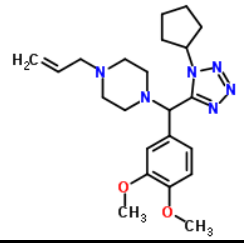
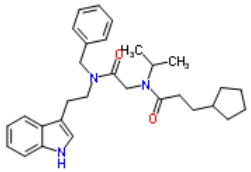
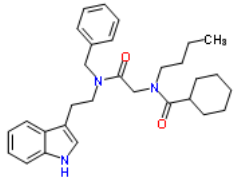
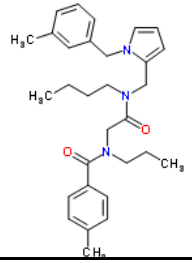
	3-{[(2-Hydroxyethyl){(1S)-1-[1-(2-methyl-2-butanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-6-methyl-2(1H)-quinolinone	
	3-{[(2-Hydroxyethyl){(1R)-1-[1-(2-methyl-2-butanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-6-methyl-2(1H)-quinolinone	
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	1-[(Mesitylmethylene)amino]-5-oxo-N-(2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinyl)-2,5-dihydro-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide	
	1-(1,3-Benzodioxol-5-ylmethyl)-4-[1-(1-cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)propyl]piperazine	

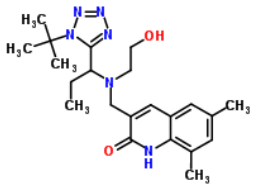
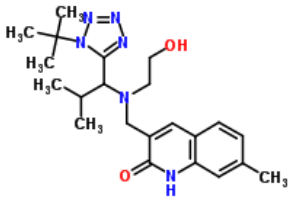
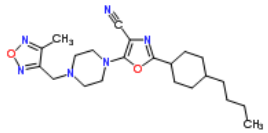
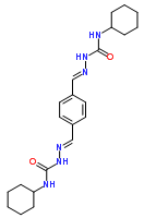
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	2,2'-(1,4-Phenylenedimethylylidene)bis(N-cyclohexylhydrazinecarboxamide)	
	N',N''-[1,4-Phenylenedi(Z)methylylidene]bis[2-(1-piperidinyl)acetohydrazide]	
	(2Z,2'Z)-2,2'-[1,4-Phenylenedi(Z)methylylidene]bis(N-cyclohexylhydrazinecarboxamide)	
	1-{2-[(4-Acetyl-1-piperazinyl)methyl]-1-methyl-1H-benzimidazol-5-yl}-3-cyclohexylurea	

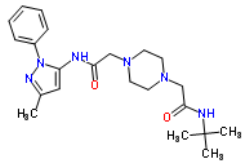
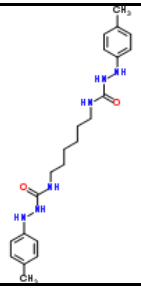
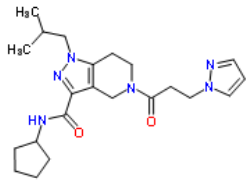
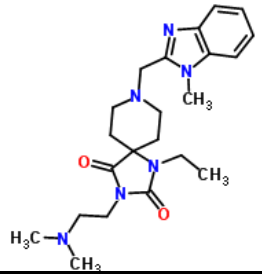
	1-{[(5-Amino-1H-1,2,4-triazol-3-yl)acetyl](propyl)amino}-N-(2,6-dimethylphenyl)cyclohexanecarboxamide	
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	8-Cyclopentyl-1,6,7-trimethyl-3-[2-(1-piperidinyl)ethyl]-1H-imidazo[2,1-f]purine-2,4(3H,8H)-dione	
	1H-imidazo[2,1-f]purine-2,4(3H,8H)-dione, 8-cyclohexyl-1,7-dimethyl-3-[2-(1-piperidinyl)ethyl]-	
	3-{[(2-Hydroxyethyl){1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]butyl}amino]methyl}-7-methyl-2(1H)-quinolinone	

