

**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ALGAS PARDAS:  
IMPLICAÇÕES ECOLÓGICAS, TAXONÔMICAS E FILOGENÉTICAS**

**BEATRIZ GROSSO FLEURY**

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ALGAS PARDAS:  
IMPLICAÇÕES ECOLÓGICAS, TAXONÔMICAS E FILOGENÉTICAS

BEATRIZ GROSSO FLEURY

APROVADA EM 16/09/91

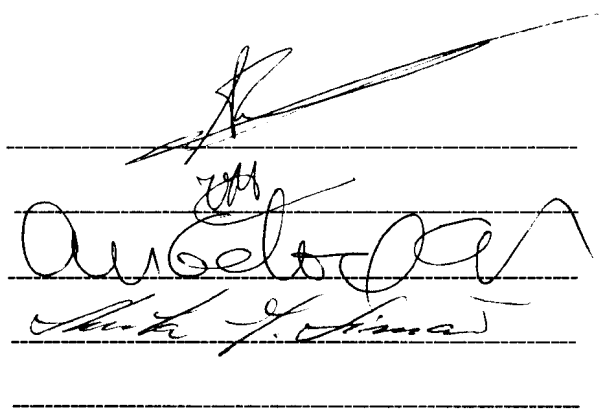
Prof. Dr. Alphonse Kelecom

Profa. Dra. Valéria L. Teixeira

Prof. Dr. Ângelo da C. Pinto

Profa. Dra. Sheila M. Simão

Prof. Dr. Victor M. Rumjanek



The image shows four horizontal lines representing a signature strip. The first line contains a signature that appears to be 'Alphonse Kelecom'. The second line contains a signature that appears to be 'Valéria L. Teixeira'. The third line contains a signature that appears to be 'Ângelo da C. Pinto'. The fourth line contains a signature that appears to be 'Sheila M. Simão'. The fifth line is empty.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ALGAS PARDAS:  
IMPLICAÇÕES ECOLÓGICAS, TAXONÔMICAS E FILOGENÉTICAS

BEATRIZ GROSSO FLEURY

Sob a orientação dos Professores

Alphonse Kelecom e Valéria L. Teixeira

Tese submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau  
de Mestre em Química.

Área de concentração em  
Química Orgânica

Itaguaí, Rio de Janeiro

1991

"Para que haja progresso na compreensão de defesas químicas, os ecologistas terão que prestar mais atenção à complexidade dos processos químicos em questão e refletir sobre a tendência de agrupar compostos e suas atividades em grupos convenientes, porém não comprovados do ponto de vista ecológico."

(Hay, Duffy & Fenical, 1988)

Aos meus amigos, principalmente,  
Aurélio B. B. Ferreira,  
Vasco, Helena e Linda.

## AGRADECIMENTOS

A lista de pessoas que me ajudaram de uma maneira ou de outra na elaboração deste trabalho seria por demais extensa. Todavia, há algumas que merecem especial destaque e aos quais gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Alphonse Kelecom, pela oportunidade concedida do estudo multidisciplinar que levou à definição da temática desta tese, agora apresentada.

A Prof<sup>a</sup> Valéria L. Teixeira, pelo exemplo de perseverança profissional. Sou grata por ter me iniciado na ciência e por ter me orientação neste trabalho.

Ao Prof. Renato C. Pereira, agradeço também por boa parte da minha formação profissional, pela abertura da linha de Ecologia Química Marinha experimental no Brasil e ajuda neste estudo.

Ao Prof. Aurélio Baird Buarque Ferreira, por tudo. Sou grata pelo interesse, competência, seriedade, confiança, questionamentos e, sobretudo, pela contribuição decisiva no desenvolvimento deste trabalho. Seu estímulo constante e críticas perspicazes tornaram possível a realização desta tese, não deixando que me curvasse diante dos obstáculos. Além disso, agradeço pela ajuda dos desenhos de estruturas químicas contidos

neste estudo.

Ao Prof. Roberto Figliuolo por ter me iniciado na Ecologia Química.

Ao Prof. Ângelo da Cunha Pinto, pelo constante incentivo e apoio profissional.

A Prof<sup>a</sup>. Ceres Maria Rezende Gomes, pelas ótimas sugestões.

Aos Profs. da UFRRJ, Victor Marcos Rumjaneck, José Carlos Netto Ferreira, Raimundo Braz Filho, Mário Geraldo de Carvalho, Francisco de Assis da Silva, Maria Cristina Barra, Sílvio Martins Júnior, Edna Cruz Fantini, Áurea Echevarrie, Anselmo Alpande de Moraes, cujas amizades se revelaram nas valiosas colaborações prestadas no decorrer da execução deste trabalho.

A Nanci Câmara de Lucas, companheira desta viagem, por tudo.

A Lenize Fernandes Maia, Liane Pitombo, Maria Aparecida Maciel, Maria das Dores Dutra Behrens e Marise M. Oliveira Cabral pelo estímulo constante e valiosa ajuda, e para os demais amigos da pós-graduação, pela amizade e convivência harmoniosa.

Aos demais professores, funcionários e colegas do Departamento de Química do ICE da UFRRJ, pelo apoio demonstrado.

A Renato C. Pereira, Sérgio A. da S. Almeida, Ariângelo Helburn, Marcelo R. Jorge, Liane Pitombo, José Roberto M. Farias, Aurélio B. B. Ferreira, Mariana Ferraz Ferreira e Patrícia, pelo auxílio nas coletas.

Aos Profs. Octávio Augusto Ceva Antunes, Marcos Vinícius G. Pereira e José Roberto Pereira da Silva, pela grande ajuda em diferentes partes do presente trabalho.

A Dra. Regina C. Lago (EMBRAPA, RJ), à Lurdinha (IQ, UFRJ) e ao Prof. Hélio Mattos (FF, UFRJ), pelos padrões de esteróis.

Ao Prof. Francisco Radler de Aquino Neto, a Ricardo Bezerra Coelho e Carlos César Flores Vidotti (IQ, UFRJ) e à Rosali Maftoum (COPEL, PR), pela obtenção de espectros e ajuda nas análises cromatográficas.

Ao Dr. Michel Kaisin (Universidade Livre de Bruxelas, Química Orgânica), pelos espectros de massa das misturas de esteróis.

A Maria Fernanda Rangel, pelos desenhos de alguns gráficos desta tese.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, à Universidade Federal Fluminense, ao CNPq e à FAPERJ, pela oportunidade concedida.



## RESUMO

As algas pardas (Phaeophyta) constituem-se no grupo de maior biomassa na costa brasileira. Neste trabalho, foram estudados representantes de duas das ordens mais evoluídas desta divisão: **Dictyotales** e **Fucales**.

Nossos resultados fitoquímicos indicaram um balanço na produção de três classes de substâncias: **taninos**, **terpenos** e **esteróis**. Foi observado que as algas que apresentam alto teor de **esteróis**, as **Fucales**, não possuem **terpenos** ou apenas pequenas quantidades deles, enquanto as **Dictyotales**, que são ricas em **terpenos**, apresentam baixos níveis de **esteróis**. Por outro lado, os **taninos**, surpreendentemente, foram encontrados em baixos níveis de concentração, o que difere drasticamente do que ocorre em regiões temperadas.

Testes de herbivoria foram realizados, mostrando que as

substâncias empregadas, a fração esteroidal e os diterpenos dictyol H e 4 $\alpha$ -acetoxi-14 $\alpha$ -hidroxidolastano-1(15),7,9-trieno isolados de *Sargassum furcatum* Kuetzing, *Dictyota cervicornis* Kuetzing, *Dictyota mertensii* (Martius) Kuetzing, respectivamente, parecem ser inativas frente à pastagem pelo herbívoro marinho, crustáceo anfípoda *Parhyale hawaiiensis* Dana.

Para concluir, foi feita uma análise quimiosistemática destas duas ordens de algas pardas, com base em dados da literatura empregando índices taxonômicos como o de oxidação e o de avanço evolutivo de esqueleto. Os resultados obtidos comprovaram a utilização dos terpenos, sejam eles de origem biossintética mista ou não, como bons marcadores taxonômicos. Entretanto, indicamos os meroterpenos (terpenos de origem biossintética mista) como os marcadores quimiosistemáticos e filogenéticos mais "evoluídos" dentre os estudados até o momento em algas pardas.

## ABSTRACT

Brown algae (Phaeophyta) are the group with the largest biomass in the Brazilian coast. Representative specimens of the Fucales and Dictyotales orders were studied in this work. They are among the most evolved of brown algae.

Our phytochemical results indicate a balance in the production of tannins, terpenes and sterols. Fucales algae, which are rich in sterols, show small amounts or absence of terpenes, while with Dictyotales, the inverse occurs. Surprisingly, tannins, were found in small concentrations, contrary to what is observed in temperate regions.

Herbivory tests were conducted, showing that the substances employed, the steroidal fraction and the diterpens dictyol H and 4 $\alpha$ -acetoxy-14 $\alpha$ -hydroxydolastane-1(15),7,9-triene, isolated from *Sargassum furcatum* Kuetzing, *Dictyota cervicornis*

Kuetzing, *Dictyota mertensii* (Martius) Kuetzing, respectively, seem to be inactive towards grazing by the marine herbivore amphipod *Parhyale hawaiiensis* Dana.

Finally, a chemo-systematic analysis of these two orders of brown algae was made, based of literature data and employing taxonomic indices such as "oxidation index", and "skeleton evolutive advancement index". Our results show that terpenes, either of simple or mixed biosynthetic origin, can be good taxonomic markers. Meroterpenes (mixed biosynthetic origin terpenes) are the most "evolved" of the chemo-systematic and phylogenetic markers so far studied for brown algae.

## ÍNDICE

	<b>pág.</b>
RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XVIII
ÍNDICE DE TABELAS	XXIV
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1. ECOSISTEMAS MARINHOS E INTERAÇÕES SEMIOQUÍMICAS</b>	<b>2</b>
<b>1.2. ALGAS E HERBÍVOROS</b>	<b>6</b>
<b>1.3. METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS</b>	<b>8</b>
<b>1.4. TEORIA DE DEFESA: VÁLIDA PARA SISTEMAS MARINHOS ?</b>	<b>13</b>
<b>1.5. PREDOMINÂNCIA DA VIA DO ACETATO NAS ALGAS PARDAS</b>	<b>25</b>
<b>1.6. PRODUTOS NATURAIS DE ALGAS PARDAS</b>	<b>28</b>

1.6.1. SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS	28
1.6.2. TERPENOS	31
1.6.3. ESTERÓIS	49
1.7. IMPLICAÇÕES ECOLÓGICAS E QUIMIOTAXONÔMICAS	67
1.8. OBJETIVOS	69
CAPÍTULO 2. TANINOS, TERPENOS E ESTERÓIS DE ALGAS PARDAS	71
2.1. METABÓLITOS ORIGINADOS DA VIA DO MALONATO: FLOROTANINOS	74
2.2. METABÓLITOS DA VIA DO MEVALONATO: DITERPENOS E ESTERÓIS	76
2.2.1. OS DITERPENOS	78
2.2.1.1. Identificação dos diterpenos isolados de <i>Dictyota cervicornis</i> <sup>B</sup>	81
2.2.1.1.a. Identificação da substância Dc-1	81
2.2.1.1.b. Identificação da substância Dc-2	90
2.2.1.2. Identificação dos diterpenos isolados de <i>Dictyota mertensii</i>	103
2.2.1.2.a. Identificação da substância Dm-1	103
2.2.1.3. Identificação dos diterpenos isolados de <i>Dictyota mertensii</i> e <i>Dictyota dichotoma</i>	112
2.2.1.3.a. Identificação de Dmd-2	112
2.2.2. ESTERÓIS	114
2.2.2.1. Identificação da fração esteroidal de <i>Dictyota cervicornis</i> <sup>M</sup>	119

2.2.2.2.	Identificação da fração esteroidal de <i>Dictyota cervicornis</i> <sup>B</sup>	132
2.2.2.3.	Identificação da fração esteroidal de <i>Dictyota dichotoma</i>	137
2.2.2.4.	Identificação da fração esteroidal de <i>Dictyota mertensii</i>	140
2.2.2.5.	Identificação da fração esteroidal de <i>Dictyopteris delicatula</i>	142
2.2.2.6.	Identificação da fração esteroidal de <i>Dictyopteris plagiogramma</i>	144
2.2.2.7.	Identificação da fração esteroidal de <i>Sargassum filipendula</i>	146
2.2.2.8.	Identificação da fração esteroidal de <i>Sargassum furcatum</i>	150
2.2.3.	COMPARAÇÃO ENTRE AS ANÁLISES DAS FRAÇÕES ESTEROIDAIAS DAS DIFERENTES ALGAS	153
CAPÍTULO 3. TESTES DE HERBIVORIA		161
3.1.	EFEITO DETERRENTE DA FRAÇÃO ESTEROIDAL DE <i>Sargassum furcatum</i> SOBRE O ANFÍPODA <i>Parhyale hawaiiensis</i> .	163
3.2.	EFEITO DETERRENTE DO DITERPENO DOLASTANO Dc-1 (4 $\alpha$ -acetoxi-14 $\alpha$ -hidroxidolastano,1(15,7,9-trieno) (35) SOBRE O ANFÍPODA <i>Parhyale hawaiiensis</i>	166
3.3.	EFEITO DETERRENTE DO DITERPENO GUAIANO Dm-I (Dictyol H) SOBRE O ANFÍPODA <i>P. hawaiiensis</i>	168
CAPÍTULO 4. AVALIAÇÕES TAXONÔMICAS		172
4.1.	MÉTODOS QUIMIOTAXONÔMICOS	177

<b>4.2. CONSIDERAÇÕES BIOGENÉTICAS DOS TERPENOS DAS ORDENS DICTYOTALES (Dictyotaceae) E FUCALES (Cystoseiraceae e Sargassaceae)</b>	<b>181</b>
<b>4.2.1. GRUPO "Dictyopteris" E GRUPO "Taonia" (Dictyotales)</b>	<b>181</b>
<b>4.2.1.1. GRUPO "Dictyopteris"</b>	<b>181</b>
<b>4.2.1.2. GRUPO "Taonia"</b>	<b>184</b>
<b>4.2.1.3. CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS PARA A ORDEM DICTYOTALES</b>	<b>190</b>
<b>4.2.2. GÊNERO <i>Cystoseira</i> (Cystoseiraceae, Fucales)</b>	<b>193</b>
<b>4.2.2.1. CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS PARA A ORDEM FUCALES</b>	<b>210</b>
 <b>CAPÍTULO 5. EXPERIMENTAL</b>	<b>215</b>
<b>5.1. ESPÉCIES COLETADAS E ÁREAS ESTUDADAS</b>	<b>216</b>
<b>5.2. QUANTIFICAÇÃO DOS FLOROTANINOS</b>	<b>218</b>
<b>5.3. QUANTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS DITERPENOS E ESTERÓIS</b>	<b>219</b>
<b>5.3.1. APARELHOS</b>	<b>219</b>
<b>5.3.2. EXTRAÇÃO</b>	<b>222</b>
<b>5.3.3. PRIMEIRO FRACIONAMENTO</b>	<b>226</b>
<b>5.3.4. ISOLAMENTO DOS TERPENOS E ESTERÓIS PARA CADA ESPÉCIE DE ALGA</b>	<b>226</b>
<b>5.4. DADOS ESPECTRAIS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS</b>	<b>231</b>
<b>5.4.1. DITERPENOS</b>	<b>231</b>
<b>5.4.1.1. SUBSTÂNCIA Dc-1</b>	<b>231</b>
<b>5.4.1.2. SUBSTÂNCIA Dc-2</b>	<b>233</b>



5.4.1.3.	SUBSTANCIA Dm-2	235
5.4.2.	ESTERÓIS - EM (70 eV): m/z (% abundância relativa)	237
5.4.2.1.	22-DEIDRO-COLESTEROL (22-DHC)	237
5.4.2.2.	COLESTEROL	237
5.4.2.3.	5 $\alpha$ -COLESTAN-3 $\beta$ -OL	237
5.4.2.4.	BRASSICASTEROL	238
5.4.2.5.	24-DEIDRO-24-METIL-COLESTEROL (24-DHMC)	238
5.4.2.6.	24-METILENO-COLESTEROL (chalinasterol)	238
5.4.2.7.	FUCOSTEROL	239
5.4.2.8.	MISTURA DE 24 $\xi$ -ETILCOLESTEROL E FUCOSTEROL	239
5.4.2.9.	M 414 (desconhecido)	239
5.4.2.10.	M 426 (desconhecido)	239
5.4.3.	Esteróis (EM das misturas) (70 eV) m/z (% abundância relativa)	240
5.4.3.1.	<i>Dictyota dichotoma</i>	240
5.4.3.2.	<i>Dictyopteris delicatula</i>	240
5.4.3.3.	<i>Dictyopteris plagiogramma</i>	241
5.4.3.4.	<i>Sargassum furcatum</i>	241
5.5.	TESTES DE HERBIVORIA	241
5.5.1.	TRATAMENTO DOS DADOS	243
CAPÍTULO 6.	CONCLUSÕES	244
CAPÍTULO 7	BIBLIOGRAFIA	249

## ÍNDICE DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1:</b> Esquema simplificado das possíveis interações que ocorrem na natureza	<b>4</b>
<b>Figura 2:</b> Interações químicas nos ambientes marinho e terrestre	<b>5</b>
<b>Figura 3:</b> Relações metabólicas entre os metabolismos primários e secundários	<b>10</b>
<b>Figura 4:</b> Custo acumulado de defesas das folhas	<b>17</b>
<b>Figura 5:</b> Esquema biossintético simplificado da produção de fenóis, terpenos e esteróides	<b>27</b>
<b>Figura 6:</b> Derivados fenólicos de algas pardas	<b>29</b>
<b>Figura 6 (cont.):</b> Derivados fenólicos de algas pardas	<b>30</b>
<b>Figura 7:</b> Proposta biogenética dos diterpenos de <i>Dictyota</i>	<b>33</b>
<b>Figura 8:</b> Diterpenos isolados de algas pardas da costa	

brasileira	34
<b>Figura 9:</b> Metabólitos característicos de <i>Dictyopteris zonarioides</i>	37
<b>Figura 10:</b> Metabólitos característicos de <i>Dictyopteris divaricata</i>	38
<b>Figura 11:</b> Metabólitos característicos de <i>Taonia</i>	40
<b>Figura 12:</b> Metabólitos característicos de <i>Stypopodium</i>	41
<b>Figura 13a:</b> Alguns metabólitos de <i>Cystoseira</i>	43
<b>Figura 13b:</b> Alguns metabólitos de <i>Cystoseira</i>	44
<b>Figura 13c:</b> Alguns metabólitos de <i>Cystoseira</i>	45
<b>Figura 14:</b> Proposta biossintética para formação dos esteróides	52
<b>Figura 15:</b> Caminhos Biossintéticos para os 24 $\alpha$ e 24 $\beta$ alquil-esteróis	54
<b>Figura 16:</b> Esteróis isolados de algas pardas	58
<b>Figura 17:</b> Caminhos biossintéticos para formação das cadeias laterais dos esteróis de algas pardas	65
<b>Figura 18:</b> Fluxograma de isolamento e quantificação dos taninos, terpenos e esteróis de algas pardas	73
<b>Figura 19:</b> Concentração de florotaninos (em % de peso seco) nas algas pardas.	75
<b>Figura 20:</b> Espectro de UV da substância Dc-1 (35)	85
<b>Figura 21:</b> Espectro de IV de Dc-1 (35)	86
<b>Figura 22:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de Dc-1 (35)	87
<b>Figura 23:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de Dc-1 (35)	88
<b>Figura 24:</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ - DEPT de Dc-1 (35)	89
<b>Figura 25:</b> Espectro de UV da substância Dc-2 (36)	94

<b>Figura 26:</b>	<b>Espectro de IV de Dc-2 (36)</b>	<b>95</b>
<b>Figura 27:</b>	<b>Espectro de RMN <sup>1</sup>H de Dc-2 (36)</b>	<b>96</b>
<b>Figura 28:</b>	<b>Espectro de HOMOCOSY <sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H (bidimensional) do dolastano Dc-2 (36)</b>	<b>97</b>
<b>Figura 29:</b>	<b>Espectro de RMN <sup>13</sup>C do dolastano Dc-2 (36)</b>	<b>98</b>
<b>Figura 30:</b>	<b>Espectro de RMN <sup>13</sup>C - DEPT do dolastano Dc-2</b>	<b>99</b>
<b>Figura 31:</b>	<b>Processo de desidratação de 35a e 36a para Dc-1 (35) e Dc-2 (36), respectivamente, na presença de CHCl<sub>3</sub>.</b>	<b>102</b>
<b>Figura 32:</b>	<b>Espectro de IV da substância Dm-1 (39)</b>	<b>107</b>
<b>Figura 33:</b>	<b>Espectro de RMN <sup>1</sup>H de Dm-1 (39)</b>	<b>108</b>
<b>Figura 34:</b>	<b>Espectro de RMN <sup>13</sup>C de Dm-1 (39)</b>	<b>109</b>
<b>Figura 35:</b>	<b>Espectro de RMN <sup>13</sup>C - DEPT de Dm-1</b>	<b>110</b>
<b>Figura 36:</b>	<b>Proposta do mecanismo de perda de água e da Me-19 a partir do esqueleto do tipo colest-5-en-3β-ol</b>	<b>115</b>
<b>Figura 37:</b>	<b>Proposta de mecanismo da eliminação de água a partir do esqueleto do tipo colest-5α-3β-ol</b>	<b>116</b>
<b>Figura 38:</b>	<b>Cromatograma de <i>Dictyota cervicornis</i><sup>M</sup></b>	<b>120</b>
<b>Figura 39:</b>	<b>Espectro de massas do 22-deidrocolesterol</b>	<b>121</b>
<b>Figura 40:</b>	<b>Principais caminhos de fragmentação observados para 22-deidrocolesterol (22-DHC)</b>	<b>122</b>
<b>Figura 41:</b>	<b>Caminho proposto para clivagem dos carbonos 13-17 e 14-15 do 22-deidrocolesterol (22-DHC)</b>	<b>123</b>
<b>Figura 42:</b>	<b>Espectro de massa do colesterol</b>	<b>124</b>
<b>Figura 43:</b>	<b>Fragmentações da cadeia lateral do colesterol</b>	<b>124</b>

<b>Figura 44:</b>	Espectro de massa do brassicasterol	<b>125</b>
<b>Figura 45:</b>	Principais fragmentações para cadeia lateral de brassicasterol	<b>126</b>
<b>Figura 46:</b>	Espectro de massa de 24-deidro-24-metilcolesterol (24-DHMC)	<b>127</b>
<b>Figura 47:</b>	Proposta da fragmentação na cadeia lateral para 24-deidro-24-metilcolesterol (24-DHMC)	<b>128</b>
<b>Figura 48:</b>	Espectro de massas do chalinasterol	<b>129</b>
<b>Figura 49:</b>	Fragmentação da cadeia lateral do chalinasterol	<b>129</b>
<b>Figura 50:</b>	Espectro de massas do fucosterol	<b>130</b>
<b>Figura 51:</b>	Fragmentações da cadeia lateral para o fucosterol	<b>130</b>
<b>Figura 52:</b>	Espectro de massas do pico 9 ( <i>Dictyota cervicornis</i> <sup>M</sup> )	<b>131</b>
<b>Figura 53:</b>	Cromatograma da espécie <i>Dictyota cervicornis</i> <sup>B</sup>	<b>133</b>
<b>Figura 54:</b>	Espectro de massas da mistura 24ξ-etilcolesterol e fucosterol	<b>135</b>
<b>Figura 55:</b>	Proposta de fragmentações da cadeia lateral para 24ξ-etilcolesterol	<b>136</b>
<b>Figura 56:</b>	Cromatograma da espécie <i>Dictyota dichotoma</i>	<b>138</b>
<b>Figura 57:</b>	EM da mistura de esteróis de <i>Dictyota dichotoma</i>	<b>139</b>
<b>Figura 58:</b>	Cromatograma de <i>Dictyota mertensii</i>	<b>141</b>
<b>Figura 59:</b>	Cromatograma de espécie <i>Dictyopteris delicatula</i>	<b>143</b>
<b>Figura 60:</b>	EM da mistura de esteróis de <i>D. delicatula</i>	<b>143</b>
<b>Figura 61:</b>	Cromatograma dos esteróis da espécie <i>Dictyopteris plagiogramma</i>	<b>145</b>
<b>Figura 62:</b>	EM da mistura de esteróis de <i>D. plagiogramma</i>	<b>145</b>

<b>Figura 63:</b> Cromatograma dos esteróis de <i>Sargassum filipendula</i>	<b>146</b>
<b>Figura 64:</b> Espectro de 5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol	<b>148</b>
<b>Figura 65:</b> Espectro do íon molecular 414	<b>148</b>
<b>Figura 66:</b> Propostas de fragmentações da cadeia lateral de 5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol	<b>149</b>
<b>Figura 67:</b> Cromatograma dos esteróis de <i>Sargassum furcatum</i>	<b>151</b>
<b>Figura 68:</b> EM da mistura de esteróis de <i>Sargassum furcatum</i>	<b>152</b>
<b>Figura 69a:</b> Cromatogramas das espécies de <i>Dictyota</i>	<b>155</b>
<b>Figura 69b:</b> Cromatogramas das espécies de <i>Dictyopteris</i> e <i>Sargassum</i>	<b>156</b>
<b>Figura 70:</b> Cromatograma da solução concentrada de <i>D. cervicornis</i> <sup>B</sup>	<b>158</b>
<b>Figura 71:</b> Efeitos da fração esteroidal de <i>S. furcatum</i> sobre o anfípoda <i>P. hawaiiensis</i>	<b>165</b>
<b>Figura 72:</b> Efeitos do dolastano Dc-1 (35) isolado de <i>D. cervicornis</i> sobre o anfípoda <i>P. hawaiiensis</i>	<b>167</b>
<b>Figura 73:</b> Efeitos do guaiano Dm-1 (39) isolado de <i>D. mertensii</i> sobre o anfípoda <i>P. hawaiiensis</i>	<b>170</b>
<b>Figura 74:</b> Proposta biogenética para os sesquiterpenos do grupo "Dictyopteris"	<b>183</b>
<b>Figura 75:</b> Proposta biogenética para os diterpenos isolados do grupo "Taonia"	<b>186</b>
<b>Figura 76:</b> AE x AE dos gêneros estudados quimicamente para o grupo "Taonia"	<b>189</b>
<b>Figura 77:</b> Proposta biogenética para os diterpenos de <i>Cystoseira</i>	<b>194</b>
<b>Figura 78:</b> Proposta biogenética para formação do	

	neobalearona e epineobalearona	197
<b>Figura 79:</b>	Proposta biogenética para formação do cystoseirol	198
<b>Figura 80:</b>	AE <sub>e</sub> x AE <sub>o</sub> das espécies de <i>Cystoseira</i>	203
<b>Figura 81:</b>	Provável filogenia dos membros da superespécie <i>C. ericaefolia</i>	208
<b>Figura 82:</b>	AE x AE para todos os gêneros quimicamente estudados da família Cystoseiraceae	212

## ÍNDICE DE TABELAS

	<b>pág.</b>
<b>Tabela 1:</b> Resumo da teoria de defesa dos vegetais terrestres	<b>14</b>
<b>Tabela 2:</b> Modelo simplificado de estratégias evolutivas de macroalgas marinhas	<b>18</b>
<b>Tabela 3:</b> Nomes dos esteróis (Fig. 16) com os respectivos pesos moleculares e estruturas	<b>59</b>
<b>Tabela 4:</b> Nomes triviais e sistemáticos dos esteróis encontrados nas algas pardas	<b>60</b>
<b>Tabela 5 (a):</b> Ocorrência de esteróis em algas pardas	<b>61</b>
<b>Tabela 5 (b):</b> Ocorrência de esteróis em algas pardas	<b>62</b>
<b>Tabela 5 (c):</b> Ocorrência de esteróis em algas pardas	<b>63</b>
<b>Tabela 6:</b> Quantidades de florotaninos (% de peso seco) nas diferentes espécies de algas pardas: ordens	



	<i>Dictyotales e Fucales</i>	74
<b>Tabela 7:</b>	Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^1\text{H}$ das metilas de diterpenos com esqueleto dolastano	79
<b>Tabela 8:</b>	Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN $^1\text{H}$ das metilas de diterpenos com esqueleto guaiano	80
<b>Tabela 9:</b>	Dados selecionados de RMN $^1\text{H}$ dos compostos Dc-1 e Dc-2 comparados com os dados da literatura	100
<b>Tabela 10:</b>	Dados espectrais de RMN $^{13}\text{C}$ de Dc-1 e Dc-2 e comparação com dados da literatura	101
<b>Tabela 11:</b>	Dados espectrais de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do guaiano Dm-1 (39) comparados com dados da literatura	111
<b>Tabela 12:</b>	Técnicas analíticas empregadas para identificações dos esteróis para cada espécie	118
<b>Tabela 13:</b>	Porcentagem de esteróis nas diferentes espécies de algas pardas: ordens <i>Dictyotales</i> e <i>Fucales</i>	119
<b>Tabela 14:</b>	Tempos de retenção (relativos ao colesterol, TRRc) e composição da fração esteroidal de <i>Dictyota cervicornis</i> <sup>M</sup> .	120
<b>Tabela 15:</b>	Resumo dos dados de CG/EM para os esteróis de <i>Dictyota cervicornis</i> <sup>M</sup>	132
<b>Tabela 16:</b>	Tempos de retenção (relativos ao colesterol, TRRc) e composição da fração esteroidal de <i>Dictyota cervicornis</i> <sup>B</sup>	133
<b>Tabela 17:</b>	Resumo dos dados de CG/EM para os esteróis de <i>Dictyota cervicornis</i> <sup>B</sup>	137
<b>Tabela 18:</b>	TRRc dos diferentes esteróis isolados de <i>D. dichotoma</i> e suas respectivas porcentagens	138
<b>Tabela 19:</b>	Resumo dos diferentes esteróis isolados de <i>D.</i>	

	<i>dichotoma</i> e suas respectivas porcentagens	140
<b>Tabela 20:</b>	TRRc dos diferentes esteróis isolados de <i>D. mertensii</i> com suas respectivas porcentagens	141
<b>Tabela 21:</b>	TRRc dos diferentes esteróis isolados de <i>D. delicatula</i> e suas respectivas porcentagens	142
<b>Tabela 22:</b>	TRRc dos diferentes esteróis de <i>D. plagiogramma</i>	144
<b>Tabela 23:</b>	TRRc dos diferentes esteróis de <i>S. filipendula</i> e suas respectivas porcentagens	147
<b>Tabela 24:</b>	Resumo dos diferentes esteróis isolados de <i>S. filipendula</i> e suas respectivas porcentagens	150
<b>Tabela 25:</b>	TRRc dos diferentes esteróis de <i>S. furcatum</i> e suas respectivas porcentagens	151
<b>Tabela 26:</b>	Técnicas analíticas empregadas para identificação dos esteróis	153
<b>Tabela 27:</b>	Código, nome e massa (M) de esteróis detetados	154
<b>Tabela 28:</b>	Porcentagem dos componentes esteroidais nas algas pardas	157
<b>Tabela 29:</b>	Resultado do experimento do efeito deterrente da fração esteroidal de <i>S. furcatum</i> sobre o anfípoda <i>P. hawaiiensis</i>	163
<b>Tabela 30:</b>	Resultado do experimento do efeito deterrente de Dc-I isolado de <i>Dictyota cervicornis</i> <sup>B</sup> sobre o anfípoda <i>P. hawaiiensis</i>	166
<b>Tabela 31:</b>	Resultado do experimento do efeito deterrente de Dm-I isolado de <i>Dictyota mertensii</i> sobre o anfípoda <i>P. hawaiiensis</i>	169
<b>Tabela 32:</b>	Gêneros constituintes da ordem Dictyotales	

	(Phaeophyta)	174
<b>Tabela 33:</b>	Gêneros constituintes da ordem Fucales (Phaeophyta)	175
<b>Tabela 34:</b>	Distribuição dos sesquiterpenos do grupo "Dictyopteris" e os locais de coleta das algas	181
<b>Tabela 35:</b>	Distribuição dos diterpenos (meroditerpenos e simples) do grupo "Taonia" e os locais de coleta das algas	184
<b>Tabela 36:</b>	Distribuição dos diterpenos do grupo "Taonia" (considerando apenas a parte diterpenoídica das substâncias) e índices taxonômicos médios	187
<b>Tabela 37:</b>	Matriz de similaridade entre as espécies dos grupos "Dictyopteris" e "Taonia"	188
<b>Tabela 38:</b>	Número total e substâncias isoladas para cada espécie de <i>Cystoseira</i> e seus respectivos tipos de esqueletos	195
<b>Tabela 39:</b>	Índices taxonômicos para as espécies de <i>Cystoseira</i>	200
<b>Tabela 40:</b>	Distribuição dos diterpenos do gênero <i>Cystoseira</i> (considerando apenas a parte diterpenoídica das substâncias)	201
<b>Tabela 41:</b>	Reunião das espécies de <i>Cystoseira</i> segundo a similaridade dos esqueletos diterpenicos mistos ou não	202
<b>Tabela 42:</b>	Índice de similaridade para as espécies de <i>Cystoseira</i>	204
<b>Tabela 43:</b>	Ocorrência e distribuição de diterpenos nos gêneros da família Cystoseiraceae	211

<b>Tabela 44:</b> Peso úmido, relação peso úmido/peso seco, peso do esterol e percentual de esteróis nas diferentes espécies analisadas	<b>225</b>
<b>Tabela 45:</b> Primeira cromatografia do resíduo II e quantidades finais de amostra para os diterpenos e frações esteroidais	<b>227</b>

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO**

## **1.1. ECOSSISTEMAS MARINHOS E INTERAÇÕES SEMIOQUÍMICAS**

O ambiente marinho é um sistema complexo controlado por vários processos físicos-químicos e biológicos. As comunidades biológicas nele existente são dependentes das relações tróficas e sexuais entre os organismos. Tal conceito indica que este ecossistema permite, a longo prazo, uma estabilidade no equilíbrio dinâmico de uma rede biológica altamente complexa<sup>1</sup>.

As interações entre os organismos no oceano concentram-se principalmente na micro-camada superficial (zona fótica), onde se encontram a maioria dos organismos unicelulares e uma rica acumulação de matéria orgânica dissolvida. As regiões mais próximas aos continentes, como os costões rochosos, muito ricos em seres bentônicos, são particularmente adequadas a estudos sobre estas interações.

Uma abordagem recente para compreender os ecossistemas é o estudo das interações entre os membros das comunidades biológicas mediadas por substâncias químicas. Esta área de estudo é uma ciência nova, originária da química de produtos naturais, que passou a ser conhecida mais recentemente por "Ecologia química marinha".

Os estudos neste campo, intensificados na década de 1980, permitiram reconhecer que a comunicação química é um fenômeno muito mais comum e de maior importância no ambiente marinho que no terrestre. A água do mar é um vetor melhor que o ar, pois permite a dissolução de substâncias orgânicas, liberadas ativa ou passivamente pelos organismos que a habitam, e que mantêm entre si um verdadeiro "diálogo químico"<sup>2</sup>.

Estas substâncias, frequentemente micromoléculas originárias do metabolismo secundário das plantas ou animais, agem como portadoras de sinais químicos provocando reações específicas em outros organismos. Neste sentido, elas se comportam como mediadoras de interações entre organismos.

Até o momento, apenas uma pequena proporção dessas substâncias teve sua atividade biológica comprovada. Entretanto, existem evidências crescentes da generalidade de seu papel em diferentes funções ecológicas<sup>2-6</sup> como, por exemplo, a participação em estratégias defensivas. Contudo, é importante ressaltar que nem todos os organismos desenvolveram mecanismos de defesa química e, neste caso, a utilização de outras estratégias alternativas tem

alcançado o mesmo objetivo.

As inúmeras interações químicas existentes no mar podem ser visualizadas, de forma bem sintética, como um ciclo, onde as moléculas orgânicas e inorgânicas circulam dentro e entre os três reinos, mineral, vegetal e animal<sup>7</sup> (Figura 1).

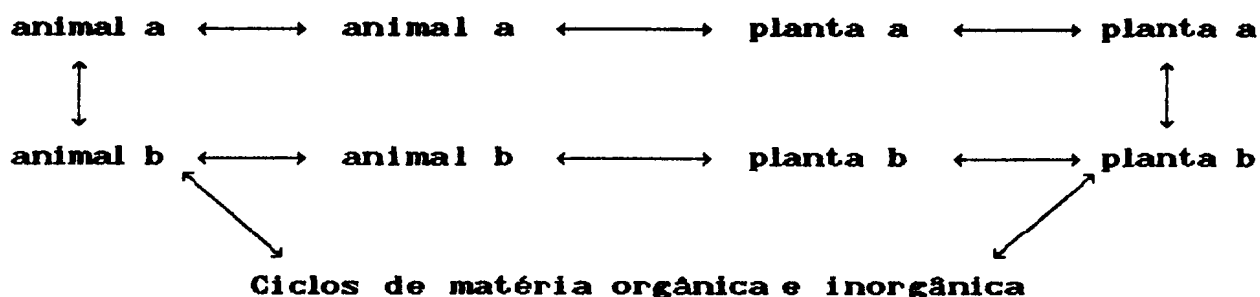


Figura 1: Esquema simplificado das possíveis interações que ocorrem na natureza (Barbier, 1981).

Estas complexas relações moleculares, descritas por Whittaker & Feeny (1971)<sup>8</sup>, e conhecidas por "Interações Semioquímicas" (interações provocadas pelas substâncias que interferem no comportamento), são separadas em dois grandes grupos (Figura 2):<sup>2,7-11</sup>

- Intra-específicas, como no caso do grande grupo de feromônios (ex: feromônios sexuais); e
- Inter-específicas, como os efeitos aleloquímicos. Estes se



dividem em:

- **Cairomônios:** são mensageiros químicos que oferecem vantagens adaptativas aos receptores da mensagem, ex: vasto número de atraentes e fagoestimulantes que ajudam os predadores encontrar sua presa, como a localização do hospedeiro pelo simbiote; e

- **Alomônios:** são mensageiros químicos que fornecem vantagens adaptativas aos organismos que os produzem, sendo produzidos frequentemente, mas não sempre, com finalidades defensivas; ex: as substâncias que são produzidas ou acumuladas nos organismos para minimizar a predação, como os mecanismos de defesas de macroalgas marinhas.

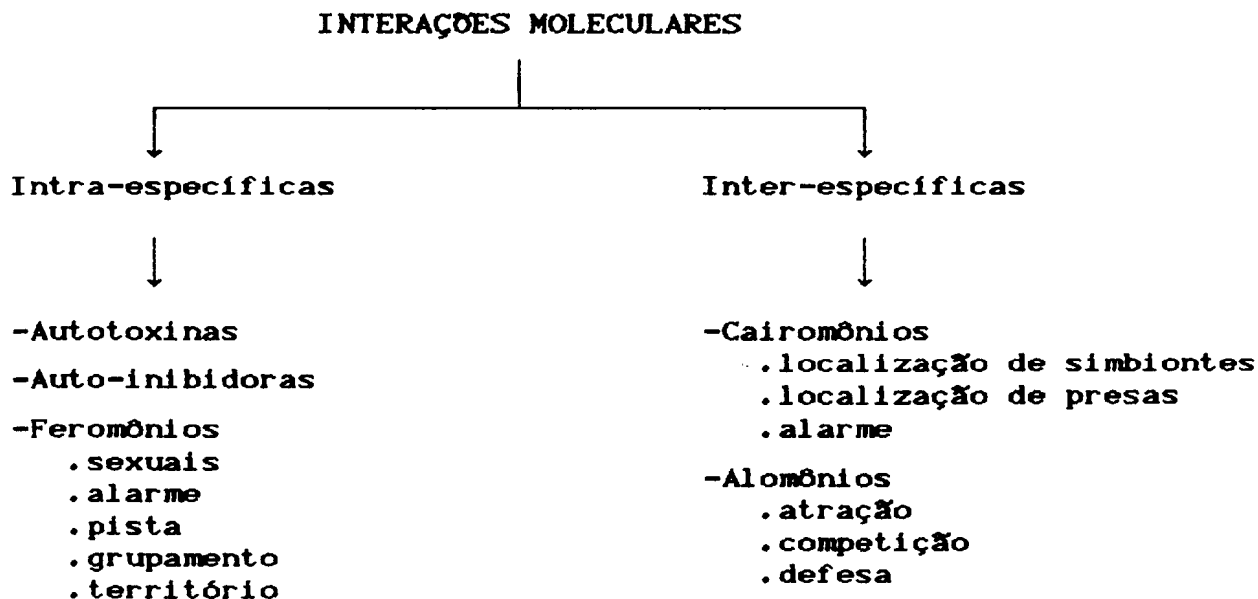


Figura 2: Interações químicas nos ambientes marinho e terrestre

Dentre estas inúmeras relações ressaltamos as peculiares interações entre os organismos pertencentes a uma importante porção da complexa rede biológica marinha: produtores primários e produtores secundários, ou seja, algas e herbívoros.

Mas que são algas? Como elas se distinguem de outros organismos clorofilados?

## 1.2. ALGAS E HERBÍVOROS

As algas constituem um grupo heterogêneo de vegetais criptogâmicos compreendendo treze grandes divisões e diversos grupos menores ainda não completamente estudados.<sup>12</sup> São organismos não vasculares que contêm *clorofila a* e possuem estruturas reprodutivas simples não protegidas por células estéreis (com exceção das Charophyceae). Seu corpo vegetal ou talo é simples, com exceção das algas pardas de grande porte que apresentam escassa diferenciação em tecidos.<sup>13</sup>

Dentre estas, as macroalgas marinhas desenvolveram grande variedade anatômica e complexidade morfológica. Embora muitas macroalgas sejam restritas a uma porção relativamente pequena nos Oceanos do Mundo, sua biomassa concentrada, sua alta

produtividade primária costeira, assim como seu papel na cadeia alimentar fazem delas importantes contribuintes para o sistema marinho.<sup>14</sup>

A intensa pressão seletiva dos herbívoros sobre as macroalgas marinhas bentônicas tropicais exerce um forte impacto em suas estruturas de comunidades, podendo até mesmo influenciar a história evolutiva do seu ecossistema.<sup>10,15,16</sup>

As algas marinhas desenvolveram vários tipos de estratégias defensivas para minimizar a atividade predatória, tais como: 1) possuir uma estrutura física resistente e impalatável (ex.: algas calcáreas e a rigidez do talo de certas algas pardas)<sup>17</sup>; 2) residir em locais que são críticos ou desfavoráveis aos herbívoros (ex.: frestas nas rochas e locais muito batidos)<sup>18</sup>; 3) exibir um ciclo de vida heteromórfico, sendo uma fase resistente (e.g.: *Laminaria*, com gametófito microscópico e esporófito grande com talo rígido)<sup>19</sup>; 4) ser imprevisível temporal e espacialmente (ex.: espécies efêmeras)<sup>20</sup>, 5) viver em associação com algas tóxicas ou impalatáveis (ex.: *Caulerpa* e dinoflagelados tóxicos)<sup>21</sup>; e finalmente, 6) produzir metabólitos secundários fagorepelentes ou tóxicos.<sup>22,23</sup>

Nos últimos vinte anos, tem sido identificado um grande número destes metabólitos biologicamente ativos de algas tropicais. Dentre os principais grupos, os representantes das Cyanophyceae (algas verde-azuladas ou cianobactérias), Chlorophyceae (algas verdes), Phaeophyceae (algas pardas) e

Rhodophyceae (algas vermelhas) têm despertado maior interesse dos fitoquímicos, taxonomistas e atualmente, em particular, dos ecologistas, que tentam compreender melhor os ecossistemas marinhos.<sup>24,25</sup>

Quais são estas micromoléculas orgânicas e biologicamente ativas? Quais as diferenças principais entre os metabólitos primários e secundários?

### 1.3. METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS

Há pouco mais de quinze anos os metabólitos secundários eram considerados simplesmente como produtos de excreção ou de detoxificação do metabolismo vegetal.

Há uma tendência hoje em dia a considerar que a separação dos produtos, com base nos caminhos biossintéticos, em metabólitos primários (essenciais à vida) e secundários (adaptativos), seja um pouco arbitrária, podendo mostrar simplesmente lacunas em nosso conhecimento sobre a função biológica dos metabólitos secundários.<sup>26</sup>

Ao longo da evolução, mutações genéticas provocaram desvios do metabolismo principal (metabolismos de proteínas,

glicídeos, lipídeos, pigmentos, nucleotídeos, etc.) que resultaram em mudanças na atividade enzimática que estão estreitamente associadas com a manifestação do genótipo.<sup>6,27</sup> Deste modo, os organismos passaram a sintetizar novos produtos que, diferentemente dos acima mencionados, não estão diretamente ligados à sua constituição e funcionamento vital.

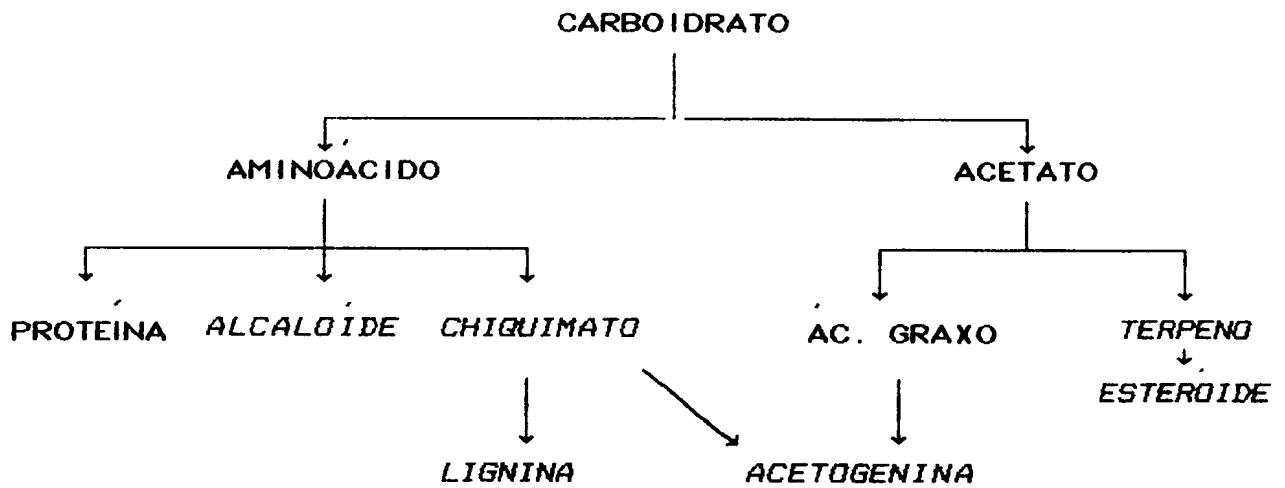
Como exemplo da rápida evolução do conceito de produtos do metabolismo secundário vegetal, atualmente é comum encontrar-se na literatura, definições comparadas entre metabólitos primários e secundários,<sup>28,29</sup> tais como:

- Metabólitos primários: universalmente distribuídos nos organismos; proporcionam essencialmente a base para o crescimento, desenvolvimento e reprodução e,

- Metabólitos secundários: distribuição mais restrita (específico) a alguns organismos; proporcionam principalmente a base para adaptação e interação com o ambiente (Figura 3).

Se por um lado, conceitos bem definidos para estes dois tipos de metabólitos são úteis didaticamente, o limite entre as duas áreas do metabolismo, no entanto, ainda é impreciso.<sup>26</sup>

Na verdade, ambos tipos de metabólitos são biossinteticamente derivados dos mesmos precursores básicos e a sobrevivência dos vegetais em um dado ambiente depende de ambos. Assim, não é mais possível, designar, inequivocamente, um produto natural como pertencente a uma das categorias. No entanto, a tradição continua e até certo ponto facilita o raciocínio.<sup>30</sup>



**Figura 3:** Relações metabólicas entre os metabolismos primários e secundários (em itálico).

Os diferentes metabólitos secundários são resultantes de uma longa pressão de seleção e podem, entre outros fatores, estar relacionados com os estágios do desenvolvimento do organismo com a suscetibilidade ao *stress* ambiental, seja este caracterizado por fatores físicos ou abióticos (intensidade de luz, alta e baixa temperatura, deficiência de nutrientes, salinidades, disponibilidade de água, etc..), e/ou com fatores bióticos (competição por espaço, predação, interações entre os diferentes organismos, etc..).

Assim, com sua grande diversidade estrutural e de atividades, estas substâncias exercem múltiplos papéis na sobrevivência dos organismos, principalmente nas regiões tropicais

e subtropicais, onde existe um aumento da pressão de predadores. Estes metabólitos parecem conferir vantagens adaptativas aos organismos produtores.<sup>10,27</sup>

A rápida evolução na conceituação dos metabólitos secundários é devida, principalmente, ao avanço do entendimento, a nível molecular, das relações bióticas das plantas com o meio ambiente, tais como: interações planta-plantas, planta-herbívoros, planta-microorganismos.

Por serem as plantas superiores seres sedentários, para muito de nós elas parecem ser passivas diante do ataque de herbívoros. Além disso, a grande disparidade de potencial reprodutivo e de recombinação genética, assim como de tempo de geração, entre herbívoros e plantas superiores, sugere que os herbívoros poderiam superar as defesas das plantas muito mais rapidamente do que as plantas sintetizariam outras defesas. Tais observações geraram uma questão fundamental quanto às interações coevolutivas e ecológicas destes grupos e têm sido, através dos tempos, a preocupação de muitos ecologistas, evolucionistas e, mais recentemente, de químicos de produtos naturais:

Como o Mundo ainda permanece verde?<sup>30</sup>

Várias possíveis respostas a este paradoxo surgiram, ao longo dos anos, na forma de teorias tentando revelar como e porquê as plantas, aparentemente em nítida desvantagem, são tão bem

sucedidas frente a seus herbívoros.

A diversidade fascinante dos metabólitos secundários vegetais, substâncias ainda pouco conhecidas na década de sessenta, estimularam os químicos, sistematas e ecologistas a pesquisarem seus diversos papéis ecológicos e evolutivos, inclusive na defesa das plantas terrestres contra os seus inimigos potenciais. Deste modo, Fraenkel (1959),<sup>31</sup> Ehrlich e Raven (1964),<sup>32</sup> Janzen (1969),<sup>33</sup> Whittaker (1970)<sup>34</sup> e Whittaker e Feeny (1971)<sup>8</sup> passaram a defender a posição que a evolução destas substâncias não era compreensível, exceto num contexto ecológico. Sugere-se que as substâncias do metabolismo secundário funcionavam como defesas contra os predadores e patógenos. Atualmente, existem propostas alternativas viáveis como a evolução destas substâncias a partir da pressão parcial de oxigênio na atmosfera.<sup>6</sup>

Comparativamente, as algas marinhas diferem das plantas terrestres principalmente pela incorporação de halogênios em seus metabólitos secundários e por não serem capazes de sintetizar os alcalóides fagorepelentes, tão comuns aos vegetais terrestres. Com algumas exceções, as cianofíceas, capazes de fixar N<sub>2</sub> são as principais algas que produzem defesas químicas nitrogenadas, como os alcalóides indólicos na família Oscillatoriaceae.<sup>4</sup>

Existem correlações entre atividade defensiva e quantidade de substâncias ("ativas") presentes, localização geográfica, e taxonomia morfológica das algas? As substâncias de



defesa são continuamente produzidas ou se acumulam nas algas?

#### 1.4. TEORIA DE DEFESA: VÁLIDA PARA SISTEMAS MARINHOS ?

Desde o aparecimento das publicações clássicas reconhecendo a importância dos metabólitos secundários das plantas na interação planta-herbívoro, a literatura tem documentado a diversidade estrutural, a distribuição, a concentração, o metabolismo e as propriedades anti-herbívoria de substâncias aleloquímicas presentes em plantas.<sup>35-7</sup>

Dentre esses vários artigos, destacam-se aqueles que propuseram os modelos teóricos desenvolvidos para explicar as diferenças nos padrões das defesas de plantas. Tais teorias foram formalizadas independentemente por Feeny (1976)<sup>38</sup> e Rhoades & Cates (1976)<sup>39</sup>, em meados da década de setenta. Embora estes grupos utilizassem diferentes argumentos, chegaram a prognósticos muito similares. Tais modelos se aproximam de uma teoria ecológica geral e suas previsões explicam de modo convincente os dados experimentais e as observações feitas nos sistemas naturais (Tabela 1, pág. 14).

**Tabela 1: Resumo da teoria de defesa dos vegetais terrestres**<sup>38-9</sup>

Aspectos das plantas	Plantas "não aparentes"	Plantas aparentes
Ciclo de vida	curto	longo
Comunidade	diversificada	simples
Chance de detecção	baixa	alta
Consequências evolutivas das defesas contra herbívoros	produção de toxinas (qualitativas)	produção de redutores de digestibilidade (quantitativa)
Concentração e custo	baixos	altos
Eficiência contra:	herbívoros especialistas	herbívoros especialistas e generalistas
Contra-adaptação	facil para os especialistas	muito difícil
Exemplos	alcalóides, cianetos, aminoácidos não protéicos, terpenos	sílica, taninos, terpenos e dureza do corpo vegetativa

Esta teoria foi chamada inicialmente por Rhoades (1979)<sup>40</sup> de "Teoria de defesa ótima", ou "Teoria da Aparência". Posteriormente, Fox (1981)<sup>41</sup> adotou simplesmente o nome de "TEORIA DE DEFESA" e este nome será também adotado neste trabalho.

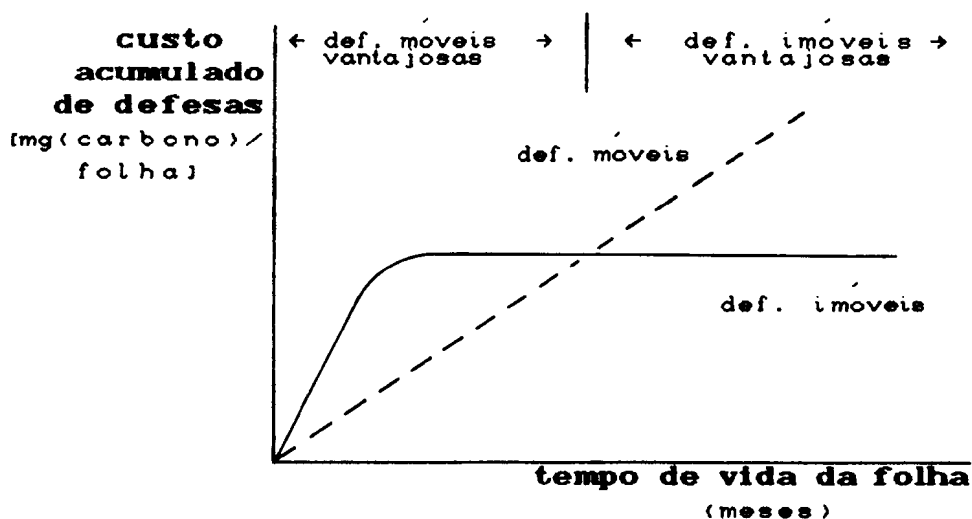
Tomados em conjunto, estes trabalhos fornecem um dos principais modelos de interação planta-herbívoro. A teoria parte do conceito de "planta aparente", aquela cujo aparecimento e localização são previsíveis ou evidentes para o predador, e tenta explicar as diferenças nas estratégias de defesas, em relação às

outras plantas. Este tipo de planta caracteriza-se também por ser invasora de comunidades pioneiras e por apresentar um longo ciclo de vida que, por sua vez, favorece a seleção de defesas generalizadas, efetivas para os herbívoros especialistas e generalistas. Tais defesas são conhecidas como reduzoras de digestibilidade, defesas quantitativas ou dependentes de dose (efetivas apenas em grandes concentrações, como os taninos), por serem complexantes de proteínas, interrompendo uma função básica dos animais, a digestão. Estas substâncias reduzem a disponibilidade dos substratos peptídicos às enzimas digestivas e, possivelmente complexam as próprias enzimas.<sup>39</sup> Deste modo, haveria pouca possibilidade de contra-adaptação da parte dos herbívoros (gasto energético muito alto para alterar o mecanismo básico da digestão). Em contraste, as plantas "não-arentes" são caracterizadas pelas formas oportunistas, que escapam da predação pela natureza imprevisível temporal e espacialmente, ou pelo seu rápido crescimento (saciando os herbívoros). Estas plantas investem grande quantidade de energia e nutrientes na reprodução. Sintetizam "toxinas" muito eficazes em baixas concentrações (defesas qualitativas, como os alcalóides) contra os herbívoros generalistas mas, em contra-partida, são facilmente evitadas pelos herbívoros especialistas, que desenvolveram mecanismos de desintoxicação.

Para avaliar os modelos vigentes, Fox (1981)<sup>41</sup> propôs que o modelo de interações coevolutivas "passo a passo" é razoável

básicamente para comunidades de plantas "não aparentes", pois tal modelo depende de números limitados de espécies. Mas, enfatiza que, em geral, a dinâmica destas espécies está ligada a caminhos muito complexos e é afetada por outras pressões ecológicas. Recentemente vários pesquisadores mostraram que uma variedade de estresses físicos influenciam a resistência de plantas a herbívoros.<sup>42-5</sup> Assim, Coley *et al*<sup>45</sup> estudaram a influência da disponibilidade de recursos do meio ambiente, tomada como um fator complementar quando consideradas as interações planta-herbívoros. Os autores observaram que as respostas evolutivas dos vegetais a recursos limitados ocorrem em etapas sucessivas e interdependentes. Taxas de crescimento vegetal lentas favorecem altas produções de defesas quantitativas com alto custo de construção inicial. Como estas substâncias (ex.: taninos) são razoavelmente estáveis, sendo retidas e não remetabolizadas nas folhas, os custos de manutenção contínua são pequenos (defesas "imóveis"). Por outro lado, as defesas denominadas "móveis", tais como os alcalóides (defesas qualitativas) estão presentes em baixas concentrações e portanto inicialmente representam um baixo custo de construção total. Entretanto, como estas substâncias são continuamente recicladas, para que as concentrações nas folhas possam permanecer constantes, ainda que pequenas, é necessário um investimento de manutenção contínuo, que se torna significativo com o tempo. Estas defesas são claramente favorecidas para folhas de vida curta. Além disso,

a alta taxa de produção das defesas móveis (recicladas metabolicamente) permite uma maior versatilidade na resistência à herbivoria (Figura 4).



**Figura 4:** Custo acumulado de defesas das folhas (grande quantidade de defesa imóvel com taxa de reciclagem desprezível comparado a pequena quantidade de defesa móvel reciclada durante toda a vida da folha) (Coley 1985).<sup>45</sup>

Estas hipóteses têm sido amplamente investigadas com o intuito de aprimorar o entendimento da distribuição e toxicidade dos metabólitos secundários. A sua avaliação requer informações detalhadas sobre a química da comunidade de plantas, aliadas aos dados da ecologia da comunidade e das interações de herbívoros com outros agentes deletérios.

Por outro lado, apenas recentemente foi estabelecido um modelo teórico sobre as estratégias evolutivas de macroalgas marinhas.<sup>2º</sup> Este modelo estabelece duas estratégias distintas (formas oportunistas e formas sucessionais avançadas) baseado em várias características morfo-fisiológicas das macroalgas (Tabela 2). Dentre estas características destaca-se a estratégia para minimizar os efeitos da herbivoria.

**Tabela 2. Modelo simplificado de estratégias evolutivas de macroalgas marinhas (Littler & Littler 1980).<sup>2º</sup>**

Formas oportunistas	Formas sucessionais avançadas
1. Colonizadoras rápidas	1. Invasoras de comunidades pioneiras
2. Talo simples	2. Talo diferenciado estrutural e funcionalmente
3. Crescimento rápido e alta produtividade primária por talo	3. Crescimento lento e baixa produtividade primária por talo
4. Alta capacidade reprodutiva. Formação de grande número de estruturas de reprodução	4. Baixa capacidade reprodutiva. Tecidos especializados para reprodução, com alta energia contida em cada propágulo
5. Alto valor calórico uniformemente distribuído por todo o talo	5. Baixo valor calórico em algumas porções do talo
6. Escapa da predação pela natureza imprevisível temporal e espacialmente ou pelo rápido crescimento de suas populações (saciando os herbívoros)	6. Reduzem a palatabilidade frente aos herbívoros pela complexidade estrutural e pela produção de defesas químicas

Nem todas as espécies de macroalgas se inserem de forma exclusiva em uma ou outra destas duas categorias. Entre as algas pardas, as representantes da família Dictyotaceae, com várias características estruturais e fisiológicas das formas oportunistas, têm sido assunto de várias investigações, dada sua grande resistência à predação e produção de defesas químicas.<sup>16,17,20</sup>

A primeira vista, pode-se prever, quanto ao papel dos metabólitos secundários, uma analogia entre o efeito de uma mesma pressão evolutiva na vegetação terrestre e na marinha.<sup>8,23</sup> Entretanto, à medida que a carência inicial de informações detalhadas sobre substâncias secundárias nas comunidades marinhas foi sendo suprida por novos estudos, algumas diferenças começaram a se evidenciar.<sup>46-48</sup>

Embora a "Teoria de Defesa" das plantas contenha hipóteses primárias auto-evidentes, seus prognósticos têm sido constantemente questionados, demonstrando a necessidade de modificações. No entanto, ela ainda serve como a base fundamental para os estudos de interações planta-herbívoros em ambos os ecossistemas.