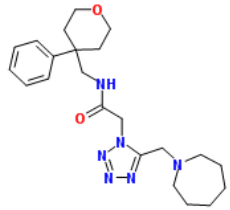
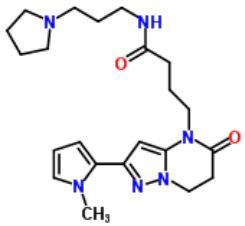
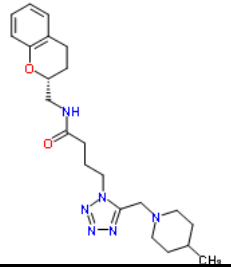
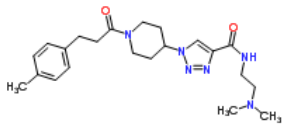
	3-{[(2-Hydroxyethyl){2-methyl-1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-6-methyl-2(1H)-quinolinone	
	3-{[(2-Hydroxyethyl){1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]butyl}amino]methyl}-6-methyl-2(1H)-quinolinone	
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	N-Cyclohexyl-N^2-{[5-(4-methylphenyl)-2H-tetrazol-2-yl]acetyl}-N^2-(2-methyl-2-propanyl)glycinamide	
	3-{[(3-Hydroxypropyl){1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-8-methyl-2(1H)-quinolinone	

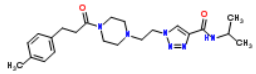
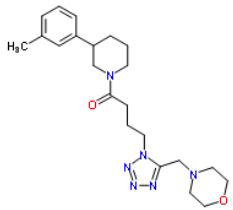
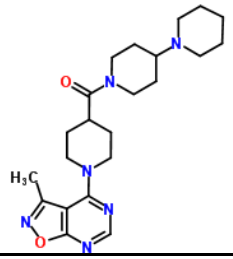
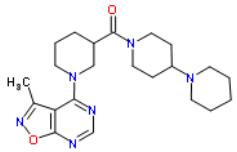
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	3-{[(3-Hydroxypropyl){1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-6-methyl-2(1H)-quinolinone	
	3-{[(2-Hydroxyethyl){1-[1-(2-methyl-2-butanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-6-methyl-2(1H)-quinolinone	
	3-{[(2-Hydroxyethyl){1-[1-(2-methyl-2-butanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-7-methyl-2(1H)-quinolinone	
	3-{[(2-Hydroxyethyl){1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-6,7-dimethyl-2(1H)-quinolinone	

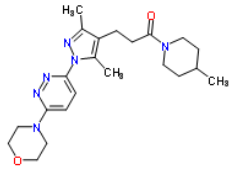
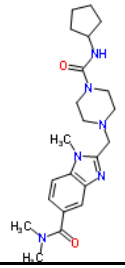
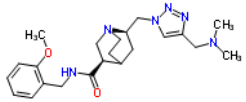
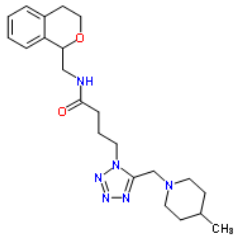
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	1-Allyl-4-[(1-cyclopentyl-1H-tetrazol-5-yl)(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]piperazine	
	N-(2-{Benzyl[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-3-cyclopentyl-N-isopropylpropanamide	
	N-(2-{Benzyl[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]amino}-2-oxoethyl)-N-butylcyclohexanecarboxamide	
	N-[2-(Butyl{[1-(3-methylbenzyl)-1H-pyrrol-2-yl]methyl}amino)-2-oxoethyl]-4-methyl-N-propylbenzamide	