Uma comparação das defesas químicas entre as comunidades terrestres e marinhas sugere que: a) a hipótese de diferenças fundamentais e bem definidas entre os custos e funções das defesas qualitativas comparadas às quantitativas necessita ser reavaliada;

b) o grau de especialização de pastagem nas comunidades marinhas e terrestres devem diferenciar principalmente os vários modos de dispersão dos herbívoros; c) é improvável que um modelo de coevolução simples, levando em conta somente certos herbívoros e as respectivas algas marinhas que lhes servem de alimento, seja válido para explicar as características de ambos.

Ainda não ficou claro como se comporta a taxa de reciclagem dos produtos de defesa nas algas marinhas. Espécies com baixas concentrações de defesas qualitativas podem estar sujeitas a custos altos ou baixos assim como nas defesas supostamente quantitativas. Este fato pode ser mais facilmente evidenciado com alguns exemplos: *Laurencia* (alga vermelha) produz "toxinas" potentes que são mantidas em vesículas e aparentemente são liberadas no mar somente quando sua membrana se rompe. Outras algas, como *Styopodium* (alga parda), liberam continuamente na água "toxinas" terpenoidicas que, por isso, devem ser constantemente sintetizadas. Além disso, os florotaninos de algas pardas, ao invés de serem acumulados, são continuamente liberados na água. Portanto, as algas marinhas que sintetizam florotaninos ou terpenos podem apresentar custos semelhantes de reciclagem ou manutenção, não mostrando diferenças nos custos entre as chamadas defesas qualitativas e as quantitativas.

É necessário uma reavaliação geral sobre a teoria em que afirma que os taninos ou florotaninos (reduzores de digestibilidade) são especialmente resistentes à contra-adaptação



pelos herbívoros e diferem fundamentalmente de outras substâncias defensivas. Está provado que estas substâncias diminuem a pastagem dos herbívoros, mas não é evidente ainda o modo de ação ou os efeitos fisiológicos sobre os herbívoros marinhos.<sup>46</sup>

Recentemente, muitos trabalhos têm evidenciado que a concentração e atividade das substâncias químicas estão diretamente relacionadas com a variação biogeográfica e/ou com as defesas morfológicas dos organismos marinhos.<sup>47-49</sup>

Como mencionado anteriormente, os metabólitos secundários de algas tropicais apresentam, de uma maneira geral, maior diversidade estrutural e funcional do que nos sistemas temperados.<sup>47, 50</sup> Entretanto, foi verificado que mesmo nos recifes de corais, onde a herbivoria e a diversidade de herbívoros são elevadas, os florotaninos são raros ou ausentes mesmo nas algas pardas da ordem Fucales.<sup>49, 51</sup> Ao contrário do observado neste sistema, as substâncias fenólicas são consideradas como uma das classes de defesas químicas de algas mais importantes contra os herbívoros nos mares temperados.<sup>15, 46</sup>

O efeito dos florotaninos sobre a pastagem dos herbívoros mostra uma variação significativa entre as diferentes espécies destes e diferentes tipos daqueles, sugerindo que tais substâncias não são uniformemente ativas, nem amplamente deterrentes, como suposto em muitos modelos terrestres.<sup>51</sup>

Além dos florotaninos, as ordens Dictyotales e Fucales

(algas pardas) contêm outros metabólitos secundários não-polares (ex.: terpenos) ou não-polifenólicos (ex.: fenóis prenilados). Estas substâncias são abundantes nas espécies tropicais de Dictyotales. Por outro lado, estas substâncias podem ser variáveis quantitativamente (ex.: *Sargassum*) ou até mesmo desconhecidas (*Turbinaria*). Sabe-se que algumas destas substâncias detêm a pastagem de muitos herbívoros tropicais ou temperados. Steinberg & Paul (1990)<sup>49</sup> observaram que muitos terpenos, estruturalmente similares ou não, podem ter efeitos completamente diferentes sobre o comportamento dos herbívoros.

Estes dados sugerem que os polifenóis apresentam-se em concentração muito baixa nas algas pardas tropicais não sendo eficazes contra os predadores e fazendo com que as defesas químicas nos sistemas tropicais devam provavelmente estar limitadas às grandes concentrações de substâncias lipofílicas, como no caso dos terpenos.

A importância destas defesas químicas nas algas pardas mais uma vez, parece depender da distribuição geográfica da planta estudada, do tipo de herbívoros e, frequentemente, da estrutura específica de cada molécula.

Uma explicação para a baixa produção de fenóis nestas algas em sistemas tropicais pode estar relacionada com fatores do meio ambiente. É importante lembrar que a produção dos metabólitos secundários baseados em carbono tem taxas elevadas nas áreas de alta intensidade luminosa, baixa quantidade de nutrientes

e alta pastagem, como é o caso em muitos recifes tropicais. Steinberg & Paul (1990)<sup>49</sup> sugeriram que a produção de polifenóis nestas algas é limitada pela disponibilidade de íons metálicos divalentes, necessários durante a biossíntese dos fenóis. Estes metais atuam como co-fatores para certas enzimas, como a polifenol-oxidase que, se deficientes nas águas e algas tropicais, prejudicaria a síntese dos compostos polifenólicos.

Uma diferença fundamental entre as comunidades marinhas e terrestres encontra-se no potencial de co-evolução entre estes ambientes. Os herbívoros especialistas parecem ser relativamente raros nos sistemas marinhos tropicais.<sup>47,48,52</sup> Este fato parece estar relacionado com o ciclo de vida e forma de recrutamento destes herbívoros. Os herbívoros terrestres especializados tem seus estágios adultos altamente móveis, de vida curta, sendo logo dotados para o acasalamento, dispersão e procura cuidadosa de localização para a ovoposição sobre as plantas-hospedeiras. Os jovens, menos dispersivos, são dotados para a pastagem e crescimento sobre as mesmas, onde eclodiram os ovos. Em contraste com os herbívoros terrestres, são poucos os herbívoros marinhos, já encontrados (como alguns crustáceos, por ex.: o anfípoda *Pseudamphithoides incurvaria* e moluscos, principalmente o gastrópodo *sacoglossa*) que mostraram experimentalmente algum grau de especialização de pastagem. Eles se caracterizam por sua mobilidade limitada (meso-pastadores), não passam pelo estágio larval planctônico durante o seu desenvolvimento e parecem ter um

ciclo de vida similar ou mais curto que a alga-hospedeira.<sup>52</sup>

Recentemente, vários estudos sobre as defesas químicas de algas contra os diferentes tipos de herbívoros marinhos têm demonstrado que os meso-pastadores agem seletivamente sobre as algas que não são comidas pelos peixes e que os metabólitos de algas que detêm significativamente a pastagem dos peixes podem não afetar ou até estimular a pastagem pelos meso-pastadores. A suscetibilidade à predação e limitações em sua mobilidade e tamanho parecem conduzir os herbívoros sedentários pequenos a selecionar as algas-hospedeiras como habitat e alimento apropriado. Este fenômeno pode ser análogo ao observado com certos insetos terrestres.

Estes e outros resultados mostram que seria muito precipitado traçar agora conclusões gerais sobre a teoria da coevolução nas comunidades marinhas.

Como podemos ver, a TEORIA DE DEFESA é capaz de fornecer uma moldura geral das interações alga-herbívoro, mas o estudo detalhado de cada caso revela especificidades que ainda necessitam de dados experimentais para que o quadro fique mais nítido.

O estudo dos metabólitos secundários neste contexto passa necessariamente pelos mecanismos bioquímicos de sua produção:

Quais as rotas biossintéticas predominantes para a produção destas substâncias nas algas pardas?

## 1.5. PREDOMINÂNCIA DA VIA DO ACETATO NAS ALGAS PARDAS

As interações aleloquímicas envolvem uma variedade enorme de substâncias originadas do metabolismo secundário. Entretanto, de todas as rotas biossintéticas possíveis, os organismos marinhos, entre eles as algas pardas, utilizam principalmente as substâncias originadas da via do acetato para exercer suas funções ecológicas.<sup>25</sup>

A via do acetato conduz, através de duas rotas biossintéticas distintas, às sínteses das substâncias fenólicas (caminho do malonato) e dos terpenos e esteróis (caminho do mevalonato) (Figura 3, pág. 10 e Figura 5, pág. 27).<sup>28,29</sup>

A condensação cabeça-cauda de unidades malonil com a acetil-CoA fornece uma cadeia policetídica linear, (grupos alternados de cetona (carbonila) e metileno ( $\text{CH}_2$ )). A ciclização interna destas cadeias policetídicas leva à formação de uma diversidade de compostos aromáticos (ex.: floroglucinóis). Por sua vez, acoplamentos do tipo C-C e/ou C-O-C destes fenóis podem levar à formação de inúmeros polímeros com alto peso molecular.

A descoberta da rota do ácido mevalônico (ácido 3-metil-3,5-dihidroxipentanóico) na biossíntese de substâncias esteroidais serviu de base para as pesquisas que eventualmente elucidaram os caminhos que levam à síntese de todos os tipos de substâncias terpenoidicas.

As substâncias terpenoidicas originam-se da condensação de derivados do ácido aceto-acético com acetil-CoA, conduzindo a  $\beta$ -hidroxid- $\beta$ -metilglutaril-CoA. Posteriores reduções originam o ácido mevalônico. Em seguida, o ácido mevalônico dá origem às "unidades isoprênicas" (pirofosfato de isopentenila) pela perda simultânea de água e dióxido de carbono. A isomerização enzimática do pirofosfato de isopentenila leva ao pirofosfato de dimetilalila, responsável pela reação chave na biossíntese dos terpenos. O encadeamento cabeça-cauda destes dois resíduos  $C_5$  fornece o pirofosfato de geranila, o precursor dos monoterpenos. Condensação da unidade geranila com uma unidade isopentenila resulta no pirofosfato de farnesila ( $C_{15}$ ), o precursor dos sesquiterpenos, e continuando o processo, origina-se o pirofosfato de geranilgeranila ( $C_{20}$ ), precursor dos diterpenos.

A biossíntese do esqualeno, unidade precursora dos triterpenos e, conseqüentemente dos esteróis, consiste da condensação de duas unidades farnesila através de um processo simétrico, o encadeamento "cauda-cauda". A ciclização de 2,3-epoxiesqualeno a lanosterol ou cicloartenol requer uma série de rearranjos do tipo 1,2 de grupos metila e átomos de hidrogênio.

Muitas substâncias encontradas nos organismos marinhos, como as algas pardas, provêm da combinação da via do malonato com a do mevalonato. Frequentemente bioativos, são conhecidos como substâncias de origem biossintética mista ou meroterpenos.

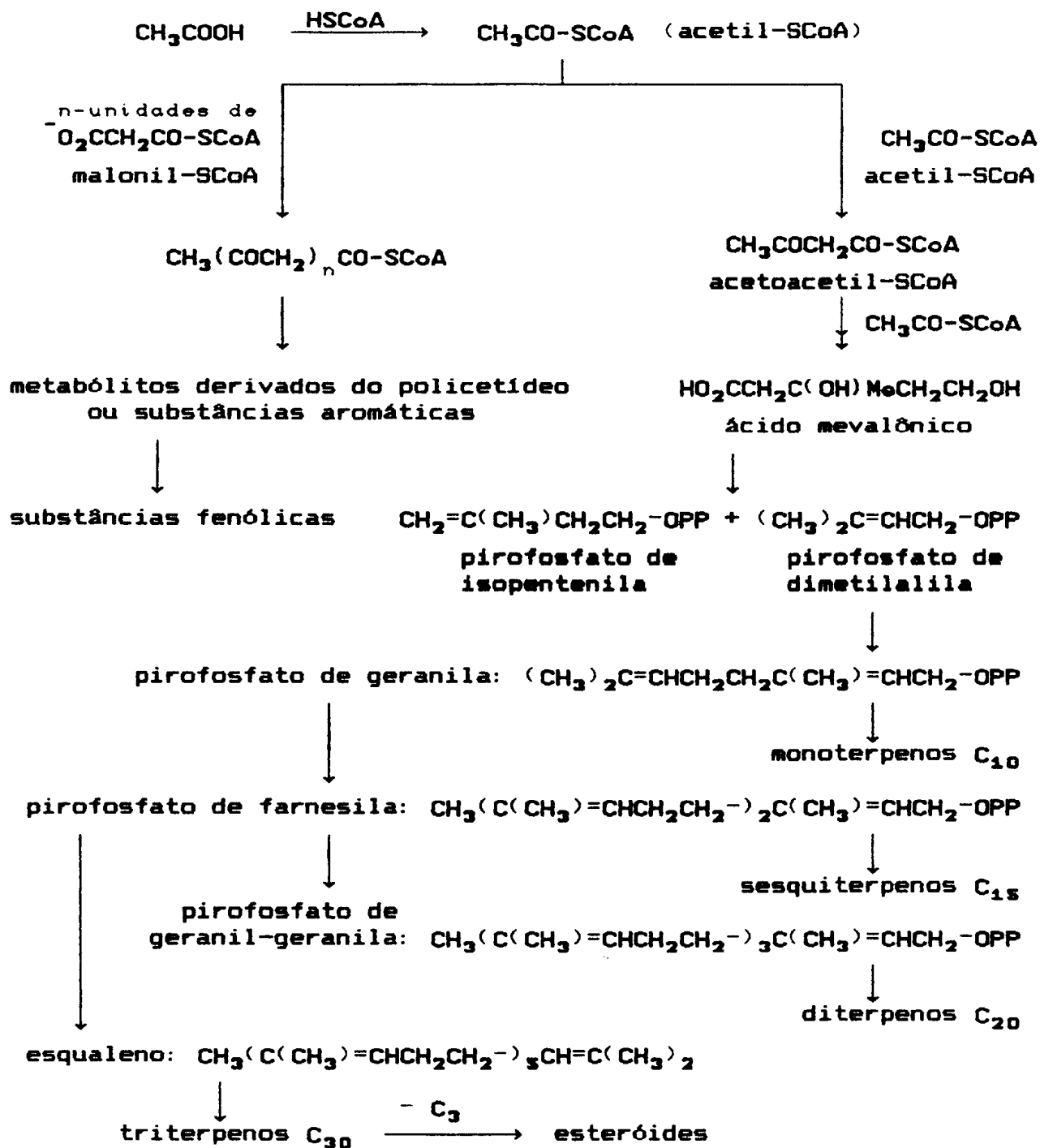


Figura 5: Esquema biossintético simplificado da produção de fenóis, terpenos e esteróides

## 1.6. PRODUTOS NATURAIS DE ALGAS PARDAS

### 1.6.1. Substâncias fenólicas

Muitas macroalgas bentônicas produzem diferentes metabólitos secundários biologicamente ativos principalmente nos ecossistemas marinhos tropicais e subtropicais. Dentre esses, os terpenos parecem ser especialmente abundantes e ativos nas algas pardas. Vários trabalhos de campo e laboratório com estas algas demonstraram que os diterpenos, e em menor extensão, os sesquiterpenos, desempenham um papel importante como defesa química contra predadores nestes sistemas. Por outro lado, mais recentemente verificou-se que os florotaninos se mostram ativos apenas em alta concentração.<sup>51</sup> De uma maneira geral, estes resultados indicam que tais substâncias parecem estar relacionadas com a evolução adaptativa das algas podendo, deste modo, acompanhar a filogenia.

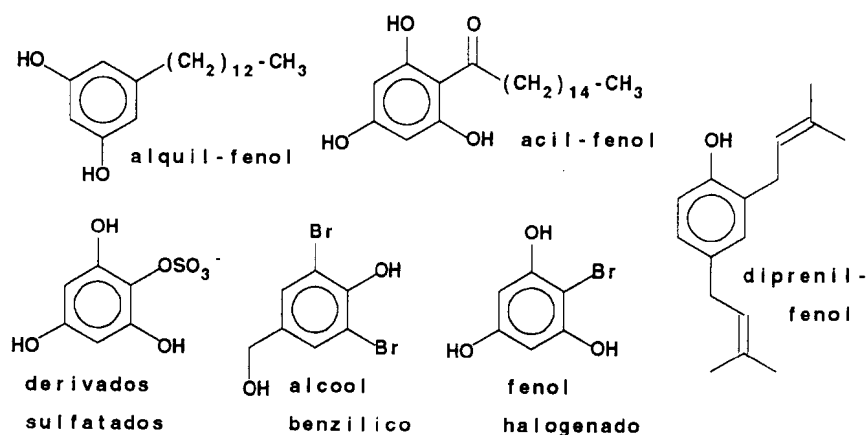
A literatura relata para diversas ordens de algas pardas, principalmente de regiões temperadas, altos teores de substâncias fenólicas derivadas do floroglucinol (de <1 a 15%), que parecem atuar como redutores de digestibilidade nos herbívoros marinhos.<sup>53</sup> As ordens Fucales e Laminariales mostram claramente essa tendência, apresentando 72% e 39%, respectivamente, do total de florotaninos conhecidos em algas pardas. Já no caso de algumas espécies brasileiras, os baixos valores de concentração



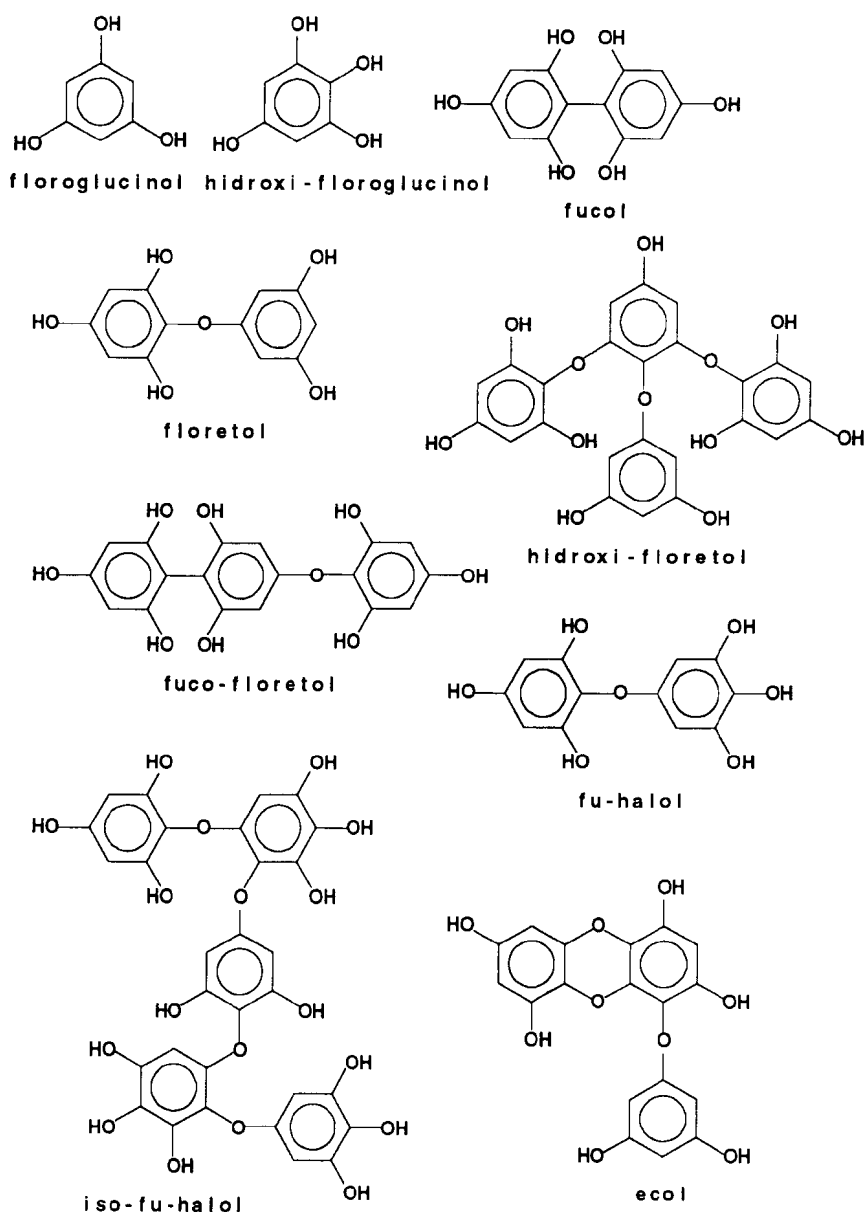
encontrados não as protegem contra a ação dos predadores.<sup>51</sup> Alguns pesquisadores<sup>47, 51</sup> sugerem uma tendência de evolução biogeográfica, com maior expressão e funcionalidade dos florotaninos e fenóis das algas pardas em regiões temperadas.

Uma recente revisão mostrou o papel destas substâncias como defesa e propôs o seu uso como marcadores taxonômicos das feofíceas.<sup>51,54</sup>

Esta revisão evidenciou também, a distribuição de 110 derivados fenólicos como o floroglucinol, hidroxí-floroglucinol, fucóis, floretóis, hidroxí-floretóis, fuco-floretóis, fu-halóis, iso-fu-halóis, ecóis, alquil-fenóis, acil-fenóis, derivados halogenados, halo-floroglucinóis, halo-floretóis, halo-ecóis, alcoóis benzílicos, prenil-fenóis e derivados sulfatados (Figura 6, págs. 29 e 30) em oito diferentes ordens distintas de algas pardas (Phaeophyceae).



**Figura 6:** Derivados fenólicos de algas pardas



**Figura 6 (cont.): Derivados fenólicos de algas pardas**

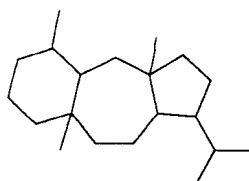
Dentre estas ordens, como mencionado acima, as **Fucales** e as **Laminariales** destacaram-se por serem as mais ricas na produção deste tipo de metabólito. Elas apresentaram 12 (fuco-floretol e fu-halol, como dominantes) e 10 substâncias (ecol, dominante e restrito a esta ordem ) dos 17 tipos de fenóis encontrados nas algas pardas, respectivamente. As **Dictyotales** caracterizaram-se principalmente pela produção dominante de acil-fenol (somente encontrado nesta ordem e em **Fucales**) e de floroglucinol, fucol, floretol, e derivados sulfatados em menores proporções. As demais ordens, como **Chordariales**, **Scytosiphonales**, **Sphacelariales**, **Ectocarpales** e **Sporochnales** restringem-se à produção de floroglucinol, ou prenil-fenol, ou derivados sulfatados.

### 1.6.2. Terpenos

A ordem **Dictyotales**, principal produtora de terpenos, consiste de algas típicas de mares de águas quentes. Esta ordem compreende 16 gêneros pertencentes a uma única família, **Dictyotaceae**.<sup>55</sup> A análise fitoquímica de seus representantes tem revelado grandes diferenças entre eles e permite agrupá-los em, pelo menos, três grupos químicos, de acordo com seus constituintes químicos: "Dictyota", "Dictyopteris" e "Taonia."<sup>56,57</sup>

O grupo "Dictyota" consiste de plantas morfologicamente semelhantes pertencentes aos gêneros *Dictyota*, *Dilophus*,

*Glossophora*, *Pachydictyon*, *Spatoglossum* e *Stoechospermum*, todas produtoras de diterpenos policíclicos com esqueletos exclusivos de organismos marinhos (ex.: 1, esqueleto dolastano, de alguns produtos isolados de *D. cervicornis*).



1

Dentre os gêneros deste grupo, *Dictyota* tem sido o mais estudado, dada a sua grande distribuição geográfica e a sua grande resistência à predação e produção de defesas químicas.<sup>16,50</sup> Os diterpenos isolados do gênero *Dictyota* e do grupo "Dictyota" foram objeto de recentes revisões sobre sua biossíntese e distribuição nas espécies.<sup>58-9</sup> Além disso, vários trabalhos têm evidenciado a preferência alimentar de certos moluscos herbívoros por estas algas, revelando a presença de uma cadeia alimentar específica entre estes organismos.<sup>60-1</sup> *Dictyota* apresenta dezesseis dos vinte e três tipos de esqueletos encontrados em todos os representantes de Dictyotales. Estes esqueletos foram divididos em três grupos, relacionados entre si, pela primeira ciclização do precursor t,t,c-geranilgeraniol como demonstrado na Figura 7 (pág.

33). Na costa brasileira foram isolados um total de 19 diterpenos deste gênero (Figura 8, pág. 34).<sup>62-5</sup>

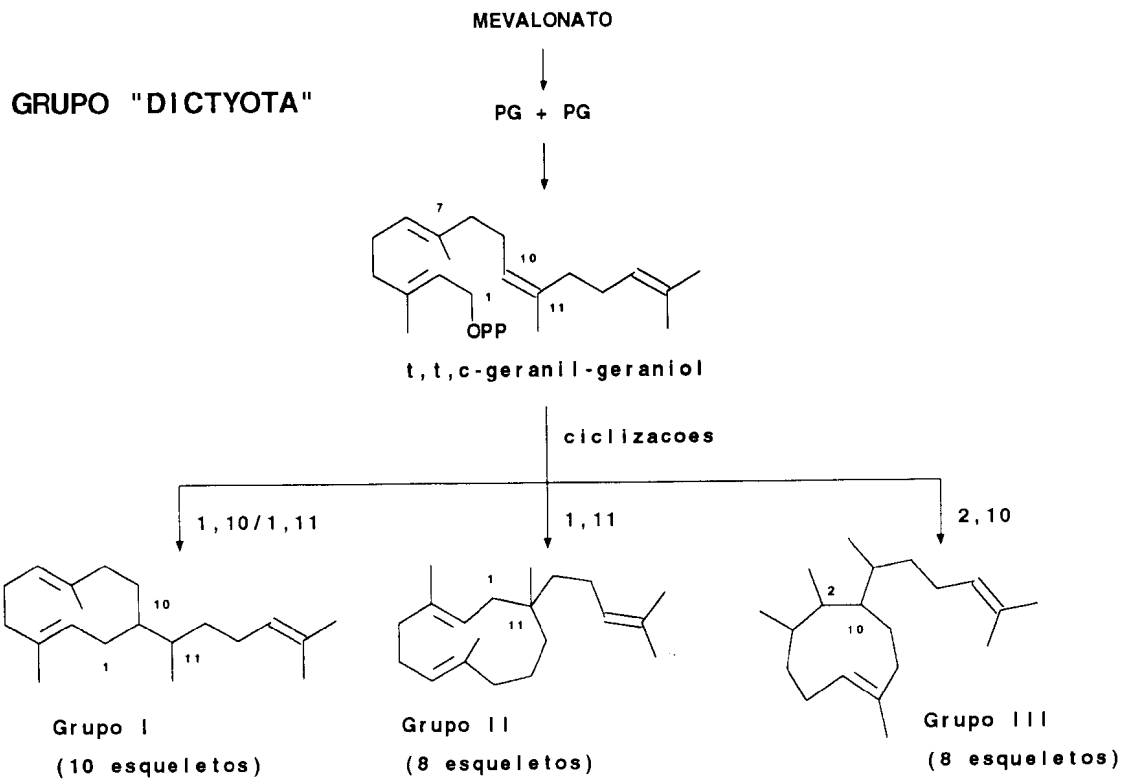
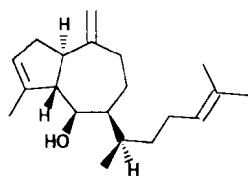
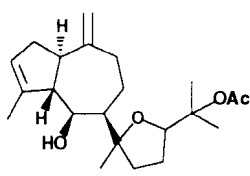


Figura 7: Proposta biogénica dos diterpenos de *Dictyota*<sup>58</sup>

GUAIANOS

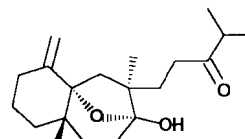
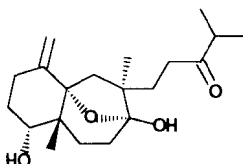
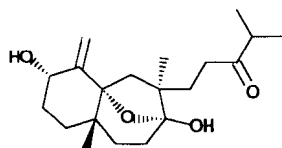


pachydictyol A (\*)

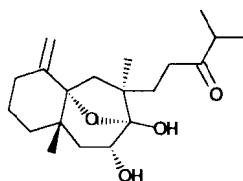
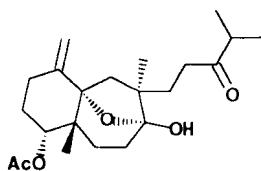


dictyol H (\*)

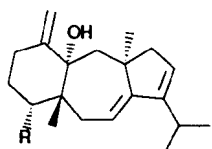
SECODOLASTANOS



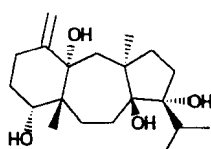
(estrutura proposta)



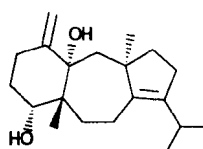
DOLASTANOS



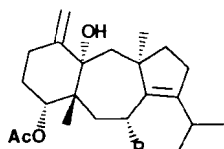
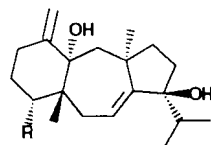
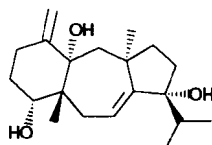
R = H (\*), OH (\*), OAc



R = OH, OAc



(estrutura proposta)



R = OH, OAc

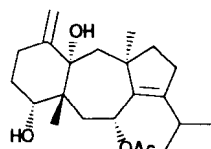
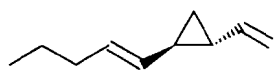


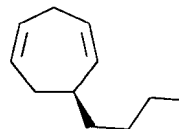
Figura 8: Diterpenos isolados de algas pardas da costa brasileira (\* : substâncias isoladas neste trabalho)

O grupo "Dictyopteris" inclui somente os representantes do gênero *Dictyopteris*. Este grupo têm apresentado um quadro bastante heterogêneo. A maioria, entretanto, produz hidrocarbonetos odoríferos<sup>66-7</sup> e substâncias contendo enxofre.<sup>68</sup>

Os hidrocarbonetos odoríferos mais conhecidos como atrativos de gametas (feromônios sexuais) são responsáveis pelo processo reprodutivo em algumas espécies<sup>69</sup> (2 e 3, isolados de *Dictyopteris spp*). A produção destas substâncias pelas algas pardas faz parte de um dos exemplos mais espetaculares no mundo marinho em relação às respostas biológicas induzidas por mensagens químicas.



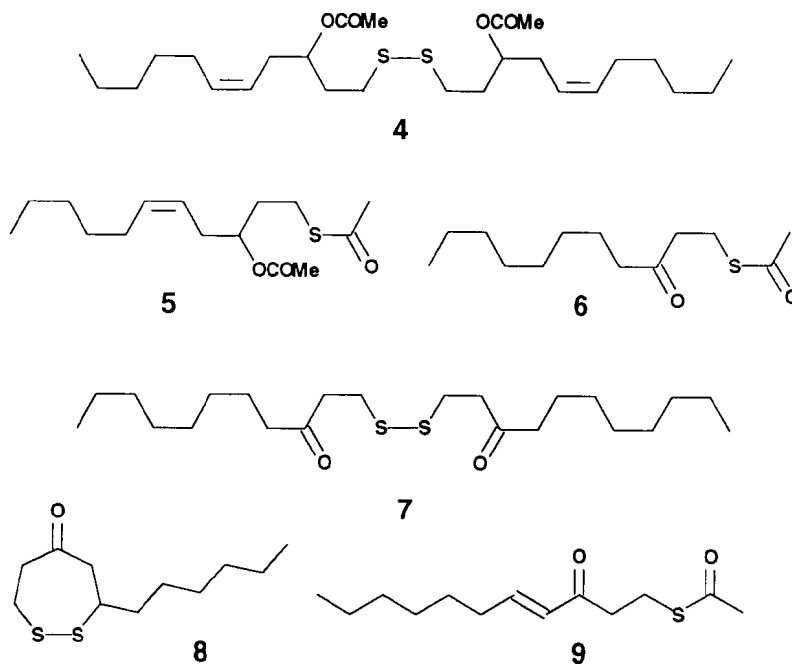
2



3

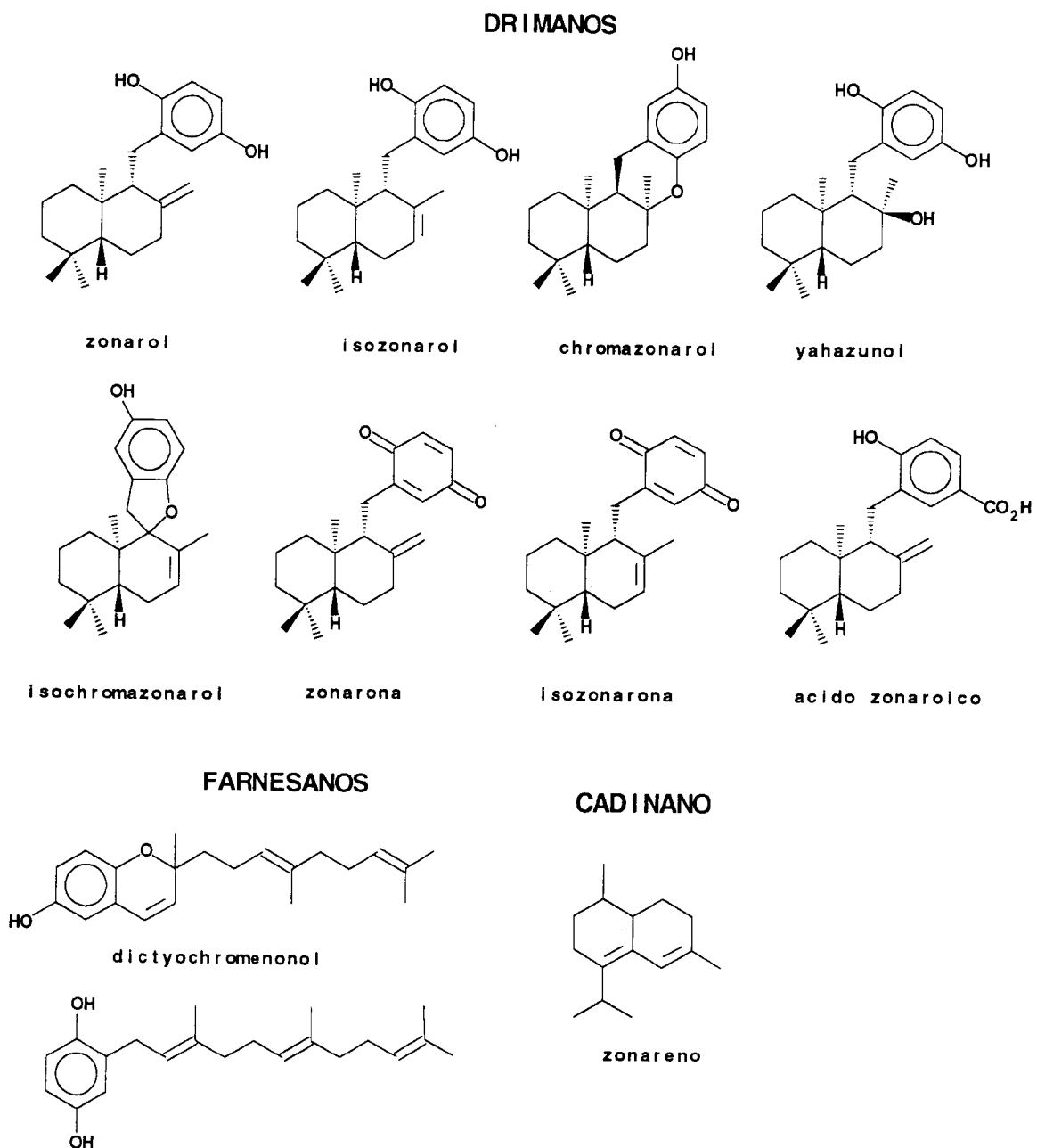
Todos os metabólitos contendo enxofre, como os dissulfetos e tio-ésteres (4 a 9, isolados de *D. plagiogramma* (Montagne) Vickers e *D. australis* (Sonder) Askenasy) possuem uma unidade C<sub>11</sub> fixada ao enxofre com um oxigrupo no C<sub>3</sub> e estão, obviamente, relacionados com os hidrocarbonetos. Devido às suas abundâncias em algumas espécies, essas substâncias, de odor

característico podem ter alguma importância como estratégia defensiva. Futuros estudos poderão confirmar esta hipótese.

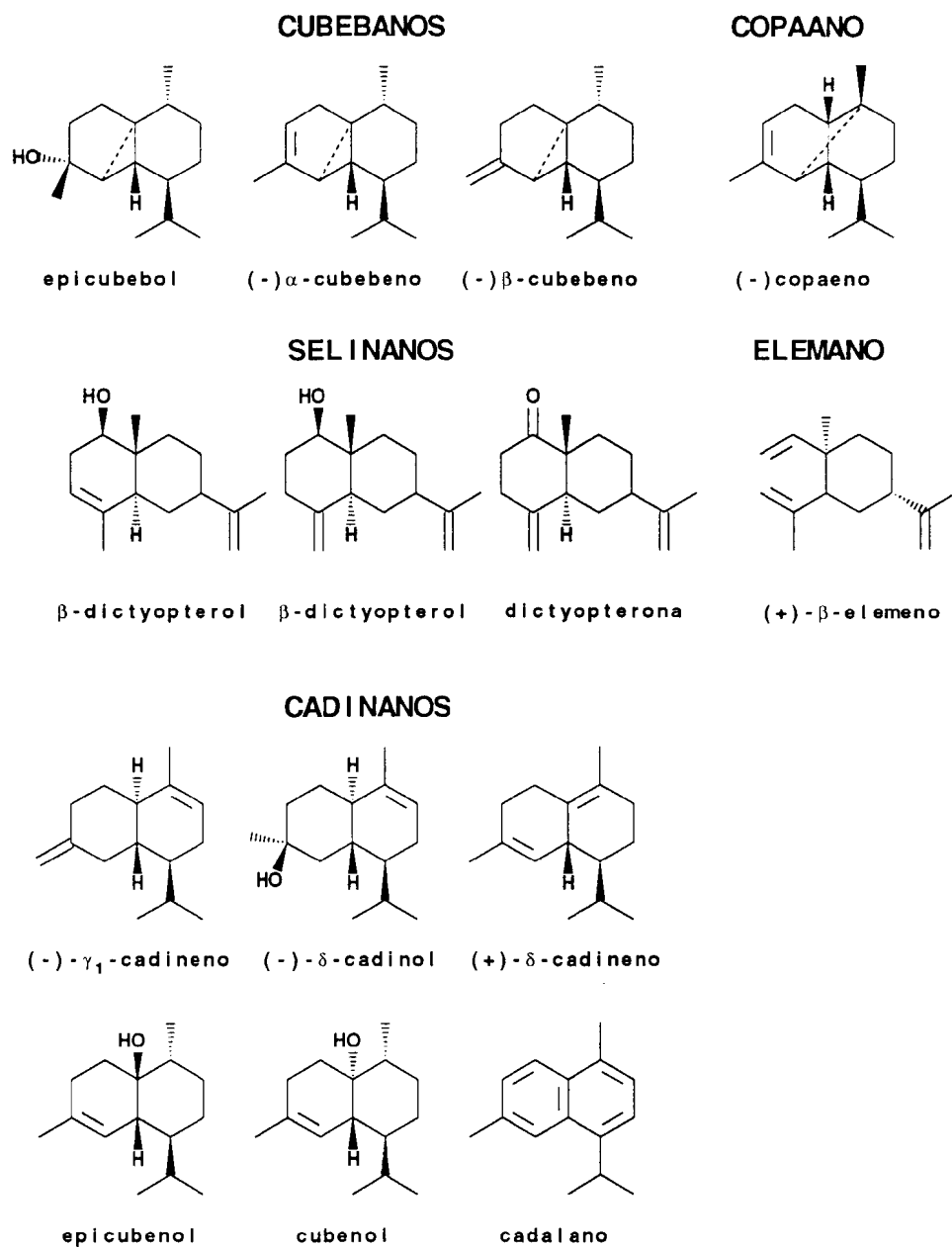


Diferentes da grande maioria das espécies, *D. zonarioides* e *D. divaricata* têm exibido sesquiterpenos de origem biossintética mista<sup>70-5</sup> (com uma única exceção, o zonareno (Figura 9, pág. 37))<sup>76</sup> isolados de *D. zonarioides* (= *D. undulata*) e sesquiterpenos simples,<sup>77-9</sup> como os da Figura 10 (pág. 38) isolados de *D. divaricata*.



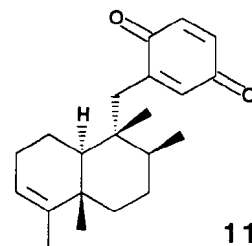
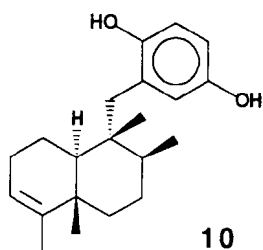


**Figura 9: Metabólitos característicos de *Dictyopteris zonarioides***

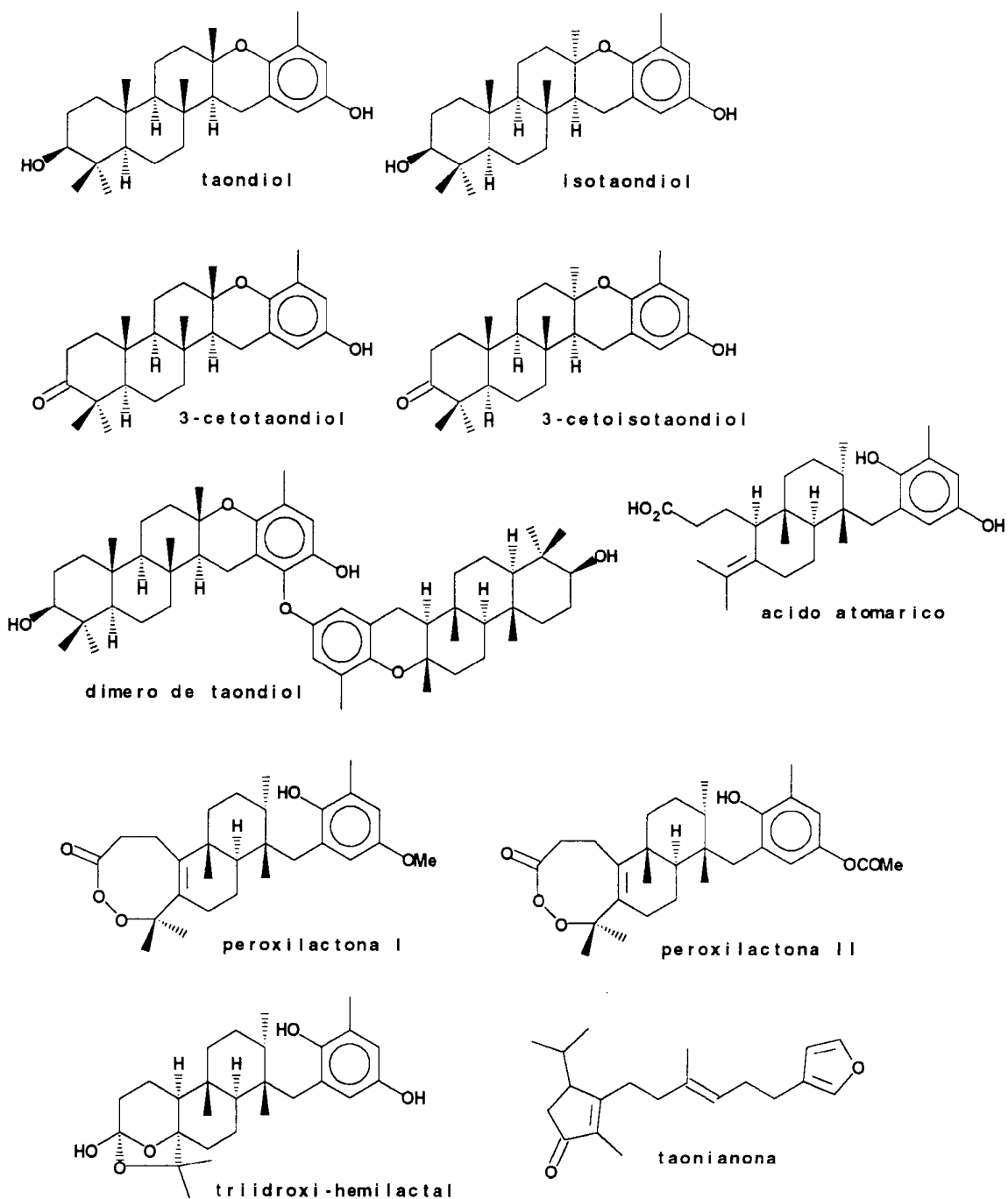


**Figura 10: Metabólitos característicos de *Dictyopteris divaricata***

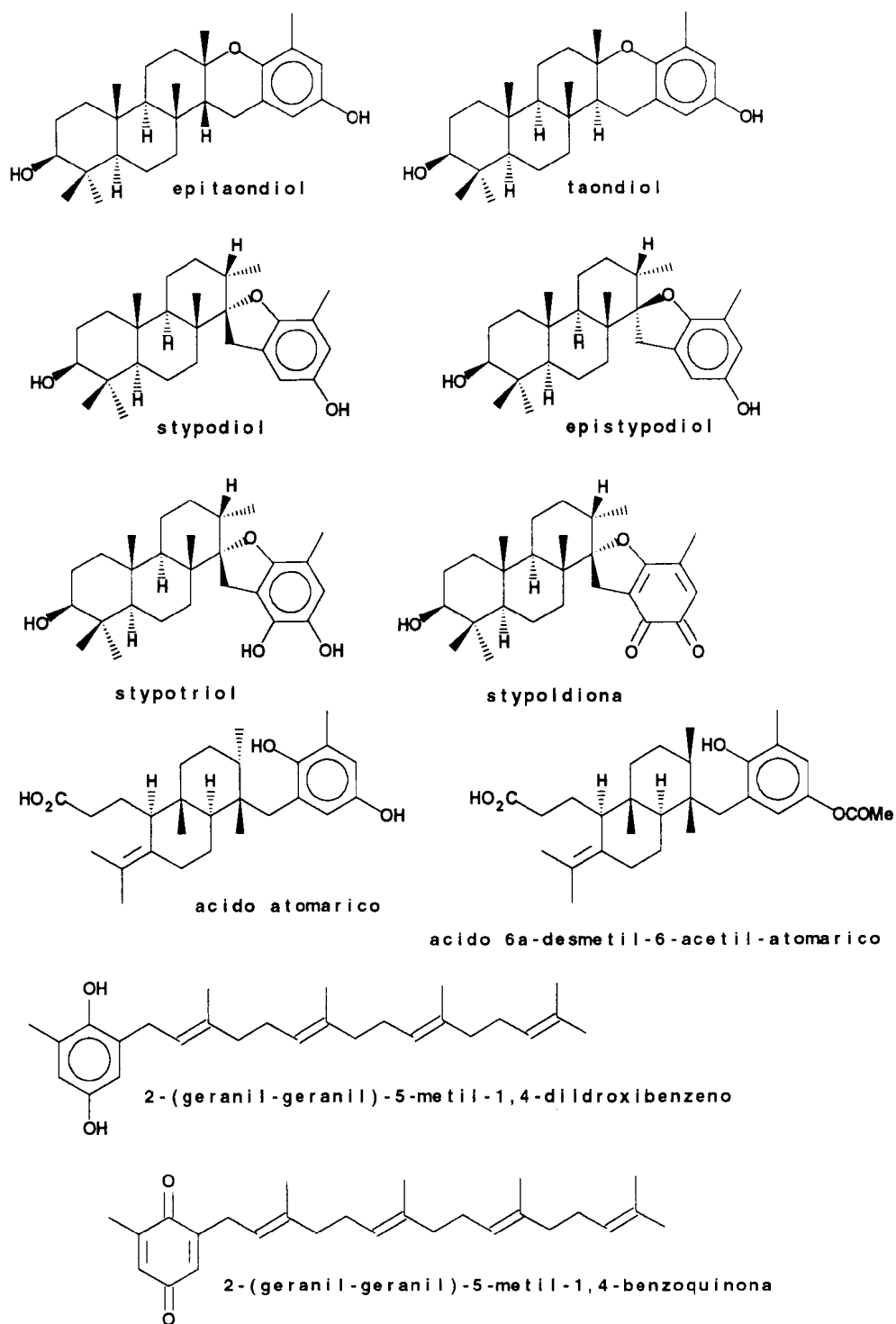
Alguns autores têm sugerido um papel defensivo para estas substâncias e a íntima relação com uma série de metabólitos chromazonaróis de esponja marinha.<sup>70</sup> O avarol (10) primeiramente isolado de *Dysidea avara* (esponja) apresenta uma forte atividade citostática, reduzindo 50% do crescimento das células de linfomas de ratos ("in vitro") na concentração de 0.9  $\mu$ M. Estes resultados têm incentivado a investigação do avarol e do seu produto de oxidação, a avarona (11), como possíveis inibidores da replicação do retrovírus da AIDS (síndrome de imuno-deficiência adquirida).<sup>80</sup>



Ao contrário das espécies de *Dictyopteris*, o grupo "Taonia", que compreende os gêneros *Taonia*<sup>81-86</sup> e *Stypopodium*<sup>87-90</sup>, apresenta distribuição geográfica mais restrita, e apenas o gênero *Stypopodium* tem ocorrência registrada no Brasil.<sup>91</sup> Os representantes deste grupo são principalmente produtores de diterpenos de origem biossintética mista ou meroditerpenos (com uma única exceção para *Taonia*, a taonianona) (Figura 11, pág. 40 e Figura 12, pág. 41) *S. zonale* é fonte de potentes substâncias ictiotóxicas, como stypoldiona e stypotriol (Figura 12, pág. 41).



**Figura 11: Metabólitos característicos de *Taonia***



**Figura 12: Metabólitos característicos de *Styopodium***

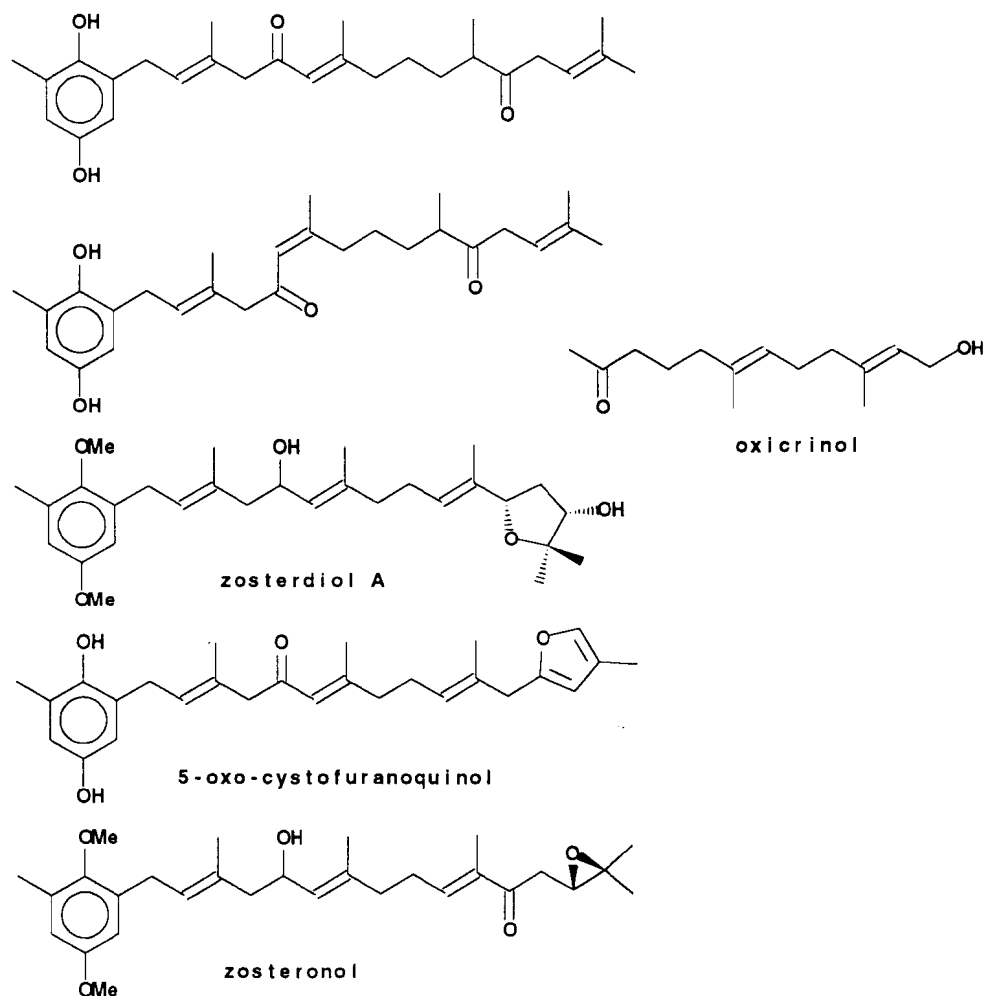
Apesar da proposta anterior de dividir a ordem Dictyotales em três grupos de gêneros (grupos "Dictyota", "Dictyopteris" e "Taonia"),<sup>56</sup> dados da literatura<sup>92</sup> indicam a formação de um quarto grupo, o grupo "Zonaria", com constituintes químicos totalmente diferenciados dos demais. Este "grupo" compreende os gêneros *Lobophora* e *Zonaria* (Dictyotaceae, Dictyotales), ambos produtores de acetogeninas fenólicas (Figura 6, págs. 29 e 30). Entretanto, é interessante ressaltar que homólogos destes lipídeos fenólicos foram recentemente isolados de algumas espécies de *Cystophora* (Cystoseiraceae, Fucales),<sup>93</sup> apesar destas não se relacionarem taxonomicamente com os gêneros citados acima.

Outra ordem bastante investigada quimicamente é a Fucales. De acordo com Papenfuss (1977),<sup>55</sup> os representantes desta ordem compreendem 7 famílias, entre as quais se destacam *Cystoseiraceae* e *Sargassaceae* pela grande produção de metabólitos diterpenoídicos de origem biossintética mista.<sup>93-101</sup>

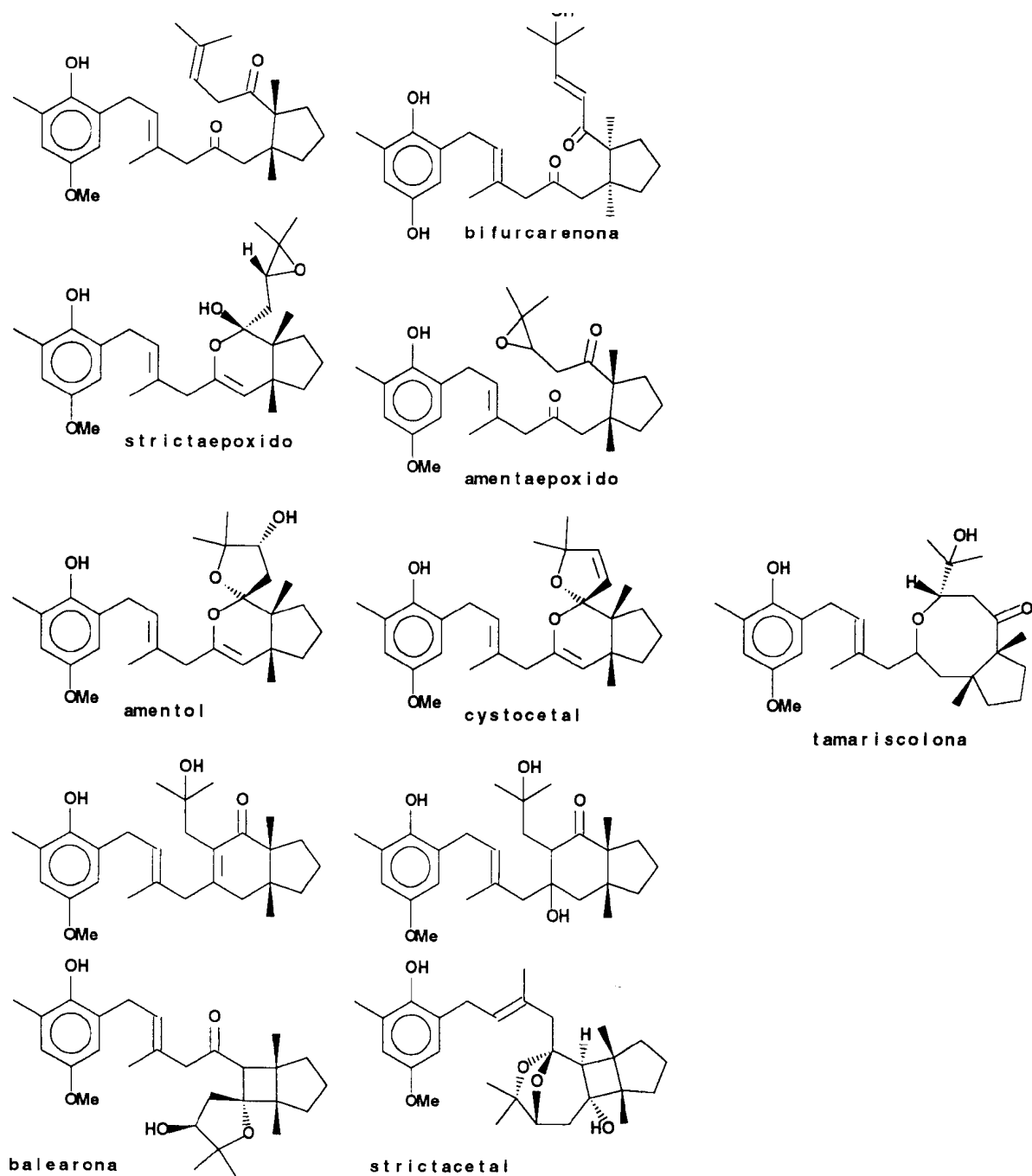
A família *Cystoseiraceae* inclui 13 gêneros distribuídos em diversas regiões do mundo. Dentre estes, foram estudados fitoquimicamente os gêneros *Cystoseira* (21 spp. 94 substâncias), *Cystophora* (5 spp. 24 substâncias), *Bifurcaria* (2 spp. 7 substâncias) e *Halidrys* (1 sp. 6 substâncias).

O gênero *Cystoseira*, típico do Mar Mediterrâneo, apresenta cerca de 40 espécies, das quais 30 subdividem-se em sub-espécies, variedades e formas.<sup>102</sup> Vários apresentam alta

plasticidade morfológica, o que dificulta o estabelecimento de limites de separação entre as espécies e as variedades. Talvez tal diversidade reflita uma alta capacidade adaptativa que pode, pelo menos em parte, ser atribuída à habilidade destas algas de produzir uma variedade de diterpenos derivados dos precursores do tipo tetraprenil-toluquinona (Figura 13a-c, págs. 43-45).

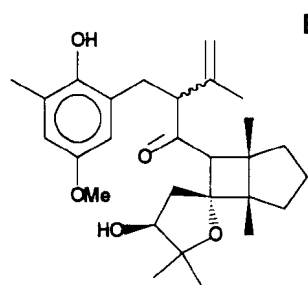


**Figura 13a:** Alguns metabólitos de *Cystoseira*



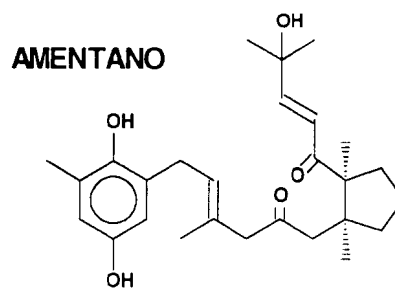
**Figura 13b: Algunos metabolitos de *Cystoseira***





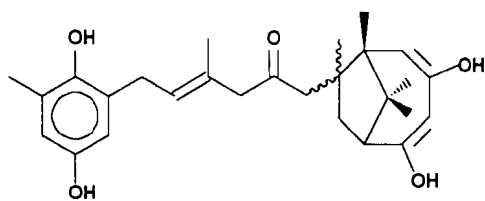
neobalearona  
e  
epineobalearona

**BALEARANOS  
IRREGULARES**

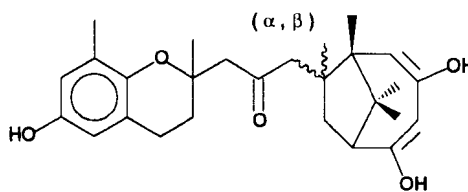


bifurcarenona

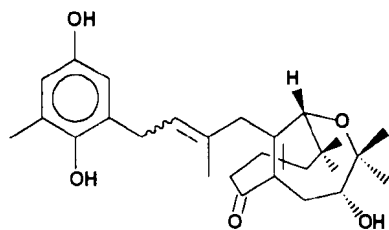
**MEDITERRANOS**



mediterraneois A e B

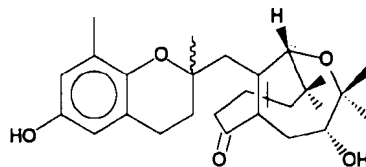


mediterraneois C e D

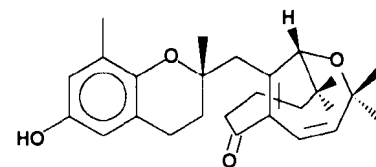


cystoseirois D e E

**CYSTOSEIRANOS**



cystoseirois B e C



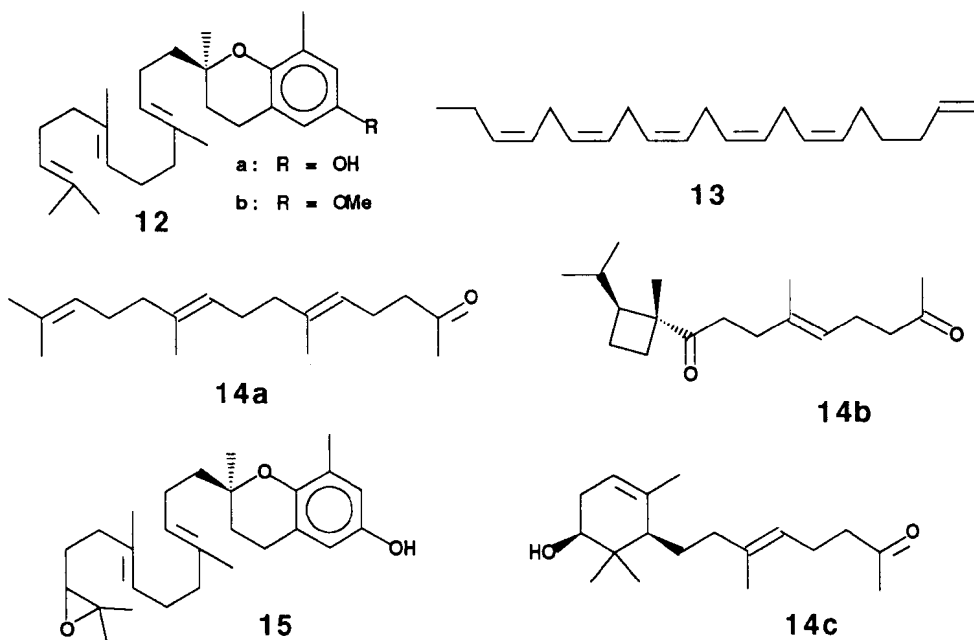
cystoseiroi A

**Figura 13c: Alguns metabólitos de *Cystoseira***

Combaut et al (1981)<sup>103</sup> relataram a existência de variação sazonal na produção de metabólitos diterpenóidicos da espécie *C. elegans*. Diterpenos acíclicos foram observados apenas durante a fase inicial de crescimento, desaparecendo logo no princípio do período quente do ano, coincidindo com o início da produção dos diterpenos fenólicos. Este fato é surpreendente, já que a maioria dos microorganismos sintetiza e estoca seus metabólitos secundários apenas nos últimos estágios do desenvolvimento, antes de entrar em repouso.

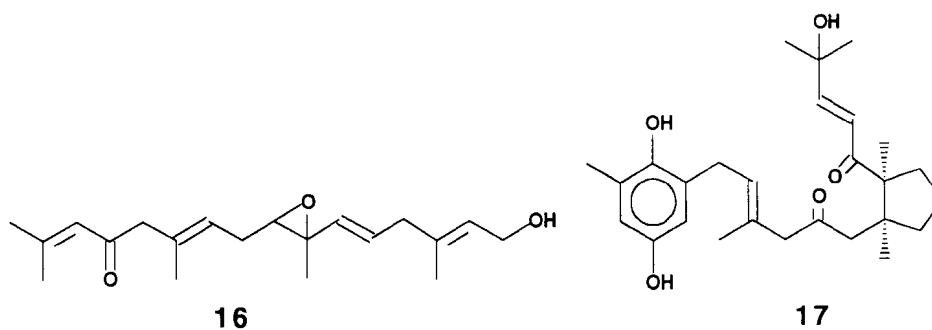
As espécies de *Cystophora* (Australasia) caracterizam-se pela grande diversidade de metabólitos.<sup>99,104-109</sup> *C. expansa* e *C. platylobium* são extremamente ricas em  $\delta$ -tocotrienol (12a), mas também sintetizam acil-fenóis (Figura 6, págs. 29 e 30), *C. torulosa* produz pequenas quantidades de éter metil de  $\delta$ -tocotrienol (12b), polienos (13) e é rica em alquil-fenóis (Figura 6); *C. congesta* apresenta acil-fenol como o metabólito principal. Ao contrário destas espécies, *C. moniliformis*, considerada taxonomicamente bastante diferente das demais espécies,<sup>105-106</sup> produz apenas derivados de farnesil acetona (14a-c). Estes derivados biologicamente ativos são supostamente "norditerpenos", formados a partir dos tocotrienóis por clivagem oxidativa das ligações C-C.<sup>110</sup> Por outro lado, Gregson (1977)<sup>104</sup> evidenciou que as substâncias  $\delta$ -tocotrienol (12a) e seu epóxido (15) são poderosos atraentes da larva nadante (hidróide) de *Coryne uchidai*. Portanto, foi surpresa notar que várias coleções de

*Cystophora torulosa* da Australásia eram desprovidas de tais simbioses. Deste modo, por algum motivo ainda desconhecido, estas substâncias não parecem atuar como atraentes específicos sobre *C. torulosa* neste sistema.

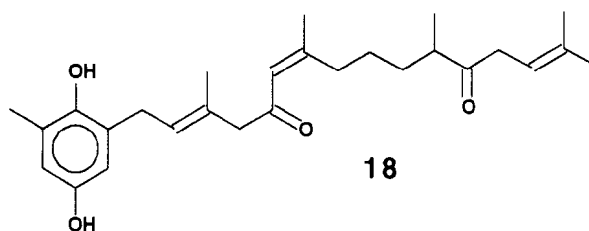


Investigações químicas das espécies de *Bifurcaria* mostraram a presença de metabólitos específicos e diferenciações geográficas entre eles. Enquanto *B. bifurcata* sintetiza diterpenos lineares no Atlântico<sup>111-114</sup> (16), *B. galapagensis* das Ilhas Galápagos, no Pacífico, é produtora de um meroditerpeno irregular, bifurcarenona<sup>115, 116</sup> (17) com propriedades antibacteriana e antineoplásica. Além de *B. galapagensis*, esta substância foi encontrada apenas nas espécies de *Cystoseira*

produtoras de meroterpenos irregulares (*C. mediterranea*, *C. stricta* e *C. tamariscifolia*).<sup>117,118</sup>



A única espécie de *Halidrys* estudada (*H. siliquosa*, Atlântico) caracteriza-se pela produção de meroditerpenos acíclicos (ex.: 18).<sup>119</sup>

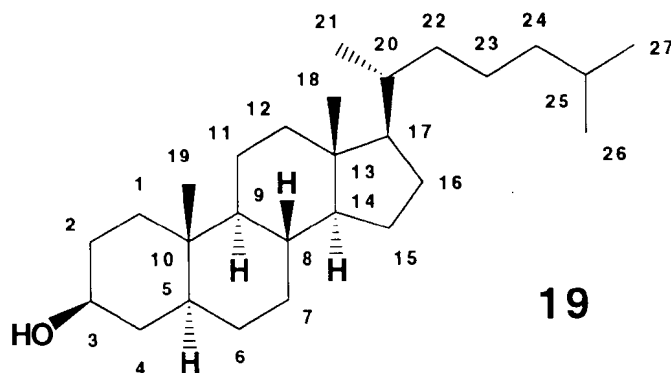


A família Sargassaceae compreende 7 ordens (6 gêneros), destas o gênero *Sargassum*, único representante no Brasil, é o mais estudado. Enquanto *S. tortile*<sup>100, 120-122</sup> produz principalmente derivados de tocotrienóis (12) ou farnesil-acetona acíclica (14), *S. micracanthum*<sup>123</sup> sintetiza apenas derivados de farnesil-acetona.

### 1.6.3. ESTERÓIS

O interesse por metabólitos esteroidais de origem marinha tem crescido nos últimos anos, principalmente devido ao isolamento de novas substâncias com enorme variedade estrutural, desconhecidas em fontes terrestres que, por sua vez, levaram a novos questionamentos sobre sua biossíntese e funções biológicas.<sup>124</sup>

Os esteróis são micromoléculas de 27 a 29 átomos de carbono pertencentes ao grupo dos esteróides apresentando, portanto, como esqueleto básico, um sistema tetracíclico (ciclopentano-peridrofenantrênico) substituído no carbono 17 por uma cadeia lateral acíclica de 8 a 10 ou mais átomos de carbonos (ex.: 5 $\alpha$ -colestano-3 $\beta$ -ol, **19**, esqueleto colestano).



Os fitosteróis típicos contêm um substituinte alquila no C<sub>24</sub> da cadeia lateral, derivados de reação de transmetilação a partir de metionina. Porém nas últimas décadas, vários autores relataram a presença de esteróis "não-convencionais" (com 26 a 30

átomos de carbono, envolvendo diferentes padrões de alquilações e insaturações na cadeia lateral, modificações no núcleo tetracíclico e polioxigenações nos anéis e/ou na cadeia lateral) em invertebrados marinhos, principalmente nos celenterados, por exemplo, as esponjas e os equinodermas.<sup>125-129</sup>

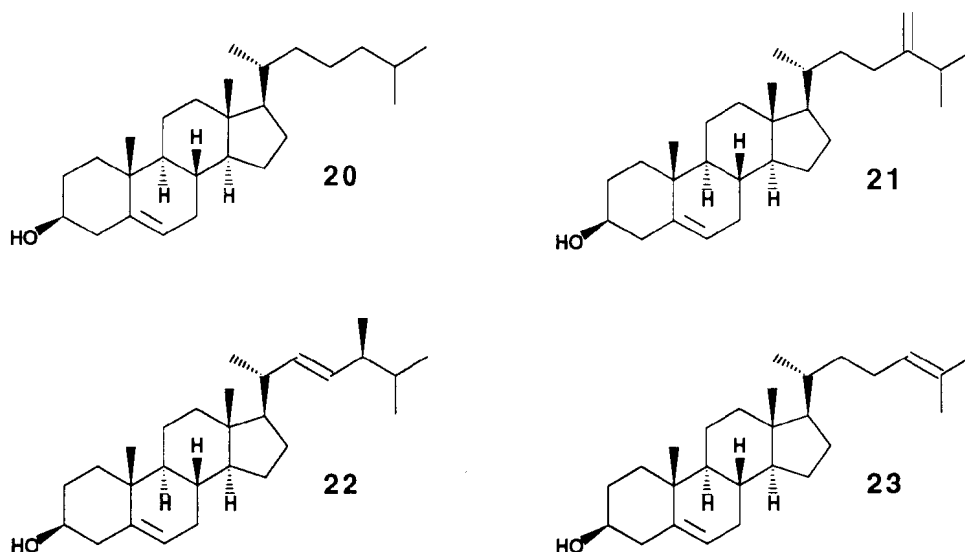
Os esteróis são amplamente distribuídos na Natureza. Participam de processos bioquímicos como intermediários na biossíntese de hormônios e outras substâncias, e desempenham um papel fundamental na constituição das membranas celulares.<sup>130-133</sup> Eles também têm sido considerados bons marcadores biológicos de sedimentos marinhos.<sup>134</sup>

Ao contrário dos esteróis terrestres, é particularmente difícil estabelecer a origem correta destas substâncias nos organismos marinhos. Isto porque quatro processos podem estar envolvidos:<sup>124</sup>

- biossíntese *de novo*, via acetato, mevalonato e esqualeno;
- origem a partir da dieta alimentar, sem posteriores modificações químicas;
- origem a partir da dieta alimentar, seguida por transformações químicas e,
- relações simbióticas (ex.: alga, fungo, bactéria).

Como consequência, os estudos biossintéticos dos metabólitos secundários de invertebrados marinhos, com precursores radioativos por exemplo, tornam-se dificultados e permitem apenas conclusões especulativas.

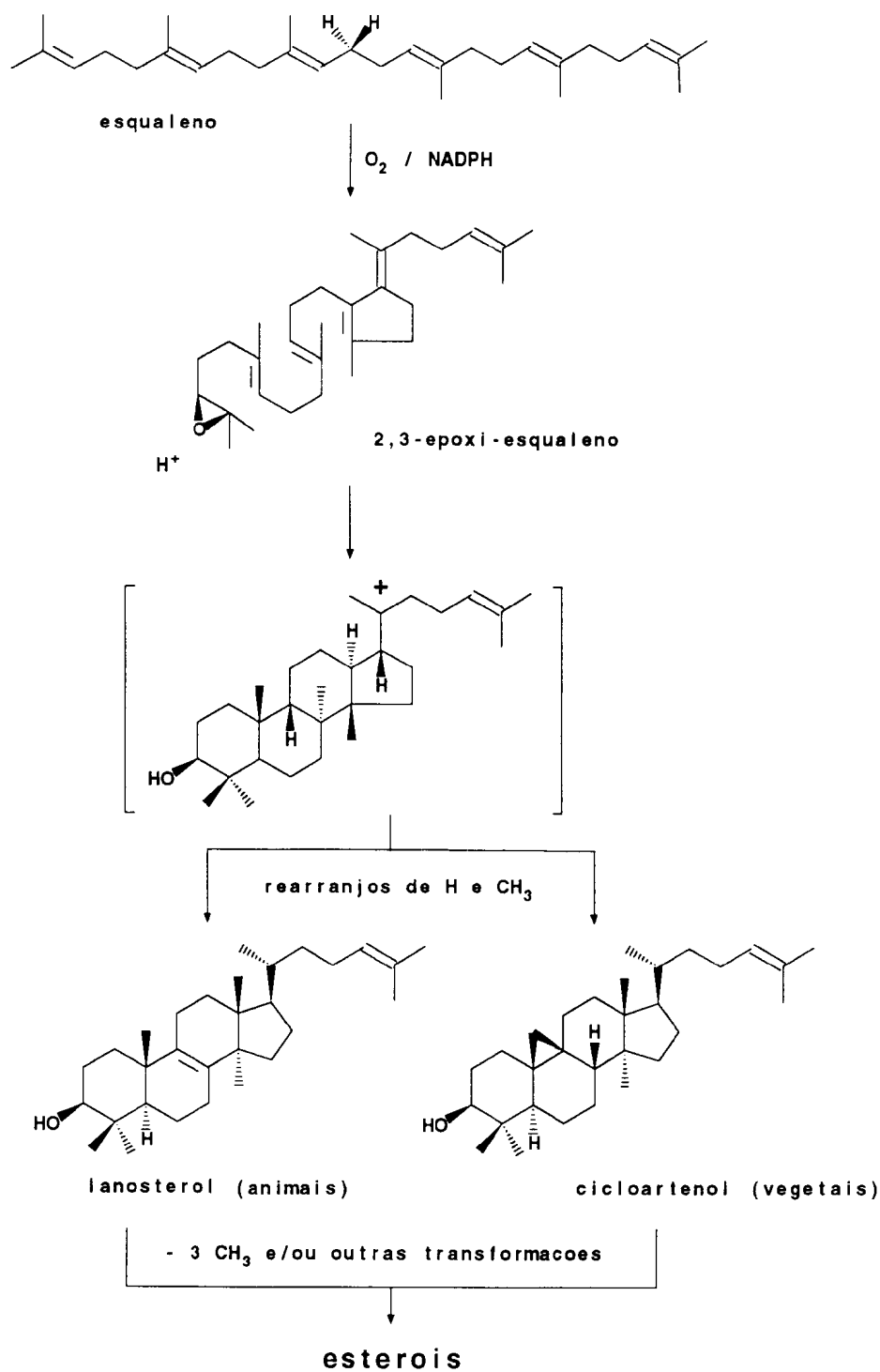
Embora a ampla distribuição dos esteróis comuns (como o colesterol (20), o chalinasterol (21), o brassicasterol (22) e o desmosterol (23)) restrinja seu uso como marcadores quimiosistemáticos, outras substâncias de distribuição mais restrita podem ser usadas com essa finalidade.<sup>135</sup>



A grande diversidade dos esteróides provavelmente está intimamente relacionada com a capacidade de especialização ao meio ambiente e necessidade de adaptação permanente dos organismos.<sup>7, 135</sup>

Na verdade, o papel cairomonal dos esteróis é um caso especial na ecologia química. O colesterol (20), por exemplo, é um representante típico nos organismos e parece ser uma molécula fundamental no meio marinho. No Atlântico, o colesterol dissolvido, principalmente na zona fótica, varia de 12 a 45 % (de 0.24 a 7.30  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) da quantidade total de esteróis, um número enorme de toneladas quando se considera a massa dos oceanos.<sup>7, 136</sup>

A figura seguinte esquematiza a biossíntese de esteróis:



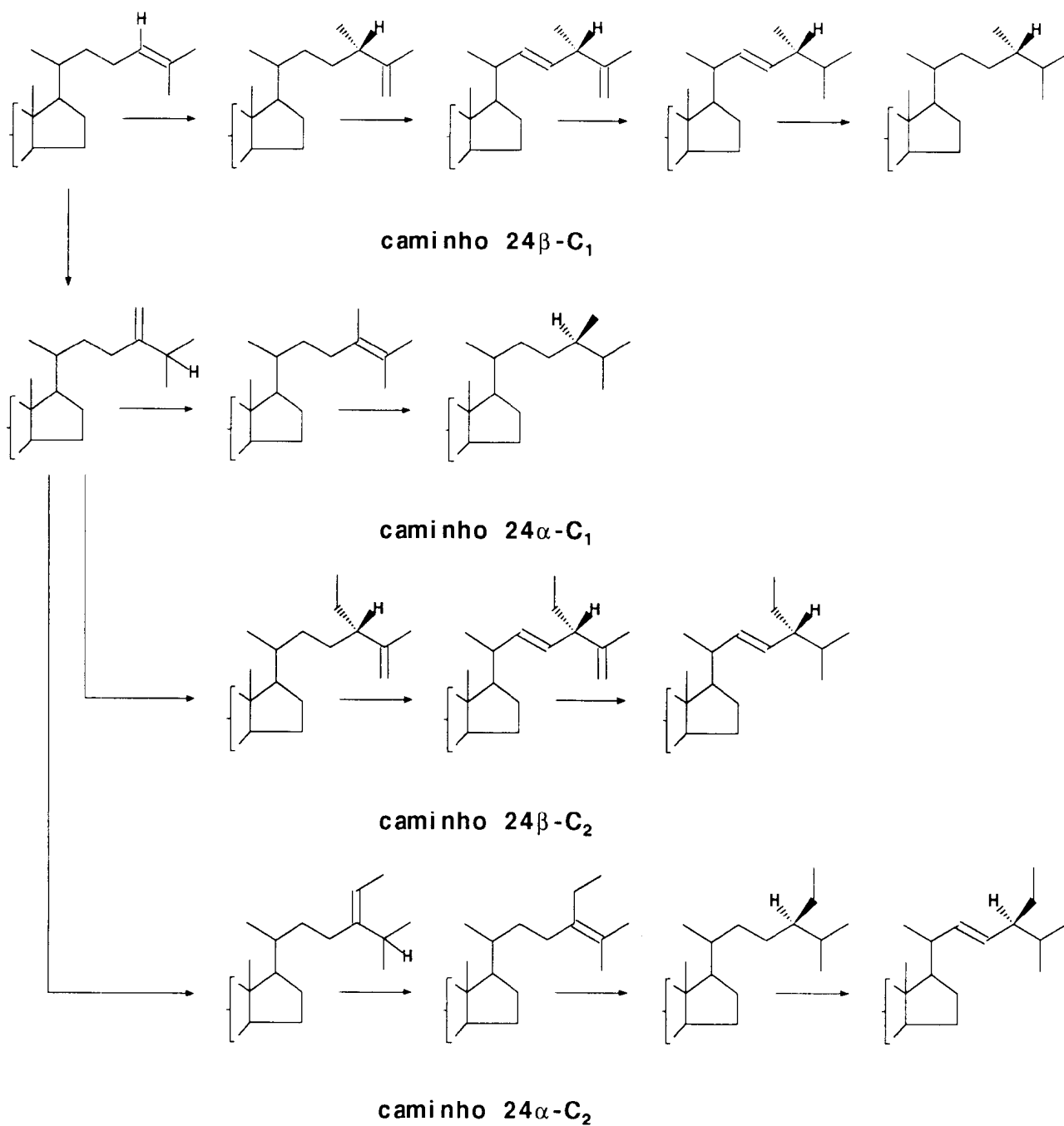
**Figura 14: Proposta biossintética para formação dos esteróides<sup>28</sup>**



A biossíntese dos esteróides (Figura 5, pág. 27 e Figura 14, pág. 52) ocorre a partir do esqualeno, um composto isoprenóide que sofre primeiramente uma epoxidação e posterior ciclização. Para os organismos não fotossintéticos (principalmente os animais), o processo de ciclização origina o lanosterol e para os fotossintéticos (maioria dos vegetais), o cicloartenol.<sup>130</sup>

Estudos biossintéticos permitiram a classificação das plantas em 2 categorias distintas segundo a estereoquímica do substituinte,  $\alpha$  ou  $\beta$ , no C<sub>24</sub> dos seus fitosteróis (Figura 15, pág. 54). Segundo Nes *et al* (1977)<sup>130,137</sup> e Goad *et al* (1974)<sup>138</sup> a categoria I, plantas contendo exclusiva ou principalmente 24 $\alpha$ -alquil-esteróis, constitui a maioria das plantas mais evoluídas, enquanto a categoria II, que inclui fungos e algas, corresponde à predominância dos 24 $\beta$ -alquil-esteróis. Tal divisão é filogeneticamente atrativa mas, infelizmente, em muito poucas espécies, particularmente algais, foram os esteróis suficientemente bem caracterizados para permitir que esta observação se tornasse regra geral.<sup>138</sup> Na verdade, já existem algumas exceções.

Outra classificação foi também proposta, no que se refere à localização da ligação dupla nos anéis: se ela estiver no carbono 5 (grupo A), 7 (grupo B) ou em ambos (grupo C).<sup>137</sup>

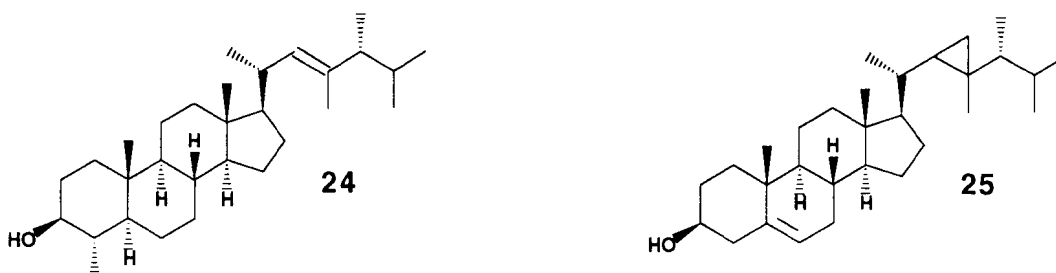


**Figura 15:** Caminhos Biossintéticos para os 24 $\alpha$  e 24 $\beta$  alquil-esteróis<sup>197</sup>

Desde a antiguidade, os dinoflagelados (Dinophyceae) são conhecidos pela produção de "blooms" tóxicos (marés vermelhas) causando intoxicação e/ou morte de pessoas, via cadeia alimentar.

A partir dos trabalhos de Ando & Barbier (1975)<sup>139</sup> e Shimizu *et al* (1976)<sup>140</sup> a atenção foi direcionada para a química dos esteróis nestes organismos. Os dinoflagelados são principais fontes de 4 $\alpha$ -metil-esteróis para o sistemas marinhos.

Destes, o dinosterol (24), considerado uma das substâncias mais características e abundantes, tem afinidades biossintéticas óbvias com o gorgosterol (25) isolado previamente de gorgônias (cnidários).<sup>124</sup>

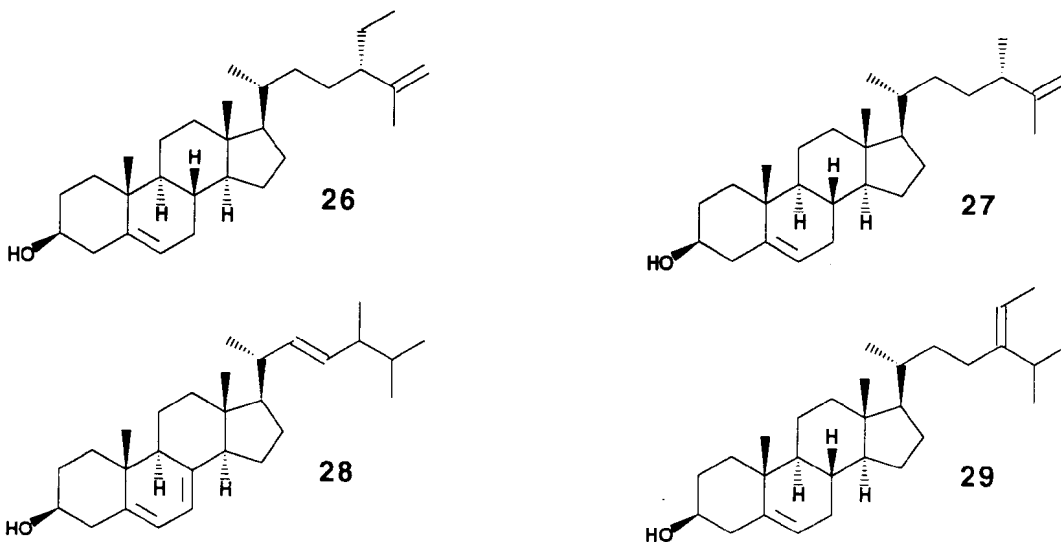


Os esteróis dos dinoflagelados têm sido proposto como marcadores biológicos e geológicos fundamentais para os sistemas marinhos, particularmente por suas características específicas, concentração e estabilidade molecular.<sup>141</sup>

Poucos estudos foram realizados sobre os esteróis das algas azuis-esverdeadas (Cyanophyceae). De uma maneira geral, elas produzem misturas simples como colesterol e substâncias com núcleo  $\Delta^5$  e  $\Delta^7$ .<sup>135,141</sup>

A configuração no C<sub>24</sub> pode ser especificada por qualquer

nomenclatura: 24 $\alpha$ /24 $\beta$  ou 24R/24S.<sup>131</sup> As algas verdes (Chlorophyceae) geralmente produzem substâncias com configuração  $\beta$  neste carbono. A composição dos esteróis nestas algas parece ser mais complexa e diferente das demais macroalgas e vegetais superiores.<sup>130, 131, 135, 138</sup> Algumas algas apresentam clerosterol (26) e codisterol (27) (como em *Codium fragile*), colesterol (20) (como nas rodófitas), ergosterol (28) (como nos fungos), além do 28-isofucoesterol (29) (isômero do fucoesterol) e outras substâncias idênticas às dos vegetais superiores (exceto no que se refere à quiralidade do C<sub>24</sub>).



No entanto, esta complexidade não é totalmente inesperada, pois as algas verdes ocupam uma posição consideravelmente central na evolução vegetal, enquanto as algas vermelhas e pardas são consideradas "becos-sem-saída" evolutivos.<sup>131</sup>

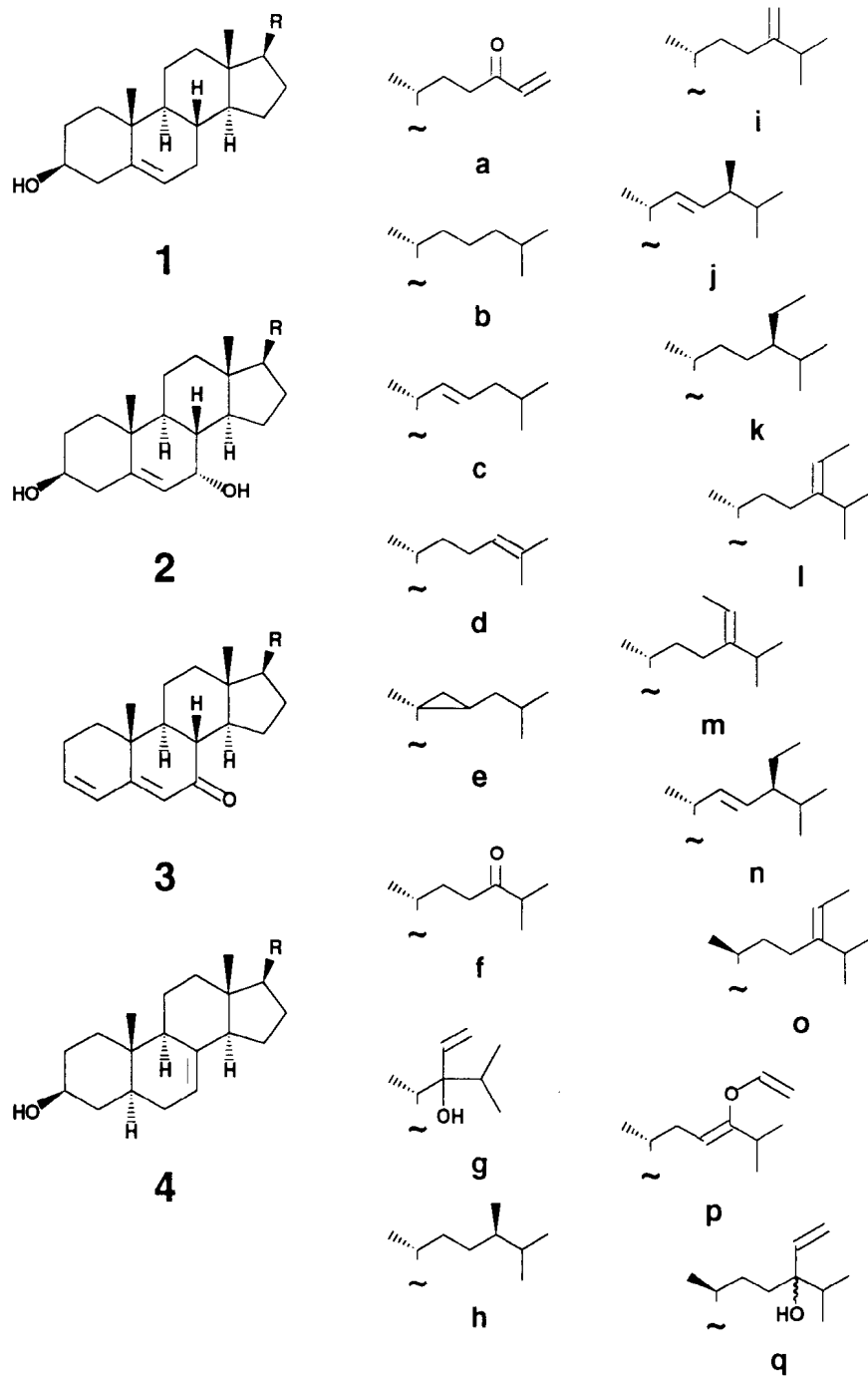
As algas vermelhas (Rhodophyceae)<sup>130, 131, 135, 138</sup> contêm

o colesterol como constituinte principal, embora tenha sido encontrado o cholesta-5,23(E)dieno-3 $\beta$ ,25-diol ou lagosterol (30) e o cholesta-5,25-dieno-3 $\beta$ ,24-diol (31). Poucos estudos biossintéticos, entretanto, têm sido realizados. Através dos resultados químicos obtidos até o momento, parece que a metilação na cadeia lateral é pouco significativa para muitas espécies nesta divisão.



Nos últimos anos, as algas pardas (Phaeophyceae) têm despertado maior interesse dos fitoquímicos, quimiosistemáticos e ecólogos, particularmente por produzirem metabólitos secundários capazes de minimizar a predação pelos herbívoros.

Por esta razão, e por serem as algas pardas o objeto central deste trabalho, apresentamos uma revisão sobre a ocorrência dos esteróis nas diferentes espécies desta classe (Figura 16, pág. 58 e Tabelas 3, 4, e 5, págs. 59, 60, e 61-63).



**Figura 16: Esteróis isolados de algas pardas**

**Tabela 3:** Nomes dos esteróis (Fig. 16) com os respectivos pesos moleculares e estruturas

Número de carbonos	PM	Estrutura (e código)	Nome trivial
26	368	1a	-
27	368	1b	colesterol
	384	1c	22-deidrocolesterol
	384	1d	desmosterol
	384	1e	cystosterol
	400	1f	24-cetocolesterol
	400	1g	-
	28	400	1h
398		1i	24-metilenocolesterol (chalinasterol)
398		1j	brassicasterol
29	414	1k	24-etilcolesterol
	412	1l	isofucoesterol ( $\Delta^5$ -avenasterol)
	412	1m	fucoesterol
	412	1n	estigmasterol
	412	1o	sargasterol
	426	1p	24-viniloxicolesta-5,23-dien-3 $\beta$ -ol
	428	1q	saringosterol
	428	2m	5,24-estigmastadieno-3 $\beta$ -7 $\alpha$ -diol
	408	3m	3,5,24-estigmastatrieno-7-ona
	412	4m	$\Delta^7$ -estigmasterol

Tabela 4: Nomes triviais e sistemáticos dos esteróis encontrados nas algas pardas

Nome trivial	Nome sistemático
1a	27-desmetil-25-deidro-24-oxo-colesterol
colesterol	colest-5-en-3 $\beta$ -ol
22-dehidrocolesterol	(22E)-colesta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol
desmosterol	colesta-5,24-dien-3 $\beta$ -ol
cystosterol	20,22-ciclocolest-5-en-3 $\beta$ -ol
24-cetocolesterol	3 $\beta$ -hidroxi-colest-5-en-24-ona
1g	<u>abeo</u> 25(24 $\rightarrow$ 22)-colest-5,23-dien-3 $\beta$ ,22 $\xi$ -diol
campesterol	(24R)-24-metilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol
24-metilenocolesterol	24 $\beta$ -metilcolesta-5-en-3 $\beta$ -ol
brassicasterol	(22E,24S)-24-metilcolesta-5-22-dien-3 $\beta$ -ol
24-etilcolesterol	24 $\xi$ -etilcolest-5-en-3 $\beta$ -ol
isofucoesterol ( $\Delta^5$ -avenasterol)	(24E)-24-etilcolesta-5,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol
fucoesterol	(24Z)-24-etilcolesta-5,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol
estigmasterol	(22E,24S)-24-etilcolest-5,22-dien-3 $\beta$ -ol
sargasterol	(24E)-24-etil-20-epicolest-5,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol
24-viniloxicolesta-5,23-dien-3 $\beta$ -o	(23E)-24-viniloxicolesta-5,23-dien-3 $\beta$ -ol ou (23Z)
saringosterol	24 $\xi$ -etilcolest-5,28-dien-3 $\beta$ -24 $\xi$ -diol
5,24-estigmastadieno-3 $\beta$ -7 $\alpha$ -diol	(24Z)-24-etilcolest-6,24(28)-dien-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol
3,5,24-estigmastatrieno-7-ona	(24Z)-24-etilcolest-3,5,24(28)-trien-7-ona
$\Delta^7$ -estigmasterol	(22E,24S)-24-etil-5 $\alpha$ H-colest-7,22-dien-3 $\beta$ -ol



TAXA	SUBSTÂNCIA/CÓDIGO	REFERÊNCIA
<i>Agarum cribosum</i>	fucosterol/1m, 24-metilenocolesterol/1i, colesterol/1b, 24-cetocolesterol/1f, saringosterol/1q, desmosterol/1d	142
<i>Ascophyllum nodosum</i>	fucosterol/1m, 24-metilenocolesterol/1i, saringosterol/1q, 24-cetocolesterol/1f, colesterol/1b, $\beta$ -sitosterol, isofucosterol/1l, brassicasterol/1j	135,143-146 172
<i>Alaria crassifolia</i>	fucosterol/1m, 24-metilenocolesterol/1i, colesterol/1b, saringosterol/1q	135,147,148
<i>Chorda filum</i>	fucosterol/1m	135
<i>Cladostephus spongiosus</i>	fucosterol/1m	135
<i>Costaria Costata</i>	fucosterol/1m, 24-metilenocolesterol/1i, saringosterol/1q, colesterol/1b	135,147-149
<i>Cystophyllum hakodatense</i>	fucosterol/1m, 24-metilenocolesterol/1i, saringosterol/1q, colesterol/1b	135,141-150
<i>Cystoseira barbata</i>	fucosterol/1m	151
<i>Cystoseira corniculata</i>	fucosterol /1m	152
<i>Cystoseira elegans</i>	fucosterol/1m, 24-metilenocolesterol/1i, colesterol/1b, cystosterol/1e, 22-deidro- colesterol/1c, brassicasterol/1j	133,153,154
<i>Cystoseira fibrosa</i>	fucosterol/1m, 24-metilenocolesterol/1i, colesterol/1b	155,156
<i>Cystoseira fimbriata</i>	fucosterol/1m, 24-metilenocolesterol/1i, colesterol/1b, 22-deidrocolesterol/1c, cystosterol/1e, brassicasterol/1j	153,154
<i>Cystoseira mediterranea</i>	fucosterol/1m, colesterol/1b, cystosterol/1e, 22-deidrocolesterol/1c, brassicasterol/1j, 24-metilenocolesterol/1i	153,154
<i>Cystoseira stricta</i>	fucosterol/1m, colesterol/1b, desmosterol/1d, $\beta$ -sitosterol, 24-metilenocolesterol/1i, isofucosterol/1l	144,157
<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	fucosterol/1m, colesterol/1b, cystosterol/1e, 22-deidrocolesterol/1c, brassicasterol/1j, 24-metilenocolesterol/1i	153,154
<i>Cystoseira zosteroides</i>	fucosterol/1m, colesterol/1b, cystosterol/1e, 22-deidrocolesterol/1c, brassicasterol/1j, 24-metilenocolesterol/1i	153,154,157
<i>Desmarestia aculeata</i>	abeq-25(24->22)-colest-5,23-dien-3 $\beta$ ,22 $\zeta$ -diol/1g	159
<i>Desmarestia viridis</i>	fucosterol/1m, colesterol/1b, saringosterol/1q, 24-cetocolesterol/1f, 24-metilenocolesterol/1i	160
<i>Dictyopteris divaricata</i>	fucosterol/1m, colesterol/1b, saringosterol/1q, 24-metilenocolesterol/1i	128,135,147
<i>Dictyopteris membranacea</i>	fucosterol/1m	162
<i>Dictyopteris prolifera</i>	colesterol/1b, 24-metilenocolesterol/1i fucosterol/1m	163

**Tabela 5 (a). Ocorrência de esteróis em algas pardas**

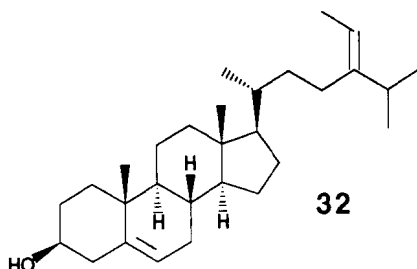
<i>Dictyota dichotoma</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , 22-deidrocolesterol/ <b>1c</b> colesterol/ <b>1b</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b>	135,163,164
<i>Durvillea</i> sp	fucosterol/ <b>1m</b>	163
<i>Ecklonia cava</i>	colesterol/ <b>1b</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , $\beta$ -sitosterol, fucosterol/ <b>1m</b> , isofucosterol/ <b>1i</b>	164
<i>Ectocarpus tomentosum</i>	fucosterol/ <b>1m</b>	135
<i>Eisenia bicyclis</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , sargasterol/ <b>1o</b> , saringosterol/ <b>1q</b> , 24-cetocolesterol/ <b>1f</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , colesterol/ <b>1b</b> , isofucosterol/ <b>1i</b> , 24-oxo-25-metilenocolesterol/ <b>1a</b>	128,135,148 149,150,155 164
<i>Endarachne binghamiae</i>	24-metilenocolesterol/ <b>1i</b>	166
<i>Fucus ceranoides</i>	fucosterol/ <b>1m</b>	131,135
<i>Fucus diviarcarpus</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b>	131,135,150
<i>Fucus evanescens</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , 3,5,24-estigmastrieno-7-ona/ <b>3m</b> , 5,24-estigmasdieno-, 3 $\beta$ -7 $\alpha$ -diol/ <b>2m</b> , saringosterol/ <b>1q</b>	131,135,147 148-150,167
<i>Fucus gardneri</i>	fucosterol/ <b>1m</b>	131,135
<i>Fucus serratus</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , colesterol/ <b>1b</b> , $\beta$ -sitosterol, isofucosterol/ <b>1i</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b>	131,135,144 146
<i>Fucus spiralis</i>	fucosterol/ <b>1m</b>	135,168
<i>Fucus vesiculosus</i>	fucosterol/ <b>1m</b>	135,169
<i>Halydris siliquosa</i>	fucosterol/ <b>1m</b>	135
<i>Halopteris scoparia</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , colesterol/ <b>1b</b> , brassicasterol/ <b>1j</b> , $\beta$ -sitosterol, estigmasterol/ <b>1n</b> , campesterol/ <b>1h</b> , desmosterol/ <b>1d</b> , isofucosterol/ <b>1i</b> , 22-deidro- colesterol/ <b>1c</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b>	157
<i>Heterochordaria abietina</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , 22-deidrocolesterol/ <b>1c</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , colesterol/ <b>1b</b>	135
<i>Hizikia fusiformis</i>	colesterol/ <b>1b</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , fucosterol/ <b>1m</b> , saringosterol/ <b>1q</b> ,	163,165
<i>Laminaria</i> sp.	fucosterol/ <b>1m</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , saringosterol/ <b>1q</b>	128
<i>Laminaria angustata</i>	fucosterol/ <b>1m</b>	135
<i>Laminaria digitata</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , colesterol/ <b>1b</b> , $\Delta^7$ -estigmasterol/ <b>4m</b> , isofucosterol/ <b>1i</b> , $\beta$ -sitosterol, saringosterol/ <b>1q</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , desmosterol/ <b>1d</b>	135,144,146 172
<i>Laminaria faeroensis</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , colesterol/ <b>1b</b> , desmosterol/ <b>1d</b> , saringosterol/ <b>1q</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b>	135,169,172
<i>Laminaria hyperborea</i>	fucosterol/ <b>1m</b>	135
<i>Laminaria japonica</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b>	135,164
<i>Laminaria saccharina</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , colesterol/ <b>1b</b> , saringosterol/ <b>1q</b> , 24-cetocolesterol/ <b>1f</b>	135,145
<i>Lessonia</i> sp	fucosterol/ <b>1m</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b>	171
<i>Macrocystis pyrifera</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , colesterol/ <b>1b</b> , 5,24(28)-E-estigmastadien-3 $\beta$ -ol	170,173
<i>Myelophycus caespitosus</i>	fucosterol/ <b>1m</b>	135,148
<i>Nemacystus decipiens</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , 22-deidrocolesterol/ <b>1c</b> , colesterol/ <b>1b</b>	164

**Tabela 5 (b). Ocorrência de esteróis em algas pardas**

<i>Padina arborescens</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , estigmasterol/ <b>1n</b> , colestero/1 <b>b</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , 22-deidrocolesterol/ <b>1c</b>	135,153,163
<i>Padina vickersiae</i>	estigmasterol/ <b>1n</b> , 22-deidrocolesterol/ <b>1c</b> , fucosterol/ <b>1m</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , campesterol// <b>1h</b> , colestero/1 <b>b</b> , $\beta$ -sitosterol	153
<i>Padina pavonica</i>	estigmasterol/ <b>1n</b> , 22-deidrocolesterol/ <b>1c</b> , fucosterol/ <b>1m</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , isofucosterol/ <b>1l</b> , brassicasterol/ <b>1j</b> , desmosterol/ <b>1d</b> , colestero/1 <b>b</b> , $\beta$ -sitosterol	153,157
<i>Pelvetia canaliculata</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , 24-cetocolesterol/ <b>1f</b>	135,174
<i>Pelvetia wrightii</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , colestero/1 <b>b</b> , saringosterol/ <b>1q</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b>	9,66,89-91 128,135,147 148-150
<i>Pylaiella littoralis</i>	fucosterol/ <b>1m</b>	135
<i>Sargassum confusum</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , saringosterol/ <b>1q</b> colestero/1 <b>b</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b>	128,135,147
<i>Sargassum fluitans</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , colestero/1 <b>b</b> , 22-deidrocolesterol/ <b>1c</b> , 24-etil- colesterol/ <b>1k</b> , 24-metil-22-deidrocolesterol, 24-etil-22-deidrocolesterol	175
<i>Sargassum horneri</i>	22-deidrocolesterol/ <b>1c</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , colestero/1 <b>b</b> , fucosterol/ <b>1m</b>	163
<i>Sargassum muticum</i>	fucosterol/ <b>1m</b>	135
<i>Sargassum ringgoldianum</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , colestero/1 <b>b</b> , saringosterol/ <b>1q</b> , sargasterol/ <b>1o</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , isofucosterol/ <b>1l</b> , 22-deidrocolesterol/ <b>1c</b>	128,135,148 149,150,161 164,177
<i>Sargassum sagamianum</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , colestero/1 <b>b</b> , 22-deidrocolesterol/ <b>1c</b>	163
<i>Sargassum thunbergii</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , colestero/1 <b>b</b> , saringosterol/ <b>1q</b> , $\beta$ -sitosterol, 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , 22-deidrocolesterol/ <b>1c</b> , 24-viniloxicolesta- 5,23-dien-3b-ol	128,135,1464 176
<i>Sargassum patens</i>	22-deidrocolesterol/ <b>1c</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , fucosterol/ <b>1m</b> , colestero/1 <b>b</b> , isofucosterol/ <b>1l</b>	164
<i>Sargassum piluriferum</i>	fucosterol/ <b>1m</b> , colestero/1 <b>b</b> , $\beta$ -sitosterol, 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , 22-deidrocolesterol/ <b>1c</b>	128
<i>Sargassum vulgare</i>	colestero/1 <b>b</b> , fucosterol/ <b>1m</b>	178
<i>Sphacelaria pennata</i>	fucosterol/ <b>1m</b>	135
<i>Stypocaulon scoparium</i>	fucosterol/ <b>1m</b>	135
<i>Undaria pinnatifida</i>	colestero/1 <b>b</b> , 24-metilenocolesterol/ <b>1i</b> , fucosterol/ <b>1m</b>	164

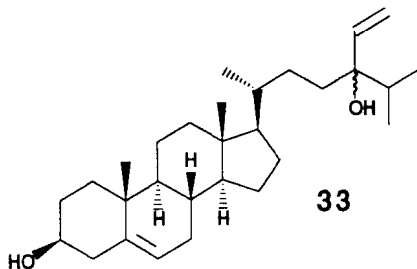
**Tabela 5 (c). Ocorrência de esteróis em algas pardas**

Em todos os representantes das ordens Ectocarpales, Sphacelariales, Dictyotales, Chordariales, Dictyosiphonales, Laminariales e Fucales, o fucosterol (32) é o esterol predominante. De uma maneira geral, este produto vem acompanhado de quantidades menores de colesterol (20) e chalinasterol (21).

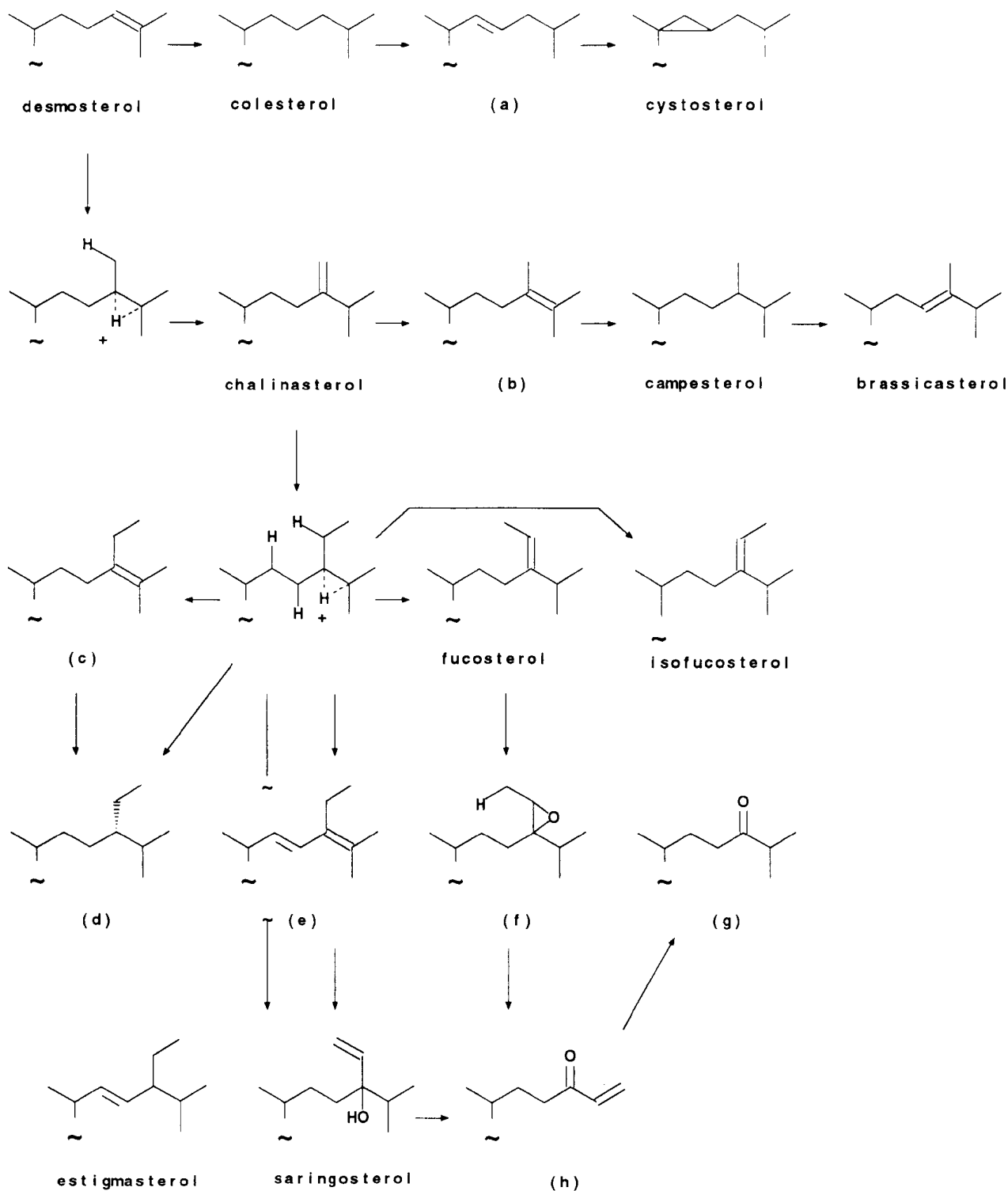


A biossíntese da cadeia lateral do fucosterol (32) foi proposta através de estudos com marcadores isotópicos. A metionina atua como grupo doador de metila para o esterol  $\Delta^{24}$  (substrato) a fim de produzir o derivado 24-metileno. Este, em seguida, sofre uma segunda metilação para originar o fucosterol.<sup>138</sup>

A presença de derivados oxidados de fucosterol, como o saringosterol (33) é também eventualmente constatada. Provavelmente eles são artefatos resultantes de oxidação durante a secagem das algas ao ar, antes da extração.<sup>130</sup>



A Figura 17 (pág. 65) mostra uma proposta biogenética das cadeias laterais dos esteróis de algas pardas.<sup>130,135,138</sup>



**Figura 17:** Caminhos biossintéticos para formação das cadeias laterais dos esteróis de algas pardas  
(a: 22-deidrocolesterol; b: 24-metil-24-deidrocolesterol; c: 24-etil-24-deidrocolesterol; d: 24-etil-colesterol; e: 24-etil-colesta-5,22,24-trien-3 $\beta$ -ol; f: 24,28-epoxi-24-etil-colesterol; g: 24-cetocolesterol; h: 27-desmetil-25-deidro-24-oxo-colesterol)

Por ser o fucosterol (32) uma substância abundantemente distribuída nas feófitas em comparação às outras classes de organismos, é possível sugerir seu uso como marcador taxonômico.<sup>135</sup>

É importante ressaltar que a abundância, generalidade e diversidade dos esteróis marinhos em relação aos terrestres indica uma importância muito maior no sistema marinho. Embora a função destes esteróis não tenha sido muito estudada, sabe-se que alguns hormônios de crescimento e sexuais, como a ecdisona, intervêm na regulação osmótica a nível das membranas e no papel da reprodução sexual dos equinodermos.

Além disso, pelo fato dos organismos marinhos serem primitivos, os esteróis podem ser reminescência de rotas biogenéticas antigas abandonadas ao longo da evolução.

Apesar da existência de vários estudos sobre os esteróis marinhos, algumas questões permanecem não respondidas e geram boa parte do interesse e estímulo à continuação desta linha de pesquisa.

- Quais as principais rotas biossintéticas que conduzem aos esteróis "não-convencionais"? Quais os organismos envolvidos na complexa cadeia alimentar que são responsáveis por gerar estes produtos?

- Qual o papel biológico e ecológico destes esteróis?

- Há variações sazonais, temporais e geográficas na produção destas substâncias?

## 1.7. IMPLICAÇÕES ECOLÓGICAS E QUIMIOTAXONÔMICAS

Alguns metabólitos secundários das macroalgas podem desempenhar papel importante como defesa química contra os predadores.

A primeira vista, a grande quantidade e diversidade de herbívoros nos mares tropicais deveria levar à produção abundante e diversificada de defesas químicas por parte das algas.

Entretanto, nem sempre estas expectativas têm sido constatadas. Nas algas pardas de mares tropicais temos verificado reduções nas concentrações e/ou variedade das classes de metabólitos secundários produzidos, em comparação com as mesmas algas em ambientes temperados.

Por que será que determinadas rotas biossintéticas agem mais, ou menos intensamente em cada caso?

Que fatores ambientais podem ter causado o desvio destas rotas biossintéticas?

Por que será que ocorre uma distribuição latitudinal destes metabólitos?

Será que as substâncias efetivamente produzidas são ativas como defesa contra os herbívoros?

Para vários representantes de macroalgas existem problemas na determinação dos limites de separação entre ordens e

famílias e variedades com base em critérios puramente morfológicos.

De uma maneira geral, as micromoléculas são frequentemente espécie ou gênero-específicas. Isto tem levado a sugestões quanto à utilização destas substâncias em análises taxonômicas, em paralelo aos critérios morfológicos.

Existe alguma relação entre a produção das micromoléculas e a posição filogenética das algas que as produzem?

Para responder a estas e outras perguntas é preciso maiores estudos teóricos e experimentais em áreas como ecologia química marinha e quimiosistemática de algas. Estas áreas de conhecimento estão em fase de implantação em nosso País.

Portanto, é neste contexto que se insere o presente trabalho.



## 1.8. OBJETIVOS

Dentre as principais divisões de macroalgas, as algas pardas (Phaeophyta) constituem o grupo mais importante em termos de biomassa na costa brasileira.<sup>91</sup>

A maioria destas algas pertencem a espécies típicas de águas frias. Entretanto, as representantes das ordens Dictyotales e Fucales, duas das ordens mais evoluídas morfologicamente nesta divisão, são abundantes em mares tropicais e subtropicais.

Este trabalho, portanto, tem como objetivos:

1. Avaliar o potencial dos organismos marinhos como fonte de substâncias biologicamente ativas, através da caracterização e quantificação de três classes distintas de metabólitos secundários: TANINOS, TERPENOS e ESTERÓIS em algas pardas destas ordens, para as Dictyotales as espécies *Dictyota cervicornis* Kuetzing, *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux, *Dictyota mertensii* (Martius) Kuetzing, *Dictyopteris delicatula* (Lamouroux), *Dictyopteris plagiogramma* (Montagne) Vickers; e para as Fucales, *Sargassum filipendula* Agardh, *Sargassum furcatum* Kuetzing.

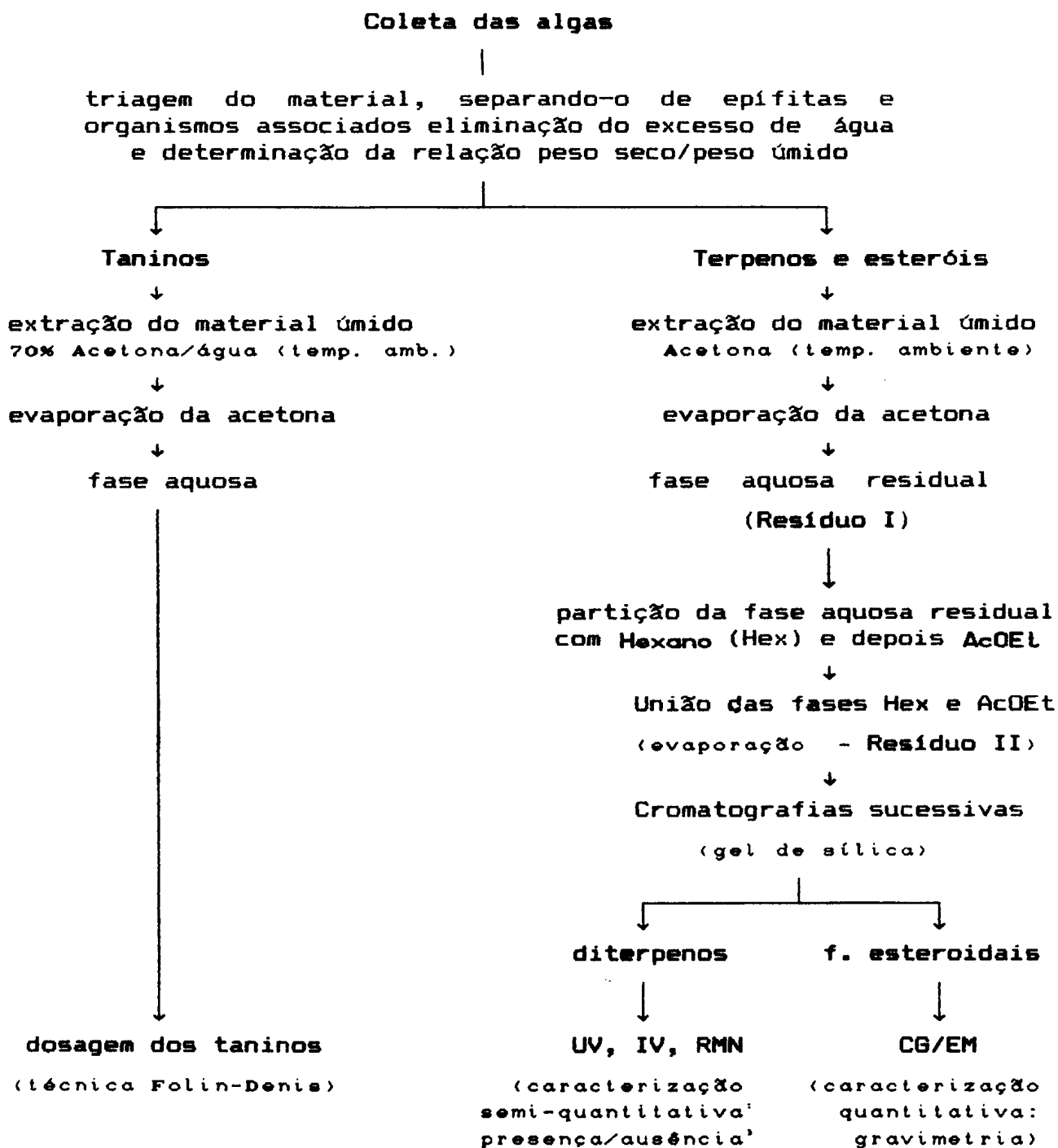
2. Evidenciar como as diferentes classes de metabólitos afetam a pastagem pelos herbívoros, testando a ação de algumas substâncias isoladas de *Dictyota cervicornis*, *Dictyota mertensii* e *Sargassum furcatum* como defesa contra a pastagem pelo anfípoda

marinho (crustáceo) *Parhyale hawaiiensis* Dana.

3- Avaliar o uso de terpenos de origem biossintética mista ou não como marcadores taxonômicos e filogenéticos potenciais para as ordens Dictyotales e Fucales (Phaeophyta) empregando as técnicas da análise quimiosistemática<sup>6</sup> e o conjunto de informações bibliográficas sobre composição micromolecular e taxonomia morfológica acumuladas ao longo deste trabalho.

Oito algas pardas pertencentes as ordens Dictyotales e Fucales foram coletadas nas regiões entre-marés em localidades da costa do Rio de Janeiro, durante o ano de 1990. As algas foram lavadas em água do mar local e separadas de sedimentos, epífitas e outros organismos associados.

Após a determinação da relação peso úmido/peso seco de cada alga, os materiais úmidos foram extraídos com acetona, ou com acetona aquosa (70%), fases iniciais de processamentos empregados para quantificar taninos e caracterizar diterpenos e esteróis, como esquematizado na **Figura 18** (pág.73) e detalhado no **Capítulo 5 (Experimental)**.