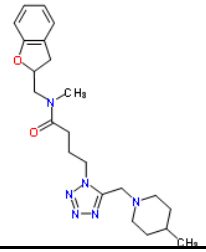
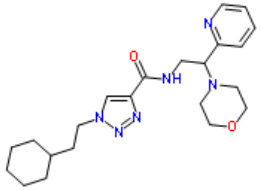
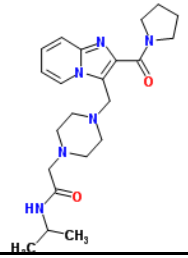
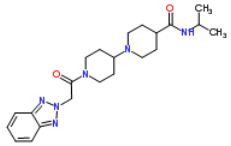
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	3-{[(2-Hydroxyethyl){1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-6,8-dimethyl-2(1H)-quinolinone	
	3-{[(2-Hydroxyethyl){2-methyl-1-[1-(2-methyl-2-propanyl)-1H-tetrazol-5-yl]propyl}amino]methyl}-7-methyl-2(1H)-quinolinone	
	2-(4-Butylcyclohexyl)-5-{4-[(4-methyl-1,2,5-oxadiazol-3-yl)methyl]-1-piperazinyl}-1,3-oxazole-4-carbonitrile	
	(2E,2'E)-2,2'-[1,4-Phenylenedi(E)methylylidene]bis(N-cyclohexylhydrazinecarboxamide)	

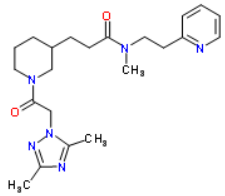
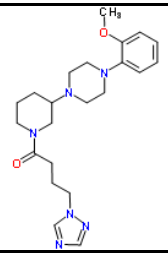
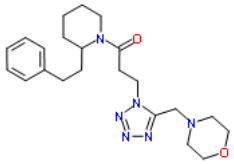
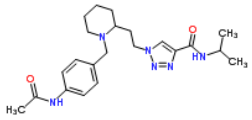
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	2-(4-{2-[(3-Methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-yl)amino]-2-oxoethyl}-1-piperazinyl)-N-(2-methyl-2-propanyl)acetamide	
	N,N'-1,6-Hexanediylbis[2-(4-methylphenyl)hydrazinecarboxamide]	
	N-Cyclopentyl-1-isobutyl-5-[3-(1H-pyrazol-1-yl)propanoyl]-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[4,3-c]pyridine-3-carboxamide	
	3-[2-(Dimethylamino)ethyl]-1-ethyl-8-[(1-methyl-1H-benzimidazol-2-yl)methyl]-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione	

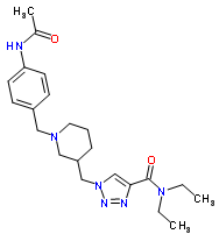
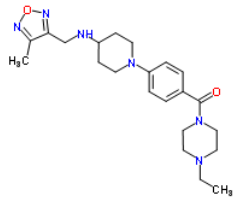
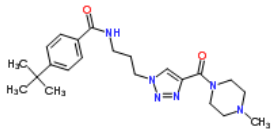
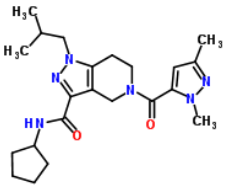
	2-[5-(1-Azepanylmethyl)-1H-tetrazol-1-yl]-N-[(4-phenyltetrahydro-2H-pyran-4-yl)methyl]acetamide	
	4-[2-(1-Methyl-1H-pyrrol-2-yl)-5-oxo-6,7-dihydropyrazolo[1,5-a]pyrimidin-4(5H)-yl]-N-[3-(1-pyrrolidinyl)propyl]butanamide	
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	N-[(2R)-3,4-Dihydro-2H-chromen-2-ylmethyl]-4-{5-[(4-methyl-1-piperidinyl)methyl]-1H-tetrazol-1-yl}butanamide	
	N-[2-(Dimethylamino)ethyl]-1-{1-[3-(4-methylphenyl)propanoyl]-4-piperidinyl}-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide	