**Figura 18: Fluxograma de isolamento e quantificação dos taninos, terpenos e esteróis de algas pardas**

## 2.1. METABÓLITOS ORIGINADOS DA VIA DO MALONATO: FLOROTANINOS

Foram dosados, através do método Folin-Denis, os teores de florotaninos em exemplares de cinco espécies de Dictyotales: *Dictyota cervicornis*, *Dictyota dichotoma*, *Dictyota mertensii*, *Dictyopteris delicatula* e *Dictyopteris plagiogramma* e duas espécies de Fucales, *Sargassum cymosum* e *Sargassum furcatum*. Os valores encontrados (Tabela 6, e Figura 19, pág. 75) variaram de 0,12 a 1,4% do peso seco nas oito espécies de algas analisadas.

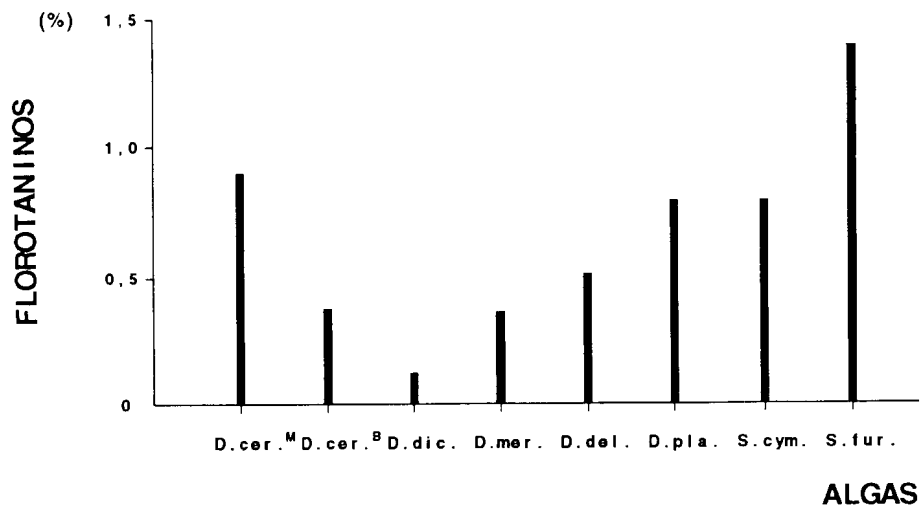
Tabela 6: Quantidades de florotaninos (% de peso seco) nas diferentes espécies de algas pardas: ordens Dictyotales e Fucales

ESPECIES	P. SECO/ P. ÚMIDO (%)	FLORO- TANINOS (%)
<b>Dictyotales</b>		
<i>Dictyota cervicornis</i> <sup>M</sup>	12	0,90
<i>Dictyota cervicornis</i> <sup>B</sup>	13	0,37
<i>Dictyota dichotoma</i> <sup>B</sup>	16	0,12
<i>Dictyota mertensii</i> <sup>B</sup>	14	0,36
<i>Dictyopteris delicatula</i> <sup>B</sup>	20	0,51
<i>Dictyopteris plagiogramma</i> <sup>A</sup>	14	0,80
<b>Fucales</b>		
<i>Sargassum cymosum</i> <sup>M</sup>	17	0,80
<i>Sargassum furcatum</i> <sup>B</sup>	17	1,40

M- algas coletadas em Mambucaba (RJ)

A- algas coletadas em Angra dos Reis (RJ)

B- algas coletadas em Buzios (RJ)



**Figura 19:** Concentração de florotaninos (em % de peso seco) nas algas pardas.

(Ordem Dictyotales: D.cer.<sup>M</sup> : *Dictyota cervicornis* coletada em Mambucaba (RJ); D.cer.<sup>B</sup> : *Dictyota cervicornis* coletada em Búzios (RJ); D.dic.: *Dictyota dichotoma*; D.mer.: *Dictyota mertensii*; D.del.: *Dictyota delicatula*; D.pla.: *Dictyota plagiograma*; Ordem Fucales: S.cym.: *Sargassum cymosum*; S.fur.: *Sargassum furcatum*)

Foram encontrados baixos teores percentuais de florotaninos em todas espécies. Estes resultados corroboram os dados da literatura<sup>47,51</sup> para as algas pardas estudadas nos sistemas marinhos tropicais.

Ao contrário destes resultados, altos teores de florotaninos são encontrados para esta divisão nos mares temperados.<sup>47,179</sup>

## 2.2. METABÓLITOS DA VIA DO MEVALONATO: DITERPENOS E ESTERÓIS

É importante ressaltar que a principal finalidade deste trabalho foi quantificar os diterpenos e esteróis isolados das algas pardas. Deste modo, não houve maior cuidado em purificação rigorosa e nem interesse particular em isolar substâncias novas.

As espécies *Dictyota cervicornis*<sup>M,B</sup>, *Dictyota dichotoma*, *Dictyota mertensii*, *Dictyopteris delicatula*, *Dictyopteris plagiogramma* (Dictyotales), *Sargassum filipendula* e *Sargassum furcatum* (Fucales) foram submetidas a extrações em acetona, evaporação, e posteriores partições das fases aquosas residuais (resíduo I) com hexano e acetato de etila (AcOEt).

Os extratos em hexano e em AcOEt, reunidos, possibilitaram o isolamento de oito frações esteroidais e quatro diterpenos conforme mostrado na Figura 18 (pág.73). Os diterpenos foram isolados apenas de três espécies: *Dictyota cervicornis*<sup>B</sup>, *Dictyota dichotoma* e *Dictyota mertensii*.

Na tentativa de verificarmos possíveis distinções entre grupos de terpenos e esteróis, investigamos o emprego de diferentes reagentes (solução de 2% de sulfato cérico em 2N de ácido sulfúrico (A), cloreto de antimônio III (SbCl<sub>3</sub>) (reagente Carr-Price) (B), cloreto de antimônio III (SbCl<sub>3</sub>) + ácido acético glacial (CH<sub>3</sub>COOH) (C), cloreto de bismuto III (BiCl<sub>3</sub>) (D), vanilina + ácido fosfórico (E), anidrido acético + ácido sulfúrico

(reagente Lieberman-Buchard) (F), e anisaldeído + ácido sulfúrico (G)), como reveladores qualitativos em cromatografia de camada fina.<sup>180</sup>

Os resultados foram pouco informativos. O teste de coloração de Lieberman-Buchard para caracterização de esteróis foi positivo quando empregado em tubo de ensaio.<sup>181</sup> Porém quando usado como revelador em c.c.f. este reagente não diferenciou estes dois grupos de substâncias. O reagente de revelação de sulfato cérico (A) mostrou alguma capacidade para diferenciar sistematicamente os esteróis dos terpenos, enquanto grupos. Este método associado ao emprego de padrões de diterpenos e esteróis monoidroxilados (colesterol) parece permitir tal caracterização. Já no caso dos demais reagentes, observamos apenas variações quanto à velocidade, intensidade e quantidade de produtos revelados.

A partir destes resultados, passamos a utilizar as técnicas de análise por c.c.f. (revelação de sulfato cérico (A) e comparação de  $R_f$  com padrões) como descritas na parte experimental (Capítulo 4): os esteróis monoidroxilados foram caracterizados por comparação de  $R_f$  e cor resultante da revelação com sulfato cérico (cor azul passando a arroxeadada), tomando o colesterol como padrão.

Nas condições utilizadas não houve grande diferença de  $R_f$  e cor para os vários esteróis monoidroxilados testados (amostras puras de chalinasterol e ergosterol, e misturas de  $\beta$ -sitosterol, campesterol,  $\Delta^5$ -avenasterol,  $\Delta^7$ -avenasterol, brassicasterol e stigmasterol).



Os diterpenos também foram caracterizados através da comparação com amostras autênticas ou, simplesmente, através do comportamento das manchas em c.c.f., uma vez que a existência deste grupo de substâncias é facilmente reconhecível quando empregado o sulfato cérico como revelador (cor violeta passando a arroxeadada).

### 2.2.1. OS DITERPENOS

Como anteriormente mencionado, as algas pardas da família Dictyotaceae são ricas fontes de diterpenos monocíclicos, bicíclicos e tricíclicos.<sup>57</sup> Dos dez principais gêneros desta família, o gênero *Dictyota* tem sido o mais extensamente estudado. A espécie *Dictyota cervicornis* produz dolastanos e seco-dolastanos,<sup>62,64</sup> ao passo que *Dictyota dichotoma* e *Dictyota mertensii* produzem guaianos prenilados<sup>69,182</sup>.

Entre os esqueletos conhecidos para algas pardas, os diterpenos de esqueleto dolastano (1) podem ser caracterizados por RMN <sup>1</sup>H, principalmente através da presença de duas metilas dubletos, duas metilas singletos e por dois prótons vinílicos da dupla exometilênica no anel A. A variação nas faixas dos deslocamentos químicos dos hidrogênios destas metilas está

diretamente relacionada com o padrão de insaturação nos anéis B e C, da oxigenação em C-4 e C-9 e com efeitos de solvente (Tabela 7).

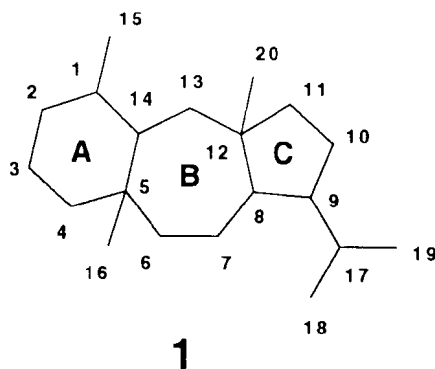


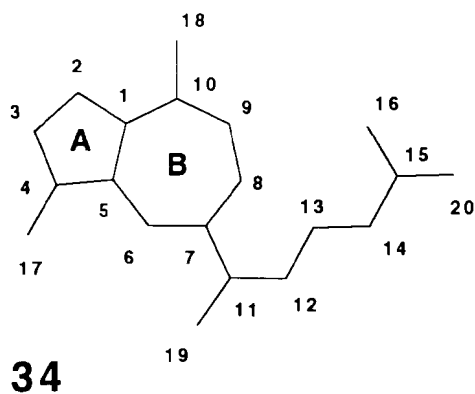
Tabela 7: Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^1\text{H}$  das metilas de diterpenos com esqueleto dolastano

METILAS	$\delta$
C-15**	4.80 - 5.10 ls
C-16*	0.60 - 0.90 s
C-18*	0.80 - 1.05 d
C-19*	0.95 - 1.15 d
C-20	1.20 - 1.50 s

\* = estes deslocamentos pertencem a dupla exocíclica  
 ■ valores intercâmbios

Por outro lado, o padrão das metilas em RMN  $^1\text{H}$  é insuficiente para identificar os diterpenos de esqueleto guaiano prenilado (34). A parte bicíclica, no entanto, pode ser caracterizada com dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A técnica de RMN  $^{13}\text{C}$

indica a presença de 3 carbonos metínicos (CH) saturados não substituídos por heteroelemento na faixa de deslocamentos químicos entre 40 a 60 ppm, dependendo da funcionalização no C-6 e C-10 (Tabela 8), ao passo que a ausência de metila angular em carbono quaternário pode ser facilmente verificada por RMN <sup>1</sup>H. Nenhum outro esqueleto de diterpenos conhecido para *Dictyota* reúne estas condições.



**Tabela 8:** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN <sup>13</sup>C dos metinos de diterpenos com esqueleto guaiano

CARBONOS	$\delta$
1	40.00 - 60.00 d
5	40.00 - 61.00 d
7	38.00 - 51.00 d

### 2.2.1.1. Identificação dos diterpenos isolados de *Dictyota cervicornis*<sup>B</sup>

#### 2.2.1.1.a. Identificação da substância Dc-1

Esta substância, de aspecto oleoso-amarelado, quando submetida a c.c.f., aparece na revelação por UV nos comprimentos de onda longo e curto. Quando revelada com sulfato cérico, apresenta coloração violeta passando a arroxeadada.

O espectro de Ultra-violeta (UV) revelou uma única absorção com  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}} = 243 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 5.950$ ), característica de um dieno conjugado (Figura 20, pág. 85).

Os dados espectroscópicos de IV, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C desta substância levaram à fórmula molecular  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_3$ , compatível com 7 graus de insaturação (um grupamento acetato, duas ligações duplas trissubstituídas, uma exometilênica e 3 ciclos), sugerindo um diterpeno monoacetilado, o que está de acordo com a grande riqueza de diterpenos nesta espécie.

Adicionalmente, os padrões das metilas e do exometileno apontaram para um diterpeno com esqueleto dolastano.

Os resultados abaixo, comparados com os dados da literatura para diterpenos dolastanos, confirmam esta indicação.

O espectro de Infravermelho (IV) (Figura 21, pág. 86)

revelou a presença de grupos hidroxila ( $3580\text{ cm}^{-1}$ ), carboxila de éster ( $1740$  e  $1220\text{ cm}^{-1}$ ) e grupo exometileno ( $1640$  e  $910\text{ cm}^{-1}$ ).

A análise do espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) (Tabela 9, pág. 100 e Figura 22, pág. 87) indicou a presença de quatro grupos metila, em  $\delta$  0.91 (s, H-16) , 1.05 (d,  $J=7.4\text{ Hz}$ , H-18) , 1.09 (d,  $J=7.4\text{ Hz}$ , H-19) e 1.33 (s, H-20). As absorções em  $\delta$  4.80, sl e 4.91, sl (H-15 e H-15') , 4.85, (t,  $J=2.7\text{ Hz}$ , H-4) , 2.16, (s, OCOMe) , 5.30, (dd,  $J=4$  e  $10\text{ Hz}$ , H-7) e 5.60, (sl, H-10) corroboram os resultados obtidos no IV e UV para o exometileno característico deste tipo de esqueleto, pela presença de um grupamento acetato secundário no C-4 e dos prótons vinílicos H-7 e H-10. As localizações de H-7 e H-10 estão de acordo com as únicas posições possíveis para as duas ligações duplas trissubstituídas conjugadas. Por outro lado, a posição do grupamento acetato secundário *a priori* poderia estar localizada em qualquer metileno presente na molécula: C-2, C-3, C-4, C-6, C-11, C-13. No entanto, podemos descartar cinco destas seis posições em função dos seguintes argumentos: pela multiplicidade do hidrogênio do carbono terciário ligado ao grupamento acetato (um tripleto mal definido) descartam-se as posições C-3 e C-13, para as quais o H ao pé do acetato seria multiplete ou singlete, respectivamente; a ausência de acoplamento deste hidrogênio com H-7 e H-10 , indica que o acetato só pode estar localizado no anel A em C-2 ou C-4 ; e finalmente, o deslocamento químico do mesmo hidrogênio elimina a posição alílica

C-2, e localiza a posição do acetato como sendo C-4.

O hidrogênio H-7 apresenta-se como duplo dubleto ( $J = 4$  e  $10$  Hz) acoplando com os 2 hidrogênios de C-6. O  $\alpha$ -H-6 é observado no espectro em deslocamento químico  $\delta$  3.20 (dd,  $J = 4$  e  $14$  Hz), enquanto o  $\beta$ -H-6 não se destaca no espectro.

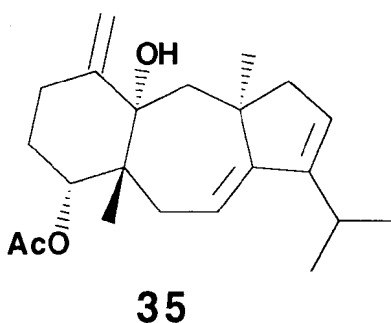
O sinal duplo triplete em  $\delta$  2.7 corresponde ao  $\alpha$ -H-2, desprotegido pelas interações 1,3 diaxiais da hidroxila em C-14 e pelo grupamento acetato em C-4.

O espectro de ressonância magnética nuclear de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) (Tabela 10, pág. 101, Figura 23, pág. 88) apresentou como absorções características para as metilas (em  $\delta$ ): 19.90, (q, C-20); 21.30, (q, C-18)\*; 22.00, (q, C-19)\*; 27.40, (q, C-16) (\* valores intertrocáveis); para o metileno: 109.40, (t, C-15); e para os carbonos vinílicos: C-1 (151.34, s), C-7 (112.31, d), C-8 (154.80, s), C-9 (149.40, s), C-10 (125.50, d). O grupamento acetato ligado ao C-4 provoca desproteção deste carbono ( $\delta$  82.17, d) devido ao seu efeito indutivo. A absorção em  $\delta$  79.92, s, indica a presença de uma hidroxila ligada em carbono quaternário C-14), de acordo com os dados de IV e RMN  $^1\text{H}$ , enquanto os demais carbonos quaternários e secundários, correspondem aos seguintes deslocamentos ( $\delta$ ): quaternários: 149.40, (s, C-9), 154.80, (s, C-8), 45.51, (s, C-12); secundários 30.56, (t, C-2), 26.70, (t, C-3), 27.10, (t, C-6), 41.63, (t, C-11), 50.85, (t, C-13).

Esta interpretação é garantida pelo espectro de

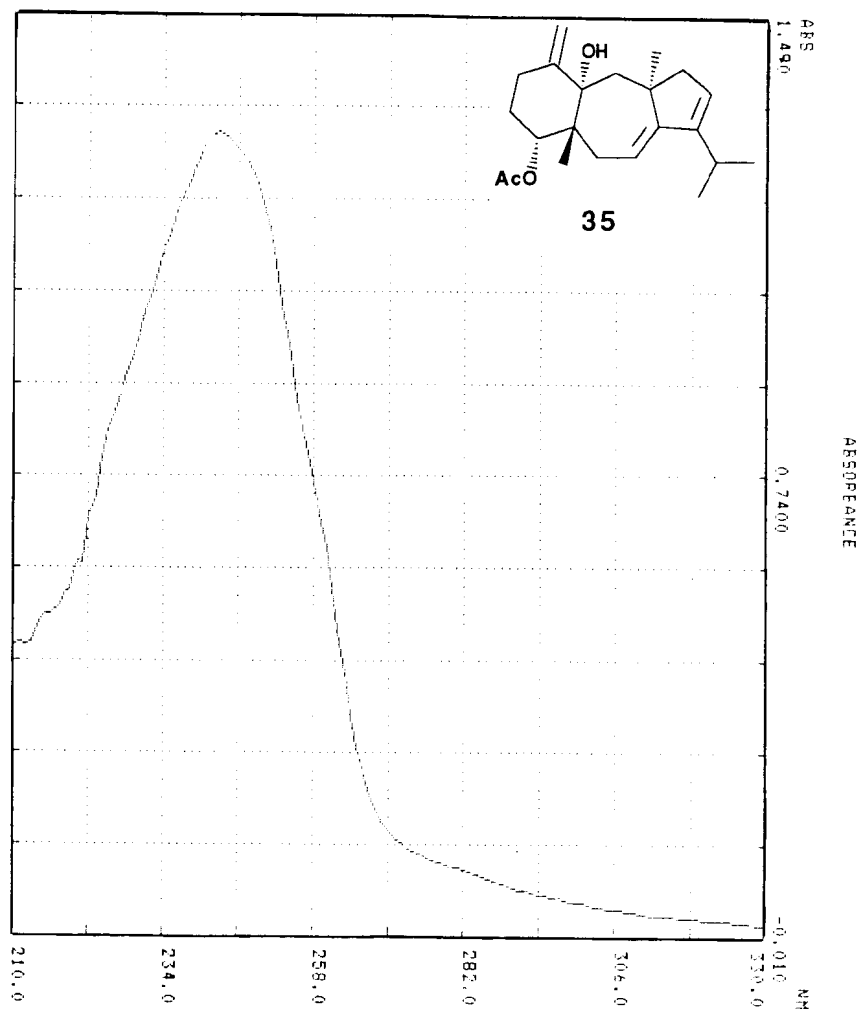
RMN  $^{13}\text{C}$  - DEPT (Figura 24, pág. 89) e pela comparação com os dados da literatura sobre os dolastanos (Tabela 9, pág. 100).

Estas considerações levaram à proposta estrutural para Dc-1 (35), mostrada abaixo:



A identificação desta substância foi confirmada através da busca no banco de dados de RMN  $^1\text{H}$  para os diterpenos marinhos do gênero *Dictyota*<sup>183</sup>, usando como regra de seleção "quatro metilas (duas singleto e duas dubleto), três ligações duplas (1 exocíclica e 2 trissubstituída) e um OAc (em carbono secundário)".

Esta substância, 4 $\alpha$ -acetoxi-14 $\alpha$ -hidroxidolastano-1(15),7,9-trieno ( $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_3$ ) já foi descrita na literatura para outras espécies.<sup>62,184-186</sup>



**Figura 20: espectro de UV da substância Dc-1 (35)**



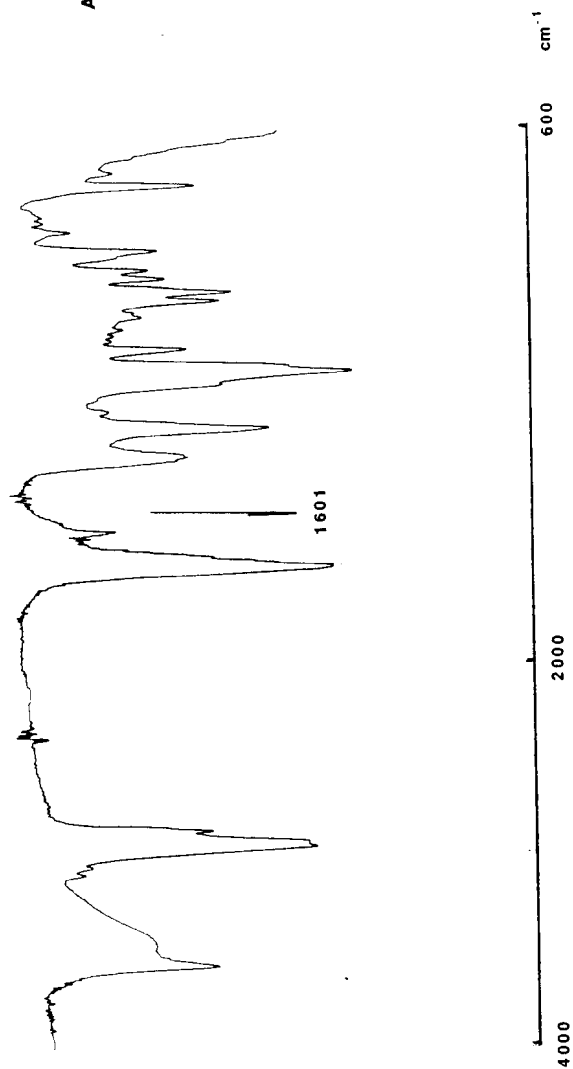
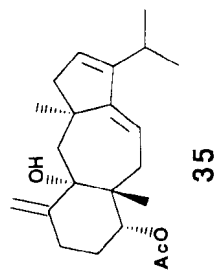


Figura 21: Espectro de IV de Dc-1 (35), registrado em filme.

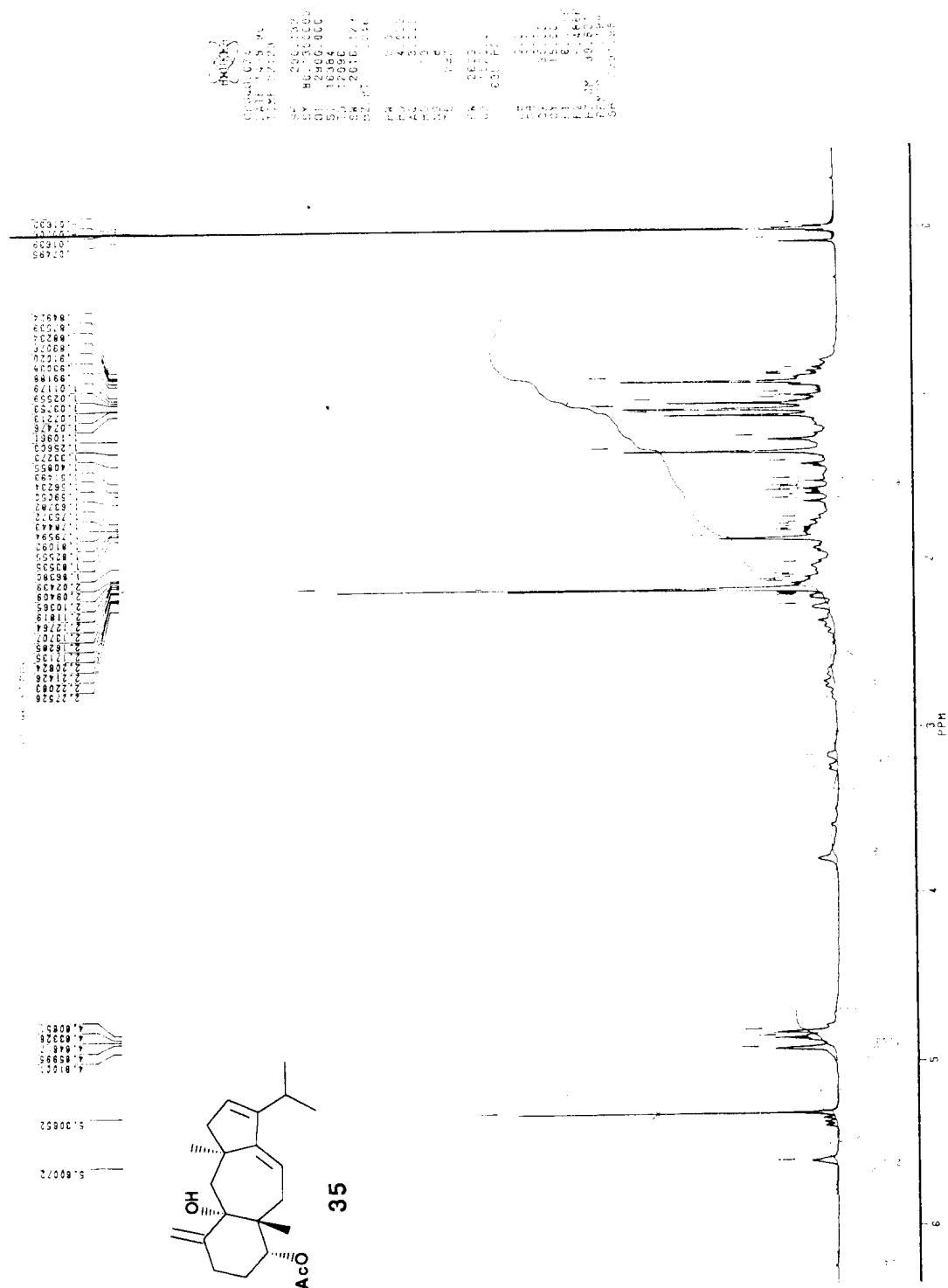


Figura 22: Espectro de RMN <sup>1</sup>H de Dc-1 (35), registrada a 200,00 MHz em CDCl<sub>3</sub> e TMS como referência interna.



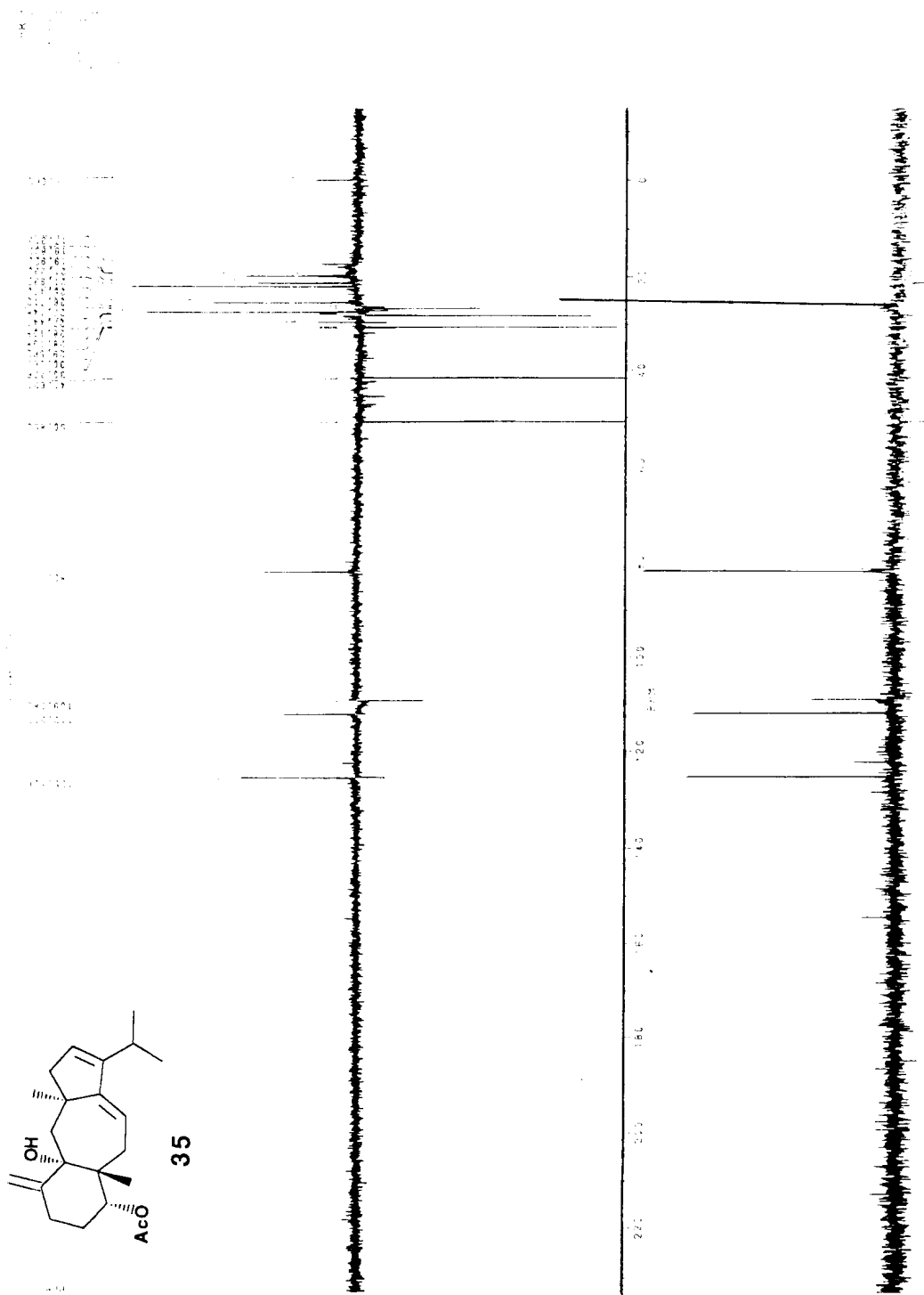


Figura 24: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  - DEPT de Dc-1 (35), registrado a 50,29 MHz em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna.

### 2.2.1.1.b. Identificação da substância Dc-2

A substância Dc-2, de aspecto oleoso-amarelado, quando submetida a c.c.f., aparece na revelação por UV. Após revelação com sulfato cérico, apresenta coloração violeta passando a arroxeadada.

O espectro de UV (Figura 25, pág. 94) indicou a presença de um dieno conjugado pela absorção a  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}} = 229 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 2.600$ ).

Os dados espectroscópicos (IV, RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ ) levaram à fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$ , compatível com 6 graus de insaturação (uma dupla exocíclica, duas ligações duplas trissubstituídas e três ciclos). O padrão das metilas e do exometileno aponta para um diterpeno de esqueleto dolastano.

O espectro IV (Figura 26, pág. 95) apresentou absorções a  $3550 \text{ cm}^{-1}$  (hidroxila) e  $1660$  e  $940 \text{ cm}^{-1}$  (grupo exometileno).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Tabela 9, pág. 100 e Figura 27, pág. 96) apresentou-se com sinais muito semelhantes aos da substância Dc-1 (35), principalmente no que se refere à C-20 (1.30  $\delta$ , s), ao grupamento isopropila (1.04  $\delta$ , d,  $J = 6.7 \text{ Hz}$ , H-18\* e 1.07  $\delta$ , d,  $J = 6.7 \text{ Hz}$ , H-19\*), aos prótons vinílicos com sinal simples e largo a 5.53  $\delta$  ( $W_{1/2} = 5.4 \text{ Hz}$  para H-10) e ao duplo dubleto a 5.39  $\delta$  ( $J = 4.8$  e  $9.5 \text{ Hz}$  para H-7), bem como aos deslocamentos em 4.68  $\delta$  (sl) e 4.81  $\delta$  (sl, H-15 e H-15'), que mais

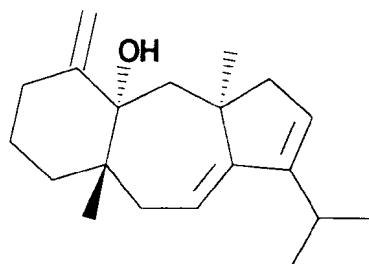
uma vez confirmam a presença da dupla exometilênica no anel A, de seis membros, adjacente a uma hidroxila. Entretanto, a ausência do tripleto em 4.85  $\delta$  (H-4 de Dc-1), a absorção em 2.97  $\delta$  (dd, J= 4.6 e 15.7 Hz para o  $\alpha$ -H-6 pseudo-axial) e a mudança do sinal simples (Me-16) de 0.91 (s) para 0.82 (s) apontaram para a ausência do grupamento OAc em C-4, o que foi confirmado pelo desaparecimento da absorção em  $\delta$  2.16 (s), presente na substância Dc-1 (35).

A correlação homonuclear-bidimensional ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - HOMOCOSY) (Figura 28, Pág. 97) facilitou a interpretação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  (Tabela 9, pág. 100), apontando a presença dos acoplamentos entre os prótons H-7 (5.39, dd) e  $\alpha$ -H-6 (2.97, dd), H-7 (5.39, dd) e H-10 (5.53, sl), e H-11 (2.2 dd), H-15 (4.68, sl) e H-15' (4.81, sl).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabela 10, pág. 101 e Figura 29, pág. 98) também é muito semelhante ao da substância Dc-1 (35), embora ocorra uma mudança nítida na absorção do C-4 (de 82.17  $\delta$  na substância Dc-1, passou a absorver a 31.98  $\delta$  nesta substância), além dos efeitos sobre os carbonos C-2 e C-6 (que passam de  $\delta$  30.56 (t) e 28.19 (t), para  $\delta$  37.10 (t) e 34.97 (t), respectivamente). A absorção em 169.4 (q,  $\text{OCOCH}_3$ ) de Dc-1 também está ausente, como seria esperado (a região em torno de 22.0  $\delta$  onde  $\text{OCOCH}_3$  absorve é congestionada). Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  - DEPT confirmam os resultados observados (Figura 30, pág. 99).

Estas considerações levam à proposta estrutural seguinte

seguinte para Dc-2 (36):



36

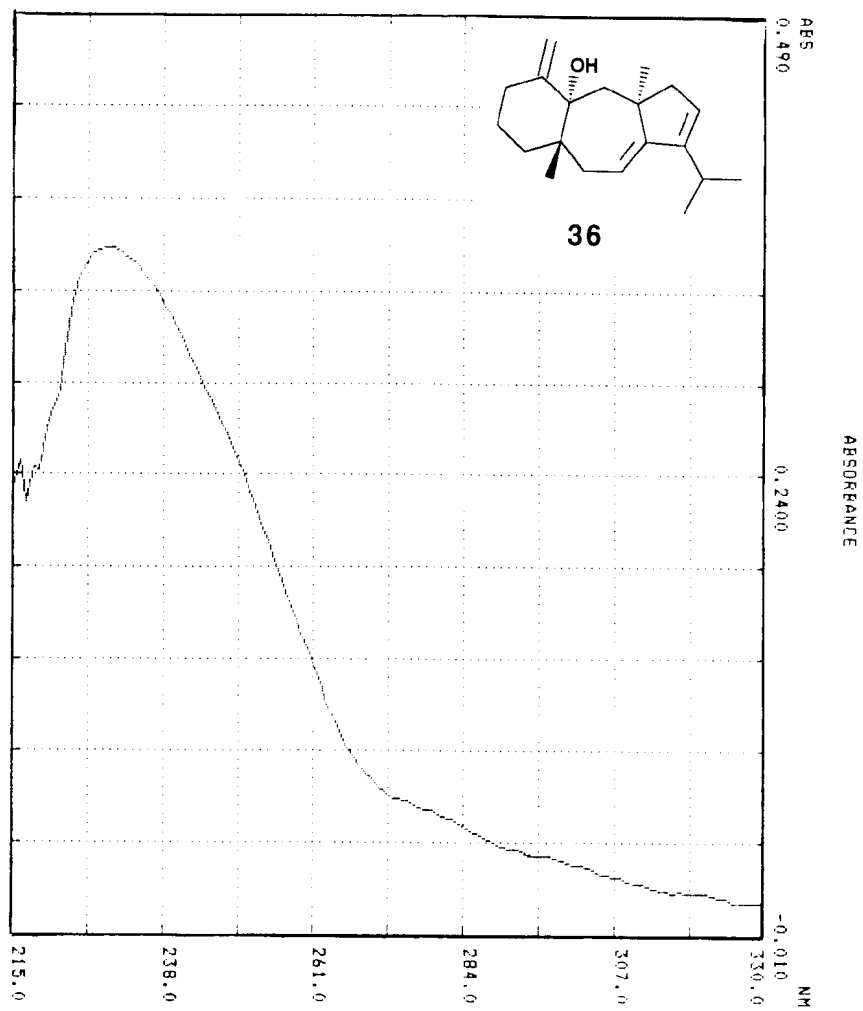
A busca dos dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  para as informações codificadas como "4 metilas (duas singlete e duas dubleto), 3 ligações duplas (uma exometilênica e duas tris-substituídas), 1 hidroxila (em carbono terciário) e ausência de grupamento  $\text{OAc}$ ", na biblioteca de padrões de diterpenos marinhos para o gênero *Dictyota*,<sup>183</sup> corroborou a caracterização de Dc-2 como 14 $\alpha$ -hidroxi-dolastano-1(15)-7,9-trieno ( $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$ )<sup>185,187</sup> (36).

Este trabalho descreve a primeira ocorrência de (36) na espécie *Dictyota cervicornis*, apesar da sua descrição anterior em *D. linearis*<sup>185</sup> e *D. divaricata*<sup>187</sup>. Os resultados espectrais estão de acordo com os dados da literatura.<sup>185,187</sup>

A substância Dc-2 (36) pode ser um artefato gerado durante as etapas de isolamento e purificação, quando em contato com solvente ácido ( $\text{CHCl}_3$ ), a partir de (36a), como demonstrado na Figura 31 (pág. 102).<sup>62,185</sup> No entanto, Crews, et al (1982)<sup>185</sup> evidenciaram a existência de Dc-1 (35) no extrato bruto de uma

amostra congelada (Ilha Roatan, EUA), através de sinais característicos em RMN  $^1\text{H}$ . Similarmente, a substância 36 poderia ser gerada a partir do precursor 36a, não encontrado ainda em *Dictyota cervicornis* (Figura 31, pág.102).





**Figura 25: espectro de UV da substância Dc-2 (36)**

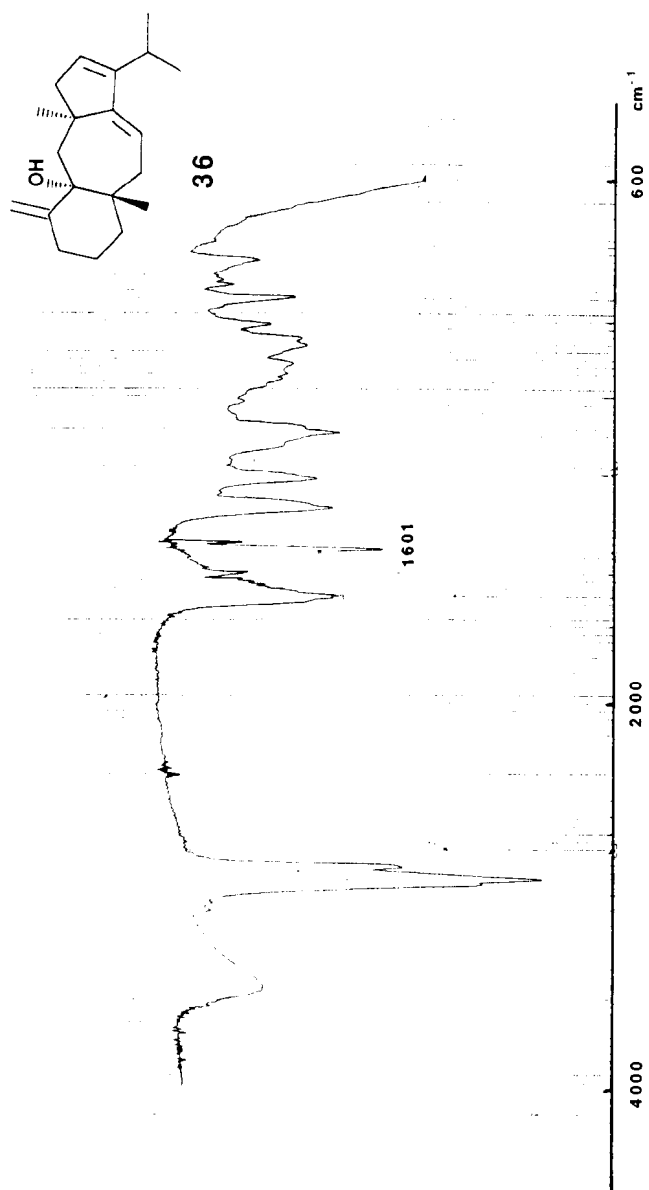


Figura 26: Espectro de IV de Dc-2 (36), registrado em filme

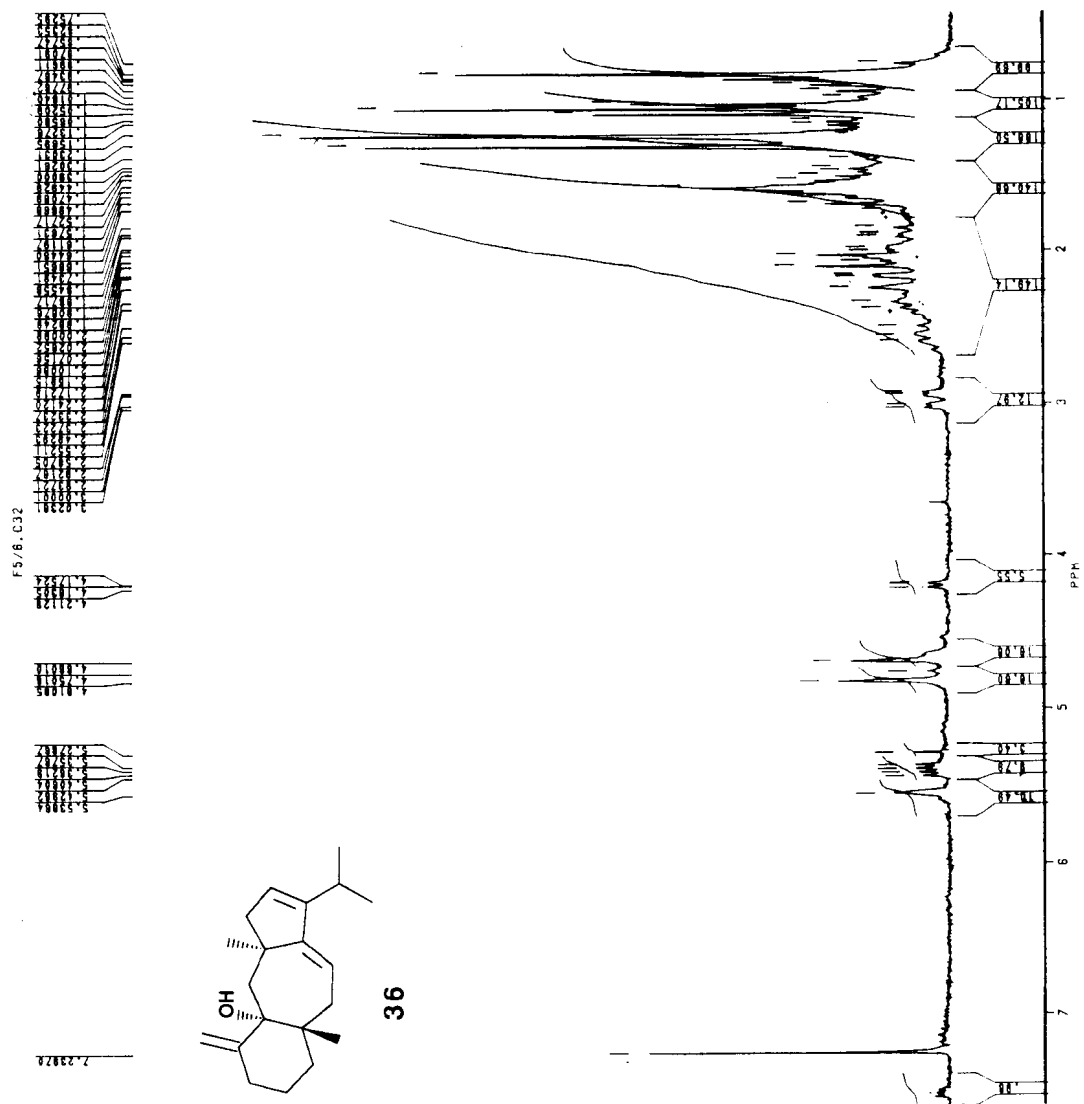
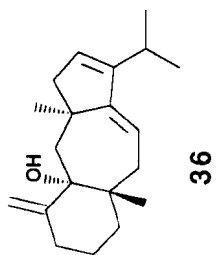
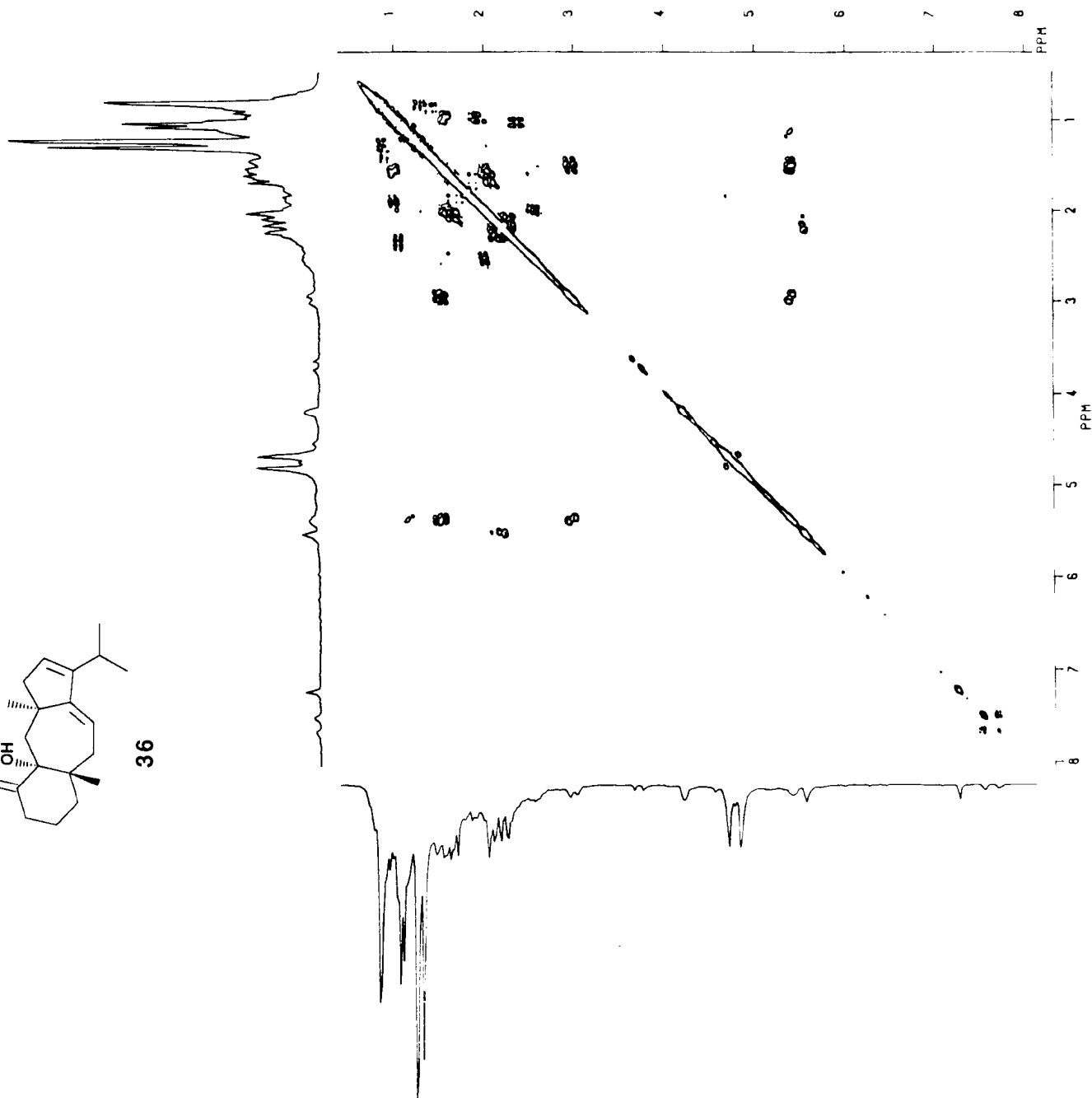


Figura 27: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de Dc-2 (36), registrada a 200,00 MHz em  $\text{CDCl}_3$  e TMS como referência interna.

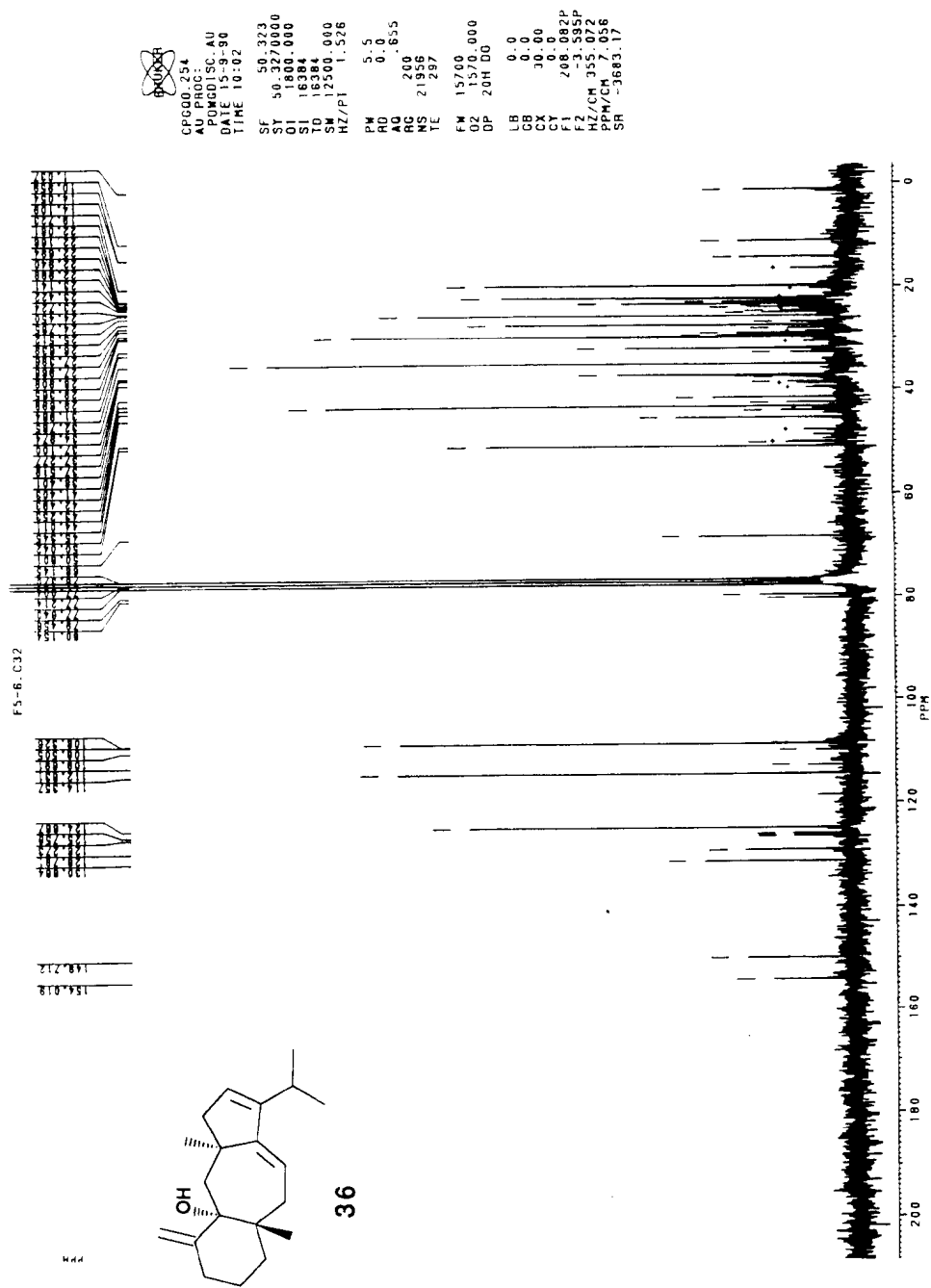


~~EXPER~~  
 H0030.SMX  
 F1.PROJ.:  
 F2.PROJ.:  
 INTERNAL  
 INTERNAL  
 AU.PROG.:  
 COSY.AU  
 DATE 18-10-90  
 S12 1024  
 S11 512  
 SM2 1884.127  
 SM1 992.063  
 NDO 1

M0M2 S  
 M0M1 S  
 S0B2 0  
 S0B1 0  
 M0Z1 H  
 PL1H ROW: 8.033P  
 F1 8.033P  
 F2 .481P  
 AND COLUMN:  
 F1 8.092P  
 F2 .385P  
 D1 1.0000000  
 P1 5.5  
 D0 -0.0000030  
 P2 3.3  
 RD 0.0  
 PW 1.0  
 DE 315.0  
 NS 8  
 DS 2  
 NE 256  
 IN .0005040



**Figura 28:** Espectro de HOMOCOSY  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (bidimensional) do dolastano Dc-2 (36) registrado a 200,00 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , TMS como referência interna.



**Figura 29:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do dolastano Dc-2 (36) registrado a 50,29 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , TMS como referência interna.



Tabela 9 : Dados selecionados de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos Dc-1 e Dc-2 (200,00 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno), comparados com os dados da literatura.<sup>184</sup>

H	Dc-1 (35)	lit. <sup>184</sup>	Dc-2 (36)
H-4	4.85 t	4.86 sl	
$\alpha$ -H-6	3.20 dd <sup>14,4</sup>	3.22 dd <sup>14,4</sup>	2.97 dd <sup>4.7, 15.7</sup>
H-7	5.36 dd <sup>10,4</sup>	5.39 dd <sup>9,4</sup>	5.39 dd <sup>4.7, 9.5</sup>
H-10	5.61 sl	5.64 sl	5.53 sl <sup><math>W_{1/2}=5.4</math></sup>
Me-15	4.80 sl*	4.83 s*	4.68 sl*
Me-15'	4.91 sl*	4.91 s*	4.81 sl*
Me-16	0.93 s	0.95 s	0.82 s
Me-18	1.05 d <sup>7.4</sup>	1.07 d <sup>6.5</sup>	1.04 d <sup>6.7</sup>
Me-19	1.09 d <sup>7.4</sup>	1.11 d <sup>6.5</sup>	1.07 d <sup>6.7</sup>
Me-20	1.33 s	1.36 s	1.30 s
$\text{OCOCH}_3$	2.16 s	2.18 s	-

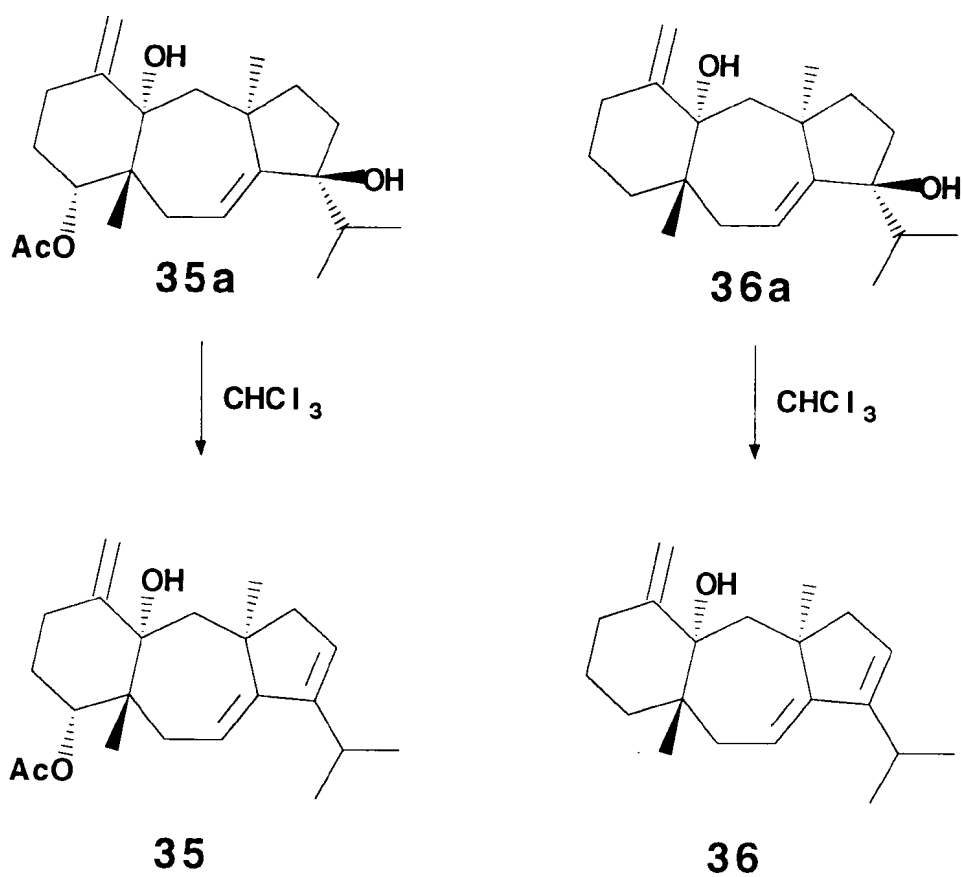
(\* e " : sinais intertrocáveis)

Tabela 10 : Dados espectrais de RMN<sup>13</sup> C (50,29 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS como padrão interno) de Dc-1 e Dc-2 e comparação com dados da literatura.

C	Dc-1 (35)	lit. <sup>184</sup>	Dc-2 (36)	lit. <sup>185</sup>
C-1	151.34 s	149.6 s	154.01 s	149.8 s
C-2	30.58 t	-	37.10 t	37.2 t
C-3	27.14 t	-	29.69 t	23.2 t
C-4	82.17 d	82.3 d	31.98 t	32.1 t
C-5	43.70 s	43.9 s	41.40 s	41.4 s
C-6	28.19 t	-	34.97 t	35.1 t
C-7	112.31 d	112.5 d	114.35 d	114.5 d
C-8	154.80 s	151.6 s	153.80 s*	154.1 s
C-9	149.40 s	155.0 s	149.71 s*	153.9 s
C-10	125.50 d	125.6 d	124.66 d	124.7 d
C-11	41.63 t	-	43.25 t	43.4 t
C-12	45.51 s	45.8 s	45.30 s	45.4 s
C-13	50.85 t	-	50.80 t	50.9 t
C-14	79.92 s	80.1 s	79.45 s	79.5 s
C-15	109.40 t	109.4 t	108.50 t	108.6 t
Me-16	27.40 q	-	19.72 q	19.9 q
C-17	25.47 d	27.6 d	25.51 d	25.6 d
Me-18	21.29 q*	-	22.06 q	22.3 q
Me-19	22.00 q*	-	22.16 q	22.3 q
Me-20	19.90 q	-	27.39 q	27.6 q
OCOCH <sub>3</sub>	169.43 s	169.3 s	-	-
OCOCH <sub>3</sub>	22.00 q*	-	-	-

(\* : sinais intertrocáveis)





**Figura 31:** Processo de desidratação de 35a e 36a para Dc-1 (35) e Dc-2 (36), respectivamente, na presença de  $\text{CHCl}_3$ .

## 2.2.1.2. Identificação dos diterpenos isolados de *Dictyota mertensii*

### 2.2.1.2.a. Identificação da substância Dm-1

Esta é uma substância de aspecto oleoso que, quando revelada com sulfato cérico, apresenta coloração violeta passando a arroxeadada.

Os dados espectroscópicos evidenciam a presença de outro diterpeno de fórmula molecular igual a  $C_{22}H_{34}O_4$ , indicando 6 graus de insaturação, sendo duas ligações duplas C=C (RMN  $^{13}C$ : 123.71 (d), 142.02 (s), 152.28 (s), 107.33 (t) e RMN  $^1H$ : 5.32 (m,  $W_{1/2}$  = 6.2 Hz) e 4.75 (m,  $W_{1/2}$  = 7.8 Hz) e um grupo acetato (RMN  $^{13}C$ : 170.62 (s) e RMN  $^1H$ : 2.00 (s)). Os três graus de insaturação restantes indicam a presença de um esqueleto tricíclico.

Por outro lado, o padrão dos prótons metínicos e a ausência de metila angular em carbono quaternário apontaram para um diterpeno de esqueleto gualano prenilado.

O espectro IV (Figura 32, Pág. 107) revelou a presença das bandas de absorção em 3448, 1725 e 1078  $cm^{-1}$  que foram atribuídas a estiramento de OH, carbonila de éster e grupo exometilênico.

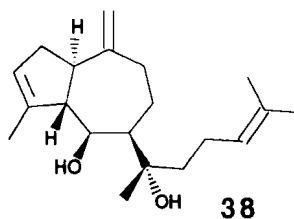
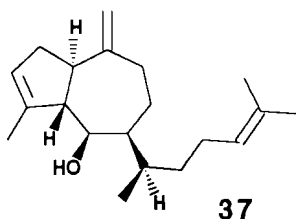
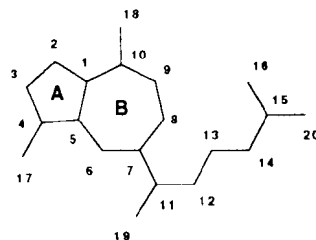
Como anteriormente mencionado, o espectro de RMN  $^1H$

(Figura 33, pág. 108) mostrou as absorções de 2 prótons vinílicos em  $\delta$  5.32 (m,  $J = W_{1/2} = 6.2$  Hz,  $C(3)H_1$ ) e 4.75 (m,  $J = W_{1/2} = 7.8$  Hz,  $C(18)H_2$ ), dois prótons ligados a carbonos substituídos por oxigênio (4.18 dd,  $J = 3$  e 7.8 Hz,  $C(8)H_1$  e 3.79 t,  $J = 7.2$  Hz,  $C(14)H_1$ ) e 5 metilas, sendo que uma delas pertence ao grupamento acetato (2.00 (s), 1.80 (s), 1.54 (s), 1.46 (s), 1.28 (s)) (Tabela 11, pág. 111).

O espectro de RMN  $^{13}C$  (Figura 34, pág. 109 e Tabela 11, pág. 111) e RMN  $^{13}C$  - DEPT (Figura 35, pág. 110) evidenciaram a presença de 5 carbonos quaternários (s) : 142.02 para C-4, 152.28 para C-10, 86.99 para C-11, 82.14 para C-15, 170.62 para  $OC(=O)CH_3$  ; 6 carbonos metínicos (d) : 46.03 para C-1, 123.71 para C-3, 59.43 para C-5, 73.40 para C-6, 50.06 para C-7, 83.59 para C-14 ; 6 carbonos metilênicos (t) : 33.96 para C-2, 22.67 para C-8, 40.85 para C-9, 35.06 para C-17, 25.96 para C-13, 107.33 para C-18; e 5 carbonos metílicos (q) : 22.59 para C-16, 15.92 para C-17, 24.56 para C-19, 22.59 para C-20, 22.59 para  $OC(=O)CH_3$  .

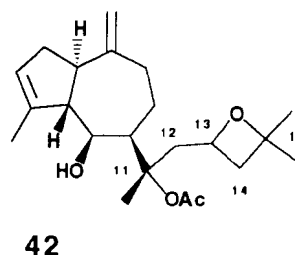
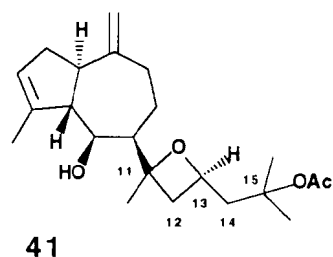
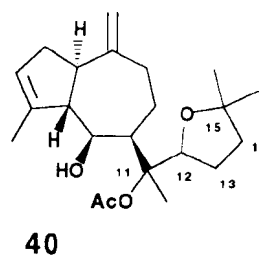
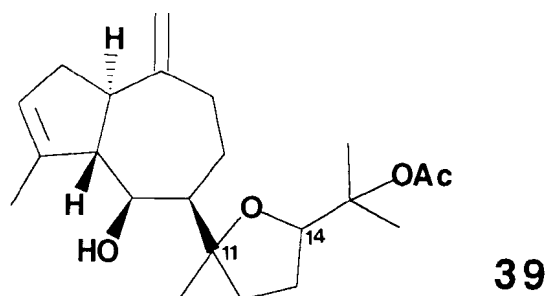
A comparação dos dados espectroscópicos de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  desta substância com uma série de guaianos prenilados conhecidos para o gênero, os dictyóis,<sup>65,188,202</sup> indicou uma alta funcionalização na sua cadeia lateral envolvendo os três grupos metila, além de uma porção carbocíclica idêntica à das substâncias pachydictyol A (37) e dictyol E (38): presença de um grupamento  $=CH_2$  exocíclico (RMN  $^1H$ :  $\delta$  4.75 (m,  $W_{1/2} = 7.8$  Hz), uma hidroxila secundária (RMN  $^1H$ :  $\delta$  4.18 (dd,  $J = 3$  e 7.8 Hz; RMN  $^{13}C$ :

73.40 d) e uma ligação dupla trissubstituída com uma metila (RMN  $^{13}\text{C}$ : 142.02 (s) para C-4, e RMN  $^1\text{H}$ : 5.32 (m),  $W_{1/2} = 6.2$  Hz, para H-3).



Os dados de ressonância relativos à cadeia lateral, no entanto, evidenciaram 4 carbonos substituídos por oxigênio (RMN  $^{13}\text{C}$ : 86.99 (s), 83.59 (d), 82.14 (s) e 170.62 (s)), 1 próton metínico (RMN  $^1\text{H}$ : 3.79 (t)), 2 carbonos metilênicos (RMN  $^{13}\text{C}$ : 35.06 (t) e 25.96 (t)), 4 metilas (22.59 (q), 22.59 (q), 24.56 (q), 22.25 (q)).

A análise destes resultados apontou para um grupo acetato e para a presença de um éter cíclico. A proposta para presença de epóxido é facilmente descartada pela ausência do deslocamento químico em torno de  $\delta$  62.00. Deste modo, sugerimos as seguintes alternativas para a localização do oxigênio do éter: entre os carbonos C-15 e C-13 (39), C-15 e C-12 (40), C-11 e C-13 (41) ou C-11 e C-14 (42).



Uma vez que a multiplicidade do hidrogênio ligado ao éter é tripleto, podemos eliminar as possibilidades de ciclizações entre os carbonos C-11 e C-13 (41) e C-13 e C-15 (42), para as quais o H em C-13 seria multiplete.

Por outro lado, a distinção das demais estruturas (39 e 40) poderia ser realizada através da fragmentação em espectrometria de massas. Entretanto, este espectro não foi registrado pela pouca quantidade da amostra e pelo processo destrutivo da técnica.

A consulta ao banco de dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  para os diterpenos de algas pardas do gênero *Dictyota* selecionando estruturas com quatro metilas (três como singletos e uma em ligação dupla) permitiu a identificação imediata de 39 como Dictyol H ( $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4$ ). Esta substância somente tinha sido relatada para *Dictyota dentata*,<sup>188</sup> provável sinônimo de *D. mertensii*.<sup>65, 182</sup>









**Tabelas 11:** Dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (200,00, e 50,29 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do guaiano **Dm-1 (39)** comparados com dados da literatura.

CARBONO N <sup>o</sup>	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$ (39)	$^{13}\text{C}$ (lit.) <sup>189</sup>
1		46.03 d	46.07 d
2		33.96 t	33.99 t
3	5.32 m <sup><math>W_{1/2}=6.2</math></sup>	123.71 d	123.64 d
4		142.02 s	142.01 s
5		59.43 d	59.45 d
6	4.18 dd <sup><math>9;7.8</math></sup>	73.40 d	73.37 d
7		50.06 d	50.13 d
8		22.67 t	22.18*
9		40.45 t	40.43 t
10		152.28 s	152.19 s
11		86.99 s	86.91 s
12		35.06 t	35.07 t
13		25.96 t	25.97 t
14	3.79 t <sup><math>7.2</math></sup>	83.59 d	83.50 d
15		82.14 s	82.15 s
16*	1.54 s	22.59 q	24.51 q
17	1.80 d	15.92 q	15.84 q
18	4.75 m <sup><math>W_{1/2}=7.8</math></sup>	107.33 t	107.28 t
19	1.28 s	24.56 q	22.55*
20*	1.46 s	22.59 q	22.55*
OCOMe	2.00 s	22.25 q	22.55*
OCOMe		170.62 s	170.50 s

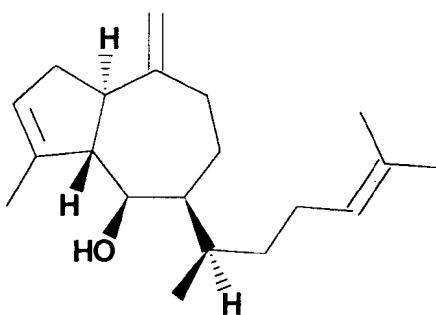
\* sinais intertrocaveis

**2.2.1.3. Identificação dos diterpenos isolados de *Dictyota mertensii* e *Dictyota dichotoma***

**2.2.1.3.a. Identificação de Dmd-2**

A substância, de aspecto oleosa-amarelada, com  $R_f$  igual a 0,88 quando submetida a c.c.f., não aparece na revelação por UV nos comprimentos de onda longo e curto, mas quando revelada com sulfato cérico, apresenta coloração violeta passando a arroxeadada.

Esta substância, que já tinha sido isolada várias vezes no laboratório, foi apenas identificada por comparação de  $R_f$  em c.c.f. com amostra autêntica (Pachydictyol A, 37).<sup>185,182,189</sup> Ela se destaca facilmente das demais substâncias pela sua pouca polaridade.



**37**

Esta substância já foi relatada para diversas espécies do mesmo gênero: *Dictyota* sp.(4),<sup>190,191</sup> *D. dentata*,<sup>188</sup> *D.*

*binghamiae*,<sup>192</sup> *D. crenulata*,<sup>193</sup> *Dictyota sp.(1)*,<sup>194</sup> *D. spinulosa*,<sup>195</sup>  
*Dictyota sp.(6)*,<sup>195</sup> *Dictyota sp.(5)*,<sup>196</sup> e *D. dichotoma*.<sup>197-200</sup> Esta  
última alga parece ser um complexo de espécies devido à grande  
variedade de esqueletos nela encontrados.<sup>201</sup>

Nossos estudos fitoquímicos e quimiosistemáticos das  
algas pardas mais representativas da costa brasileira levaram às  
observações seguintes:

- Entre as *Dictyotales*, os representantes do grupo  
"Dictyopteris" caracterizam-se pela produção de sesquiterpenos de  
origem biossintética mista ou não.

Inicialmente estudamos a espécie *Dictyopteris  
plagiogramma* com o intuito de isolarmos e caracterizarmos os  
principais terpenos nos extratos desta alga. Os resultados  
demonstraram a ausência de terpenos em quantidades detetáveis, mas  
encontramos o éter monometilado do glicerol e lipídeos de cadeia  
linear. Isto está de acordo com as informações da literatura que  
estabelecem a ausência de terpenos quando lipídeos de cadeia longa  
são detectados.<sup>203</sup>

- Por outro lado, as representantes do grupo "Dictyota"  
são ricas em diterpenos simples, com esqueletos quase  
exclusivamente marinhos, ou seja, não encontrados frequentemente  
em vegetais terrestres.

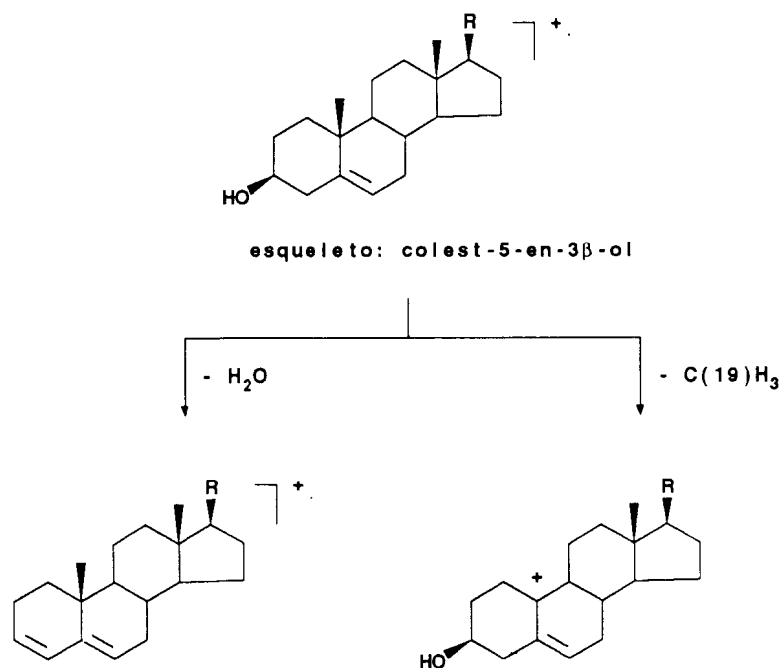
Isolamos e identificamos quatro diterpenos, dois de

*Dictyota cervicornis*, com esqueleto dolastano (um de ocorrência nova para o Brasil), e dois, guaianos prenilados, de *Dictyota dichotoma* e *Dictyota mertensii*. Estes resultados eram previsíveis através de nossos estudos quimiosistemáticos e complementa a série desses compostos anteriormente isolados<sup>62-65,182</sup> (Figura 8, pág. 34).

### 2.2.2. ESTERÓIS

Os métodos espectroscópicos convencionais (RMN, IV, UV) são geralmente inadequados para análise quantitativa e identificação de misturas, embora, por exemplo, dois sinais simples em torno de  $\delta$  0.7  $\delta$  e 0.9 ppm em RMN <sup>1</sup>H possam indicar a presença da Me-19 e Me-18, características de esteróis. Os sinais correspondentes a essas metilas em RMN <sup>1</sup>H dependem da localização de ligações duplas, do tipo de fusão dos anéis A e B e da funcionalização dos esteróides, e são previsíveis aplicando-se os incrementos de Zucker.<sup>204</sup> Entretanto, a técnica mais apropriada para separar e identificar, rapidamente, os componentes de misturas complexas é através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Os esteróis do tipo 5-en-3 $\beta$ -ol podem ser facilmente

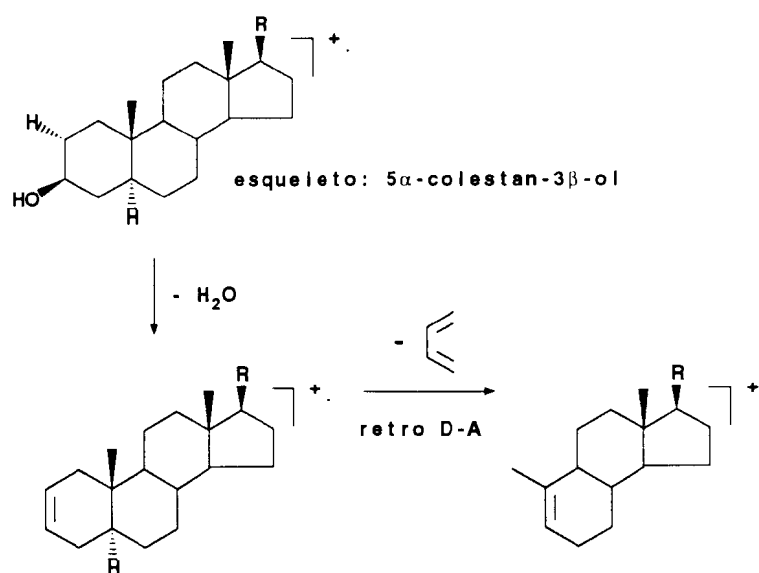
identificados por EM a partir de ions característicos como: M - 18 correspondente a perda de água, e M - 15, correspondente a perda da metila angular C-19. A presença destes ions parece estar relacionada com a eliminação 1,2 de água para formação do dieno conjugado  $\Delta^{3,5}$  e com a facilidade de estabilização do carbocátion formado no carbono terciário C-10 por ressonância com a dupla do C-5 respectivamente (Figura 36).<sup>205</sup>



**Figura 36:** Proposta do mecanismo de perda de água e da Me-19 a partir do esqueleto do tipo colest-5-en-3 $\beta$ -ol

Por outro lado, a perda de água nos sistemas esteroidais do tipo colest-5 $\alpha$ -3 $\beta$ -ol é sucedida pela perda de um butadieno.

Tal situação mostra que a quebra do anel A deve ser favorecida pela fragmentação retro-Diels-Alder (Figura 37).<sup>205</sup>



**Figura 37:** Proposta de mecanismo da eliminação de água a partir do esqueleto do tipo colestan-5 $\alpha$ -3 $\beta$ -ol

Analizamos cada mistura em cromatografia gasosa usando uma coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária apolar, SE-54 (5% fenil-metil-silicone), a fim de obter e comparar o perfil dos cromatogramas de cada espécie e as intensidades relativas de seus picos.

Algumas amostras autênticas como colesterol, chalinasterol, a mistura de campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol foram co-injetadas com as frações esteroidais das diferentes espécies para observar se havia coincidência de tempos de retenção.

Os tempos de retenção dados são relativos ao do colesterol (TRRc) e as composições (%) de cada pico são deduzidas a partir da área dos picos de c.g..

A identificação de cada esterol foi realizada por espectrometria de massa (EM) da mistura, co-injeção das misturas com seus respectivos padrões e por CG/EM.

É importante ressaltar que as três técnicas em conjunto (co-injeção, TRR, EM) conferem maior confiabilidade aos resultados, uma vez que as misturas foram injetadas em apenas um tipo de coluna cromatográfica (coluna apolar - SE-54) (Tabela 12, pág. 118).

Não foi possível adquirir todos os padrões necessários, nem os espectros de massas de todos os picos observados nos cromatogramas.

**Tabela 12: Técnicas analíticas empregadas para identificações dos esteróis para cada espécie**

Espécies	EM/da mistura	co-injeção com padrão	CG/EM
D.cer. <sup>B</sup>		+	+
D.cer. <sup>M</sup>		+	+
D.dic.	+	+	+
D.mer.		+	
D.del.	+	+	+
D.pla.	+	+	+
S.fil.		+	+
S.fur.	+	+	+

(+ : ocorrência de identificação; B : coletada em Búzios (RJ);  
M : coletada em Mambucaba (RJ))

**Dictyotales**

D.cer. = *Dictyota cervicornis*

D.dic. = *Dictyota dichotoma*

D.mer. = *Dictyota mertensii*

D.del. = *Dictyopteris delicatula*

D.pla. = *Dictyopteris plagiogramma*

**Fucales**

S.fil. = *Sargassum filipendula*

S.fur. = *Sargassum furcatum*

Foram obtidas oito frações de esteróis monoidroxilados a partir de algas pardas (Tabela 13, pág. 119).



**Tabela 13: Porcentagem de esteróis nas diferentes espécies de algas pardas: Ordens Dictyotales e Fucales**

ESPÉCIES	ESTEROL (%)
<b>Dictyotales</b>	
<i>Dictyota cervicornis</i> <sup>M</sup>	0,01
<i>Dictyota cervicornis</i> <sup>B</sup>	0,007
<i>Dictyota dichotoma</i> <sup>B</sup>	0,01
<i>Dictyota mertensii</i> <sup>B</sup>	0,02
<i>Dictyopteris delicatula</i> <sup>B</sup>	0,03
<i>Dictyopteris plagiogramma</i> <sup>A</sup>	0,01
<b>Fucales</b>	
<i>Sargassum filipendula</i> <sup>A</sup>	0,1
<i>Sargassum furcatum</i> <sup>A</sup>	0,1

legenda: M- alga coletada em Mambucaba (RJ)  
 A- algas coletadas em Angra dos Reis (RJ)  
 B- algas coletadas em Buzios (RJ)

### 2.2.2.1. Identificação da fração esteroidal de *Dictyota cervicornis*<sup>M</sup>

A análise da fração esteroidal em cromatografia a gás (Figura 38, pág. 120), apesar da complexidade do cromatograma, mostrou três picos principais de tempo de retenção (relativos a colesterol, TRRc) iguais a 1.00, 1.14 e 1.15. Esses esteróis foram identificados por co-injeção com amostras autênticas de

colesterol, chalinasterol e campesterol. Também por co-injeção verificou-se a presença de traços de estigmasterol (Tabela 14).

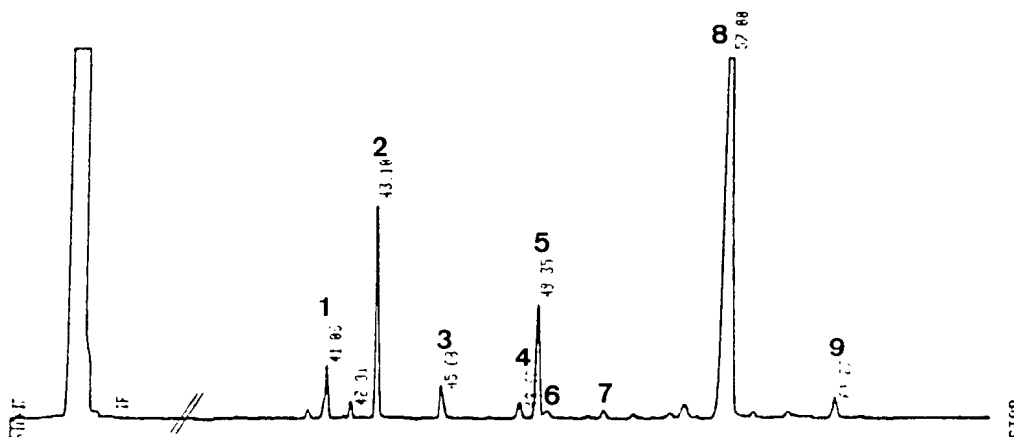


Figura 38: Cromatograma de *Dictyota cervicornis*<sup>M</sup>

A Tabela 14 apresenta os TRRc dos diferentes esteróis e suas percentagens na mistura analisada.

Tabela 14: Tempos de retenção (relativos ao colesterol, TRRc) e composição da fração esteroidal de *Dictyota cervicornis*<sup>M</sup>.

Picos	Co-injeção	TRRc	%
1		0.95	4.2
2	colesterol	1.00	13.9
3		1.06	2.8
4		1.13	1.2
5	chalinasterol	1.15	8.2
6	campesterol	1.15	0.8
7	estigmasterol	1.23	traço
8		1.32	62.2
9		1.42	2.0

Para tentar identificar os demais componentes da mistura, esta foi analisada por CG/EM.

O espectro de massas do pico 1 (Figura 39, pág. 121) apresentou os íons  $m/z$  384 como pico base (M) e os fragmentos  $m/z$  369,  $m/z$  366 e  $m/z$  351, característicos das perdas de metila, de água e metila + água, respectivamente. Os fragmentos  $m/z$  300 (M - (C<sub>8</sub>H<sub>11</sub> + 1H)),  $m/z$  271 (M - (C<sub>8</sub>H<sub>15</sub> + 2H)) e,  $m/z$  255 (M - (C<sub>8</sub>H<sub>15</sub> + H<sub>2</sub>O)) correspondem às fragmentações na cadeia lateral. Deste modo, propomos a estrutura do 22-deidrocolesterol (22-DHC, C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O) para esta substância (Figura 40, pág. 122)

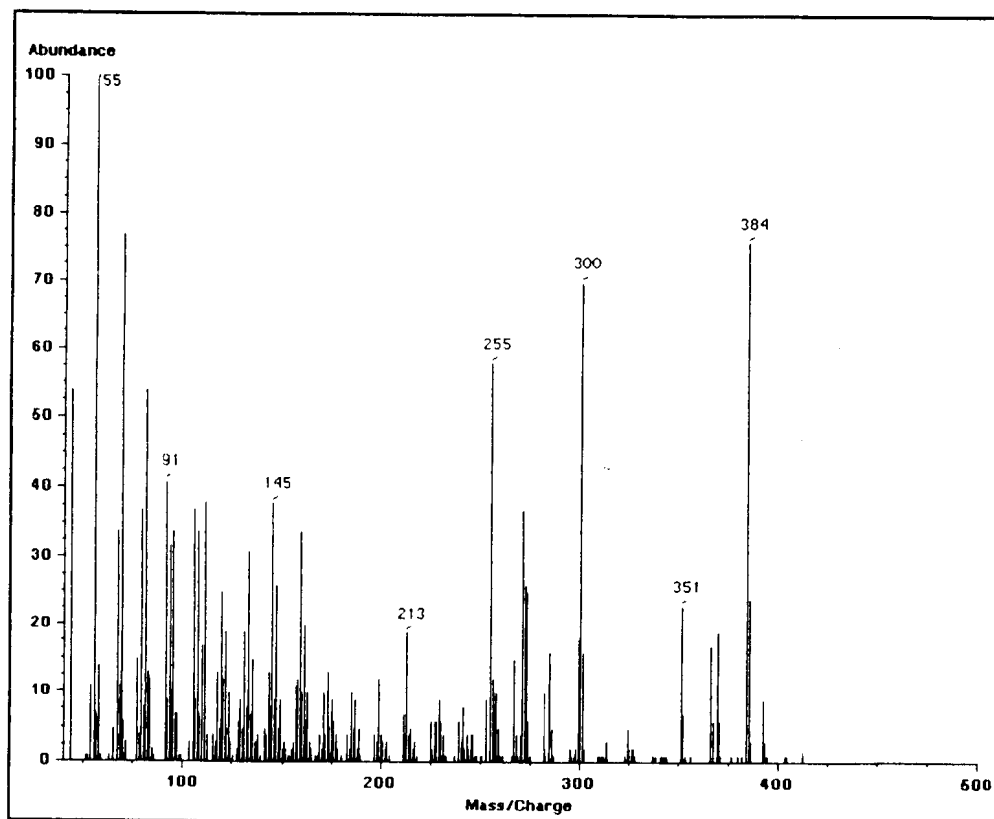
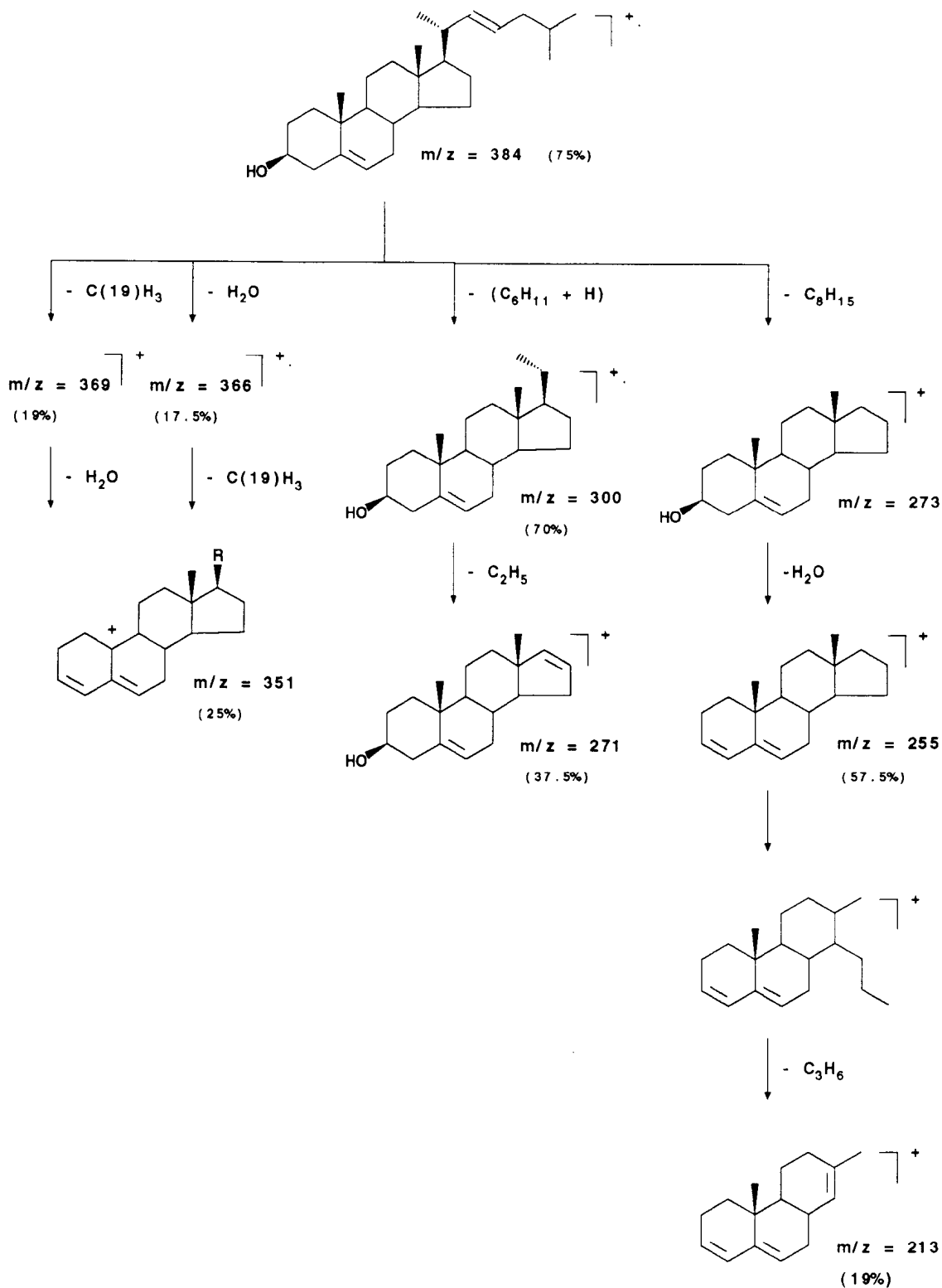
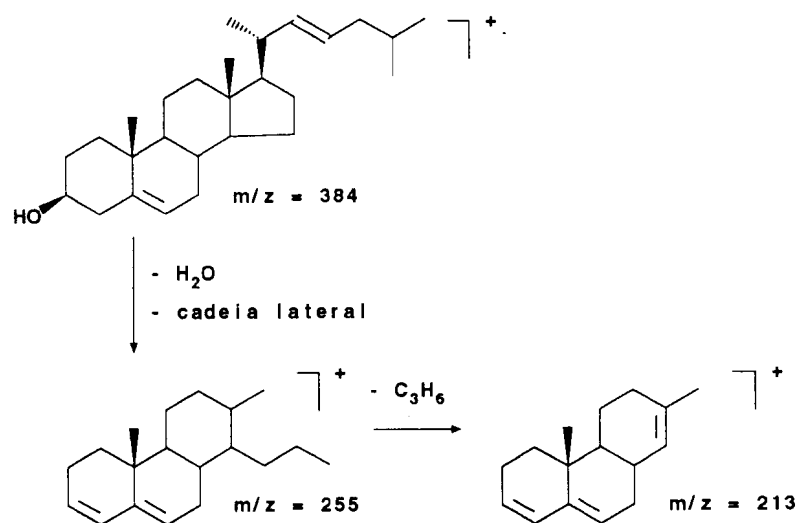


Figura 39: Espectro de massas do 22-deidrocolesterol



**Figura 40: Principais caminhos de fragmentação observados para 22-deidrocolesterol (22-DHC)**

As fragmentações na cadeia lateral e a formação do íon  $m/z$  213 (Figura 41, pág.123) foram baseadas nos mecanismos relatados (Budzikiewicz *et al* 1964).<sup>205</sup> O padrão de clivagens do anel D, entre os carbonos 13-17 e 14-15 do esqueleto colestano, é típico dos espectros de massa de esteróis com este esqueleto.



**Figura 41:** Caminho proposto para clivagem dos carbonos 13-17 e 14-15 do 22-deidrocolesterol (22-DHC)

O espectro de massas do pico 2 ( $M = C_{27}H_{46}O$ ,  $m/z$  386, 100% - pico base) (Figura 42, pág. 124), apresentou os picos  $m/z$  371 ( $M - Me$ ), 368 ( $M - H_2O$ ), 353 ( $M - (Me + H_2O)$ ). Os fragmentos  $m/z$  301 ( $M - C_6H_{13}$ ),  $m/z$  275 ( $M - (C_8H_{17} + 2H)$ ), correspondem às fragmentações da cadeia lateral. Este EM confirma a identificação do colesterol. A Figura 43 (pág. 124) apresenta as fragmentações da cadeia lateral desta substância. As demais fragmentações são como as das Figuras 40 e 41 (págs. 122 e 123).

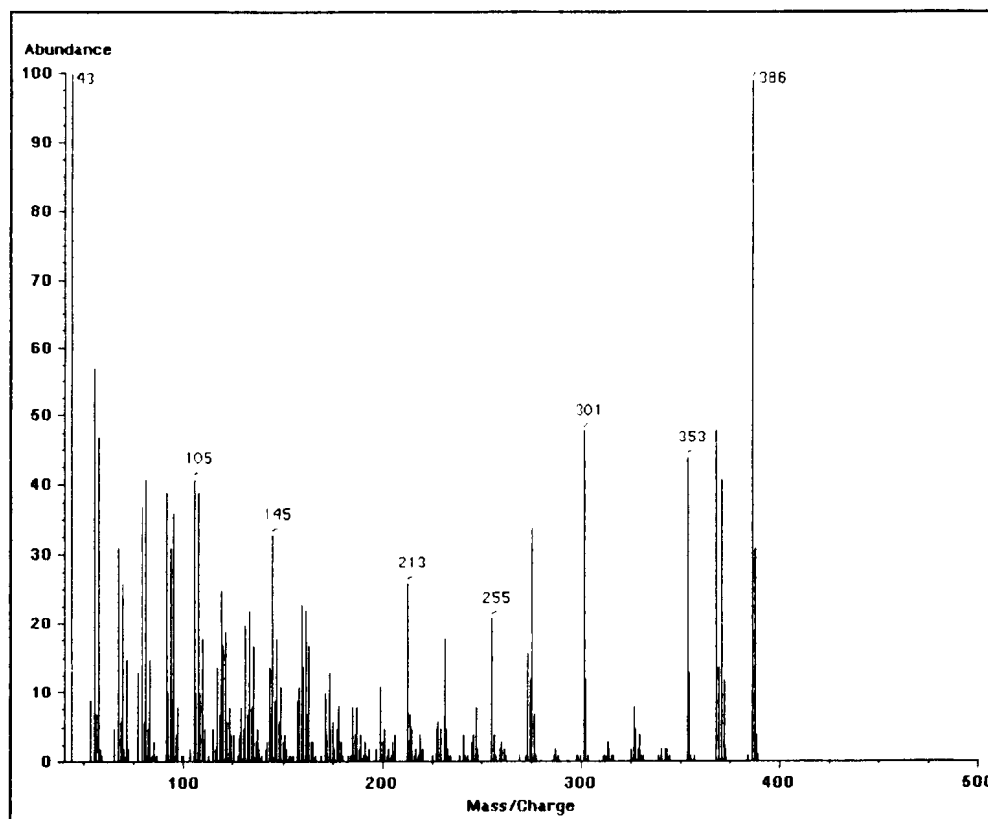


Figura 42: Espectro de massa do colesterol

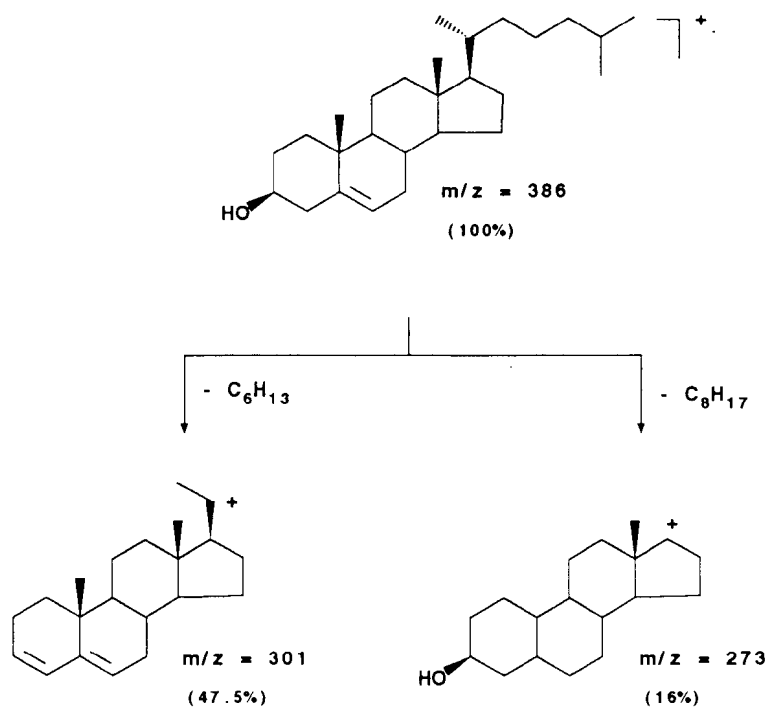
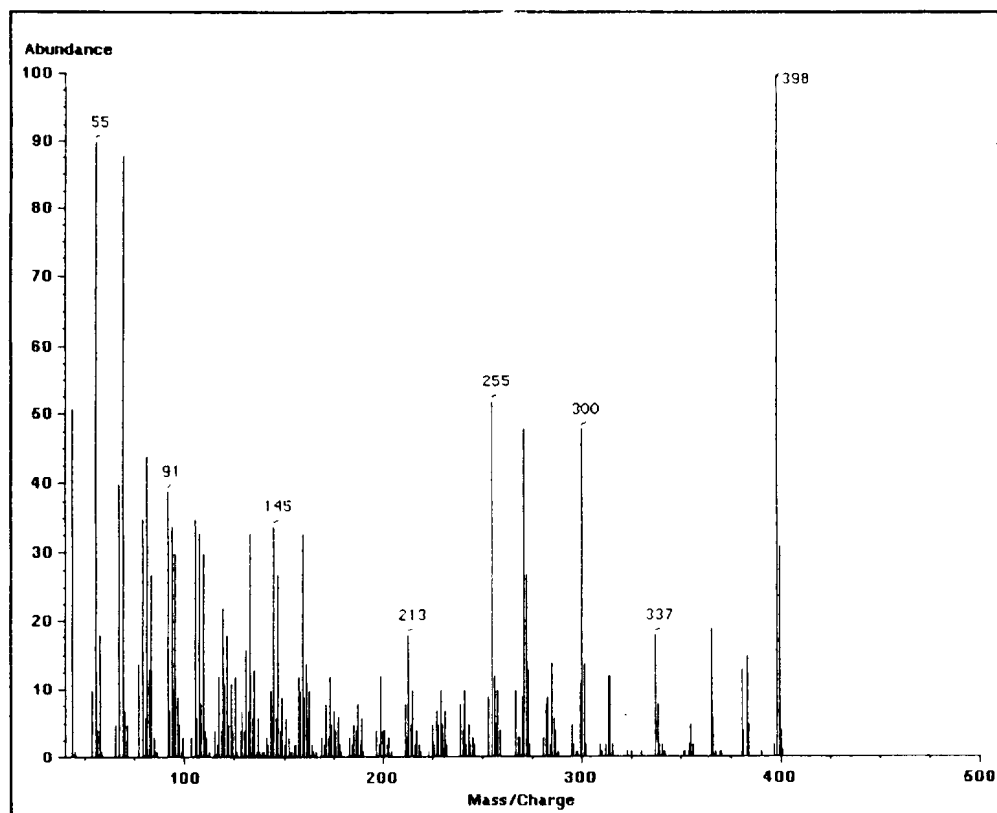


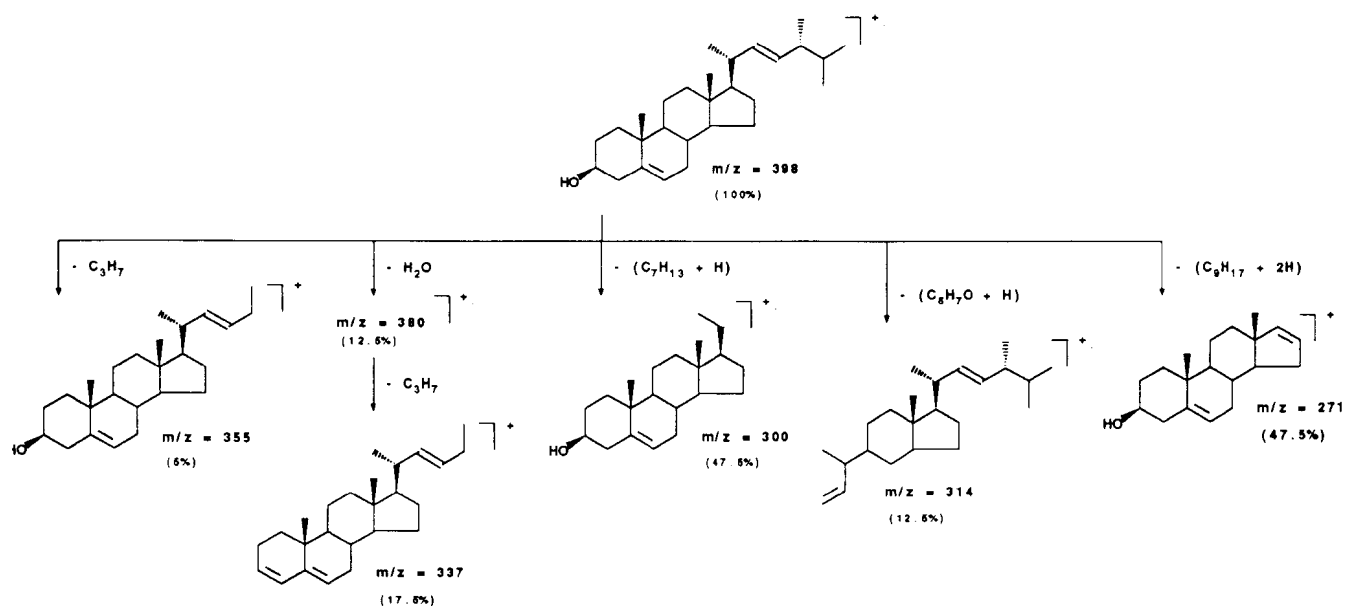
Figura 43: Fragmentações da cadeia lateral do colesterol

O espectro de massa do pico 3 ( $M = C_{28}H_{48}O$ ,  $m/z$  398, 100% - pico base) (Figura 44, pág. 125) é representado principalmente pelos íons  $m/z$  383 ( $M - Me$ ),  $m/z$  380 ( $M - H_2O$ ),  $m/z$  365 ( $M - (Me + H_2O)$ ),  $m/z$  337 ( $M - (C_3H_7 + H_2O)$ ),  $m/z$  314 ( $M - (C_5H_7O + H)$ ),  $m/z$  300 ( $M - (C_7H_{13} + H)$ ),  $m/z$  271 ( $M - (C_9H_{17} + H_2O)$ ),  $m/z$  255 ( $M - (C_9H_{17} + 2H)$ ).



**Figura 44: Espectro de massa do brassicasterol**

Propomos a estrutura do brassicasterol para esta substância (Figura 45, pág. 126).



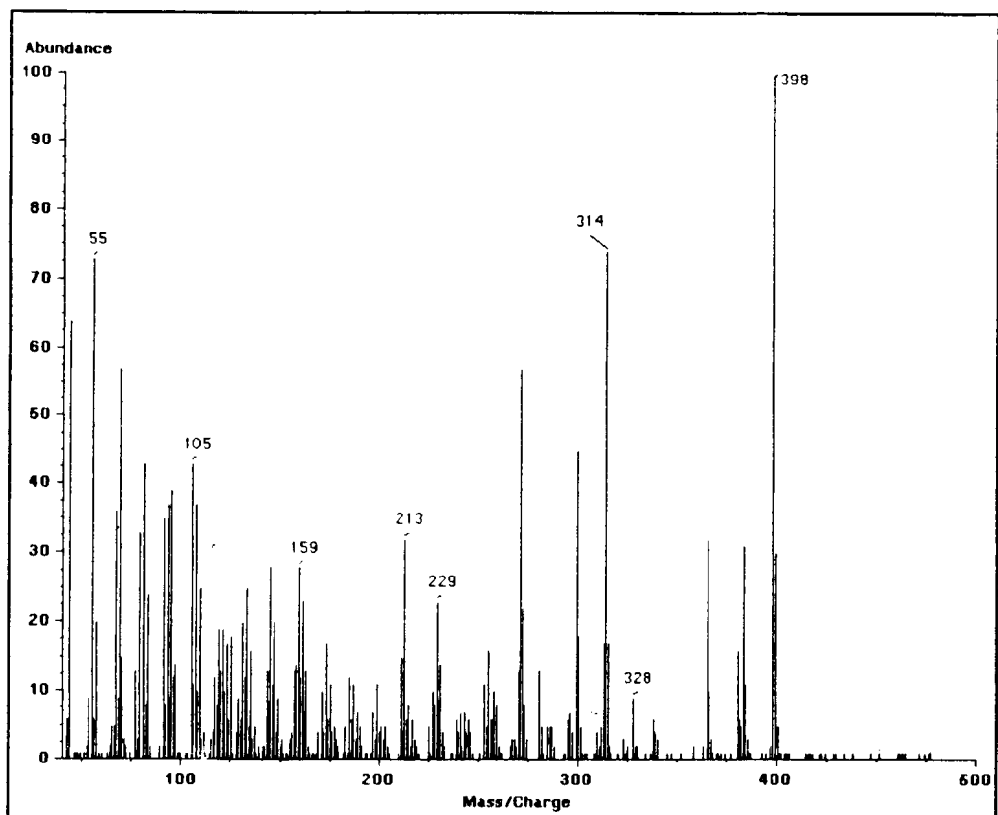
**Figura 45:** Principais fragmentações para cadeia lateral de brassicasterol

Os fragmentos relativos à clivagem da cadeia lateral para o pico 4 ( $\text{M} = \text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}$ ,  $m/z$  398, 100% - pico base) (Figura 46, pág. 127) são representados pelos ions  $m/z$  328 ( $\text{M} - (\text{C}_5\text{H}_9 + \text{H})$ ),  $m/z$  314 ( $\text{M} - \text{C}_8\text{H}_{12}$ ),  $m/z$  299 ( $\text{M} - (\text{C}_8\text{H}_{12} + \text{Me})$ ),  $m/z$  271 ( $\text{M} - (\text{C}_9\text{H}_{17} + 2\text{H})$ ). Propomos a estrutura do 24-deidro-24-metilcolesterol (24-DHMC).

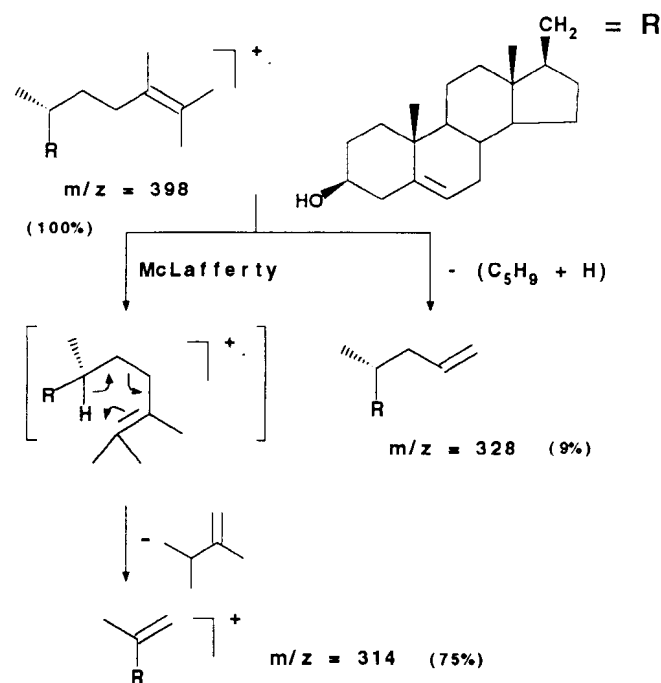
Aqui cabe mencionar que uma das principais fragmentações da cadeia lateral dos esteróis insaturados envolve o rearranjo de McLafferty<sup>205-207</sup> quando a ligação dupla é um exometileno, ou um grupo etilideno, ou uma dupla localizada em um carbono



tetrasubstituído. Este rearranjo envolve a ligação dupla e consiste na clivagem da ligação 22-23 com transferência simultânea de um hidrogênio do C-20, e foi proposto por vários autores para explicar a gênese do pico base em  $m/z$  314. Os caminhos propostos para a cadeia lateral estão demonstrados no Figura 47, pág. 128).



**Figura 46: Espectro de massa de 24-deidro-24-metilcolesterol (24-DHMC)**



**Figura 47:** Proposta da fragmentação na cadeia lateral para 24-deidro-24-metilcolesterol (24-DHMC)

Os espectros de massas dos picos 5 e 8 apresentam ions moleculares em  $m/z$  398 e 412, respectivamente; possuem fragmentos-base em  $m/z$  314, além de outros fragmentos típicos relativos à clivagem da cadeia lateral a partir do pico base, que estão representados nas Figuras 49 (pág. 129) e 51 (págs. 130). Estes ions são compatíveis com a presença do chalinasterol e fucosterol, com as fórmulas moleculares  $C_{28}H_{48}O$  e  $C_{29}H_{48}O$ , respectivamente (Figura 48, pág. 129 e Figura 50, pág. 130). Quanto ao chalinasterol, este dado confirma o resultado da co-injeção (pico 6 - Figura 38, pág. 120).

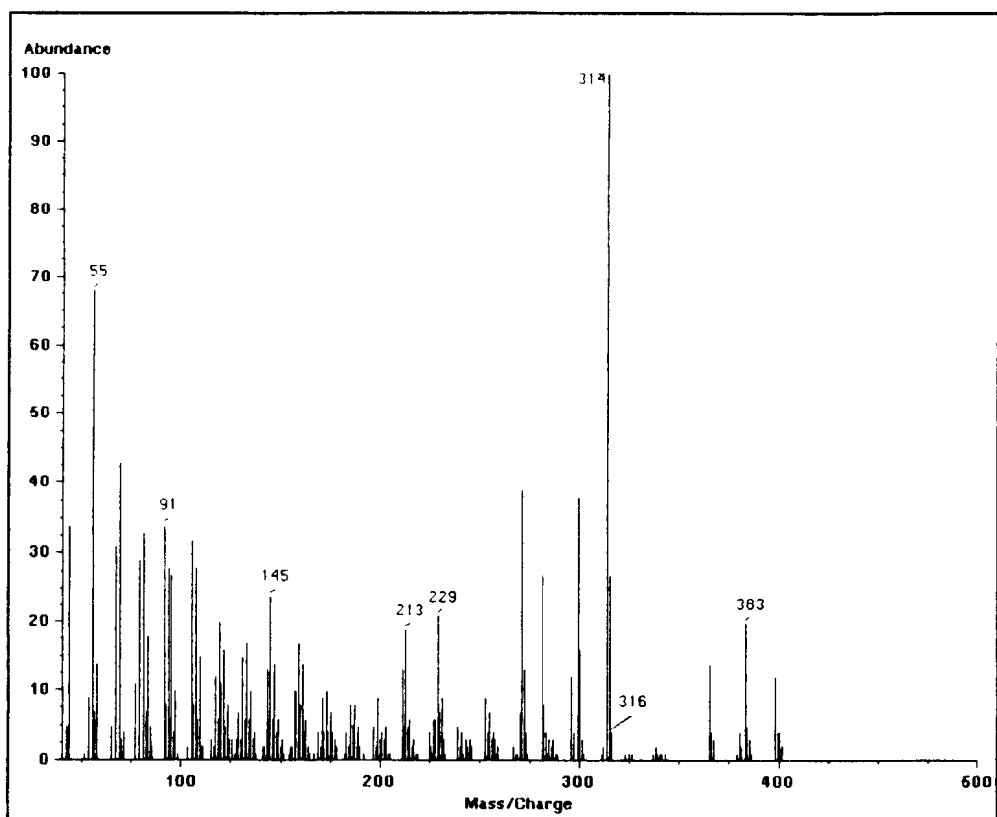


Figura 48: Espectro de massas do chalinasterol

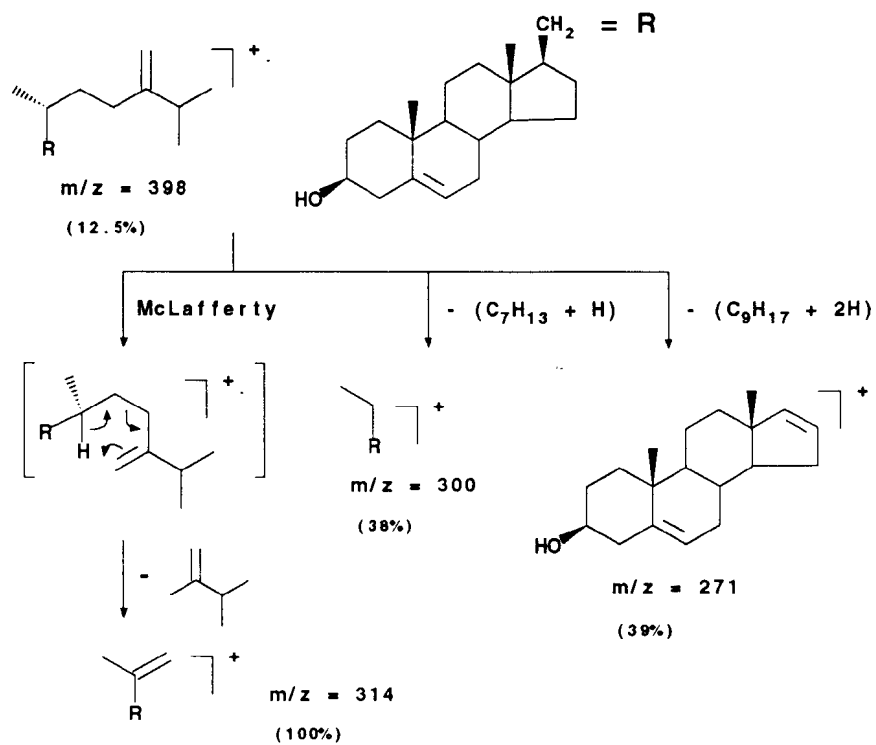
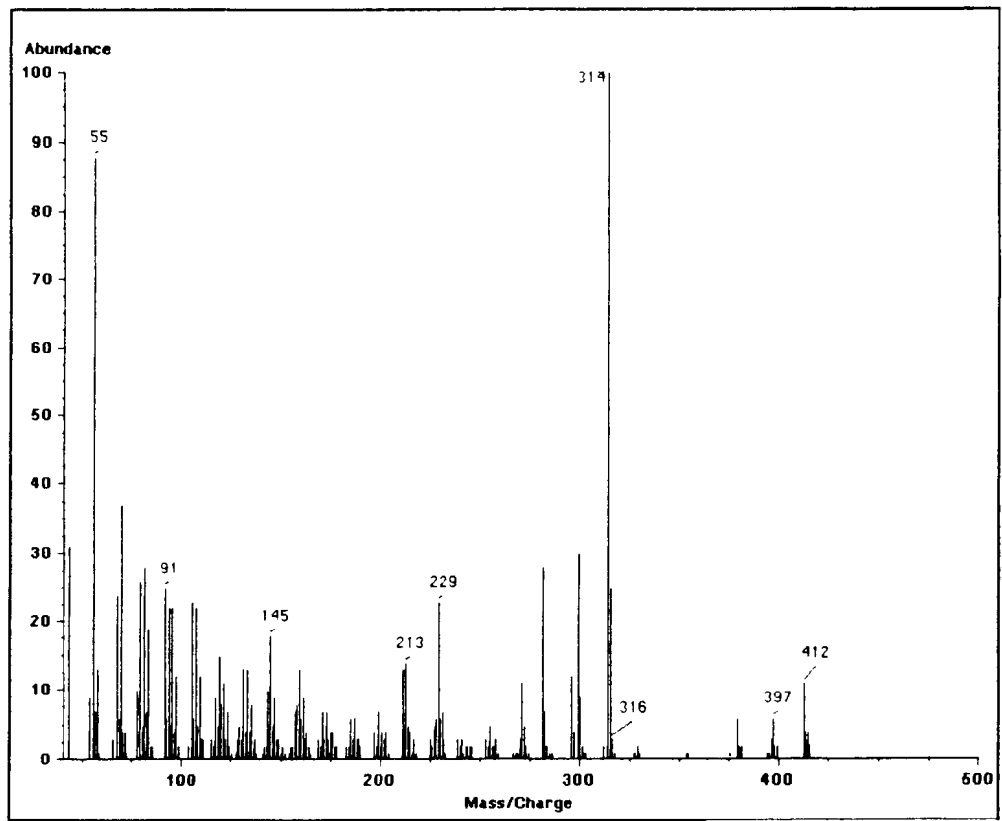
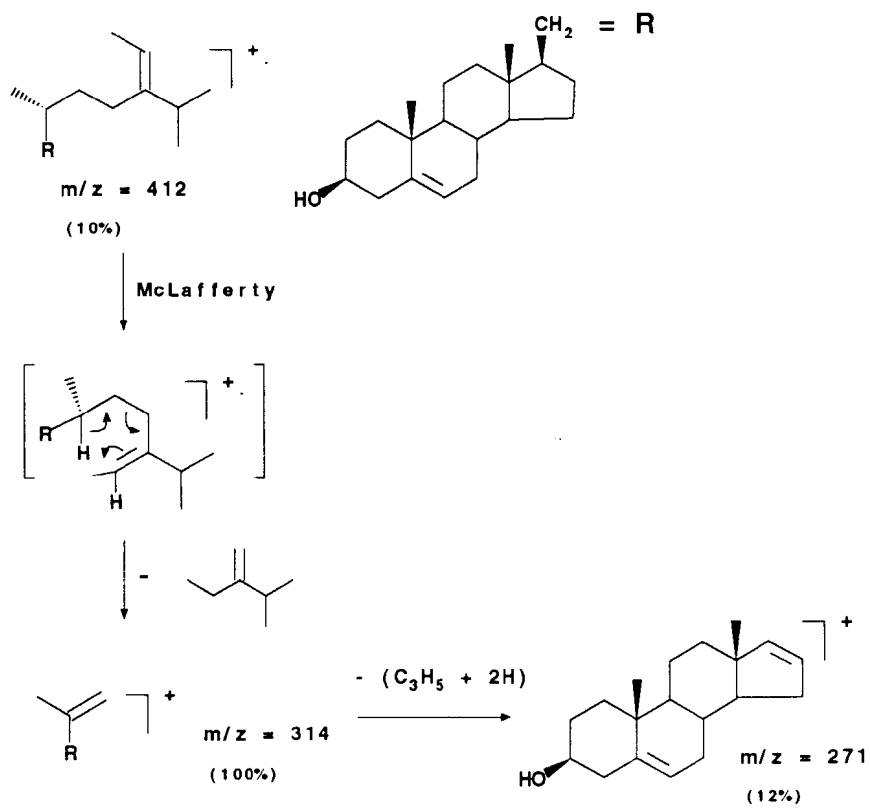


Figura 49: Fragmentação da cadeia lateral do chalinasterol



**Figura 50: Espectro de massas do fucosterol**



**Figura 51: Fragmentações da cadeia lateral para o fucosterol**

O espectro de massas do pico 9 (Figura 52) com  $M$  a  $m/z$  426 (15% - fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O$ ) e pico-base  $m/z$  271 (100%) não corresponde a qualquer esteroide conhecido em algas marinhas (ver Cap. 1, Introdução) e sugere a presença de um esteroide novo para este tipo de alga (caso o fragmento  $m/z$  426 seja efetivamente o íon molecular). Seu EM não é suficiente para permitir a completa caracterização da estrutura, sendo necessários dados de RMN e, conseqüentemente, de obter-se uma quantidade apreciável deste esteroide puro.