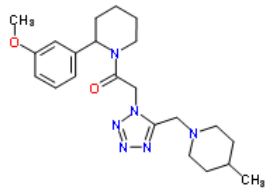
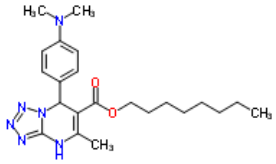
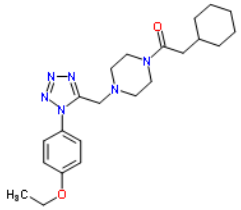
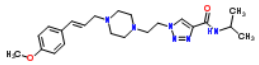
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	N-Isopropyl-1-(2-{4-[3-(4-methylphenyl)propanoyl]-1-piperazinyl}ethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide	
	1-[3-(3-Methylphenyl)-1-piperidinyl]-4-[5-(4-morpholinylmethyl)-1H-tetrazol-1-yl]-1-butanone	
	1,4'-Bipiperidin-1'-yl[1-(3-methyl[1,2]oxazolo[5,4-d]pyrimidin-4-yl)-4-piperidinyl]methanone	
	1,4'-Bipiperidin-1'-yl[1-(3-methyl[1,2]oxazolo[5,4-d]pyrimidin-4-yl)-3-piperidinyl]methanone	

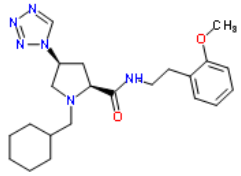
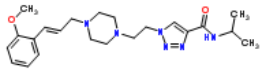
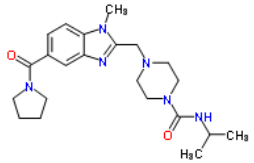
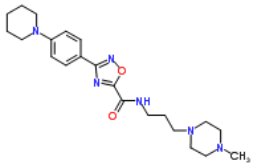
	3-{3,5-Dimethyl-1-[6-(4-morpholinyl)-3-pyridazinyl]-1H-pyrazol-4-yl}-1-(4-methyl-1-piperidinyl)-1-propanone	
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	2-{[4-(Cyclopentylcarbamoyl)-1-piperazinyl]methyl}-N,N,1-trimethyl-1H-benzimidazole-5-carboxamide	
	(3R,6R)-6-({4-[(Dimethylamino)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}methyl)-N-(2-methoxybenzyl)quinuclidine-3-carboxamide	
	N-(3,4-Dihydro-1H-isochromen-1-ylmethyl)-4-{5-[(4-methyl-1-piperidinyl)methyl]-1H-tetrazol-1-yl}butanamide	

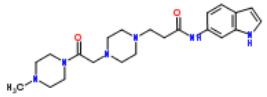
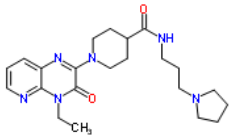
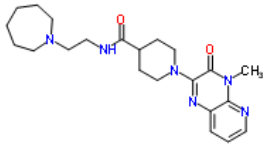
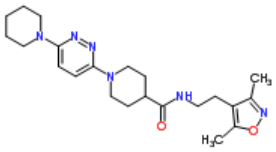
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	N-(2,3-Dihydro-1-benzofuran-2-ylmethyl)-N-methyl-4-{5-[(4-methyl-1-piperidinyl)methyl]-1H-tetrazol-1-yl}butanamide	
	1-(2-Cyclohexylethyl)-N-[2-(4-morpholinyl)-2-(2-pyridinyl)ethyl]-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide	
	N-Isopropyl-2-(4-{[2-(1-pyrrolidinylcarbonyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl]methyl}-1-piperazinyl)acetamide	
	1'-(2H-Benzotriazol-2-ylacetyl)-N-isopropyl-1,4'-bipiperidine-4-carboxamide	