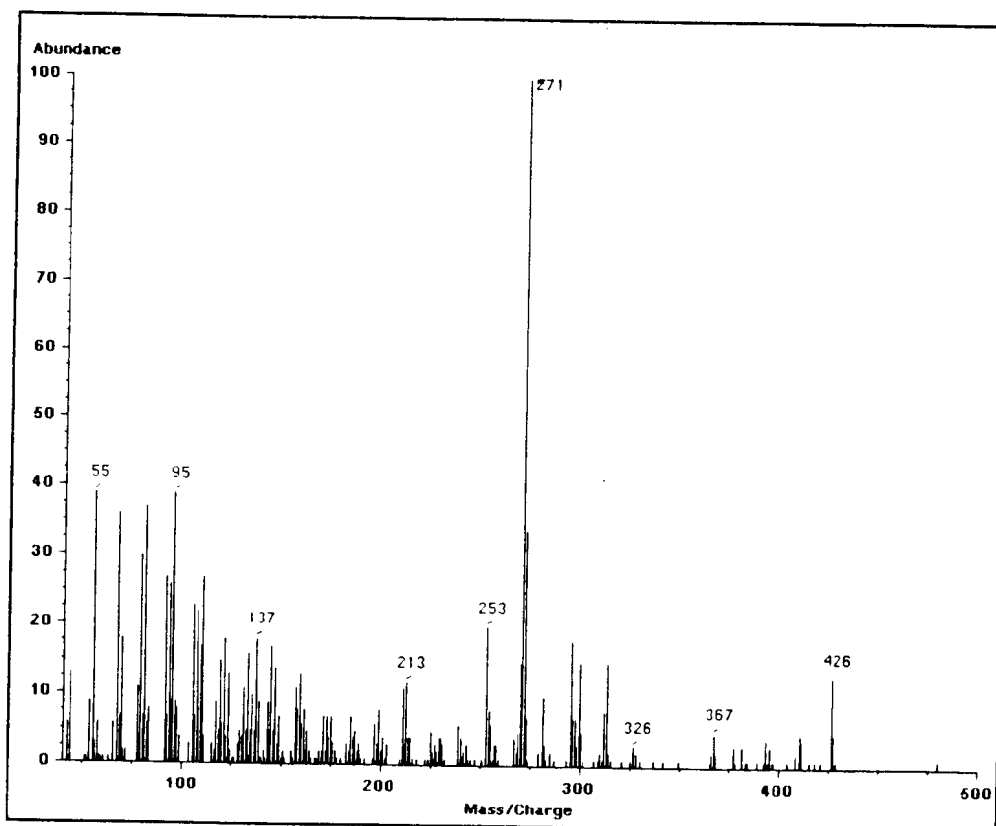


Figura 52: Espectro de massas do pico 9 (*Dictyota cervicornis*<sup>M</sup>)

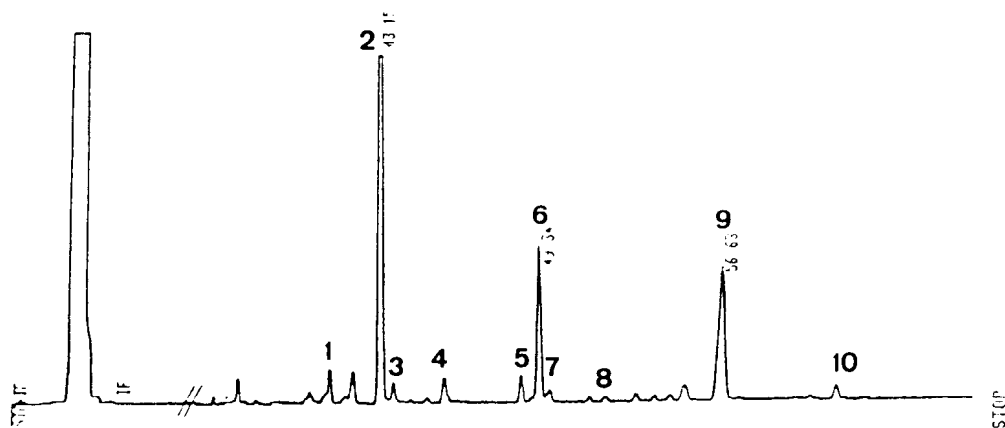
A Tabela 15 apresenta um resumo sobre os esteróis encontrados na espécie *Dictyota cervicornis*<sup>M</sup>.

**Tabela 15:** Resumo dos dados de CG/EM para os esteróis de *Dictyota cervicornis*<sup>M</sup>

Picos	Esteróis	M	%
1	22-DHC	384	4.2
2	colesterol	386	13.9
3	brassicasterol	398	2.8
4	24-DHMC	398	1.2
5	chalinasterol	398	8.2
6	campesterol	-	0.8
7	estigmasterol	-	traço
8	fucosterol	412	62.2
9		426	2.0

#### 2.2.2.2. Identificação da fração esteroidal de *Dictyota cervicornis*<sup>B</sup>

No cromatograma (Figura 53 e Tabela 16, pág. 133) predominaram três componentes com TRRC iguais a 1,00 (40.4%), 1.14 (15.9%) e 1.31 (27.14%) e outros em menores proporções. Algumas substâncias foram co-eluídas com amostras autênticas, o que indicou a presença de colesterol (1.00), chalinasterol (1.14), campesterol (1.15) e estigmasterol (1.22).



**Figura 53:** cromatograma da espécie *Dictyota cervicornis*<sup>B</sup>

**Tabela 16:** Tempos de retenção (relativos ao colesterol, TRRc) e composição da fração esteroidal de *Dictyota cervicornis*<sup>B</sup>.

Picos	Co-injeção	TRRc	%
1		0.95	1.4
2	colesterol	1.00	40.4
3		1.01	traço
4		1.06	2.5
5		1.13	2.1
6	chalinasterol	1.14	15.9
7	campesterol	1.15	1.4
8	estigmasterol	1.22	traço
9		1.31	27.1
10		1.42	3.0

A análise por CG/EM permitiu obter espectros de massa de pelo menos seis componentes apresentando ions moleculares (M) em  $m/z$  384, 386, 398, 398, 398 e 414. A comparação dos espectros de massas destas substâncias com os de *Dictyota cervicornis*<sup>M</sup>, permitiu sugerir a presença de 22-deidrocolesterol (pico 1), colesterol (pico 2, o componente principal), brassicasterol (pico 4), 24-deidro-24-metilcolesterol (pico 5) e chalinasterol (pico 6).

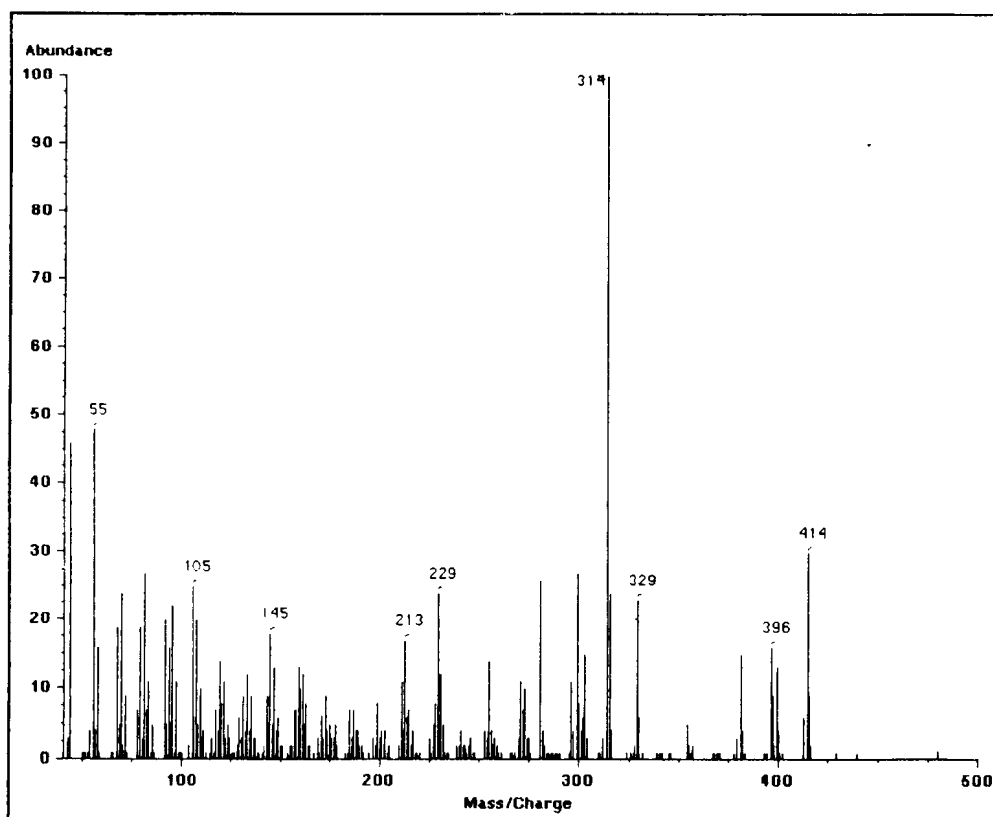
Embora haja coincidência no TRRc do pico 9 deste cromatograma com o do pico 8 do cromatograma de *D. cervicornis*<sup>M</sup> (1.31 e 1.32), os espectros de massa dos dois picos mostraram que os ions moleculares são diferentes: no caso presente, o EM pode ser interpretado como contendo dois ions moleculares (414 e 412), enquanto no caso de *D. cervicornis*<sup>M</sup> somente o  $m/z$  412 é visto. Além dos ions moleculares, apenas a presença do fragmento  $m/z$  329 originado a partir de M (414) e indicando a perda de ( $C_8H_{11} + 2H$ ), diferencia os dois espectros, uma vez que os demais ions originados do fragmento-base  $m/z$  314 (100%) ( $m/z$  299, 296, 281, 271, etc.) são idênticos aos fragmentos propostos para ion molecular  $m/z$  412.

Deste modo, sugerimos uma mistura de 24 $\xi$ -etilcolesterol e fucosterol no espectro de massa correspondente ao pico 9 (M (414) e M (412), Figura 54, pág. 135), enquanto o fucosterol apresenta somente M 412 (Figura 50, pág. 130). A Figura 55 (pág. 136) apresenta proposta de fragmentações da cadeia lateral de

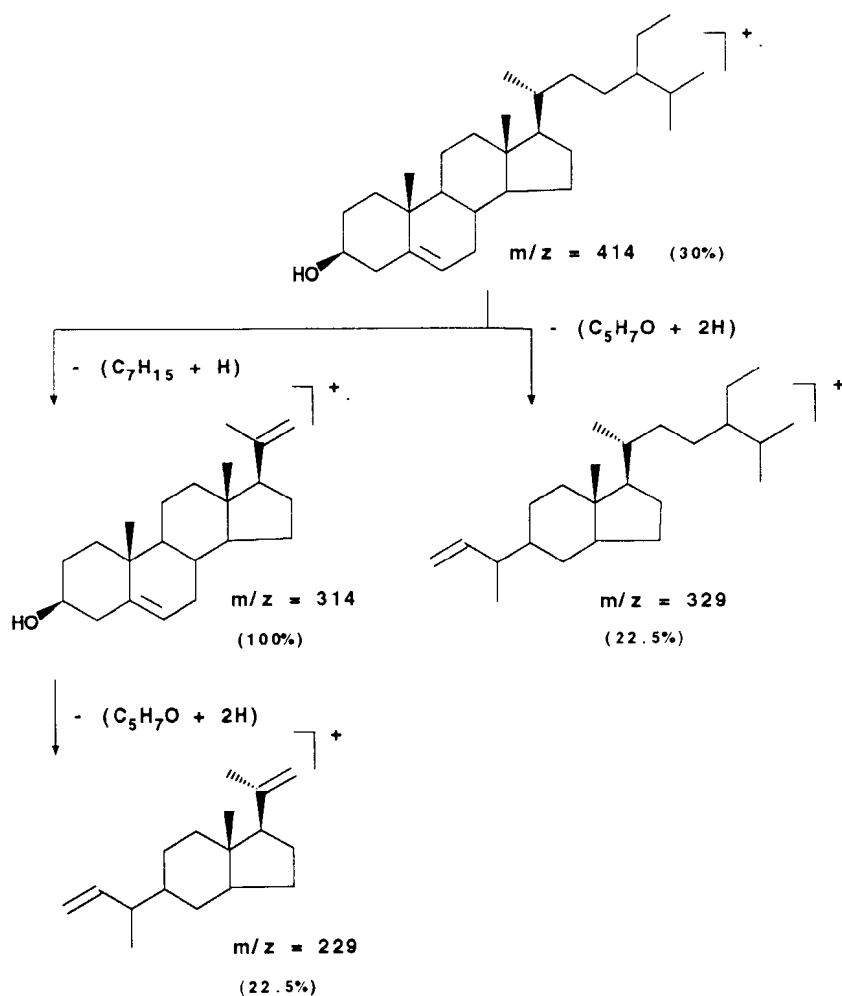


24 $\xi$ -etilcolesterol.

A literatura não menciona o TRRc, nas mesmas condições operacionais que este trabalho, para o fucosterol e 24 $\alpha$ -etilcolesterol ou 24 $\beta$ -etilcolesterol, o que permitiria confirmar a identificação sugerida.



**Figura 54: Espectro de massas da mistura 24 $\xi$ -etilcolesterol e fucosterol**



**Figura 55:** Proposta de fragmentações da cadeia lateral para 24ξ-etilcolesterol

A presença de 5α-3β-colestanol, correspondendo ao pico 3, foi sugerida pela coincidência de TRRC com um dos picos da análise por CG/EM referente a *Sargassum filipendula* (2.2.2.7),

A Tabela 17 faz um resumo sobre os esteróis encontrados na espécie *Dictyota cervicornis*<sup>B</sup>.

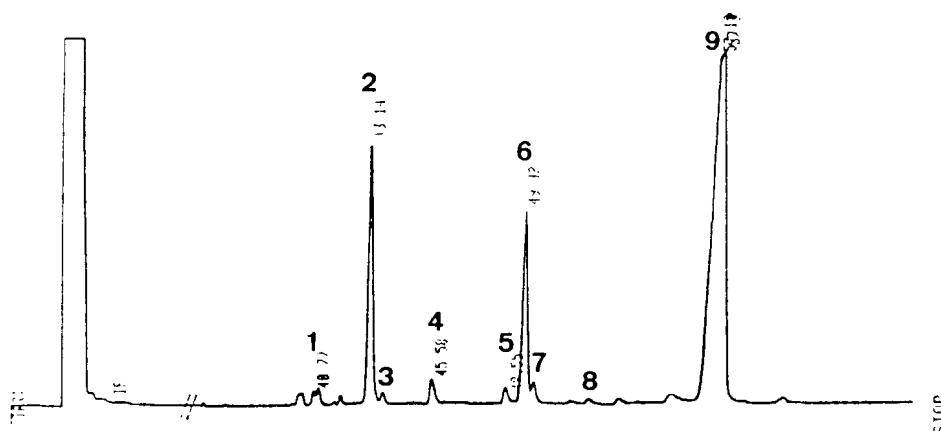
**Tabela 17: Resumo dos dados de CG/EM para os esteróis de *Dictyota cervicornis*<sup>B</sup>**

Picos	Esteróis	M	%
1	22-DHC	384	1.4
2	colesterol	386	40.4
3	colestanol	-	1.3
4	brassicasterol	398	2.5
5	24-DHMC	398	2.1
6	chalinasterol	398	16.0
7	campesterol	-	1.4
8	stigmasterol	-	traço
9	fucost. + Etcot.	412 + 414	27.0
10		426	3.0

fucost. + Etcot. = mistura de fucosterol + 24ξ-etilfucosterol

### 2.2.2.3. Identificação da fração esteroidal de *Dictyota dichotoma*

O cromatograma (Figura 56, pág. 138) mostrou a predominância de três componentes com TRRc iguais a 1.00 (13.9%), 1.14 (12.6%) e 1.32 (60.3%) e outros em menores proporções (Tabela 18, pág. 138). Algumas substâncias foram co-eluídas com amostras autênticas que indicaram a presença de **colesterol** (1.00), **chalinasterol** (1.14) e **campesterol** (1.15).



**Figura 56:** Cromatograma da espécie *Dictyota dichotoma*

**Tabela 18:** TRRc dos diferentes esteróis isolados de *D. dichotoma* e suas respectivas porcentagens.

Picos	Co-injeção	TRRc	%
1		0.95	1.1
2	colesterol	1.00	14.2
3		1.01	0.6
4		1.06	1.6
5		1.13	1.3
6	chalinasterol	1.14	12.6
7	campesterol	1.15	1.3
8	estigmasterol	1.22	4.3
9		1.32	60.3

O espectro de massa da mistura (Figura 57) indica pelo menos nove ions, candidatos possíveis a serem ions moleculares de diferentes substâncias:  $m/z$  430, 414, 412, 402, 400, 398, 388, 386, 384. Os valores  $m/z=$  386, 398 e 412 corresponderiam a

colesterol, calinasterol e fucosterol, respectivamente. A presença destes dois primeiros é confirmada por co-injeção. A análise por CG/EM só permitiu a obtenção de espectros para os três picos principais (TRRc= 1.00, 1.14 e 1.32) e confirmou a presença de colesterol, chalinasterol e fucosterol, respectivamente (Figuras 42, pág.124; 48, pág. 129; 50, pág. 130).

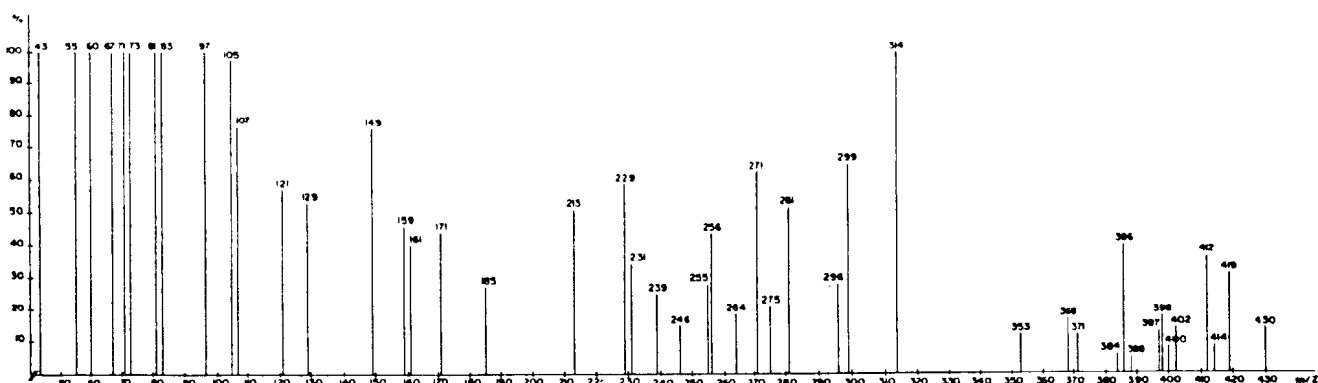


Figura 57: EM da mistura de esteróis de *Dictyota dichotoma*

A Tabela 19 (pág. 140) faz um resumo dos esteróis encontrados na espécie *Dictyota dichotoma*

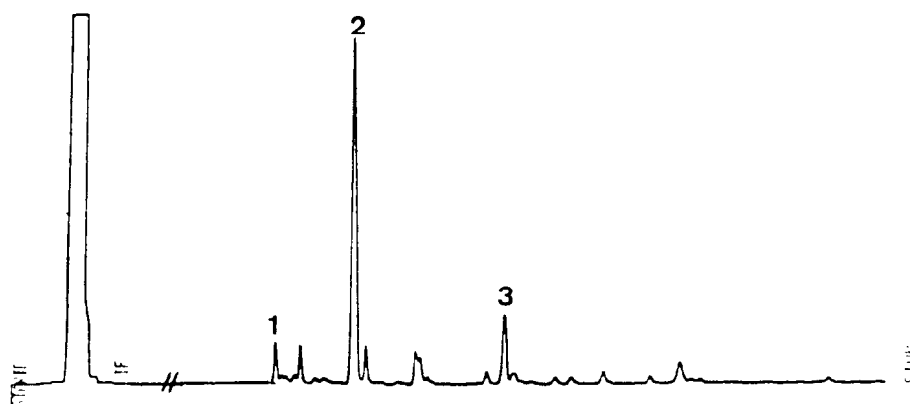
**Tabela 19:** Resumo dos diferentes esteróis isolados de *D. dichotoma* e suas respectivas porcentagens.

Picos	Esteróis	M	% de cada componente
1	22-DHC*	-	1.1
2	colesterol	386	13.9
3	colestanol*	-	0.6
4	brassicasterol*	-	1.6
5	24-DHMC	-	1.3
6	chalinasterol	398	13.0
7	campesterol	-	1.3
8	stigmasterol	-	4.3
9	fucoesterol	412	60.3

(\* : indicação baseada em semelhança de TRRc com picos analisados por CG/EM para outras amostras)

#### 2.2.2.4. Identificação da fração esteroidal de *Dictyota mertensii*

Três picos principais apareceram no cromatograma (Figura 58, pág. 141) com as seguintes porcentagens de área (e valores de TRRc): 5.7% (0.93), 81.6% (1.00) e 12.7% (1.14). Os dois últimos, por co-injeção com padrões foram identificados como **colesterol** e **chalinasterol**, respectivamente (Tabela 20. pág. 141).



**Figura 58:** Cromatograma de *Dictyota mertensii*

**Tabela 20:** TRRc dos diferentes esteróis isolados de *D. mertensii* com suas respectivas porcentagens.

Picos*	Co-injeção	TRRc	%
1		0.93	5.7
2	colesterol	1.00	81.6
3	chalinasterol	1.14	12.7

(\* : picos com TRRc semelhantes aos observados em outros cromatogramas para colestanol, brassicasterol, 24-DHMC, campesterol e fucosterol, são visíveis em pequenas concentrações no cromatograma, porém não foram detectados pelo integrador eletrônico)

2.2.2.5. Identificação da fração esteroidal de *Dictyopteris delicatula*

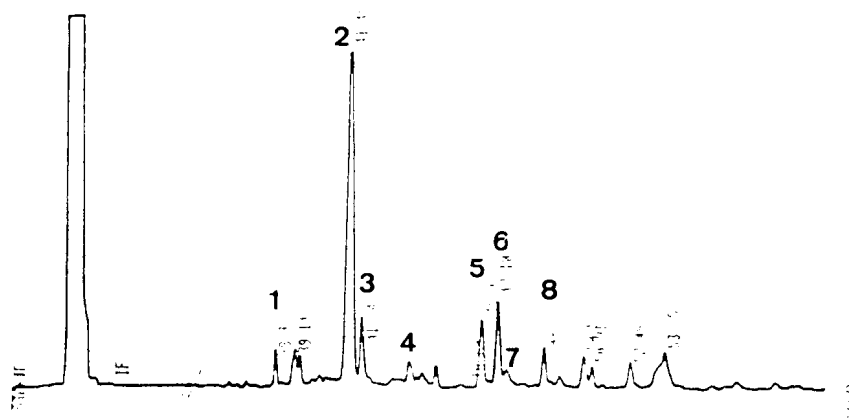
Os esteróis principais, apresentando tempos de retenção relativas ao colesterol iguais a 1.00, 1.14, 1.15 (Tabela 21) foram co-injetados com amostras autênticas e confirmaram a presença de colesterol, calinasterol e campesterol (além de traço de estigmasterol).

Tabela 21: TRRc dos diferentes esteróis isolados de *D. delicatula* e suas respectivas porcentagens.

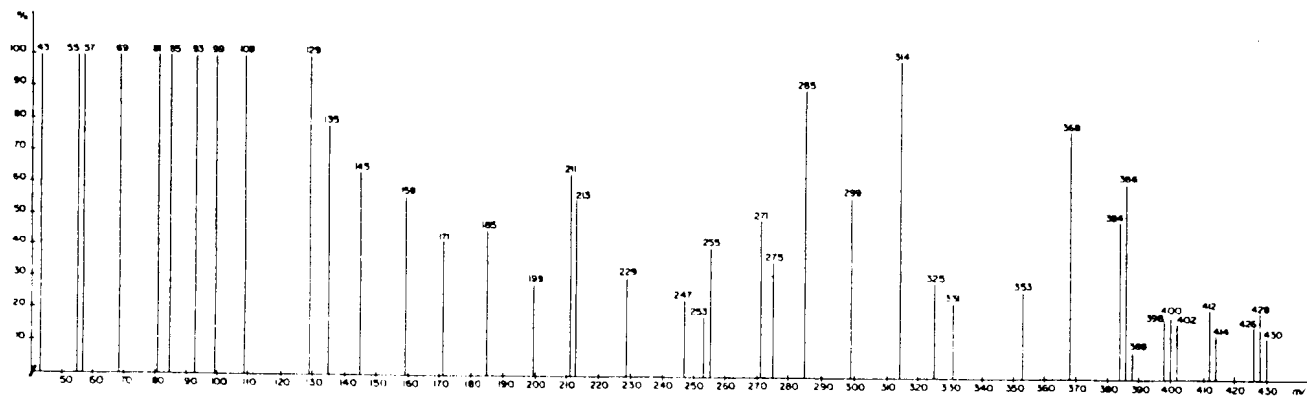
Picos	co-injeção	TRRc	%
1		0.95	2.6
2	colesterol	1.00	61.0
3		1.01	2.9
4		1.06	3.7
5		1.13	3.6
6	calinasterol	1.14	12.6
7	campesterol	1.15	traço
8	estigmasterol	1.22	traço

A análise do cromatograma (Figura 59, pág. 143) indica a presença de, pelo menos, seis picos que podem corresponder a esteróis e, analogamente, o espectro de massa da mistura (Figura 60, pág. 143) apresenta os íons  $m/z$  430, 428, 426, 414, 412, 402, 400, 398, 388, 386 e 384, possivelmente íons moleculares de esteróis.





**Figura 59:** Cromatograma de espécie *Dictyopteris delicatula*



**Figura 60:** EM da mistura de esteróis de *D. delicatula*

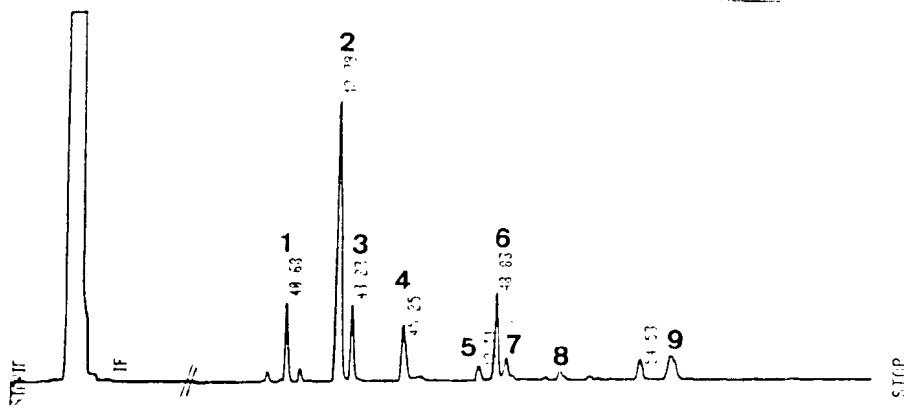
2.2.2.6. Identificação da fração esteroidal de *Dictyopteris plagiogramma*

A análise do cromatograma (Figura 61, pág. 145) e do espectro de massa da mistura (Figura 62, pág. 145) desta espécie é semelhante aos da espécie *D. delicatula*.

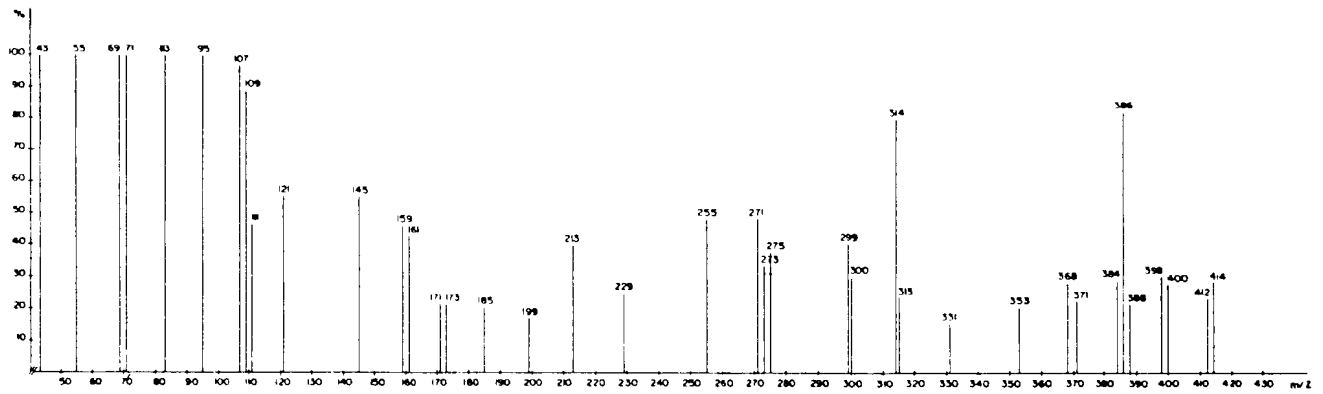
O espectro de massas da mistura indica sete íons candidatos possíveis a serem íons moleculares de diferentes substâncias:  $m/z = 414, 412, 400, 398, 388, 386$  e  $384$ . Os íons em  $m/z = 400, 398$  e  $386$  correspondem a campesterol, chalinasterol e colesterol, respectivamente. A presença destas substâncias por CG, com TRRc iguais a 1.00 (39.0%), 1.14 (13.4%) e 1.15 (4.0%) é confirmada por co-injeção (Tabela 22).

Tabela 22: TRRc dos diferentes esteróis de *D. plagiogramma*

Picos	Co-injeção	TRRc	%
1		0.95	8.7
2	colesterol	1.00	39.0
3		1.01	9.1
4		1.06	9.2
5		1.12	2.1
6	chalinasterol	1.14	13.4
7	campesterol	1.15	4.0
8		1.22	traço
9		1.31	7.0



**Figura 61: Cromatograma dos esteróis da espécie *D.plagiogramma***



**Figura 62: EM da mistura de esteróis de *D. plagiogramma***

A análise por CG/EM só permitiu a obtenção de espectros para os dois picos principais (TRRc = 1.00, colesterol e 1.14, chalinasterol) e, mais uma vez confirmou a presença do colesterol e chalinasterol nesta mistura. Os demais ions observados no espectro de massa da mistura sugerem a presença de fucosterol (M 412), 24 $\zeta$ -etilcolesterol (M 414), brassicasterol (M 398) e 24-deidro-24-metilcolesterol (M 398).

#### 2.2.2.7. Identificação da fração esteroidal de *Sargassum filipendula*

O cromatograma mostrou dois componentes predominantes de TRRc iguais a 1.00 (25.7%) e 1.14 (20.9%); estes foram identificados como colesterol e chalinasterol.(Figura 63 e Tabela 23, pág. 147).

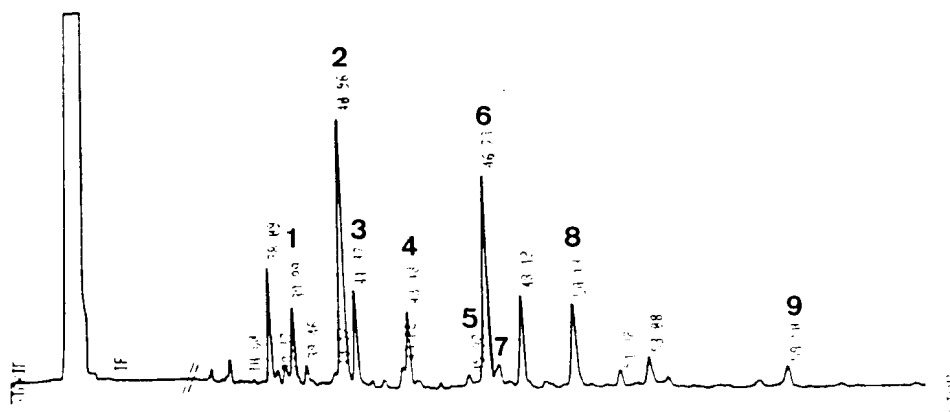


Figura 63: Cromatograma dos esteróis de *Sargassum filipendula*

**Tabela 23:** TRRc dos diferentes esteróis de *S. filipendula* e suas respectivas porcentagens.

Picos	Co-injeção	TRRc	%
1		0.93	4.7
2	colesterol	1.00	25.7
3		1.01	7.0
4		1.06	4.3
5		1.13	0.8
6	chalinasterol	1.14	20.9
7	campesterol	1.15	traço
8	stigmasterol	1.22	10.8
9		1.45	2.6

O CG/EM mostra as substâncias 22-deidrocolesterol (22-DHC), colesterol, brassicasterol, chalinasterol, 24-deidro-24-metil-colesterol (24-DHMC) e os íons moleculares 388 e 414. Os espectros de massa correspondentes aos íons moleculares M 388 e 414 (Figuras 64, pág. 148 e Figura 65, pág. 148) foram detectados pela primeira vez neste trabalho.

O íon molecular (M)  $m/z = 388$  foi identificado como o do 5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol devido à presença de fragmentos característicos como:  $m/z$  373 (36%), 370 (2.5%), 355 (8.5%) relacionados com a perda de CH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O e (CH<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O), respectivamente. Os picos em  $m/z$  281 (5%), 262 (7.5%, (M - C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>)), 248 (6%, M - C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>), 233 (40%, M - (C<sub>11</sub>H<sub>22</sub> + H)), 215 (40%, 370 - (C<sub>11</sub>H<sub>22</sub> + H)) correspondem à perda da cadeia lateral e à clivagem do anel D (Figura 64, pág. 148 e Figura 66, pág. 149).

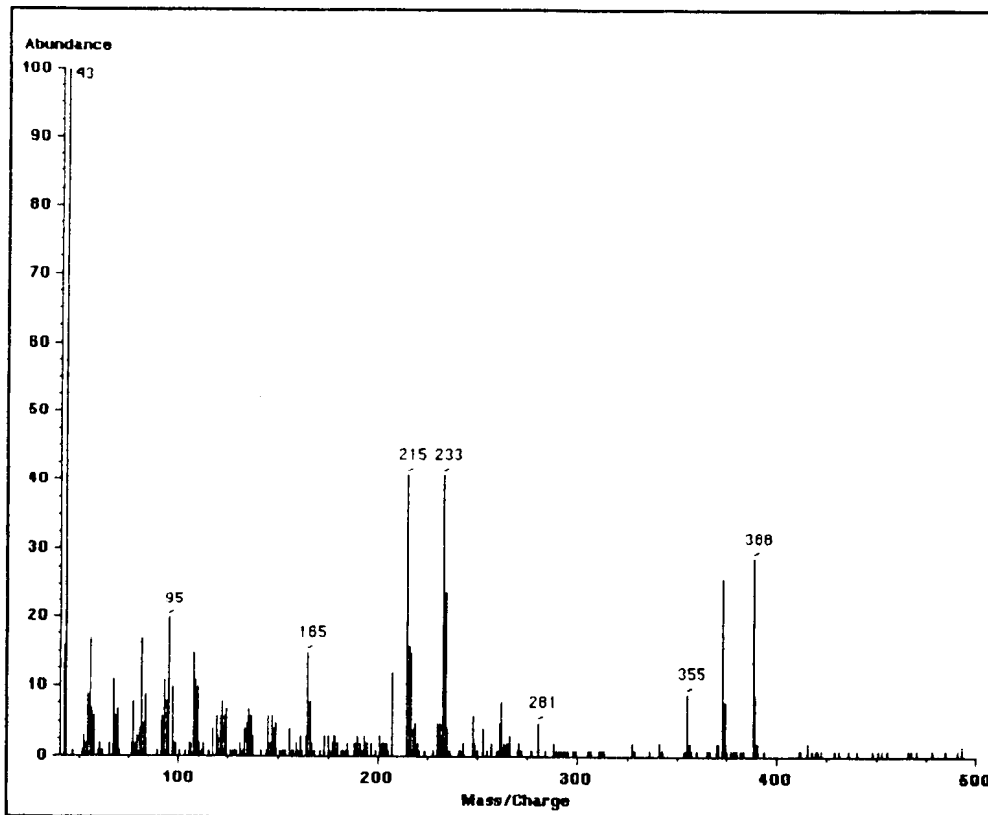


Figura 64: Espectro de 5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol

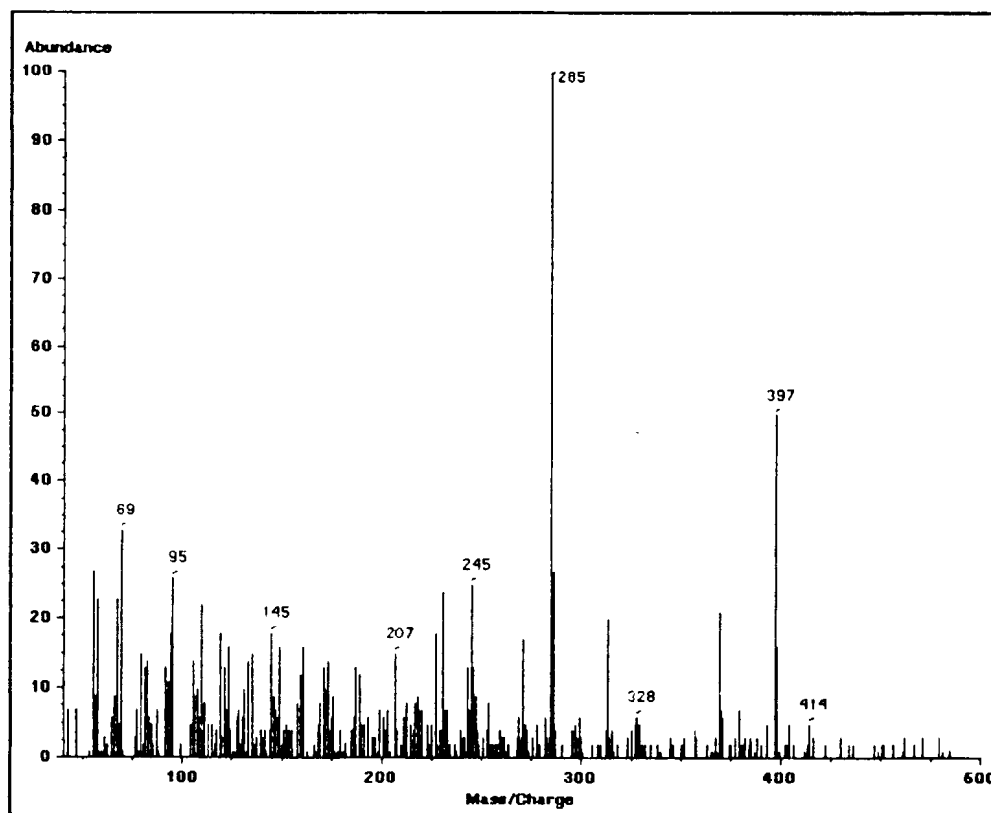
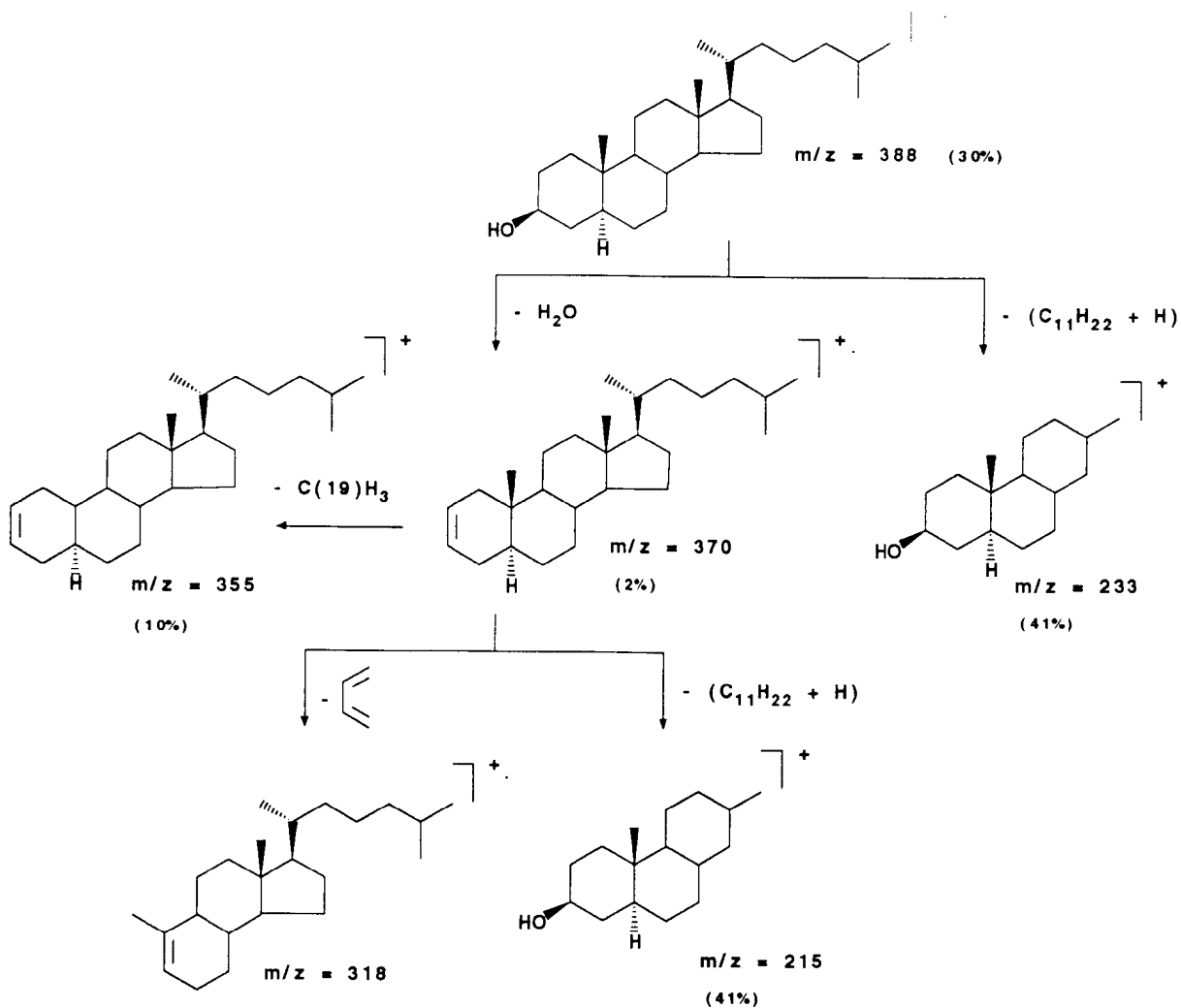


Figura 65: Espectro do ion molecular 414



**Figura 66:** Propostas de fragmentações da cadeia lateral de  $5\alpha$ -colestan- $3\beta$ -ol

O produto de massa  $m/z = 414$  (se for realmente o ion molecular, Figura 65, pág. 148) não foi identificado; seu espectro de massa não corresponde a uma substância esteróidica.

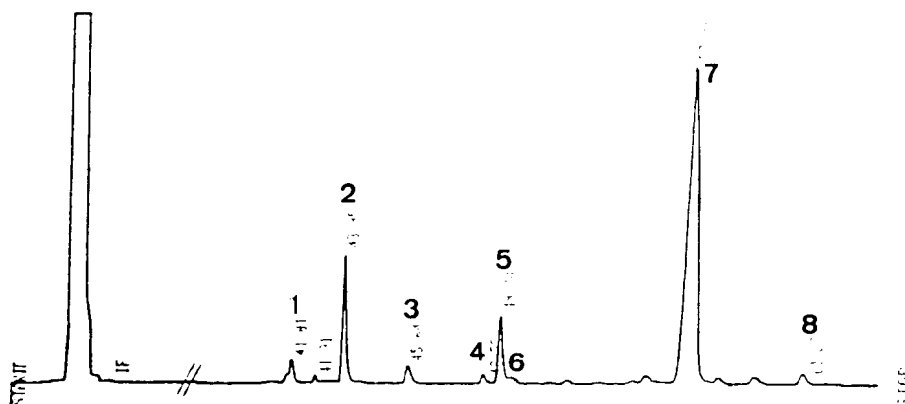
**Tabela 24:** Resumo dos diferentes esteróis isolados de *S. filipendula* e suas respectivas porcentagens.

Picos	Esteróis	M	%
1	22-DHC	384	4.7
2	colesterol	386	25.7
3	colestanol	388	7.0
4	brassicasterol	398	4.3
5	24-DHMC	398	0.8
6	chalinasterol	398	20.9
7	campesterol	-	traço
8	stigmasterol	-	10.8

#### 2.2.2.8. Identificação da fração esteroidal de *Sargassum furcatum*

O CG da mistura de esteróis de *S. furcatum* mostrou picos relevantes com TRRc de 1.00 (6.4%), 1.14 (2.4%), 1.15 (traço) (Figura 67, pág. 151 e Tabela 25, pág. 151). Eles foram identificados por co-eluição com amostras autênticas de colesterol, chalinasterol e campesterol.





**Figura 67:** Cromatograma dos esteróis de *Sargassum furcatum*

**Tabela 25:** TRRc dos diferentes esteróis de *S. furcatum* e suas respectivas porcentagens.

Picos	Co-injeção	TRRc	%
1		0.95	3.4
2	colesterol	1.00	6.4
3		1.06	0.5
4		1.13	0.2
5	chalinasterol	1.14	2.4
6	campesterol	1.15	traço
7		1.31	79.6
8		1.38	2.7

O espectro de massa da mistura (Figura 68, pág. 152) indicou íons em m/z 386, 398 e 400, 402, 410, 412 e 414, dos quais

os dois primeiros e o último correspondem, respectivamente a colesterol, chalinasterol e fucosterol, o que foi confirmado por CG/EM. Pode-se, também sugerir para M 400 o campesterol (indicado por co-injeção), e para M 414 o 24ξ-etilcolesterol (já detetado em outra amostra: *D. cervicornis*<sup>M</sup>)

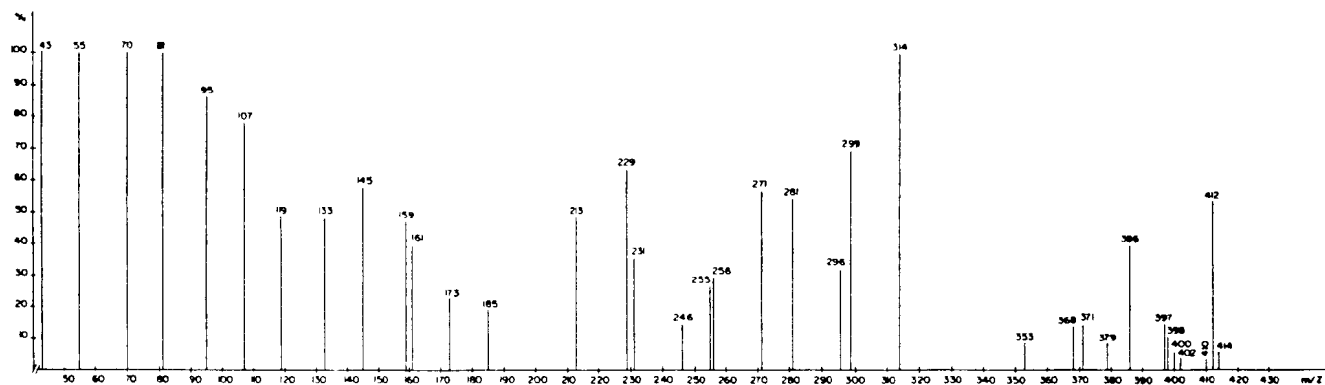


Figura 68: EM da mistura de esteróis de *Sargassum furcatum*

### 2.2.3. COMPARAÇÃO ENTRE AS ANÁLISES DAS FRAÇÕES ESTEROIDAIAS DAS DIFERENTES ALGAS

A Tabela 26 resume os resultados das várias técnicas analíticas empregadas, e a Tabela 27 (pág. 154) mostra os códigos e nomes da substâncias, com os respectivos ions moleculares (M).

Tabela 26: Técnicas analíticas empregadas para identificação dos esteróis

Espécies	Esteróis											
	DC	CR	CN	BR	DM	CL	CP	ES	FU	EC	D1	D2
D.cer. <sup>B</sup>	z	yz		z	z	yz	y	y		z		
D.cer. <sup>M</sup>	z	yz		z	z	yz	y	y	z			z
D.dic.	x	xyz	x z	x z	x z	xyz	xy	xy	x z	x		
D.mer.		y				y	y	y				
D.del.	x	xyz	x	x	x	xyz	xy	y	x		x	x
D.pla.	x	xyz	x	x	x	xyz	y	y	x	x		x
S.fil.	z	yz	z			yz	y				z	
S.fur.	x	xyz		x	x	xyz	xy	y	xyz	x		

x = espectro de massa da mistura  
y = co-injeção com o padrão  
z = CG/EM

B = Búzios (RJ)  
M = Mambucaba (RJ)

#### Dictyotales

D.cer. = *Dictyota cervicornis*

D.dic. = *Dictyota dichotoma*

D.Mer. = *Dictyota mertensii*

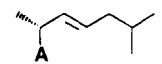
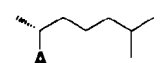
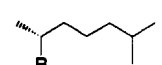
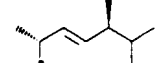
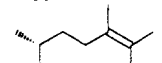
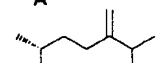
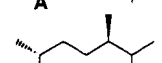
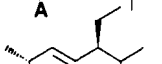
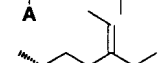
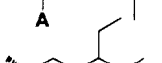
D.del. = *Dictyopteris delicatula*

#### Fucales

S.fil. = *Sargassum filipendula*

S.fur. = *Sargassum furcatum*

**Tabela 27: Código, nome e massa (M) de esteróides detetados**

<b>Código</b>	<b>nomes dos esteróis</b>	<b>íons moleculares (M)</b>	<b>cadeia lateral*</b>
DC	trans-22-deidrocolesterol	384	
CR	colesterol	386	
CN	colestanol	388	
BR	brassicasterol	398	
DM	24-metilcolesta-5,24-dieno-3β-ol	398	
CL	calinasterol	398	
CP	campesterol	400	
ES	stigmasterol	412	
FU	fucosterol	412	
EC	24ξ-etilcolesterol (β-sitosterol)	414	
D1	desconhecido	414	
D2	desconhecido	426	

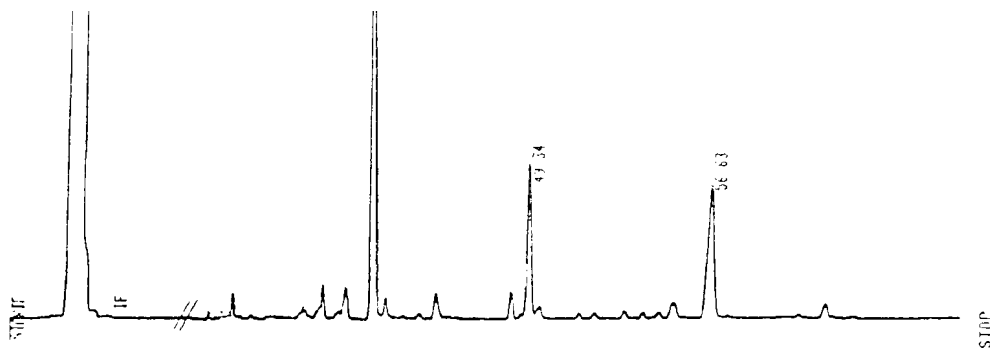
A = núcleo tipo colesterol

B = núcleo tipo colestanol

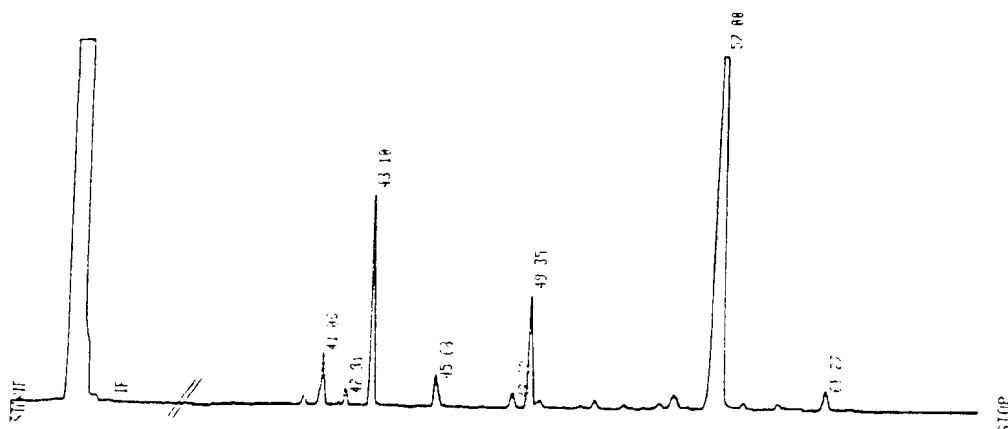
As Figuras 69a e 69b (págs. 155 e 156) apresentam, reunidos, os cromatogramas das diferentes frações esteroidais estudadas, permitindo observar-se que as analogias entre eles.

A Tabela 28 (pág. 157) dá, em resumo, o conteúdo de esteróides das algas estudadas.

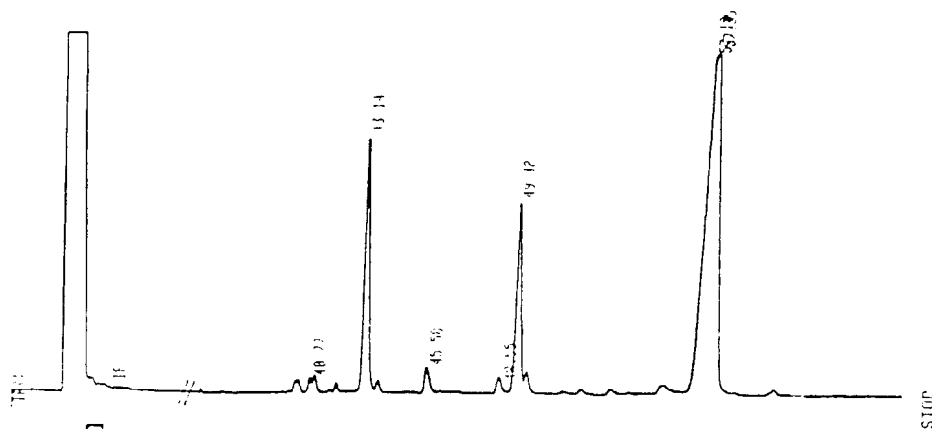
*Dictyota cervicornis*<sup>B</sup>



*Dictyota cervicornis*<sup>M</sup>



*Dictyota dichotoma*



*Dictyota mertensii*

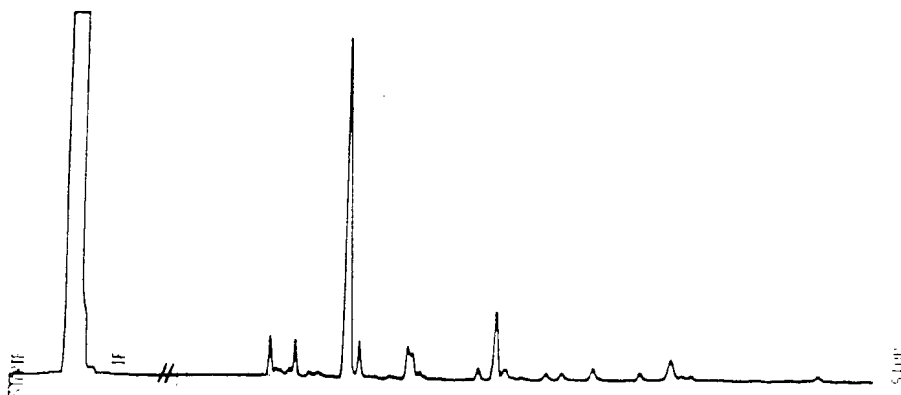
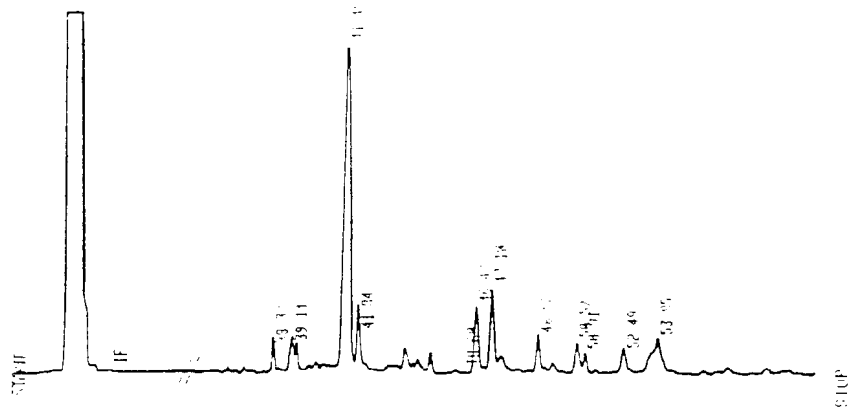
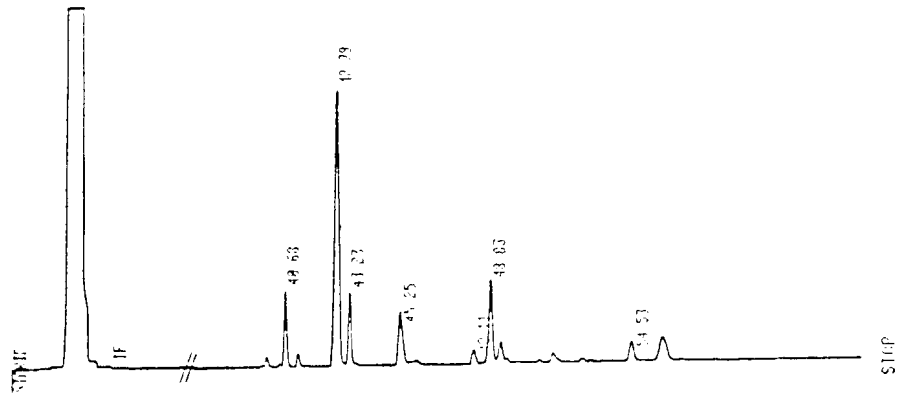


Figura 69a: Cromatogramas das espécies de *Dictyota*

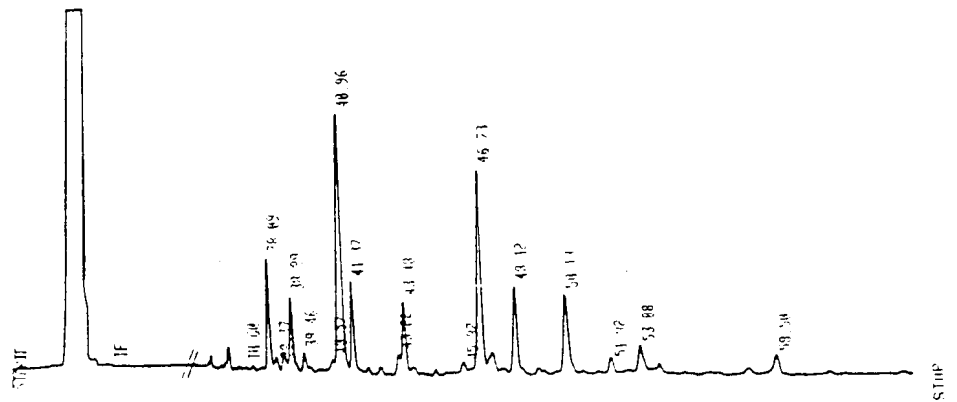
*Dictyopteris delicatula*



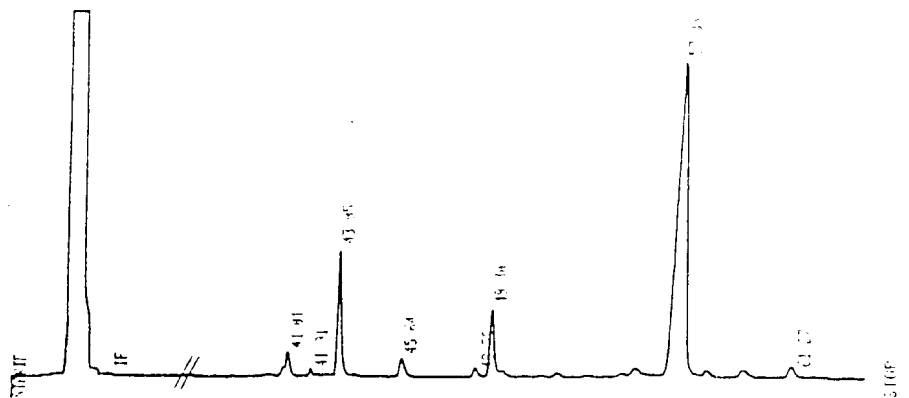
*Dictyopteris plagiogramma*



*Sargassum filipendula*



*Sargassum furcatum*



**Figura 69b:** Cromatogramas das espécies de *Dictyopteris* e *Sargassum*

**Tabela 28:** Porcentagem dos componentes esteroidais nas algas pardas

Esterol	Algas							
	D.cer. <sup>B</sup>	D.cer. <sup>M</sup>	D.dic.	D.mer.	D.del.	D.pla.	S.fil.	S.fur.
DC	1.4	4.2	1.1	5.7	2.6	8.7	4.7	1.4
CR	40.4	13.9	14.2	81.6	61.0	39.0	25.7	8.7
CN	1.3	-	0.6		2.9	9.1	7.0	
BR	2.5	2.8	1.6		3.7	9.2	4.3	
DM	2.1	1.2	1.3		3.6	2.1	0.8	
CL	16.0	8.2	12.6	12.7	12.6	13.4	20.9	3.1
CP	1.4	0.8	1.3		traço	4.0	traço	
ES	traço	traço	4.3		traço	traço	10.8	
FU	-	62.2	60.3		6.2	7.0		81.6
EC + FU	27.0							
D1							2.6	
D2		2.0						

(os códigos são os das Figuras 26 e 27 (págs. 152 e 153))

Os estudos fitoquímicos indicaram que as algas pardas da ordem Fucales apresentam alto teor de esteróis; sendo que até o momento a presença de substâncias terpenoidicas não foi detectada.

A grande maioria das espécies estudadas apresentou misturas em que um número relativamente pequeno de esteróis predominam, apesar das diferenças em suas concentrações relativas.

Além dos picos identificados nestas frações esteroidais de algas existe uma série de substâncias em menor concentração,

como aparece, por exemplo, no cromatograma de solução concentrada de *D. cervicornis*<sup>B</sup> (Figura 70; compare com o cromatograma da solução mais diluída: Figura 33, pág. 133). Devido à presença dos componentes majoritários, é difícil analisar estas substâncias diretamente, em amostras como as que empregamos, pelas técnicas comuns de CG/EM, mas com reprocessamento de amostra ou uso de técnicas especiais isso deve ser possível.

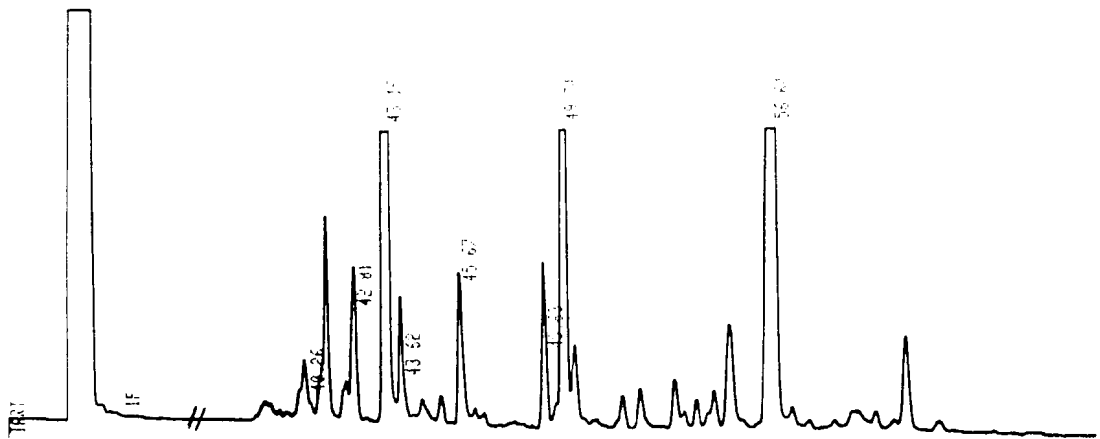


Figura 70: Cromatograma da solução concentrada de *D. cervicornis*<sup>B</sup>

Todas as espécies continham o colesterol e chalinasterol entre seus componentes (ambos esteróis são muito comuns em invertebrados marinhos).<sup>126</sup>

O fucosterol, típico de algas pardas (como ficou demonstrado no levantamento sobre esteróis de algas pardas relatados na Introdução), e frequentemente apontado como o



componente principal, não foi detectado em todas as espécies estudadas aqui. Talvez nas demais algas o fucosterol esteja presente apenas como produto traço.

*Dictyota cervicornis*<sup>M</sup>, *Dictyota dichotoma* e *Sargassum furcatum* apresentaram o fucosterol como o principal componente da mistura, em proporções sempre superiores a 50% dos esteróis totais. Enquanto, *Dictyota cervicornis*<sup>B</sup>, *Dictyota mertensii*, *Dictyopteris delicatula*, *Dictyopteris plagiogramma* e, *Sargassum filipendula* apresentaram o colesterol (maior que 20%).

A comparação entre os resultados das análises por CG/EM das duas frações esteroidais provenientes de *Dictyota cervicornis* (*D. cervicornis*<sup>M</sup> e *D. cervicornis*<sup>B</sup>) coletadas em latitudes e época do ano diferentes, indicou que apesar de nos dois casos aparecerem picos com TRRc= 1,31 (Picos 8 e 9, respectivamente), as suas composições eram diferentes: no primeiro caso encontrou-se apenas M 412 e o espectro correspondente a fucosterol; no segundo caso m/z 412 e 414 apareceram como prováveis íons moleculares, e o espectro pode ser interpretado como um mistura de fucosterol com 24ξ-etilcolesterol.

Este fato exemplifica que, de uma maneira geral, é possível que a composição qualitativa e/ou quantitativa dos esteróis livres sofra variações significativas relacionadas com mudanças fisiológicas das algas decorrentes de variações geográficas, sazonais, etc..

Além disso, alguns casos mostraram a necessidade de

padrões para co-injeções e o perigo de se confiar somente na técnica de coincidência de tempos de retenção na cromatografia a gás, principalmente quando se usa apenas uma polaridade de coluna na identificação de substâncias.

Na caracterização dos esteróis adotamos para os grupos alquil em C-24 as orientações habitualmente definidas na literatura sobre algas pardas. Notamos que a orientação  $\alpha$  ou  $\beta$  deste carbono é difícil de ser definida apenas através da espectrometria de massa. Esta orientação pode ser determinada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio de alta resolução (360 MHz), mas mesmo assim a diferença é de 5 milésimos de ppm.<sup>168</sup>

Os espectros de massa das misturas de esteróis obtidos das espécies de *Dictyopteris* e de *D. dichotoma* apresentaram além dos ions característicos de esteróis, uma série de ions moleculares de maior peso molecular. A caracterização destas substâncias foge do âmbito deste trabalho.

## **CAPITULO 3**

### **TESTES DE HERBIVORIA**

Para verificar o possível efeito de alguns metabólitos secundários isolados de algas pardas (ver Capítulo 2) como defesa contra herbívoros, exemplificados pelo crustáceo (anfípoda) *Parhyale hawaiensis*, estas substâncias foram dissolvidas em éter etílico. Em seguida, cada solução foi aplicada sobre discos da alga verde *Ulva fasciata* (que, em si, não tem defesas químicas<sup>20</sup>), de modo a obter diferentes concentrações finais (em % de peso seco). Estes discos foram usados nos experimentos, em aquários com os anfípodas; discos sem substâncias adicionadas foram usados como controle (aquários controle 1), e verificou-se também eventuais variações de peso nos discos somente por efeito de imersão na água (aquários controle 2).

**3.1. Efeito deterrente da fração esteroidal de *Sargassum furcatum* sobre o anfípoda *Parhyale hawaiiensis*.**

**Tabela 29: Resultado do experimento do efeito deterrente da fração esteroidal de *S. furcatum* sobre o anfípoda *P. hawaiiensis*.**

Concentração (% peso seco)	Inicial (mg)	Final (mg)	Diferença (%)	Média
<b>0.1 (natural)</b>	23.2	13.1	10.1	
	24.3	12.0	12.3	
	28.5	24.0	4.5	
	28.7	22.0	6.7	
	24.5	18.8	5.7	
	média = 129.2	89.9	39.3 (30%)	<b>7.86</b>
<b>1.0</b>	26.1	18.8	7.3	
	29.1	26.8	2.3	
	26.5	25.1	1.4	
	23.9	17.0	6.9	
	27.1	23.5	3.6	
	média = 132.7	111.2	21.5 (16%)	<b>4.30</b>
<b>2.0</b>	26.3	23.0	3.3	
	26.0	20.5	5.5	
	25.0	13.7	11.3	
	28.0	20.7	7.3	
	28.0	18.4	9.6	
	média = 133.3	96.3	37.0 (28%)	<b>7.40</b>
<b>controle 1</b>	26.0	15.0	11.0	
	25.3	20.0	5.3	
	26.0	17.5	8.5	
	26.6	25.2	1.4	
	25.0	11.7	13.3	
	média = 128.9	89.4	39.5 (31%)	<b>7.90</b>

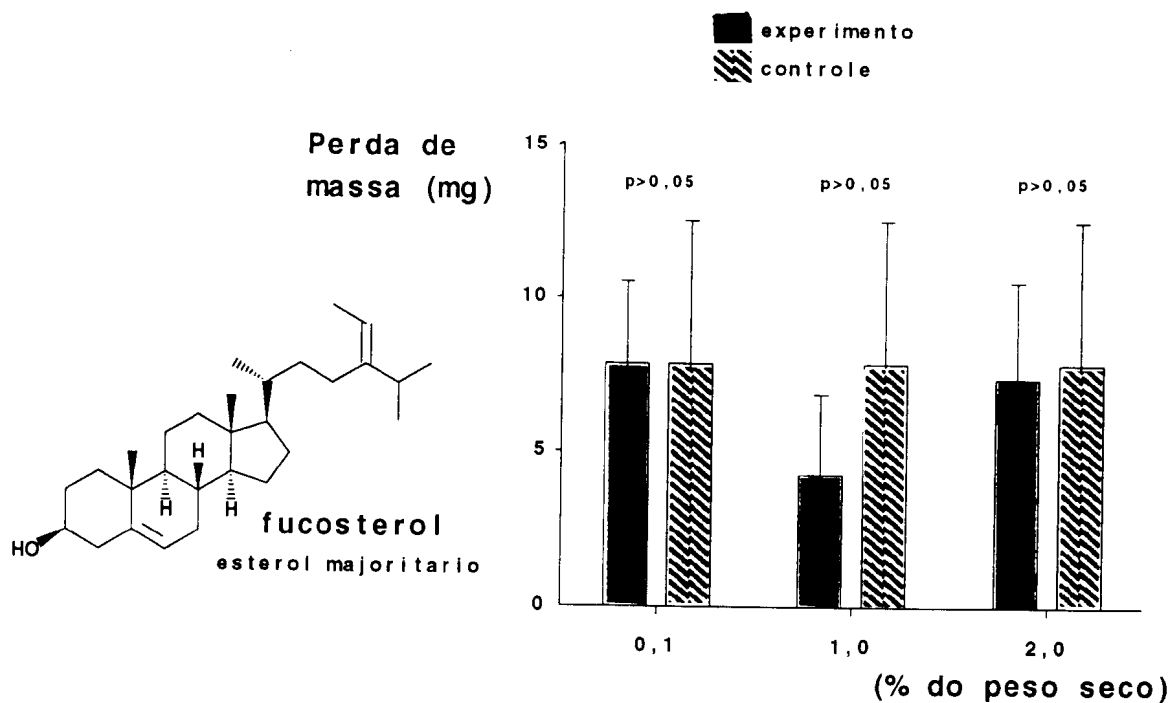
0.1% = concentração natural da f. esteroidal sobre *U. fasciata*  
 controle = alga sem produto e com anfípoda

A Tabela 29 (pág. 163) mostra os resultados obtidos no experimento que avalia o efeito deterrente sobre *P. hawaiiensis* de diferentes concentrações da fração esteroidal (3 valores em torno do natural: 2.0, 1.0 e 0.1% (natural)) de *S. furcatum* adsorvida em discos de *U. fasciata*. Os valores são expressos em variação absoluta de biomassa (mg).

Os discos de *U. fasciata* recobertos com 0.1, 1.0 e 2.0% do peso do disco de fr. esteroidal isolada de *S. furcatum* perderam, em média, 39.3 mg (30%), 21.5 mg (16%) e 37.0 mg (28%) de biomassa por herbivoria, respectivamente. Os aquários controles 1 (alga sem produto e com anfípodas) mostraram perda média de 39.5 mg (31%) de biomassa, enquanto nos aquários controles 2 (alga sem produto e sem anfípodas) houve um pequeno aumento no peso (médio) dos discos de *U. fasciata*, de 5.9 mg, o que corresponde a 5.6% de variação (Tabela 29, pág. 163).

A correção do valor de biomassa efetivamente perdida por herbivoria já está incluída nos valores apresentados.

A Figura 71 (pág. 165) mostra os efeitos das concentrações de 2.0, 1.0 e 0.1% da fração esteroidal de *S. furcatum* em discos de *U. fasciata* sobre o consumo de *P. hawaiiensis*. A análise estatística destes resultados indica que a fração esteroidal não apresentou atividade anti-herbivoria. Entretanto, os desvios padrão foram bem altos: isto provavelmente reflete o pequeno número de amostras e a dispersão dos resultados no controle.



**Figura 71: Efeitos da fração esteroidal de *S. furcatum* sobre o anfípoda *P. hawaiensis***

A baixa atividade dos esteróis pode resultar da especialização deste herbívoro durante a evolução, já que estes anfípodas vivem associados à *Sargassum furcatum*. No entanto, é importante ressaltar que estas substâncias podem ser ativas frente a outros predadores potenciais encontrados no mesmo ecossistema.

**3.2. Efeito deterrente do diterpeno dolastano Dc-1  
(4 $\alpha$ -acetoxi-14 $\alpha$ -hidroxidolastano,1(15,7,9-trieno) (35) sobre o  
anfipoda *Parhyale hawaiiensis***

**Tabela 30:** Resultado do experimento do efeito deterrente de Dc-I isolado de *Dictyota cervicornis*<sup>B</sup> sobre o anfipoda *P. hawaiiensis*.

Concentração (% peso seco)	Inicial (mg)	Final (mg)	Diferença (%)	Média
<b>0.1</b>	34.4	28.5	5.9	
	34.8	29.3	5.5	
	35.8	23.5	12.3	
	33.8	29.3	4.5	
	33.5	21.5	12.0	
média=	138.8	132.1	40.2 (29%)	<b>8.04</b>
<b>0.2 (natural)</b>	33.7	28.2	5.5	
	35.0	23.4	11.6	
	36.6	31.2	5.4	
	37.3	32.1	5.2	
	34.1	31.7	2.4	
média=	176.7	146.6	30.1 (17%)	<b>6.02</b>
<b>0.5</b>	36.8	31.0	5.8	
	37.0	28.5	8.5	
	35.6	33.5	2.1	
	36.2	34.5	1.7	
	36.0	30.0	6.0	
média=	181.6	157.5	24.1 (13%)	<b>4.82</b>
<b>controle 1</b>	39.1	33.7	5.4	
	34.1	31.4	2.7	
	36.6	32.7	3.9	
	36.0	29.6	6.4	
	37.6	32.4	5.2	
média=	183.4	159.8	23.6 (13%)	<b>4.72</b>

0.2% = concentração natural



A Tabela 30 (pág. 166) mostra os resultados obtidos no experimento que avalia o efeito deterrente sobre *P. hawaiiensis* de concentrações do dolastano Dc-I (0.1%, 0.2% (natural) e 0.5%) recobrando discos de *U. fasciata*. Foram observadas perdas (médias) de 40.2 mg (29%), 30.1 mg (17%) e 24.1 mg (13%) de biomassa. Os respectivos controles, mostraram perda de 26.3 mg (13%) e, novamente, ganho de massa para aqueles sem anfipodas de 2.5 mg (6.6%).

A Figura 72 mostra os efeitos das concentrações de 0.1%, 0.2% e 0.5% de Dc-1 em discos de *U. fasciata* sobre o consumo de *P. hawaiiensis*.

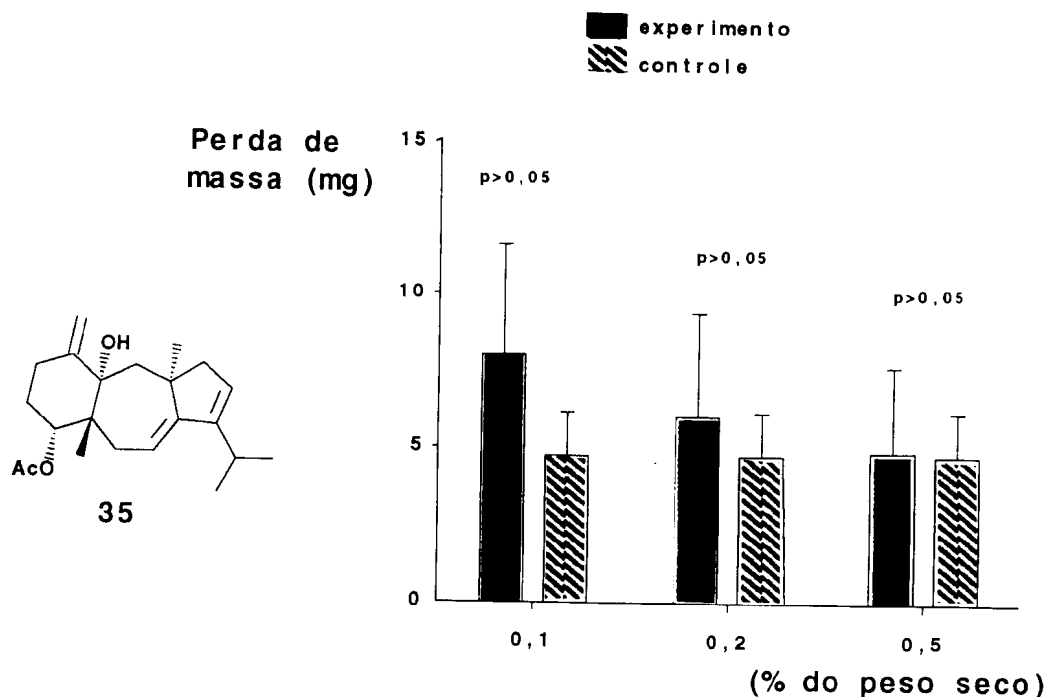


Figura 72: Efeitos do dolastano Dc-1 (35) isolado de *D. cervicornis* sobre o anfipoda *P. hawaiiensis*

As perdas verificadas nestas três concentrações, quando comparadas àquelas observadas nos discos de algas controles (sem dolastano Dc-I), mostraram que nestas quantidades, o dolastano não diminui o consumo pelo herbívoro *P. hawaiiensis* ( $p > 0.05$ , test t). Portanto, este metabólito não mostrou efeito deterrente, quando oferecido ao herbívoro, mesmo quando a concentração do dolastano oferecida foi bem maior do que a encontrada em *D. cervicornis*<sup>B</sup> no ambiente natural. Além disso, como demonstrado na Figura 31 (pág. 102), este dolastano pode resultar da desidratação do dolastano 4 $\alpha$ -acetoxi-9 $\beta$ -14 $\alpha$ -dihidroxdolastano-1(15),7,9-trieno, logo ser artefato de isolamento ou extração, e por isto não ter atividade.

### 3.3. Efeito deterrente do diterpeno guaiano Dm-1 (Dictyol H) sobre o anfípoda *P. hawaiiensis*

A Tabela 31 (pág. 169) mostra os resultados obtidos no experimento que avalia o efeito deterrente sobre *P. hawaiiensis*, de diferentes concentrações do diterpeno guaiano Dm-1 (0.06% (natural), 0.1%, 0.2%) isolado de *Dictyota mertensii*<sup>B</sup>, em discos de *U. fasciata*.

**Tabela 31: Resultado do experimento do efeito deterrente de Dm-1 isolado de *Dictyota mertensii* sobre o anfípoda *P. hawaiiensis*.**

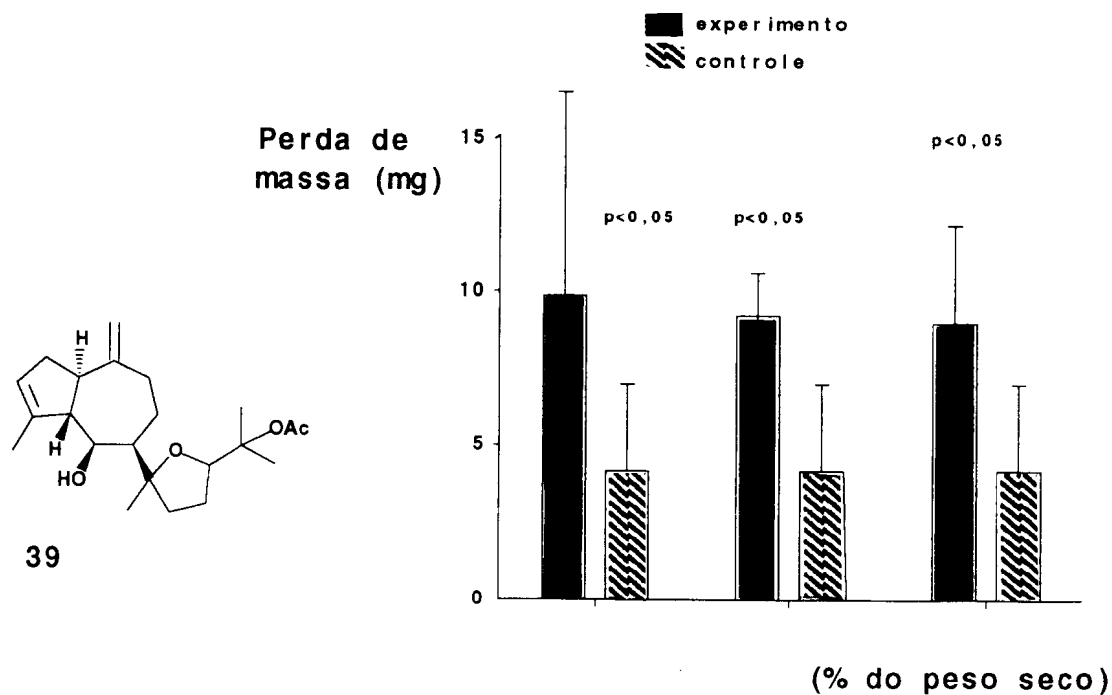
Concentração (% peso seco)	Inicial (mg)	Final (mg)	Diferença (%)	Média
<b>0.06</b> <b>(natural)</b>	24.2	16.7	7.5	
	27.3	17.2	10.1	
	24.0	3.0	21.0	
	23.4	17.8	5.6	
	26.7	21.2	5.5	
média=	125.6	75.9	49.7 (40%)	<b>9.94</b>
<b>0.1</b>	24.5	17.2	7.3	
	22.3	14.3	8.0	
	25.6	15.4	10.2	
	23.7	13.6	10.1	
	22.3	12.1	10.2	
média=	118.4	72.6	45.8 (39%)	<b>9.20</b>
<b>0.2</b>	25.3	17.0	8.3	
	22.6	13.5	9.1	
	27.0	15.2	11.8	
	24.5	20.5	4.0	
	19.8	8.2	11.6	
média=	119.2	74.4	44.8 (38%)	<b>9.00</b>
<b>controle 1</b>	20.0	16.0	4.0	
	25.3	24.6	0.7	
	22.8	19.0	3.8	
	25.2	22.1	3.1	
	22.3	13.5	8.8	
média=	115.6	95.2	20.4 (18%)	<b>4.10</b>

0.06% = concentração natural

Os discos de *U. fasciata* contendo 0.06%, 0.1% e 0.2% do diterpeno guaiano Dm-1 perderam 49.7 mg (40%), 45.8 mg (39%) e 44.8 mg (38%) de biomassa por herbivoria, respectivamente. Os

respectivos controles mostraram perda de 20.4 mg (18%) e um ganho de 2.4 mg, correspondente a 11.4% no controle sem anfípoda.

As perdas verificadas nas três concentrações, quando comparadas àquelas observadas nos discos de algas controles (sem dictyol H) mostraram que nestas quantidades, o diterpeno não teve efeito significativo contra o anfípoda *P. hawaiiensis* ( $p > 0.05$ , teste t). Portanto, este metabólito não mostrou efeito deterrente em nenhuma das concentrações acima (Figura 73).



**Figura 73:** Efeitos do guaiano Dm-1 (39) isolado de *D. mertensis* sobre o anfípoda *P. hawaiiensis*

Os testes experimentais efetuados com o Dm-1 (Dictyol H, 39), assim como os experimentos de Dc-1 (dolastano, 35)

evidenciaram que estas substâncias além de não exercerem efeito sobre o consumo deste herbívoro, podem, mesmo, estimular a predação.

Deve-se ressaltar que o número de réplicas para testes foi pequena. Isto se deve as pequenas quantidades de produtos disponíveis para testes.

É interessante que testes análogos, quando aplicados a outro diterpeno com esqueleto guaiano (pachydictyol A, 37) revelaram atividade anti-herbívoria na concentração natural (0.5%) frente ao mesmo herbívoro.<sup>208</sup>

Estas observações concordam com Hay *et al.* (1988),<sup>50</sup> que verificou que substâncias estruturalmente similares podem diferir drasticamente nos efeitos sobre a preferência alimentar dos herbívoros.

Deste modo, torna-se evidente a necessidade de estudos sobre a defesa química de algas em diferentes regiões geográficas, com diferentes tipos de herbívoros e com diferentes concentrações e especificidades estruturais de cada molécula.

## **CAPITULO 4**

### **AVALIAÇÕES TAXONÔMICAS**

As algas pardas (Phaeophyta) são constituídas de cerca de 250 gêneros distribuídos em 13 ordens pertencentes a apenas uma classe (Phaeophyceae), totalizando mais de 1.500 espécies quase exclusivamente marinhas e, em grande número, ocorrendo nas águas temperadas e frias. Dentre estas, as ordens Dictyotales e Fucales são abundantes em mares tropicais e subtropicais.<sup>12</sup>

Segundo Papenfuss (1977)<sup>55</sup> a ordem Dictyotales (Phaeophyta) compreende 16 gêneros pertencentes a uma única família, Dictyotaceae (Tabela 32, pág. 174).

**Tabela 32:** Gêneros constituintes da ordem Dictyotales (Phaeophyta) segundo Papenfuss, 1977.<sup>55</sup>

CLASSE	ORDEM	FAMÍLIA	GÊNERO
Phaeophyceae	Dictyotales	Dictyotaceae	<i>Chlanidophora</i> <i>Dictyopteris</i> <i>Dictyota</i> <i>Dilophus</i> <i>Distromium</i> <i>Glossophora</i> <i>Homoeostrichus</i> <i>Lobospira</i> <i>Pachydictyon</i> <i>Padina</i> <i>Spatoglossum</i> <i>Stoechospermum</i> <i>Styopodium</i> <i>Taonia</i> <i>Zonaria</i>

Como mencionado anteriormente, a análise fitoquímica de seus representantes revelou grandes diferenças entre eles, indicando pelo menos três grupos de gêneros quimicamente diferentes: os grupos "Dictyota", "Dictyopteris" e "Taonia". Os gêneros *Dictyota*, *Dilophus*, *Glossophora*, *Pachydictyon*, *Spatoglossum* e *Stoechospermum*, pertencentes ao primeiro grupo, têm apresentado diferentes diterpenos simples como seus principais metabólitos. O gênero *Dictyopteris*, único pertencente ao grupo "Dictyopteris", é prolífero na produção de sesquiterpenos simples e de origem biossintética mista. E finalmente, o grupo "Taonia"



consiste dos gêneros *Taonia* e *Styopodium*, ricos produtores de meroditerpenos, principalmente.

Por outro lado, a ordem Fucales compreende 7 famílias, entre as quais se destacam Cystoseiraceae (13 gêneros) e Sargassaceae (6 gêneros), pela grande produção de metabólitos diterpenoídicos de origem biossintética mista (Tabela 33).

Tabela 33: Gêneros constituintes da ordem Fucales (Phaeophyta), (segundo Papenfuss, 1951).<sup>55</sup>

CLASSE	ORDEM	FAMÍLIA	GÊNERO
Phaeophyceae	Fucales	Ascoseiraceae	<i>Ascoseira</i>
		Durvilleaceae	<i>Durvillea</i> , <i>Sarcophycus</i> , <i>Himantothallus</i>
		Notheiaceae	<i>Hormosira</i> , <i>Notheia</i>
		Fucaceae	<i>Ascophyllum</i> , <i>Ascillaria</i> , <i>Cystophaera</i> , <i>Fucus</i> , <i>Hespero-</i> <i>phycus</i> , <i>Marginariella</i> , <i>Marginaria</i> , <i>Myriodesma</i> , <i>Pelvetia</i> , <i>Pelvetiopsis</i> , <i>Phyllospora</i> , <i>Scytothalia</i> , <i>Seirococcus</i> , <i>Xyphophora</i>
		Himanthaliaceae	<i>Himanthalia</i>
		Cystoseiraceae	<i>Bifurcaria</i> , <i>Bifurcariopsis</i> , <i>Carpoglossum</i> , <i>Cystophora</i> , <i>Blossevillea</i> , <i>Cystophyllum</i> , <i>Cystoseira</i> , <i>Halidrys</i> , <i>Hormophysa</i> , <i>Landsburgia</i> , <i>Neoplatylobium</i> , <i>Platylobium</i> , <i>Platythalia</i>
		Sargassaceae	<i>Acystis</i> , <i>Carpophyllum</i> , <i>Coccophora</i> , <i>Sargassum</i> , <i>Scaberia</i> , <i>Turbinaria</i>

Dentre a família Cystoseiraceae, os gêneros *Bifurcaria*, *Cystophora*, *Cystoseira* e *Halidrys* são os únicos produtores conhecidos de diterpenos, enquanto para a família Sargassaceae destaca-se o gênero *Sargassum*, o único estudado quimicamente e representado no Brasil.

Para vários representantes desta divisão existem problemas na determinação dos limites de separação entre ordens, famílias, gêneros e/ou espécies e variedades com base em critérios puramente morfológicos.

Entretanto, mais recentemente, estudos sobre a composição química destas algas tem demonstrado que os metabólitos secundários marinhos são valiosos marcadores quimiosistemáticos.<sup>6</sup> Desta forma, a análise química vem se tornando uma importante ferramenta para classificação sistemática, em paralelo com a análise morfológica.

Na maioria dos trabalhos quimiosistemáticos realizados até hoje com os organismos marinhos, senão na totalidade, o critério analítico-descritivo usado tem se baseado na presença e/ou ausência de uma classe de metabólito ou de uma determinada substância particular. Esta abordagem não pode ser considerada adequada por uma série de razões. Primeiro, a presença de um metabólito pode não ter sido detectada (ausência falsa). Segundo, um metabólito isolado pode ser um artefato de purificação (falsa presença). Enfim, metabólitos já conhecidos, embora de novas fontes, não interessam em geral o químico de produtos naturais

que, muitas vezes, não publica tais resultados ou não recebe espaço nas principais revistas para comunicá-los. Isso resulta na pobre informação sobre a distribuição atual dos metabólitos nos organismos marinhos.

Deste modo, nossa abordagem quimiossistemática é baseada na técnica estatística semi-empírica desenvolvida no Brasil por Gottlieb (1982),<sup>6</sup> que tenta analisar a evolução destes metabólitos.

#### 4.1. MÉTODOS QUIMIOTAXONÔMICOS

A etapa preliminar deste estudo constou de um levantamento bibliográfico de terpenos simples e de origem biossintética mista (meroterpenos) para os representantes das ordens Dictyotales e Fucales (algas pardas), relatados na literatura até dezembro de 1988 e 1990, respectivamente.

De posse dessas informações foram então construídos mapas biogênicos, conforme propostas da literatura confirmadas por estudos bioquímico-mecanísticos, e outras, baseadas em especulações puramente teóricas.

De acordo com a metodologia quimiossistemática<sup>6</sup> foi possível caracterizar esses metabólitos por dois parâmetros

quantitativos: índice de especialização de esqueleto (IE) e índice de oxidação (IO).

O índice de especialização de esqueleto (IE) mede o grau de modificação estrutural sofrido pelo esqueleto da substância em questão, em relação ao esqueleto do seu precursor biogenético (geranil-geraniol, neste caso). Este índice foi calculado para cada tipo de esqueleto formado, com base no número de passos reacionais, envolvendo a formação ou clivagem da ligação C-C a partir do geranil-geraniol. O índice de avanço evolutivo de esqueleto ( $AE_e$ ) é calculado a partir da média aritmética dos valores de IE que ocorrem num determinado táxon.

O valor de IE foi calculado considerando-se apenas a parte diterpenoídica das substâncias isoladas da espécie, através do somatório de pontos que foram atribuídos da seguinte maneira.

- Todas as contagens de pontos foram feitas comparando-se o esqueleto em questão com o precursor comum.

- Dois pontos para cada átomo de carbono envolvido numa ligação C-C cindida ou formada.

- Dois pontos para átomo de carbono envolvido em ligações com heteroátomos em fechamento ou abertura de anel.

- Zero ponto para quebra ou formação de ligações C-H e  $\pi$ .

- Os átomos de carbono adicionais ao esqueleto do precursor não foram levados em consideração na contagem do número de átomos de carbono e não foram atribuídos pontos para as transformações que com eles ocorreram. Portanto, no caso de dímero, consideramos

duas substâncias separadas.

- Em caso de degradação de esqueleto, consideramos somente os átomos de carbono que sobraram, tanto na contagem do número de ligações C-C formadas ou cindidas a partir do precursor do esqueleto em questão, como do número de carbonos do esqueleto em questão.

Portanto, para os diterpenos:

$$IE = \frac{\text{N}^\circ \text{ de ligações rompidas ou formadas a partir do precursor}}{\text{N}^\circ \text{ de carbonos do esqueleto em questão (vinte)}}$$

Por outro lado, o índice de oxidação (IO) mede o nível de oxidação da substância em questão. O valor de oxidação é uma característica de cada substância e é portanto, independente do tipo de esqueleto e da sua posição no mapa biogenético. Tal valor pode ser calculado através da relação entre o somatório de pontos atribuídos pelas regras descritas abaixo e o número de carbonos do esqueleto.

- Zero ponto para ligações C-C
- (-1) para ligações C-H
- (+1) para ligações C-X
- Os grupos OMe, OAc, etc.. foram considerados como iguais a -OH, sendo atribuído o valor +1.
- As substâncias diméricas foram consideradas como duas

substâncias separadas e analisadas a partir dos monômeros.

- Para as substâncias degradadas do esqueleto considerado (comparando-se com o precursor) foram considerados apenas os átomos de carbono que sobraram tanto na contagem de pontos pelas regras pré-estabelecidas como para o número de carbonos da molécula. Além disso, adicionamos +3 pontos por grupo desligado conforme as regras de somatório de pontos pré-estabelecida.

Para cada espécie foi obtido o índice de avanço de oxidação médio ( $AE_{\circ}$ ).

Além destes dados, as espécies foram comparadas utilizando-se o índice de similaridade (S) de Sorensen (1948),<sup>208</sup> baseado no percentual de representatividade dos esqueletos comuns entre as espécies. Este índice foi escolhido com a finalidade de observarmos as afinidades entre as espécies, por não considerar a ausência de um ou mais esqueletos como evidência certa, o que pode ocorrer quando se utiliza o índice de Jaccard (Hruby 1975).<sup>209</sup>

$$S = \frac{2 \cdot C}{A+B} \times 100\%, \text{ onde}$$

A= número de compostos isolados da espécie A.

B= número de compostos isolados da espécie B.

C= o menor número de compostos isolados com esqueletos comuns entre a espécie A e B.

Posteriormente, as espécies foram reunidas por região de coletas: Oceanos Atlântico, Pacífico e Mar Mediterrâneo.

4.2. CONSIDERAÇÕES BIOGENÉTICAS DOS TERPENOS DAS ORDENS  
 DICTYOTALES (Dictyotaceae) E FUCALES (Cystoseiraceae e  
 Sargassaceae)

4.2.1. Grupo "Dictyopteris" e Grupo "Taonia" (Dictyotales)

4.2.1.1. Grupo "Dictyopteris"

Até dezembro de 1988 foram isolados das espécies *D. divaricata* (Figura 10, pág. 38) e *D. zonarioides* (= *D. undulata*) (Figura 9, pág. 37), um total de 25 sesquiterpenos, distribuídos em sete tipos de esqueletos<sup>70-79</sup> (Tabela 34)

Tabela 34: Distribuição dos sesquiterpenos no grupo "Dictyopteris" e os locais de coletas das algas.

ESPECIES	LOCAL DE COLETA E OCEANO	GRUPO I					GRUPO II		REF.
		C	C	C	E	S	F	D	
		A	U	O	L	E	A	R	
		D	B	P	E	L	R	I	
<i>D. divaricata</i>	Japão-Pacífico	6	3	1	1	3			77-79
<i>D. zonarioides</i>	Japão-Pacífico						2	8	70-75
	México-Pacífico	1						1	75,76
	Calif.-Pacífico							1	75

grupo I sesquiterpenos simples

grupo II sesquiterpenos mistos (acíclicos e cíclicos)

esqueleto: CAD= Cadinano; COP= copaano; ELE= elemano;

SEL= selinano; FAR= farnesano; DRI= drimano

Estas substâncias pertencem a dois grupos biogénéticos distintos, dependendo se eles são (grupo II) ou não (grupo I) de origem biossintética mista (Figura 74, pág. 183).<sup>211</sup>

Os sesquiterpenos pertencentes ao grupo I são todos derivados da ciclização 1,10 do t,t-farnesol, que leva à formação de um intermediário do tipo germacrano. Este intermediário, por sua vez, fornece através de uma sequência de trans-ciclizações ou via rearranjo de Cope, os esqueletos cadinano (CAD), copaano (COP), cubebano (CUB), selinano (SEL) e elemano (ELE). Dos 15 metabólitos conhecidos deste grupo, 14 pertencem à espécie *D. divaricata* e apenas uma substância de esqueleto cadinano (zonareno) foi encontrada, na espécie *D. zonarioides*.<sup>76</sup>

Os sesquiterpenos pertencentes ao grupo II resultam do acoplamento de um precursor do tipo farnesano (FAR) com uma unidade de ácido para-hidroxibenzóico ou para-hidroquinona, derivados da via do acetato. Posteriores ciclizações parecem gerar sesquiterpenos substituídos com esqueletos drimano (DRI). Todos os 10 metabólitos conhecidos nesta classe são exclusivos da espécie *D. zonarioides* (Figura 10, pág. 38 e Figura 74, pág. 183).

Através dos resultados observados acima, sugerimos que o suposto material identificado como *D. zonarioides*, produtor de um simples cadinano (sesquiterpeno simples, o zonareno), seja re-examinado morfológicamente.<sup>76</sup>



# GRUPO 'DICTYOPTERIS'

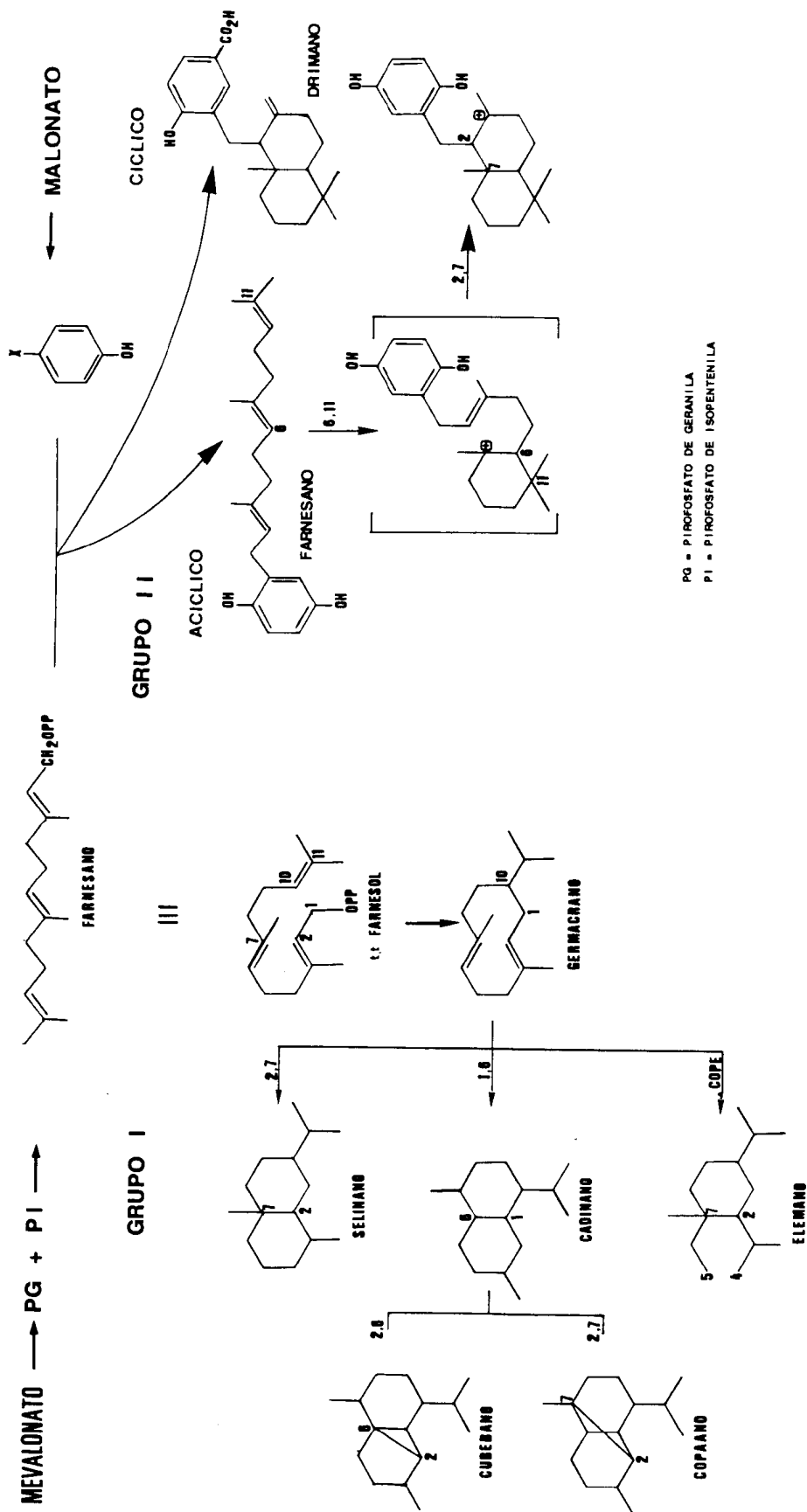


Figura 74: Proposta biogenética para os sesquiterpenos do grupo "Dictyopteris"

#### 4.2.1.2. Grupo "Taonia"

Foram isolados das espécies *Taonia atomaria*, *T. australasica* (Figura 11, pág. 40) e *Styopodium zonale* (Figura 12, pág. 41) um total de 17 substâncias diterpenoidicas de origem biossintética mista ou não, distribuídas em 3 tipos de esqueletos (Tabela 35).

**Tabela 35:** Distribuição dos diterpenos (meroditerpenos e simples) do grupo "Taonia" e os locais de coleta das algas

ESPECIES	LOCAL DE COLETA E OCEANO	ESQUELETOS				REF.
		GRUPO I		GRUPO II		
		T A N	G E R	T A D	A T O	
<i>S. zonale</i>	Caribe-Atlântico		2	5	2	87,88 90
	Micronésia-Pacífico		2	2	1	88,90
<i>T. atomaria</i>	I. Canárias-Atlântico				9	81,85
<i>T. australasica</i>	Austrália-Pacífico	1				86

grupo I sesquiterpenos simples  
grupo II sesquiterpenos mistos (acíclicos e cíclicos)  
esqueleto: TAN= taoniano; GER= geraniano; TAD= taondiano;  
ATO= atomarano

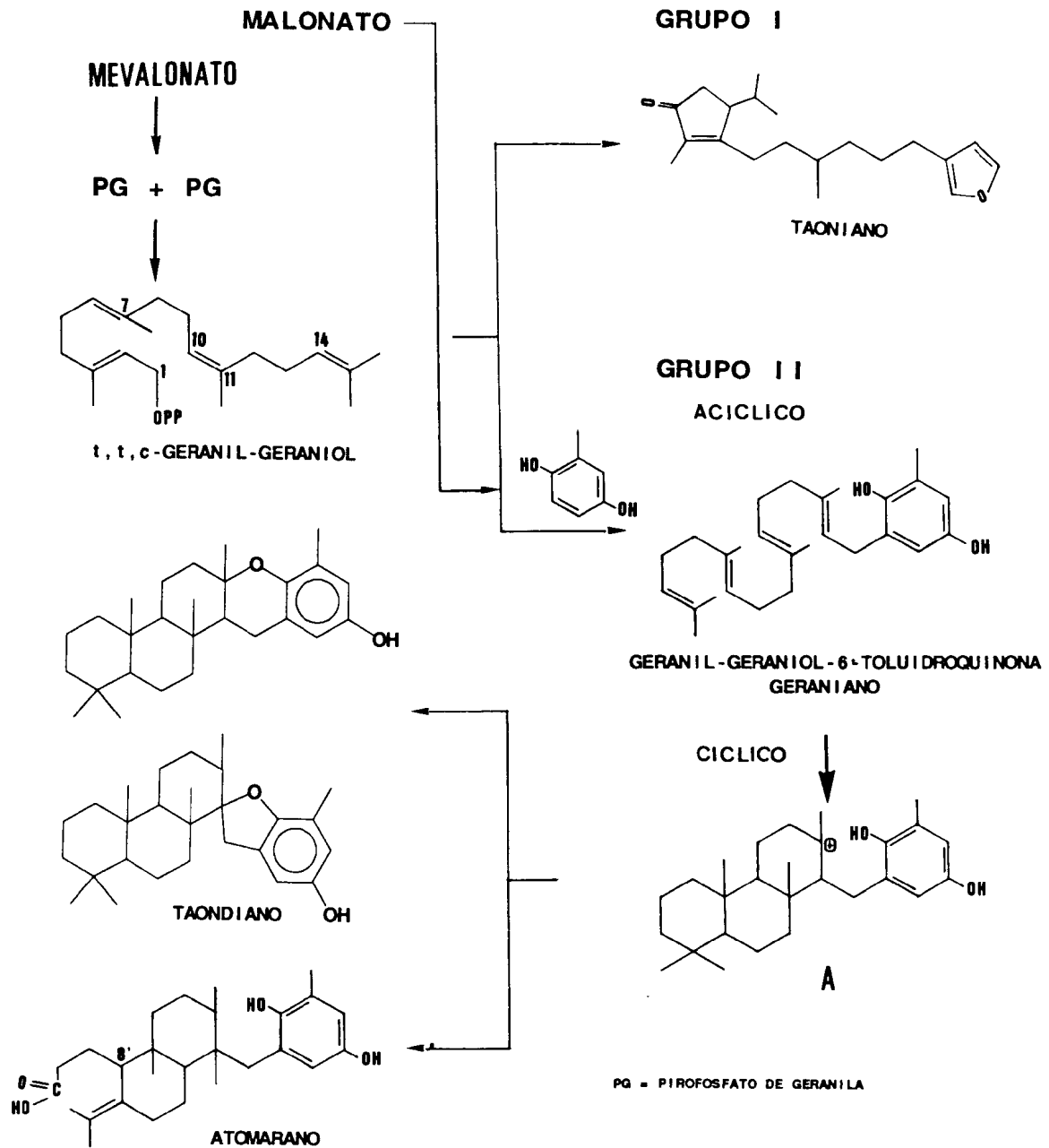
A Figura 75 (pág. 186) apresenta uma proposta biogenética para os diterpenos do grupo "Taonia".<sup>211</sup>

O grupo I (Figura 11, pág. 40) apresenta apenas um representante conhecido, a taonianona, um diterpeno com anel furânico (esqueleto taoniano: TAN) isolado de *Taonia australasica*.<sup>86</sup>

Por outro lado, são conhecidos 16 metabólitos do grupo II. São derivados do precursor geranil-geraniol-6-toluidroquinona (esqueleto gerânico: GER), como demonstrado na Figura 75 (pág. 186). Tetraprenil-toluidroquinonas simples (Figura 12, pág. 41) têm sido relatadas para *S. zonale* e parecem estar intimamente relacionadas com os metabólitos de muitas espécies de *Sargassum* (Fucales, Phaeophyta).<sup>121</sup> Ciclização do precursor dá origem a um intermediário tetracíclico desconhecido (A). Subseqüentes rearranjos de metilas e clivagem oxidativa do anel-A a partir deste intermediário proporcionam metabólitos pouco comuns do grupo dos atomaranos (ATO), observados em *T. atomaria* e *S. zonale*.<sup>87</sup> Por outro lado, a formação de éteres a partir do mesmo intermediário deve proporcionar terpenos do tipo pirano da série taondiol (TAD) ou os terpenos do tipo hidrofurano como o stypodiol,<sup>90</sup> também pertencentes ao esqueleto taondiano (TAD) (Figura 75, pág. 186). Enquanto, os primeiros estão distribuídos nos gêneros *Taonia* e *Styopodium*, o último é restrito à espécie *S. zonale*.

A Tabela 36 (pág. 187) apresenta a distribuição dos diterpenos do grupo "Taonia" (considerando apenas a parte

# GRUPO 'TAONIA'



**Figura 75:** Proposta biogénica para os diterpenos isolados do grupo "Taonia"

diterpenoídica das substâncias) e os índices de avanço evolutivo de esqueleto médio e avanço evolutivo de oxidação média para cada espécie deste grupo. Nos cálculos de índices taxonômicos<sup>6</sup> desta tabela compara-se apenas os esqueletos diterpenoídicos.

**Tabela 36:** Distribuição dos diterpenos do grupo "Taonia" (considerando apenas a parte diterpenoídica das substâncias) e índices taxonômicos médios.

ESPÉCIES	ESQUELETOS				TOTAL	AEe	AEo
	GRUPO I	GRUPO II					
	T A O	G E R	T A L	A T O			
<i>S. zonale</i>		1	2	1	4	0.30	-1.55
<i>T. atomaria</i>			4	3	7	0.44	-1.49
<i>T. australasica</i>	1				1		

grupo I= diterpenos simples  
 grupo II= diterpenos mistos (acíclicos e cíclicos)  
 esqueletos: TAN= taonianona; GER= geraniano; TAD=taondiol;  
 ATO= atomarano

A matriz de similaridade de Soerensen é demonstrado na Tabela 37 (pág. 188). Obviamente, o valor de S (similaridade) foi zero entre quaisquer pares de espécies pertencentes aos grupos "Dictyopteris" e "Taonia", já que estes grupos não produzem os mesmos esqueletos terpenoídicos. A escassez de informações

químicas sobre a espécie *Taonia australasica* também levou a similaridade com valor zero quando comparada com outras espécies do grupo "Taonia". O baixo índice de similaridade ( $S = 8\%$ ) que foi observado entre as espécies do gênero *Dictyopteris*, *D. divaricata* e *D. zonarioides* se deve a esta última por fornecer apenas um sesquiterpeno do tipo-cadinano, dentre os 25 metabólitos encontrados nestas duas espécies de *Dictyopteris*. Por outro lado, um valor significativo foi observado entre as espécies *S. zonale* e *T. atomaria* ( $S = 57\%$ ), devido à co-ocorrência das substâncias do tipo taondiol (TAD) e ácido-atomárico (ATO).

**Tabela 37:** Matriz de similaridade (Soerensen 1948)<sup>209</sup> entre as espécies dos grupos "Dictyopteris" e "Taonia"

ESPECIES	A	B	C	D	E
A: <i>Dictyopteris divaricata</i>	100				
B: <i>Dictyopteris zonarioides</i>	8	100			
C: <i>Styopodium zonale</i>	-	-	100		
D: <i>Taonia atomaria</i>	-	-	55	100	
E: <i>Taonia australasica</i>	-	-	-	-	100

Esta observação foi também evidente através da comparação gráfica entre os índices taxonômicos (Figura 76, pág. 189) calculados para *Taonia atomaria* e *T. australasica* ( $AE_e = 0.30$ ,  $AE_o = -1.55$ ) e *Styopodium zonale* ( $AE_e = 0.44$ ,  $AE_o = -1.49$ ). Através

deste gráfico, notamos que o gênero *Taonia* apresentou o mais alto valor de oxidação e a maior complexidade estrutural do que *Styopodium*.

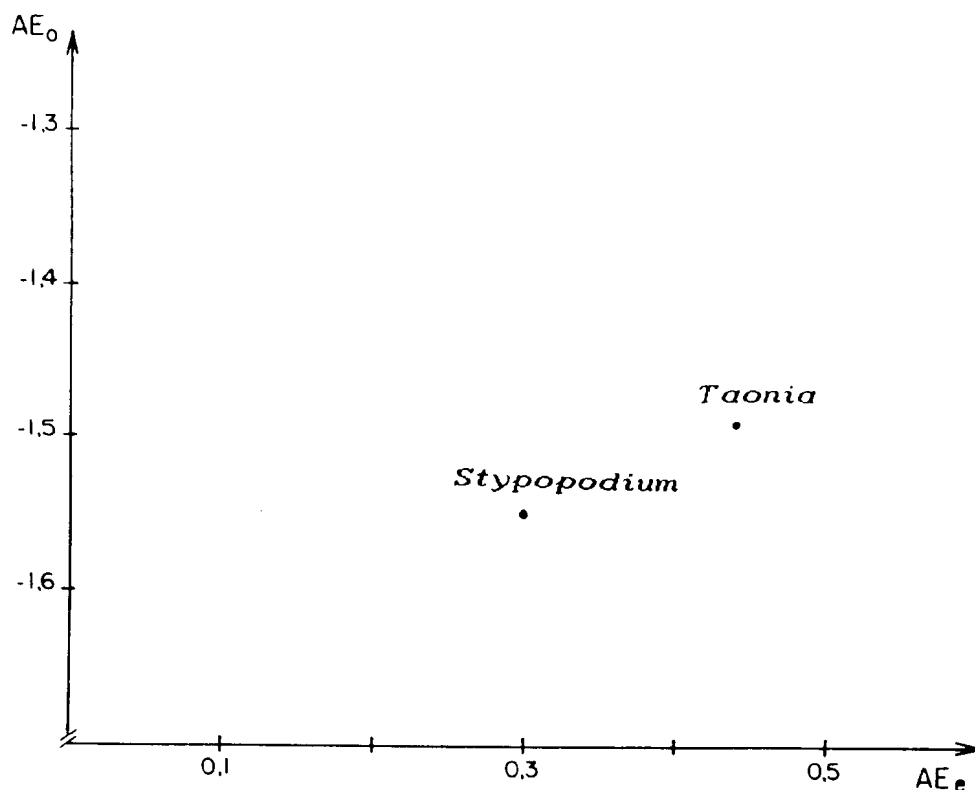


Figura 76:  $AE_e$  x  $AE_o$  dos gêneros estudados quimicamente para o grupo "Taonia"

A pouca disponibilidade de informações sobre os locais de coleta das algas estudadas fitoquimicamente restringiu a análise biogeográfica dos resultados. O gênero *Dictyopteris* inclui 13 espécies que são amplamente distribuídas nas águas quentes de várias partes do mundo. Por outro lado, os gêneros *Taonia*, com 3 espécies e *Styopodium*, com 5 espécies, apresentam

distribuição mais restrita. No entanto, todos os metabólitos descritos para *Dictyopteris* foram obtidos de espécies coletadas no Oceano Pacífico. Os metabólitos de *Taonia* foram isolados de uma espécie do Atlântico, com uma única exceção, a de um diterpeno-furano, obtido de uma espécie endêmica da Austrália (Oceano Pacífico), *T. australasica*. *S. zonale* foi a única espécie que apresentou terpenos nos Oceanos Atlântico e Pacífico.

Deve-se ressaltar que a substância precursora de todos os metabólitos diterpenoidicos de origem biossintética mista, do grupo "Taonia", a geranilgeranil-6-toluidroquinona (GER), foi encontrada nos dois oceanos, embora até o momento tenha sido isolada apenas de *S. zonale*.

#### 4.2.1.3. CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS PARA A ORDEM DICTYOTALES

Embora o número de informações químicas disponíveis sobre os terpenos das algas consideradas nestes grupos seja pequeno quando comparada com o grupo "Dictyota",<sup>58</sup> podemos confirmar a utilização destas substâncias como marcadores taxonômicos para a ordem Dictyotales.

Como anteriormente mencionado, o grupo "Taonia" (gêneros *Taonia* e *Styopodium*) produz diterpenos de origem biossintética mista. A parte proveniente da via do malonato (acetato) está



presente como uma unidade toluhidroquinona, podendo a hidroxila do C-5 ser encontrada metilada ou acilada para *Taonia* e acilada para *Styopodium*.

A afinidade química observada entre os gêneros deste grupo está de acordo com os dados morfológicos que indicam que *Taonia* e *Styopodium* são bem próximos. No entanto, uma espécie do grupo, *T. australasica*, não obedeceu à regra geral como apontada acima. Este fato pode estar relacionado, ou com uma possível identificação errada da alga, ou talvez reflita as características peculiares da flora marinha Australiana, que inclui muitas espécies endêmicas que, portanto, produzem "metabólitos endêmicos". Isto já foi observado para *Dictyota dichotoma* coletada nas costas de Sydney, que produziu dois diterpenos com esqueletos cicloxeniano e dichotomano, restritos a esta população.<sup>201</sup>

Finalmente, o grupo "Dictyopteris" produziu sesquiterpenos simples ou merossesquiterpenos, e não diterpenos. As unidades provenientes do malonato (acetato) estão presentes como uma hidroquinona ou como um ácido para-hidroxibenzóico. Os merossesquiterpenos de esqueleto drimano tem apresentado uma relação próxima com alguns metabólitos de esponja. Obviamente, nenhuma relação biológica direta (i.e. alimentar) pode ser estabelecida, sendo este provavelmente um exemplo de evolução paralela. Similarmente, os poli-prenil-hidroquinonas de *Dictyopteris zonarioides* estão relacionados com os metabólitos de

*Sargassum* (Fucales), um dos gêneros mais evoluídos de alga parda. Isto deve ser novamente uma evolução paralela ou ser um indicativo de caráter evoluído do gênero *Dictyopteris*, evidenciado pela presença de uma nervura central em seu talo, o que sugere uma diferenciação entre as regiões do talo. Outras sugestões filogenéticas derivaram da Figura 76 (pág. 189), onde estão plotados os índices taxonômicos. Na verdade, é geralmente aceito que componentes mais evoluídos são observados na diagonal, longe da origem<sup>6</sup> do gráfico. Portanto, uma sugestão é que *Taonia atomaria* deva ser mais evoluída que *Styopodium zonale*. Na verdade, são hipóteses, mas desde que *Taonia* é tipicamente habitante do Oceano Atlântico, mais recente que o Pacífico, nossa proposta faz sentido.

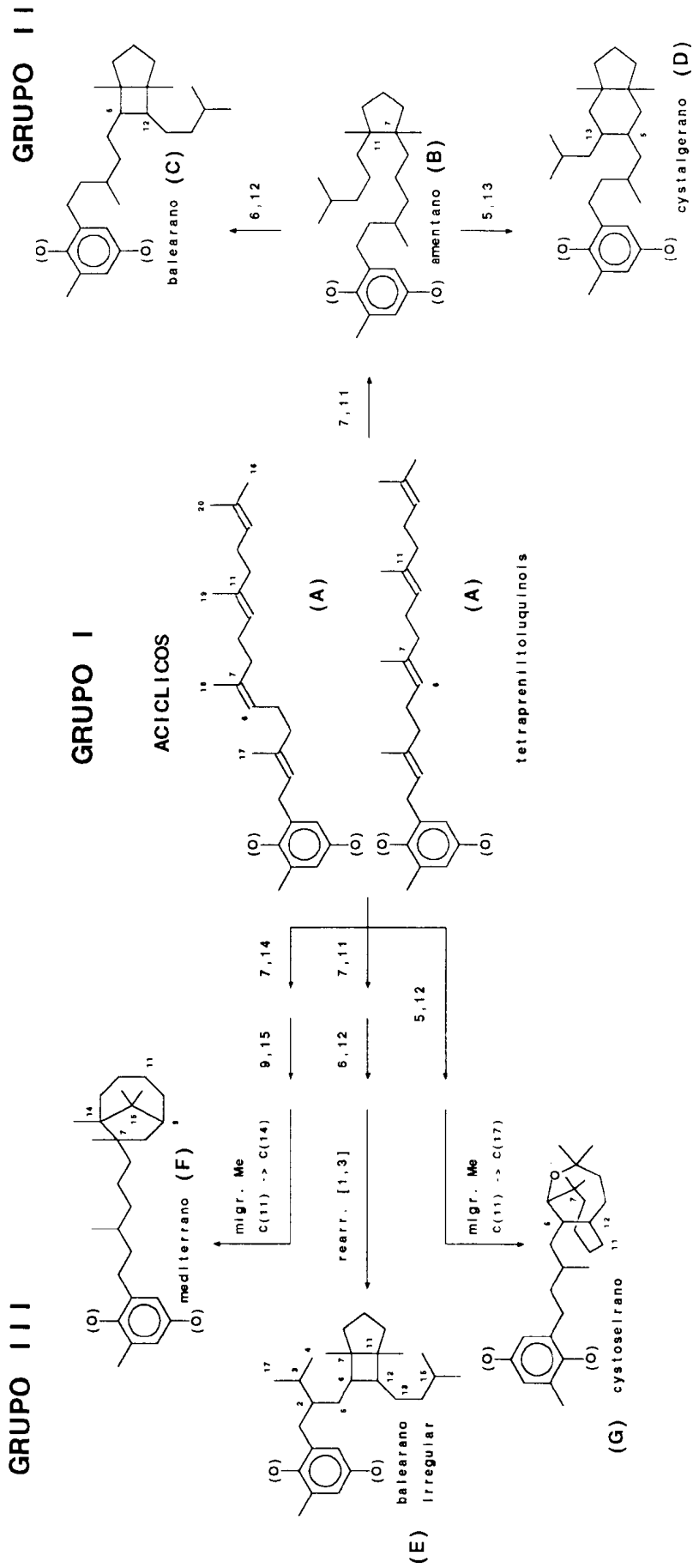
Através destes resultados, reforçamos a sugestão de Fenical (1980)<sup>5,6</sup> de dividir a ordem Dictyotales em três famílias, de acordo com a composição terpenoídica. Entretanto, é importante lembrar que ainda há falta total ou parcial de informações químicas sobre muitos dos gêneros desta ordem. Com a obtenção de maiores informações químicas talvez seja possível a formação de um quarto grupo, o grupo "Zonaria", que incluiria os gêneros *Zonaria* e *Lobophora*, hábeis na produção de acetogeninas fenólicas. Estudos químicos futuros além da obtenção de mais dados biogeográficos tornam-se necessários para a melhor caracterização quimiotaixonômica da ordem Dictyotales.