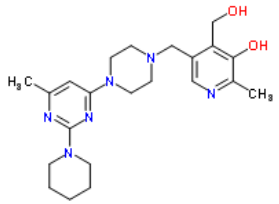
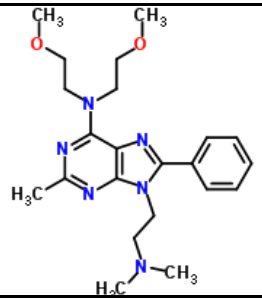
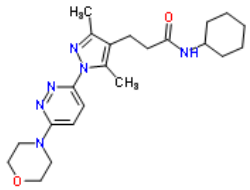
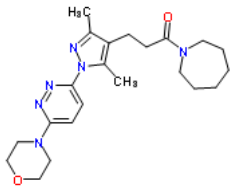
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	3-{1-[(3,5-Dimethyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)acetyl]-3-piperidinyl}-N-methyl-N-[2-(2-pyridinyl)ethyl]propanamide	
	1-{3-[4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]-1-piperidinyl}-4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-1-butanone	
	3-[5-(4-Morpholinylmethyl)-1H-tetrazol-1-yl]-1-[2-(2-phenylethyl)-1-piperidinyl]-1-propanone	
	1-{2-[1-(4-Acetamidobenzyl)-2-piperidinyl]ethyl}-N-isopropyl-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide	

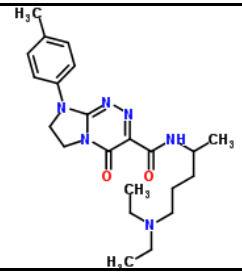
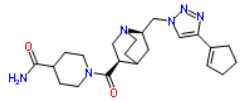
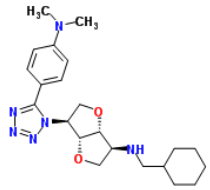
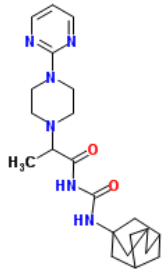
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	1-{[1-(4-Acetamidobenzyl)-3-piperidinyl]methyl}-N,N-diethyl-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide	
	(4-Ethyl-1-piperazinyl)[4-(4-{[(4-methyl-1,2,5-oxadiazol-3-yl)methyl]amino}-1-piperidinyl)phenyl]methanone	
	N-(3-{4-[(4-Methyl-1-piperazinyl)carbonyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}propyl)-4-(2-methyl-2-propanyl)benzamide	
	N-Cyclopentyl-5-[(1,3-dimethyl-1H-pyrazol-5-yl)carbonyl]-1-isobutyl-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[4,3-c]pyridine-3-carboxamide	

413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	1-[2-(3-Methoxyphenyl)-1-piperidinyl]-2-{5-[(4-methyl-1-piperidinyl)methyl]-1H-tetrazol-1-yl}ethanone	
	Octyl 7-[4-(dimethylamino)phenyl]-5-methyl-1,7-dihydrotetrazolo[1,5-a]pyrimidine-6-carboxylate	
	2-Cyclohexyl-1-(4-{[1-(4-ethoxyphenyl)-1H-tetrazol-5-yl]methyl}-1-piperazinyl)ethanone	
	N-Isopropyl-1-(2-{4-[(2E)-3-(4-methoxyphenyl)-2-propen-1-yl]-1-piperazinyl}ethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide	

	(4S)-1-(Cyclohexylmethyl)-N-[2-(2-methoxyphenyl)ethyl]-4-(1H-tetrazol-1-yl)-L-prolinamide	
	N-Isopropyl-1-(2-{4-[(2E)-3-(2-methoxyphenyl)-2-propen-1-yl]-1-piperazinyl}ethyl)-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide	
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	N-Isopropyl-4-{[1-methyl-5-(1-pyrrolidinylcarbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl]methyl}-1-piperazinecarboxamide	
	N-[3-(4-Methyl-1-piperazinyl)propyl]-3-[4-(1-piperidinyl)phenyl]-1,2,4-oxadiazole-5-carboxamide	

	N-(1H-Indol-6-yl)-3-{4-[2-(4-methyl-1-piperazinyl)-2-oxoethyl]-1-piperazinyl}propanamide	
	1-(4-Ethyl-3-oxo-3,4-dihydropyrido[2,3-b]pyrazin-2-yl)-N-[3-(1-pyrrolidinyl)propyl]-4-piperidinecarboxamide	
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	N-[2-(1-Azepanyl)ethyl]-1-(4-methyl-3-oxo-3,4-dihydropyrido[2,3-b]pyrazin-2-yl)-4-piperidinecarboxamide	
	N-[2-(3,5-Dimethyl-1,2-oxazol-4-yl)ethyl]-1-[6-(1-piperidinyl)-3-pyridazinyl]-4-piperidinecarboxamide	

413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	4-Pyridinemethanol, 3-hydroxy-2-methyl-5-((4-(6-methyl-2-(1-piperidinyl)-4-pyrimidinyl)-1-piperazinyl)methyl)-	
	9-[2-(Dimethylamino)ethyl]-N,N-bis(2-methoxyethyl)-2-methyl-8-phenyl-9H-purin-6-amine	
	N-Cyclohexyl-3-{3,5-dimethyl-1-[6-(4-morpholinyl)-3-pyridazinyl]-1H-pyrazol-4-yl}propanamide	
	1-(1-Azepanyl)-3-{3,5-dimethyl-1-[6-(4-morpholinyl)-3-pyridazinyl]-1H-pyrazol-4-yl}-1-propanone	

413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	N-[5-(Diethylamino)-2-pentanyl]-8-(4-methylphenyl)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahydroimidazo[2,1-c][1,2,4]triazine-3-carboxamide	
	1-{[(3R,6R)-6-{[4-(1-Cyclopenten-1-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]carbonyl}-4-piperidinecarboxamide	
	1,4:3,6-Dianhydro-2-[(cyclohexylmethyl)amino]-2,5-dideoxy-5-{5-[4-(dimethylamino)phenyl]-1H-tetrazol-1-yl}-L-iditol	
	N-(Adamantan-1-ylcarbamoyl)-2-[4-(2-pyrimidinyl)-1-piperazinyl]propanamide	

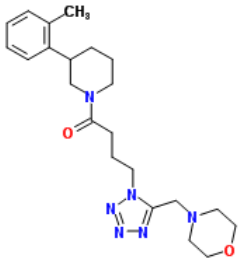
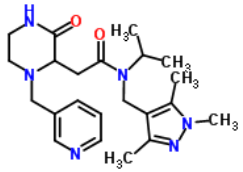
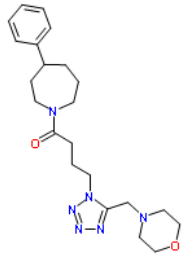
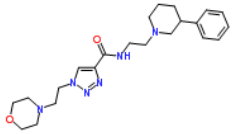
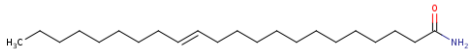
413.2667 **$C_{22}H_{32}N_6O_2$** **(Δppm = 1.001)**	1-[3-(2-Methylphenyl)-1-piperidinyl]-4-[5-(4-morpholinylmethyl)-1H-tetrazol-1-yl]-1-butanone	
	N-Isopropyl-2-[3-oxo-1-(3-pyridinylmethyl)-2-piperazinyl]-N-[(1,3,5-trimethyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl]acetamide	
	4-[5-(4-Morpholinylmethyl)-1H-tetrazol-1-yl]-1-(4-phenyl-1-azepanyl)-1-butanone	
	1-[2-(4-Morpholinyl)ethyl]-N-[2-(3-phenyl-1-piperidinyl)ethyl]-1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide	

Tabela 5: Possíveis compostos para o pico de número 22, com massa 338.3419 e fórmula $C_{22}H_{43}NO$ do cromatograma obtido por CLAE-EM para a subfração hexânica da alga *H. grandifolius.*

Pico	Composto	Estrutura
$C_{22}H_{43}NO$ **338.3419** **(Δppm = 1.002)**	13E-Docosenamide