#### 4.2.2. Gênero *Cystoseira* (Cystoseiraceae, Fucales)

Até dezembro de 1990, foram estudadas 21 espécies incluindo 2 variedades e um híbrido, do gênero *Cystoseira*.<sup>212-215</sup> Um total de 94 diterpenos de origem biossintética mista ou não, distribuídos em 7 diferentes tipos de esqueletos foram descritos (Figura 13a,b,c, págs. 43-45 e Tabela 38, pág. 195).

Os meroditerpenos isolados das espécies de *Cystoseira* foram classificados em três grupos (Figura 77, pág. 194), a partir dos precursores acíclicos tetraprenil-toluquinóis (grupo I). Torna-se necessário ressaltarmos que nenhum trabalho biossintético anterior existe, e que, apesar da proposta apresentada na Figura 77 ser lógica, é puramente teórico-especulativa. De acordo com as posições dos carbonos envolvidos na primeira ciclização dos precursores foram originados metabólitos cíclicos regulares (grupo II) e irregulares (grupo III). Entretanto, como anteriormente mencionado, os índices taxonômicos foram calculados apenas para a parte diterpenoídica de cada metabólito.

Diterpenos do grupo I (os acíclicos) (Figura 77 e 13 a, págs. 194 e 43) constituem-se no grupo típico deste gênero. Eles estão representados em 17 espécies, produtoras de uma série de meroditerpenos acíclicos, com 39 metabólitos de esqueletos regulares (A) ou não, 12 diterpenos simples e seus produtos de degradação (3 substâncias).



**Figura 77: Proposta biogenética para os diterpenos de Cystoseira**

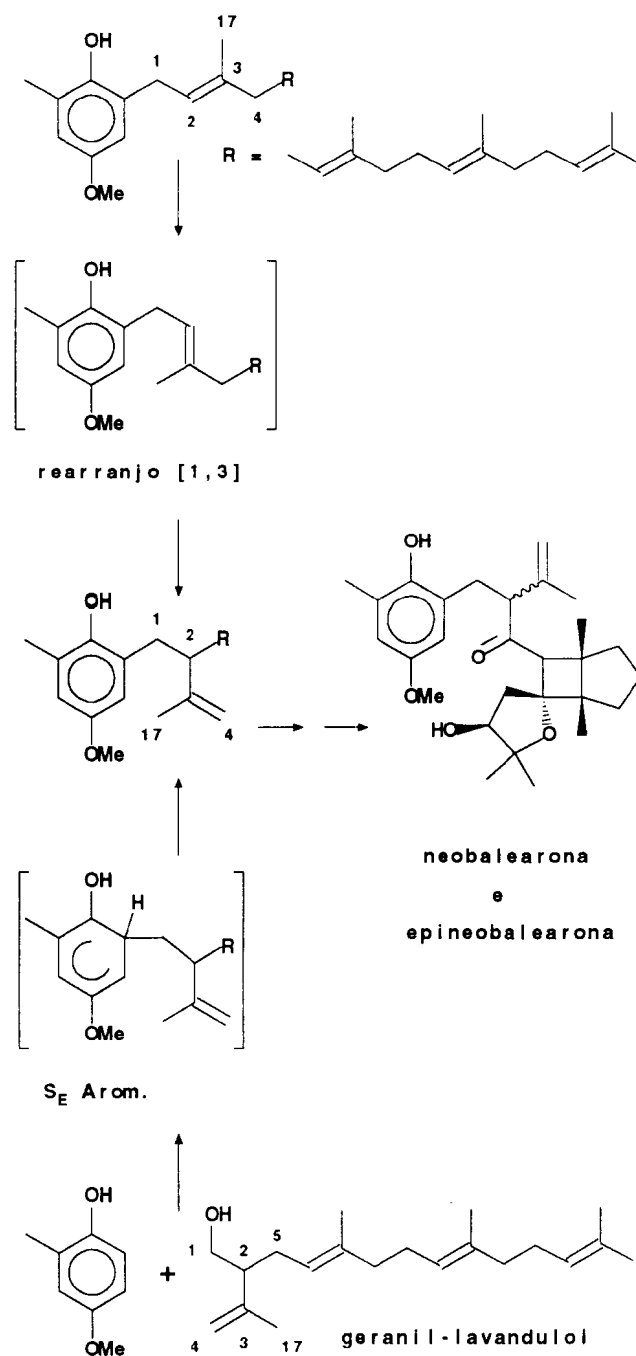
TABELA 38: Número total e substâncias isoladas para cada espécie de *Cystoseirae* seus respectivos tipos de esqueletos.

ESPECIES	GRUPO I			GRUPO II			GRUPO III			TOTAL
	M N D	D S N	D S D	A M T	B A L	C Y T	B A L	C Y S	M E D	
1. <i>C. algeriensis</i>						2				2
2. <i>C. algeriensis</i> x <i>C. elegans</i>				4		4				8
3. <i>C. balearica</i>		7								7
4. <i>C. barbata</i>	2									2
5. <i>C. barbatula</i>	5									5
6. <i>C. brachycarpa</i>		8	3							11
7. <i>C. crinita</i>	2									2
8. <i>C. dubia</i>	2									2
9. <i>C. elegans</i>	6	4		4						14
10. <i>C. ercegovicii</i>	2									2
11. <i>C. hyblae</i>	14									14
12. <i>C. jabukae</i>	1			2						3
13. <i>C. mediterranea</i>				5	4			5	4	18
14. <i>C. platyramosa</i>						1				1
15. <i>C. sauvageauana</i>	2									2
16. <i>Cystoseira sp</i>	3									3
17. <i>C. spinosa</i> var. <i>squarrosa</i>	7									7
18. <i>C. stricta</i>				5	4		2	5	4	20
19. <i>C. stricta</i> var. <i>amentacea</i>	1			5						6
20. <i>C. tamariscifolia</i>	3			2	2		2	5	4	18
21. <i>C. zosteroides</i>	5									5

grupo I (acíclicos): MND e DSN= meroditerpenos e diterpenos simples não degradados, DSD= diterpenos simples degradados  
grupo II (meroditerpenos regulares): AMT= amentano; BAL= balearano; cyt= cystalgerano; grupo III (meroditerpenos irregulares):  
BAL= balearano; CYS= cystoseirano; MED= mediterraneo

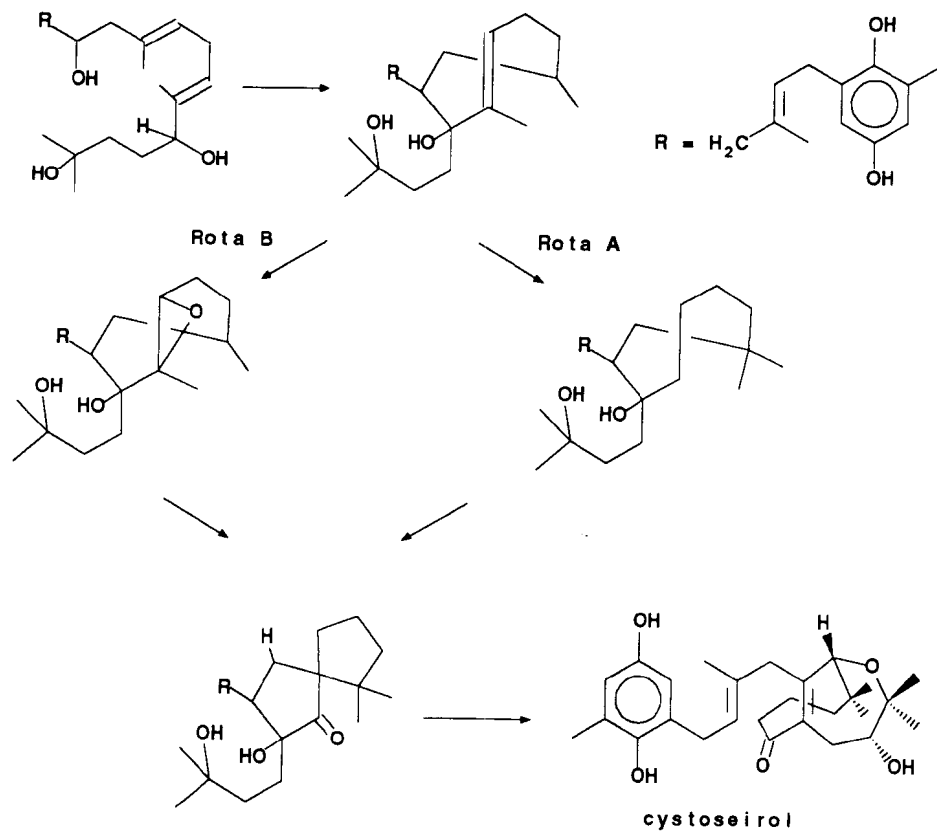
Os diterpenos do grupo II (Figura 77, pág. 194 e Figura 13b, pág. 44) são resultantes da primeira ciclização anti-Markovnikov de A entre os carbonos C-7 e C-11, para dar origem ao esqueleto amentano (B) (17 substâncias). Posterior ciclização entre as ligações do C-6 e C-12 fornece o esqueleto [3,2,0] bicicloheptano (balearona regular (C)) (4 substâncias). Por sua vez, quando os diterpenos monocíclicos formados (B) ciclizam entre as posições C-5 e C-13, através de condensação aldólica interna, conduzem ao esqueleto [4,3,0] biclicnonano (cystalgerano (D)) (4 substâncias).<sup>102,216-218</sup>

Os diterpenos do grupo III são originados por uma via biossintética mais complexa.<sup>117-118,219-223</sup> O esqueleto irregular [3,2,0] bicicloheptano (balearano irregular (E)) (2 substâncias) parece derivar de rearranjo 1,3 do precursor (A) resultando na migração da ligação C-C do C-4 - C-5 para o C-2 - C-5, seguido de modificações possivelmente catalisadas pelos mesmos sistemas enzimáticos envolvidos na biossíntese de B e C ou, alternativamente, como proposto na literatura<sup>216</sup> pela condensação de uma unidade aromática com uma forma ativada de geranyl-lavandulol<sup>102,216,217</sup> (Figura 78, pág. 197). Por outro lado, os esqueletos mediterrâneos (F), [4,2,1] biclicnonano, com 4 substâncias e cystoseiranos (G, [5,4,1] oxabicliclododecano, com 5 substâncias) são irregulares e parecem derivar de A, através de uma sequência de ciclizações não usuais, seguidas de migrações da metila Me-19 do C-11 para C-14 ou do C-11 para C-7,



**Figura 78:** Proposta biogenética para formação do neobalearona e epineobalearona (segundo Amico, *et al* (1989),<sup>220</sup> em parte).

respectivamente. Uma proposta para a obtenção dos cystoseiróis foi relatada na literatura (rota A) e uma proposta modificada por nós (rota B) são demonstradas na Figura 79. Entretanto, um ponto deve ser enfatizado: até o momento, nenhum intermediário proposto foi isolado entre os produtos-traços dos extratos que contêm estes meroditerpenos. Deste modo, apesar dos mecanismos de formação dos esqueletos dos mediterranos e cystoseiranos parecerem lógicos, os dados da literatura ainda não são suficientes para uma clara compreensão destas biossínteses.



**Figura 79:** Proposta biogenética para formação do cystoseirol



Dentre as espécies de *Cystoseira*, *C. balearica*<sup>224</sup> têm produzido somente diterpenos simples (i.e. não misto), enquanto *C. brachycarpa*<sup>225-227</sup> contém diterpenos simples e produtos de sua degradação, possivelmente oriundas da perda de um fragmento C-6 por eliminação oxidativa do geranilgeraniol. *C. elegans*,<sup>94, 109, 228-231</sup> até o momento, é a única espécie deste gênero capaz de sintetizar simultaneamente diterpenos simples e meroditerpenos. As demais espécies, produzem exclusivamente diterpenos mistos.<sup>117-118, 219-223, 232-238</sup> Entre estas algas, *C. zosteroides* e *C. spinosa* var. *squarrosa* caracterizam-se pela produção de diterpenos epoxidados e com anel furano.<sup>95, 213</sup>

Diterpenos do grupo I estão amplamente distribuídos em 17 das 21 espécies estudadas e são considerados os mais representativos do gênero *Cystoseira*. Diterpenos do grupo II têm sido encontrados em 9 espécies (sendo 1 variedade e 1 híbrido). O esqueleto monocíclico (amentano (B)) é encontrado em 10 diferentes diterpenos e em 7 táxons (sendo 1 variedade e 1 híbrido), enquanto os esqueletos C e D (balearano regular e cystalgerano) são de distribuição mais restrita (com 2 e 3 (sendo 1 híbrido) táxons cada) e menos diversificada, com somente 6 (2 irregulares) e 4 substâncias diferentes, respectivamente. Diterpenos do grupo III são encontrados exclusivamente nas espécies morfologicamente semelhantes, *C. mediterranea*, *C. stricta* e *C. tamariscifolia*. Vinte e quatro meroditerpenos pertencem a este grupo pequeno, mas característico.

As Tabelas 39 e 40 (pág. 201) apresentam os índices taxonômicos para todas espécies de *Cystoseira* e os números de diterpenos de cada tipo de esqueleto isolado, considerando-se apenas a parte diterpenoídica, respectivamente. Deste modo, não levamos em consideração na contagem dos pontos para cálculo dos índices taxonômicos, aquelas substâncias com modificações na parte proveniente da via do malonato (acetato).

**Tabela 39:** Índices taxonômicos para as espécies de *Cystoseira*

ESPECIES	AE <sub>e</sub>	AE <sub>o</sub>
1. <i>C. algeriensis</i>	0.20	-1.30
2. <i>C. algeriensis</i> x <i>C. elegans</i>	0.15	-1.30
3. <i>C. balearica</i>	0.00	-1.40
4. <i>C. barbata</i>	0.00	-1.57
5. <i>C. barbatula</i>	0.00	-1.47
6. <i>C. brachycarpa</i>	0.00	-1.31
7. <i>C. crinita</i>	0.00	-1.50
8. <i>C. dubia</i>	0.00	-1.40
9. <i>C. elegans</i>	0.03	-1.38
10. <i>C. ercegovicii</i>	0.00	-1.50
11. <i>C. hyblae</i>	0.00	-1.50
12. <i>C. jabukae</i>	0.05	-1.45
13. <i>C. mediterranea</i>	0.34	-1.18
14. <i>C. platyramosa</i>	0.20	-1.30
15. <i>C. sauvageauana</i>	0.00	-1.40
16. <i>Cystoseira</i> sp	0.00	-1.40
17. <i>C. spinosa</i> var. <i>squarrosa</i>	0.04	-1.30
18. <i>C. stricta</i>	0.36	-1.17
19. <i>C. stricta</i> var. <i>amentacea</i>	0.15	-1.20
20. <i>C. tamariscifolia</i>	0.29	-1.20
21. <i>C. zosteroides</i>	0.06	-1.28

Tabela 40: Distribuição dos diterpenos do gênero *Cystoseira*  
(considerando apenas a parte diterpenoídica das substâncias)

ESPECIES	GRUPO I			GRUPO II			GRUPO III			TOTAL
	M	D	D	A	B	C	B	C	M	
	N	S	S	M	A	Y	A	Y	E	
	D	N	D	T	L	T	L	S	D	
1. <i>C. algeriensis</i>						2				2
2. <i>C. algeriensis</i> x <i>C. elegans</i>				2		2				4
3. <i>C. balearica</i>		5								5
4. <i>C. barbata</i>	2									2
5. <i>C. barbatula</i>	4									4
6. <i>C. brachycarpa</i>		6	2							8
7. <i>C. crinita</i>	1									1
8. <i>C. dubia</i>	2									2
9. <i>C. elegans</i>	6	4		2						12
10. <i>C. ercegovicii</i>	1									1
11. <i>C. hyblae</i>	1									1
12. <i>C. jabukae</i>	1			1						2
13. <i>C. mediterranea</i>				4	4			3	2	13
14. <i>C. platyramosa</i>						1				1
15. <i>C. sauvageauana</i>	2									2
16. <i>Cystoseira sp</i>	3									3
17. <i>C. spinosa</i> var. <i>squarrosa</i>	7									7
18. <i>C. stricta</i>				4	4		2	3	2	15
19. <i>C. stricta</i> var. <i>amentacea</i>	1			3						4
20. <i>C. tamariscifolia</i>	3			2	2		2	3	2	14
21. <i>C. zosteroides</i>	5									5

grupo I (acíclicos): MND e DSN= meroditerpenos e diterpenos simples não degradados, DSD= diterpenos simples degradados  
grupo II (meroditerpenos regulares): AMT= amentano; BAL= balearano  
CYT= cystalgerano; grupo III (meroditerpenos irregulares):  
BAL= balearano; CYS= cystoseirano; MED= mediterraneo

A Tabela 41 reúne as espécies de *Cystoseira* em Conjunto de espécies segundo seus constituintes químicos.

Tabela 41: Reunião das espécies de *Cystoseira* segundo a similaridade dos esqueletos diterpênicos mistos ou não

GRUPOS QUÍMICOS* (diterpenos)	CONJUNTO DE ESPÉCIES	ESPÉCIES
GRUPO I	A	<i>C. balearica</i> <i>C. barbata</i> <i>C. barbatula</i> <i>C. brachycarpa</i> <i>C. crinita</i> <i>C. dubia</i> <i>C. ercegovicii</i> <i>C. hyblae</i> <i>C. sauvageuana</i> <i>Cystoseira sp.</i>
	A'	<i>C. spinosa v. squarrosa</i> <i>C. zosteroides</i>
GRUPO II	B	<i>C. elegans</i> <i>C. jabukae</i> <i>C. stricta v. amentacea</i> <i>C. algeriensis</i> <i>C. algeriensis x C. eleg</i>
GRUPOS I, II, e III	C	<i>C. mediterranea</i> <i>C. stricta</i> <i>C. tamariscifolia</i>

(\* : Quanto a cadeia terpenoídica:

- Grupo I → acíclicos e derivados
- Grupo II → amentano (ciclopentano)  
balearano regular (bicicloeptano [3,2,0])  
cystalgerano (biciclononano [4,3,0])
- Grupo III → balearano irregular (bicicloeptano [3,2,0])  
mediterrano (biciclononano [4,2,1])  
cystoseirano (biciclooctano [3,2,0])

A Figura 80 exhibe, gráficamente, as médias de avanço evolutivo de esqueleto ( $AE_e$ ) versus o índice médio de oxidação ( $AE_o$ ) de todas as espécies de *Cystoseira* estudadas.

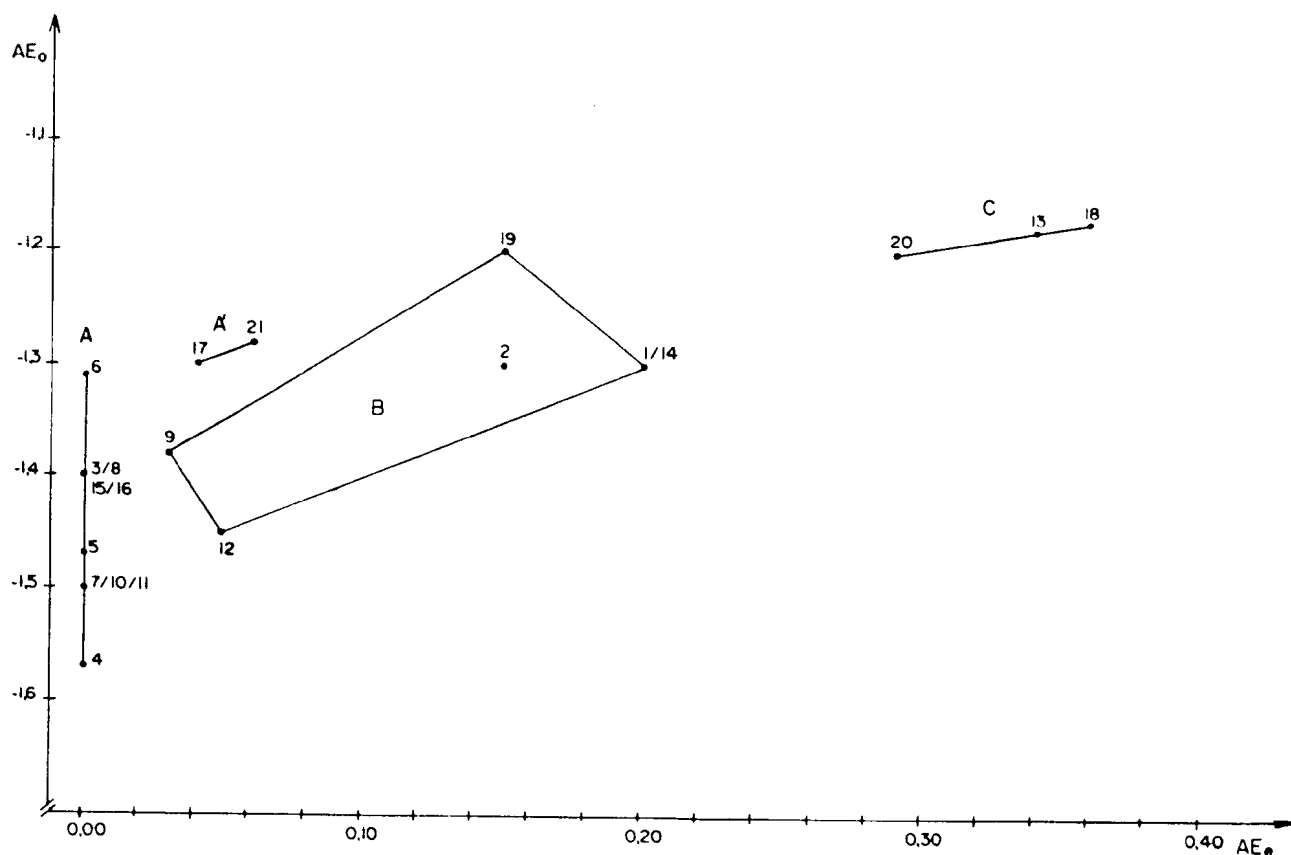


Figura 80:  $AE_e \times AE_o$  das espécies de *Cystoseira*

### Espécies

- |  |   |
|--|---|
| 1. <i>C. algeriensis</i>                     | 11. <i>C. hyblae</i>                      |
| 2. <i>C. algeriensis</i> x <i>C. elegans</i> | 12. <i>C. jabukae</i>                     |
| 3. <i>C. balearica</i>                       | 13. <i>C. mediterranea</i>                |
| 4. <i>C. barbata</i>                         | 14. <i>C. platyramosa</i>                 |
| 5. <i>C. barbatula</i>                       | 15. <i>C. sauvageauana</i>                |
| 6. <i>C. brachycarpa</i>                     | 16. <i>Cystoseira</i> sp                  |
| 7. <i>C. crinita</i>                         | 17. <i>C. spinosa</i> v. <i>squarrosa</i> |
| 8. <i>C. dubia</i>                           | 18. <i>C. stricta</i>                     |
| 9. <i>C. elegans</i>                         | 19. <i>C. stricta</i> v. <i>amentacea</i> |
| 10. <i>C. ercegovicii</i>                    | 20. <i>C. tamariscifolia</i>              |
|  | 21. <i>C. zosteroides</i>                 |

Através deste gráfico notamos que os mais altos valores de oxidação e complexidade estrutural foram encontrados para os componentes do conjunto de espécies C ( $AE_e = 0,33$  e  $AE_o = -1,18$ ), seguidos do conjunto de espécies B ( $AE_e = 0,13$  e  $AE_o = -1,32$ ) e finalmente pelo conjunto de espécies A e A' ( $AE_e = 0,01$  e  $AE_o = -1,42$ ).

A Tabela 42 (pág. 204) apresenta o índice de similaridade de Soerensen para todas as espécies envolvidas nos grupos químicos supra mencionados.

**Tabela 42: Índice de Similaridade para as espécies de *Cystoseira***

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1. <i>C. algeriensis</i>	100																				
2. <i>C. algeriensis</i> x <i>C. elegans</i>	67	100																			
3. <i>C. balearica</i>	-	-	100																		
4. <i>C. barbata</i>	-	-	-	100																	
5. <i>C. barbatula</i>	-	-	-	57	100																
6. <i>C. brachycarpa</i>	-	-	77	-	-	100															
7. <i>C. crinita</i>	-	-	-	67	40	-	100														
8. <i>C. dubia</i>	-	-	-	100	67	-	67	100													
9. <i>C. elegans</i>	-	25	47	29	50	40	15	29	100												
10. <i>C. ercegovicii</i>	-	-	-	67	40	-	100	67	15	100											
11. <i>C. hyblae</i>	-	-	-	67	40	-	100	67	15	100	100										
12. <i>C. jabukae</i>	-	33	-	50	33	-	67	50	14	67	67	100									
13. <i>C. mediterranea</i>	-	24	-	-	-	-	-	-	16	-	-	13	100								
14. <i>C. platyramosa</i>	-	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100							
15. <i>C. sauvageauana</i>	-	-	-	100	67	-	67	100	29	67	67	50	-	-	100						
16. <i>Cystoseira</i> sp	-	-	-	80	86	-	50	80	40	50	50	40	-	-	80	100					
17. <i>C. spinosa</i> var. <i>squarrosa</i>	-	-	-	44	73	-	25	44	63	25	25	22	-	-	44	50	100				
18. <i>C. stricta</i>	-	21	-	-	-	-	-	-	15	-	-	12	93	-	-	-	-	100			
19. <i>C. stricta</i> var. <i>amentacea</i>	-	50	-	33	25	-	40	33	13	40	40	67	35	-	33	29	18	32	100		
20. <i>C. tamariscifolia</i>	-	22	-	25	33	-	13	25	15	13	13	25	67	-	25	35	29	76	33	100	
21. <i>C. zosteroides</i>	-	-	-	57	89	-	33	57	59	33	33	29	-	-	57	75	83	-	22	32	100

A Alta similaridade foi observada entre as espécies produtoras de diterpenos irregulares (grupo III): *C. mediterranea* e *C. stricta* (S= 93%), *C. mediterranea* e *C. tamariscifolia* (S= 67%) e *C. stricta* e *C. tamariscifolia* (S= 76%). Nenhuma destas espécies se correlacionou significativamente com qualquer outra espécie fora deste grupo.

O híbrido *C. algeriensis* x *C. elegans* é significativamente similar à espécie-mãe *C. algeriensis* (S= 67%) e à *C. stricta* var. *amentacea* (S= 50%), principalmente pela produção de esqueletos amentano (B). Por outro lado, a ausência de esqueletos "acíclicos" (A) acarretou uma similaridade muito baixa com a outra espécie-mãe *C. elegans* (S= 25%), e com as demais, uma vez que no cálculo deste índice são observados apenas os tipos de esqueletos em comum.

*C. balearica* mostrou similaridade apenas com as espécies *C. brachycarpa* (S= 77%) e *C. elegans* (S= 47%), por produzir diterpenos simples degradados.

Muitas espécies pertencentes ao conjunto de espécies A revelaram índices de similaridade superiores a 50%, devido principalmente à presença de diterpenos acíclicos comuns.

As espécies *C. zosteroides* e *C. spinosa* var. *squarrosa*, obtiveram valores de similaridade superiores a 75%, pela predominância de diterpenos com anel furano e/ou diterpenos com grupamentos aldeído.

O gênero *Cystoseira* constitui-se de 21 espécies (1 híbrido e 2 variedades), produtoras principalmente de diterpenos de origem biossintética mista. Quando os índices taxonômicos destas espécies foram plotadas no gráfico ( $AE_e \times AE_o$ ) (Figura 80, pág. 203), verificamos 3 conjuntos de espécies (A-C) (o conjunto de espécies A' pertence às espécies produtoras de acíclicos com anel furano), de acordo com seus constituintes químicos característicos. Neste gráfico podemos notar um grande afastamento entre *C. stricta* e sua variedade *C. stricta var. amentaceae* indicando que elas não pertencem ao mesmo conjunto de espécies. Este resultado sugere uma revisão morfológica cuidadosa pelos ficologistas, uma vez que *C. stricta* apresentou-se muito diferente taxonomicamente de *C. stricta var. amentaceae*.

Por outro lado, a posição no gráfico do híbrido *C. algeriensis* X *C. elegans* retratou claramente a produção exclusiva de diterpenos do tipo cystalgerano.

O posicionamento gráfico de *C. stricta* e *C. tamariscifolia* depende da proposta biogenética. Na verdade, ao admitirmos que os esqueletos B e E são originados do precursor geranil-lavandulol (Figura 78, pág. 197), a posição destas algas desloca-se um pouco para a esquerda. Mas ao admitirmos o rearranjo do C-4 - C-5 para C-4 - C-2, a partir do precursor geranil-geraniol, a posição é exatamente como verificamos na Figura 80 (pág. 203). De qualquer forma, *C. stricta* e *C. tamariscifolia*, ao lado de *C. mediterranea*, apresentam os mais

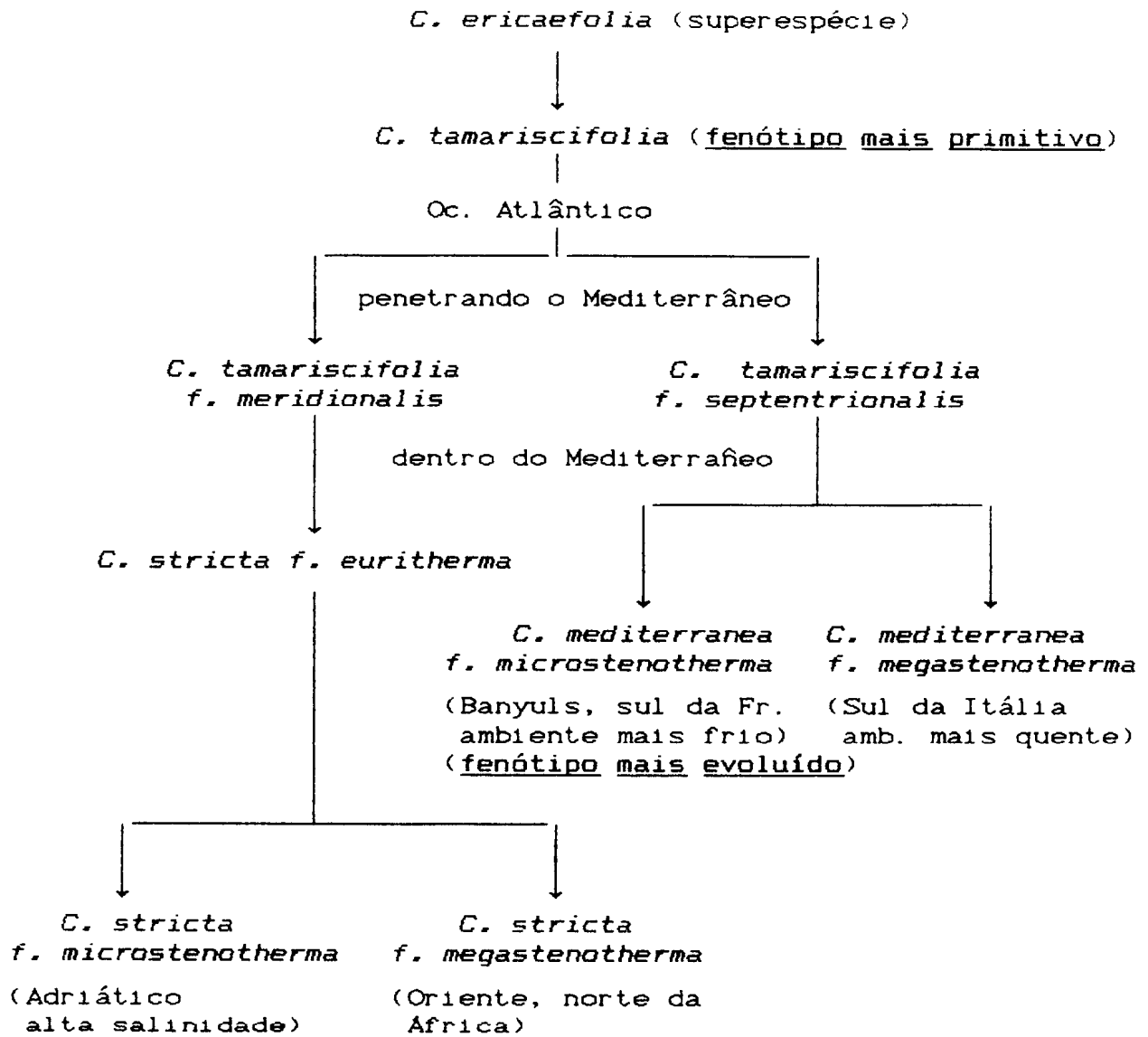


altos índices taxonômicos.

Dentre as correlações observadas em nosso estudo, destaca-se o agrupamento químico das espécies *C. mediterranea*, *C. stricta* e *C. tamariscifolia*, por corroborar fortemente os dados da literatura botânica. De acordo com Giaccone & Bruni (1971),<sup>239</sup> estas espécies fazem parte de três linhas genéticas fundamentais, as quais integram a super-espécie *C. ericaefolia* (Figura 81, pág. 208). A partir de dados sobre sua distribuição geográfica, os autores observaram que a flora algal do Mar Mediterrâneo é quase toda originária do Oceano Atlântico. Dentre estas espécies, *C. tamariscifolia* foi a única encontrada, até o momento, em águas Atlânticas.

Cabe ressaltar que hoje o Mar Mediterrâneo é totalmente dependente do Atlântico como provedor de espécies, apesar de conservar plantas e animais mais antigos, procedentes do Pacífico, através do Mar de Tethys. Mas neste caso, seria *C. tamariscifolia* o táxon "precursor" de *C. mediterranea* e *C. stricta* ? Esta espécie apresentaria o fenótipo mais primitivo dentre as três espécies relacionadas ?

Estes autores parecem ter subsídios para responder a estas perguntas, ao relatarem que *C. tamariscifolia* ao invadir o Mediterrâneo deve ter se diversificado em diferentes formas, devido pelo menos em parte, às variações de temperatura e salinidade, originando, então, outras espécies.



**Figura 81:** Provável filogenia dos membros da superespécies *C. ericaefolia* (Giaccone & Brunl, 1971)<sup>239</sup>

Portanto, *C. tamariscifolia* deve ser a mais antiga das três e *C. mediterranea f. microstenotherma*, proveniente de águas mais frias (próximas a Banyls-sur-Mer, França) deveria ser a espécie mais recente, principalmente pelo isolamento geográfico desta área. Além disso, existe a suspeita de que *C. stricta* e *C. mediterranea* sejam variedades da mesma espécie. Esta hipótese dificilmente pode ser sustentada pelos índices taxonômicos e concorda com a afirmação de Roberts (1978)<sup>235</sup> de que "apenas diferenças no hábito não constituem critério válido de classificação morfológica".

Finalmente, nossos resultados estão de acordo com estas observações e com a Teoria de Evolução Micromolecular,<sup>6</sup> que estabelece que um táxon mais avançado apresenta índices taxonômicos mais altos.

Deve-se ressaltar que variações importantes foram detectadas nas concentrações de alguns destes metabólitos secundários, onde alguns terpenos estiveram presentes somente em plantas jovens. Isto, é claro, não invalida o uso dos meroditerpenos como marcadores taxonômicos e/ou filogenéticos, mas provam que há variações na regulação das atividades das enzimas envolvidas na produção de terpenos. Isto deve ser considerado nas interpretações taxonômicas dos dados fitoquímicos.

Como mencionado na Introdução, a presença de meroditerpenos foi relatada em outros gêneros de *Cystoseiraceae*. A substância do tipo "amentano" (e.g. bifurcarenona), encontrada

em *C. mediterranea*, *C. stricta* e *C. tamariscifolia*, foi também isolada de *Bifurcaria galapagensis* (Cystoseiraceae, Fucales - Ilhas Galápagos, Oc. Pacífico). Similarmente, *Halidrys siliquosa* (Cystoseiraceae, Fucales - Escócia, Oc. Atlântico) também produz meroditerpenos. Este fato evidencia uma relação próxima entre todos estes gêneros e pode ser útil nos estudos taxonômicos da família Cystoseiraceae.

#### 4.2.2.1. CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS PARA A ORDEM FUCALES

Dentre os representantes da ordem Fucales, apenas duas famílias foram estudadas quimicamente, Cystoseiraceae e Sargassaceae.

Dentre os treze gêneros conhecidos da família Cystoseiraceae, apenas quatro foram quimicamente analisados: *Bifurcaria* (Oc. Atlântico e Pacífico), *Cystophora* (Oc. Pacífico), *Cystoseira* (Mar Mediterrâneo) e *Halidrys* (Oc. Atlântico).

A Tabela 43 (pág. 211) apresenta os diferentes gêneros pertencentes a família Cystoseiraceae, local de coleta e os respectivos números de diterpenos isolados de origem biossintética mista (meroditerpenos) ou não e degradados.

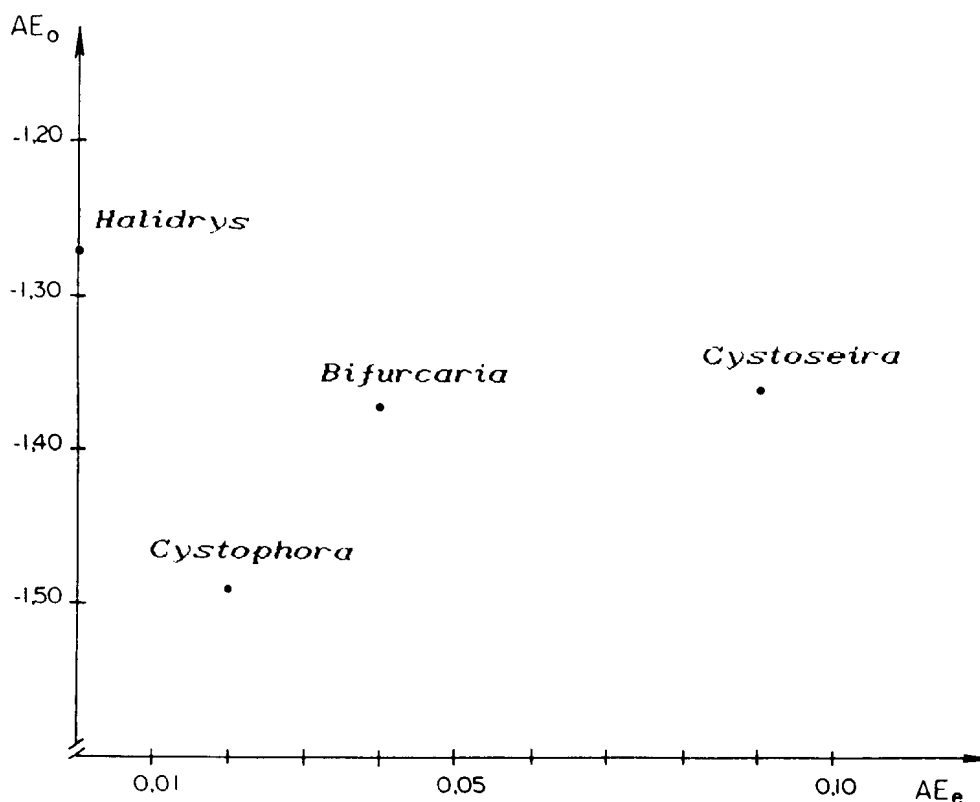
**Tabela 43:** Ocorrência e distribuição de diterpenos nos gêneros da família Cystoseiraceae

GÊNEROS	ESPÉCIES (N <sup>o</sup> de)	LOCAL (COLETA)	N <sup>o</sup> DE TERPENOS		
			SIMPLES	MISTOS	TOTAL
<i>Bifurcaria</i>	2	Atlântico Pacífico	6	1	7
<i>Cystophora</i>	5	Pacífico	12*	7**	19
<i>Cystoseira</i>	21	Mediterrâneo	15	79	94
<i>Halidrys</i>	1	Atlântico	-	6	6

(\* : todos os diterpenos simples são degradados);  
(\*\*: apenas uma substância é degradada).

A Figura 82, exibe, graficamente, as médias de avanço evolutivo de esqueleto ( $AE_e$ ) versus o índice de oxidação ( $AE_o$ ) de todos os esqueletos diterpenoidicos encontrados para cada gênero da família Cystoseiraceae.

Os resultados obtidos em nosso estudo revelaram que *Cystoseira* apresenta os maiores valores dos índices de avanço evolutivo ( $AE_e = 0.09$ ,  $AE_o = -1.36$ ), seguida por *Bifurcaria* ( $AE_e = 0.04$ ,  $AE_o = -1.37$ ), *Cystophora* ( $AE_e = 0.02$ ,  $AE_o = -1.49$ ) e finalmente, pelo gênero *Halidrys*, com metabólitos mais oxidados porém com o menor índice de esqueleto ( $AE_e = \text{zero}$ ,  $AE_o = -1,27$ ) (Figura 82, pág. 212).



**Figura 82:**  $AE_e$  x  $AE_o$  para todos os gêneros quimicamente estudados da família Cystoseiraceae

Tais resultados demonstraram que os diterpenos parecem ser bons marcadores taxonômicos desta família, distinguindo efetivamente os gêneros, até o momento, estudados.

A análise quantitativa dos diterpenos destes gêneros retrata a capacidade de síntese de substâncias mais complexas pelas espécies de *Cystoseira*, como os meroditerpenos irregulares, e pela capacidade das espécies de *Halidrys* produzir apenas

meroditerpenos acíclicos.

Os mais baixos valores taxonômicos encontrados em *Cystophora*, em relação à *Cystoseira*, podem ser interpretados pela predominante presença de diterpenos degradados (conhecidos como farnesilacetona ou norditerpenos, isolados das espécies *C. moniliformis* e *Cystophora sp.*). A origem de várias destas substâncias degradadas pode suscitar dúvidas aos químicos de produtos naturais. Seriam estas substâncias decorrentes da degradação de diterpenos ou carotenóides ? Porém, devemos ressaltar que nunca foi observado nenhum carotenóide de feofíceas, ou mesmo de qualquer outro grupo de algas relacionado filogeneticamente com as feofíceas, que possua oxigenação no C-2.<sup>240</sup> Por este motivo, consideramos estes produtos como resultantes de degradação de diterpenos.

Por outro lado, poucas informações químicas existem sobre os membros da família Sargassaceae. Esta está representada pela análise química apenas por *Sargassum*, o qual se caracteriza pela produção de diterpenos degradados e meroditerpenos acíclicos. Os índices taxonômicos observados foram de  $AE_o = 0.01$  e  $AE_e = -1.37$  e compreende 4 espécies e 19 diterpenos.

Com os resultados obtidos pelo nosso estudo com os diterpenos de algas pardas, algumas perguntas podem ser feitas.

Será a via metabólica formadora dos meroditerpenos irregulares (predominantes no Mar Mediterrâneo) a mais recente?

As espécies com esqueletos derivados desta rota seriam as mais evoluídas? Por outro lado, as espécies produtoras de diterpenos acíclicos seriam as espécies mais antiga e /ou primitivas?

Será que estes metabólitos rearranjados fazem parte de uma estratégia evolutiva para minimizar os efeitos da herbivoria, nestas áreas?

Para tantas perguntas, poucas respostas podem ser dadas com base nos conhecimentos atuais. Entretanto, a partir de nossos resultados podemos indicar os terpenos de origem biossintética mista como os marcadores quimiossistemáticos e filogenéticos mais "evoluídos" dentre os estudados até o momento em algas pardas. Além disso, é importante ressaltarmos que outras questões fundamentais referentes aos sistemas marinhos podem ser elucidadas através de uma maior interação entre químicos e biólogos.



**CAPITULO 5**

**EXPERIMENTAL**

## 5.1. ESPÉCIES COLETADAS E ÁREAS ESTUDADAS

Foram estudadas oito espécies pertencentes às ordens Dictyotales e Fucales, coletadas em de três regiões diferentes. Dentre as **Dictyotales**, estudamos: *Dictyota cervicornis* Kützing, *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux, *Dictyota mertensii* (Martius) Kützing, *Dictyopteris delicatula* Lamouroux, *Dictyopteris plagiogramma* (Montagne) Vickers e, dentre as **Fucales**: *Sargassum filipendula* Agardh e *Sargassum furcatum* Kützing.

*S. furcatum* foi coletada na região do mesolitoral, enquanto *D. cervicornis*, *D. dichotoma*, *D. mertensii* e *D. delicatula* na região do infralitoral ,durante janeiro/1990, na Ponta do Pai Vitório, Praia Rasa, Búzios, RJ.

A Praia Rasa caracteriza-se pela presença de fundo

arenoso e modo calmo, porém ocasionais ventos fortes provocam turbidez na água. Esta área é a mais rica em flora algal desta região. Dentre as algas citadas acima, *S. furcatum* forma uma faixa contínua em toda extensão do costão, constituindo-se numa característica do local. Nesta faixa, assim como em toda área compreendida entre Armação de Búzios e Cabo Frio, *S. furcatum* é a espécie mais abundante e frequente, abrigando uma rica e variada fauna associada.<sup>51</sup>

*D. plagiogramma* e *S. filipendula* foram coletadas na região do infralitoral, durante janeiro/1990, em Conceição de Jacareí, Angra dos Reis, RJ (Figura 16, pág. 83). A região caracteriza-se pelo modo calmo e riqueza de espécies de feofíceas (principalmente de *Sargassum*).

*D. cervicornis* foi também coletada na Baía da Ribeira, Mambucaba, na região do infralitoral em abril de 1990. A espécie é característica da região.

As algas foram lavadas com água do mar local e separadas de sedimento, epífitas e outros organismos associados.

Todos exemplares estudados foram identificados pelos Profs. Dra. Valéria L. Teixeira e Renato C. Pereira (MSc), fixados em formol a 4% em H<sub>2</sub>O destilada, herborizados e depositados no Herbário Ficológico da UFF, Niterói.

## 5.2. QUANTIFICAÇÃO DOS FLOROTANINOS

A extração dos florotaninos das algas úmidas previamente pesadas foi feita em acetona aquosa a 70% durante 24 h, no escuro e à temperatura ambiente. Em seguida, a acetona foi evaporada sob vácuo para obtenção das fases aquosas. As fases aquosas, de coloração escura, foram submetidas a diluições com água destilada (variando conforme a fase aquosa).

A cada alíquota de 0,5 ml da fase aquosa já diluída foram adicionados 0,5 ml do reagente Folin-Denis e 5 ml de solução de carbonato de cálcio a 20%. A solução resultante foi mantida em repouso durante 20 minutos, antes da medida de absorbância em espectrofotômetro Specol, a 725 nm, para determinação dos fenóis totais, <sup>51,53, 179,241-242</sup> (polipeptídeos, detergentes, uréia e éter dietílico também dão respostas positivas ao reagente de Folin-Denis).

A fim de quantificar apenas os florotaninos destas algas, outras alíquotas de 3 ml da fase aquosa de cada espécie foram tratadas com 90 mg de pó de pele cromada (reage com substâncias tanantes). Esta mistura foi mantida em placa sob agitação magnética e filtrada. Deste filtrado, foi retirado 0,5 ml e repetido o processo acima descrito (reagente de Folin-Denis e leitura espectrofotométrica a 725 nm). <sup>51,179,241</sup>

A diferença entre os fenóis totais e aqueles que não

reagiram com o pó de pele cromada indica a quantidade de taninos encontrados nas diferentes algas.<sup>51,241-242</sup>

Uma curva padrão foi obtida utilizando-se floroglucinol anidro, uma vez que este apresenta reatividade e valores de absorvância similares àqueles polímeros encontrados nas algas pardas. Assim, as densidades óticas podem ser expressas em quantidades de florotaninos equivalentes a floroglucinol.<sup>51,241-242</sup>

### **5.3. QUANTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS DITERPENOS E ESTERÓIS**

#### **5.3.1. Aparelhos**

Os espectros de absorção na região do ultravioleta (UV) foram registrados em aparelho Varian, DMS-80, utilizando-se solventes de grau espectroscópico.

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em aparelho Perkin-Elmer, modelo 1420. A técnica utilizada para as amostras foi a do filme líquido entre janelas de cloreto de sódio anidro. Os espectros estão expressos em número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) e foram calibrados com filme de de poliestireno ( $1601 \text{ cm}^{-1}$ ).

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN  $^1\text{H}$ : 200 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 50,29 MHz) foram determinados em espectrômetro Brüker AC-200, em solução de clorofórmio deuterado (referência interna: tetrametilsilano). Os deslocamentos químicos são expressos em ppm na escala  $\delta$  e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As letras s, d, t, m, l designam a multiplicidade dos sinais: singlete, dublete, tripleto, multipeto e sinal largo. Várias técnicas, como DEPT e bidimensional  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  - Homocopy, foram utilizadas, quando necessárias.

Os dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  dos diterpenos isolados também foram comparados com os existentes num banco de dados de 122 diterpenos marinhos codificados (ciclos, ligações duplas, grupos metila e funções oxigenadas) do gênero *Dictyota*. A busca das informações se faz utilizando-se os recursos existentes no programa "TOTALWORKS" de um micro-computador TK 3000//e da Microdigital.<sup>183</sup>

Os espectros de massa (EM) de baixa resolução (70 ev) foram determinados em aparelho Micromass MM 12F e através do acoplamento da cromatografia gasosa - espectrometria de massas (CG-EM) em aparelho Hewlett Packard 5987 A. Os fragmentos foram descritos pela razão massa/carga (m/z), e suas intensidades expressas em percentuais do pico base (100%).

A coluna cromatográfica utilizada foi uma coluna capilar de sílica fundida, de diâmetro interno de 0,2 mm, comprimento de 50 m, 0,33  $\mu\text{m}$  de espessura de fase estacionária SE-54 (1%

vinil - 5% fenil - metil - silicone). As amostras foram injetadas e co-injetadas usando-se de 0,5 a 1  $\mu$ l da solução de esteróis (dependendo da quantidade do produto), previamente diluída em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . As condições de análise foram as seguintes:

- Modo de Injeção: sem divisão de fluxo ("Splitless").

Antes da amostra ser introduzida no injetor, a válvula de divisão é fechada; assim praticamente toda a amostra vaporizada na câmara do injetor é transferida através do fluxo de gás carreador para dentro da coluna capilar. A injeção sem divisão permite uma maior sensibilidade do que a injeção com divisão de fluxo, o que é muito importante quando a quantidade de amostra disponível é muito pouca. A válvula de divisão deve ser reaberta após um período adequado à transferência de amostra para dentro da coluna, a fim de purgar do sistema pequenas quantidades de solvente.<sup>214</sup>

- Programação de temperatura da coluna: 100 a 280/10<sup>0</sup>C por minuto, mais 60 min à temperatura final.
- Temperatura do injetor: 270<sup>0</sup> C
- Temperatura do detetor: 280<sup>0</sup> C
- Gás de arraste: Hidrogênio
- Energia de ionização: 70 eV (Técnica de Impacto de Elétrons)

As análises por cromatografia em fase gasosa foram efetuadas em um cromatógrafo Hewlett Packard 5890 B.

Para a separação por cromatografia de adsorção em coluna (c.c.) usou-se gel de Kieselgel 60 (E. Merck-Darmstadt) de 0.06 a

0.20 mm de diâmetro de partícula. Na cromatografia em camada fina qualitativa (c.c.f.) foram utilizadas placas Merck revestidas de sílica do tipo Kieselgel 60 HF254, com indicador de fluorescência.

As placas analíticas foram reveladas com luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm e mediante borrifamento com solução de sulfato cérico a 2% em ácido sulfúrico, seguido de aquecimento, por alguns minutos.

A concentração dos extratos e das frações eluídas de colunas cromatográficas foi feita em evaporador rotatório em banho de água, a ~ 60°C, sob pressão reduzida (~ 30 mm Hg). Os solventes higroscópicos foram secos e destilados antes de serem utilizados.

As purificações finais das frações esteroidais foram feitas através de cristalizações utilizando-se mistura dos solventes Et<sub>2</sub>O-MeOH na proporção de 1:1.

De uma maneira geral, para as finalidades do presente trabalho, não são necessárias amostras analiticamente puras. Deste modo, propriedades como ponto de fusão e dispersão ótica rotatória, que exigem alto grau de pureza, não foram incluídas.

### 5.3.2. Extração

Antes de iniciar o processo de extração, todas as algas frescas passaram por um procedimento padronizado de retirada do excesso de água, através de 10 rotações numa centrífuga manual



doméstica (secador de verduras), para obtenção dos pesos úmidos.

Em seguida, 10 amostras da alga "úmida" foram pesadas e secas em estufa a 70<sup>o</sup> C por 24 h. As amostras foram novamente pesadas e, pela média dos pesos obtidos (antes e depois da secagem) foi determinado o fator peso seco/peso úmido de cada alga.

Todos os materiais úmidos de *D. cervicornis*<sup>M</sup> (M= Mambucaba, RJ) (125,0 g), *D. cervicornis*<sup>B</sup> (B= Búzios, RJ) (230,0 g), *D. dichotoma* (595,0 g), *D. mertensii* (90,0 g), *D. delicatula* (810,0 g), *D. plagiogramma* (1,260 g), *S. filipendula* (200,0 g), *S. furcatum* (650,0 g) foram extraídos em acetona, à temperatura ambiente.

Este procedimento proporciona maior rapidez na extração de substâncias lipofílicas, evitando o processo de secagem (capaz de originar artefatos) e o acúmulo de inúmeros extratos de polaridades distintas.

Os extratos acetônicos de cada espécie foram evaporados sob vácuo e forneceram uma fase aquosa residual (resíduos I). Estes resíduos foram particionados exaustivamente com dois solventes de polaridades diferentes: hexano e AcOEt.

As fases orgânicas obtidas (fase hexânica e fase AcOEt) foram analisadas por c.c.f.. Os esteróis monoidroxilados foram caracterizados por comparação de R<sub>f</sub> e cor resultante da revelação com sulfato cérico (cor azul passando a roxa), tomando o colesterol como padrão. Sabe-se que nas condições utilizadas não

há grande diferença de  $R_f$  e cor para a maioria dos esteróis monoidroxilados. Os diterpenos de *Dictyota spp* foram também caracterizados através da comparação com amostras autênticas ou, simplesmente, através do comportamento das manchas em c.c.f., uma vez que a existência deste grupo de substâncias é facilmente reconhecível quando empregado o sulfato cérico como revelador (cor violeta passando a arroxeadada).

As fases hexânica e em AcOEt de cada espécie, quando apresentaram manchas características das substâncias de interesse (ao serem analisados por c.c.f. e reveladas com sulfato cérico) foram reunidas, os solventes evaporados e os resíduos (resíduos II) pesados. Obtiveram-se os seguintes pesos de resíduo II em cada caso: *D. cervicornis*<sup>M</sup> (1,25 g), *D. cervicornis*<sup>B</sup> (1,45 g), *D. dichotoma* (6,65 g), *D. mertensii* (1,12 g), *D. delicatula* (4,4 g), *D. plagiogramma* (7,2 g), *Sargassum filipendula* (900,0 mg), *S. furcatum* (1,32 g).

A Tabela 44 (pág. 225) apresenta o peso úmido, a relação peso seco/peso úmido, o peso de esteróis e a percentual de esteróis em cada espécie estudada.

**Tabela 44:** Peso úmido, relação peso úmido/peso seco, peso do esterol e percentual de esteróis nas diferentes espécies analisadas

TAXA	PESO ÚMIDO (mg)	P. SECO/ P. ÚMIDO (%)	PESO DE ESTEROL (mg)	ESTEROL NA ALGA (%)
<b>Dictyotales</b>				
<i>Dictyota cervicornis</i> <sup>M</sup>	125,0	12	1,8	0,01
<i>Dictyota cervicornis</i> <sup>B</sup>	230,0	13	2,1	0,007
<i>Dictyota dichotoma</i> <sup>B</sup>	595,0	16	11,9	0,01
<i>Dictyota mertensii</i> <sup>B</sup>	90,0	14	2,8	0,02
<i>Dictyopteris delicatula</i> <sup>B</sup>	810,0	20	54,9	0,03
<i>Dictyopteris plagiogramma</i> <sup>A</sup>	1260,0	14	16,5	0,01
<b>Fucales</b>				
<i>Sargassum filipendula</i> <sup>A</sup>	200,0 g	19%	45,3	0,1
<i>Sargassum furcatum</i> <sup>B</sup>	650,0 g	17%	106,0	0,1

legenda: M- alga coletada em Mambucaba (RJ)

A- algas coletadas em Angra do Reis (RJ);

B- algas coletadas em Búzios (RJ)

### 5.3.3. Primeiro Fracionamento

Cada um dos resíduos (II) foi solubilizado em  $\text{CHCl}_3$  ou  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e adicionado a sílica (quantidade variada). Após a evaporação do solvente, os adsorventes contendo os materiais adsorvidos de forma homogênea e secos foram adicionados ao topo de colunas de gel de sílica e submetidos a rápida cromatografia, utilizando os mesmos solventes mencionados acima ( $\text{CHCl}_3$  ou  $\text{CHCl}_2$ ).

As frações coletadas (10, 25 ou 50 ml) foram concentradas, analisadas em placas cromatográficas e reveladas com solução de sulfato cérico. Aquelas que mostraram cromatogramas idênticos foram, então, reunidas e codificadas.

### 5.3.4. Isolamento dos terpenos e esteróis para cada espécie de alga

A Tabela 45 (pág. 227) resume os resultados das cromatografias.

Tabela 45: Primeira cromatografia do resíduo II e quantidades finais de amostra para os diterpenos e frações esteroidais

Táxon (código)	Resíduo II (Peso g)	Eluentes	Frações (mg)	Pesos	Eluentes	Pesos finais (mg)
D.cer. <sup>M</sup>	1,25	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	32-52	23,3	Dc/Ac 5%	1,8
D.cer. <sup>B</sup>	1,45	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5-6 13-21 22-30	13,0	Hex/Ac 5%	11,0* 58,7* 2,1
D.dic.	6,65	CHCl <sub>3</sub>	6-8 10-22	930,0	Hex/Ac 5%	475,0** 12,0
D.mer.	0,396	CHCl <sub>3</sub>	10-14 18-28 18-28		CHCl <sub>3</sub>	6,0** 106,0** 2,8
D.del.	4,37	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	25-38		Hex/Ac 5%	54,9
D.pla.	7,2	CHCl <sub>3</sub>	17-35		Hex/Ac 5%	16,5
S.fil.	0,900	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	21-38			45,3
S.fur.	1,32	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7-31			106,0

M = Mambucaba (RJ)  
 B = Búzios (RJ)  
 D.cer. = *D. cervicornis*  
 D.dic. = *D. dichotoma*  
 D.mer. = *D. mertensii*  
 D.del. = *D. delicatula*  
 D.pla. = *D. plagiogramma*  
 S.fil. = *S. filipendula*  
 S.fur. = *S. furcatum*  
 \* - dolastanos  
 \*\* - guaianos  
 e/símbolo - f. esteroidal  
 Dc= diclorometano  
 Ac= acetona  
 Hex= hexano

*Dictyota cervicornis*<sup>M</sup>

Para a primeira cromatografia em gel de sílica foi empregado  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como solvente e obtidas 72 frações de 25 ml (resíduo II= 1,25 g). Destas, apenas as frações 32 a 52 foram reunidas (fração esteroidal - 23,3 mg) e submetidas a novos fracionamentos cromatográficos em sílica, com misturas de solventes de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /acetona em proporções crescentes de acetona, para fornecer 1,8 mg de produtos esteroidais (f.e.<sub>1</sub> - 0.01%). As demais frações não foram estudadas.

*Dictyota cervicornis*<sup>B</sup>

O solvente utilizado foi o mesmo que na espécie mencionada acima ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Para 1,45 g de resíduo II, foram obtidas 65 frações de 25 ml cada uma. As frações 5 a 6 (Dc-2, 11.0 mg - 0.03%) e 13 a 21 (Dc-1, 58.7 mg - 0.2%) constituíam-se de substâncias oleosas diterpenoidicas (dolastanos). As frações mais polares de 22 a 30 (fração esteroidal= 13,0 mg), foram reunidas e recromatografadas em gel de sílica (hexano/acetona - 95:5), fornecendo 2,1 mg (f.e.<sub>2</sub>= 0,007%) do produto puro. As demais frações não foram estudadas.

*Dictyota dichotoma*

Os 6,65 g de resíduo II foram eluídos em  $\text{CHCl}_3$  fornecendo 54 frações de 25 ml cada. Destas, as frações 6 a 8 reunidas (Dd-1= 475,0 mg - ~ 0,5%) apresentaram em c.c.f. uma

mancha violeta preponderante, bastante apolar, com valor de  $R_f$  igual a 0,88, após revelação em sulfato cérico. Esta mancha foi comparada com uma amostra autêntica de pachydictyol A, um diterpeno do tipo guaiano prenilado, havendo coincidência de  $R_f$ . Por outro lado, as frações esteroidais 10 a 22 reunidas (930,0 mg) foram submetidas a novos fracionamentos por c.c. em sílica, através da mistura de solventes hexano/acetona em proporções crescentes de acetona, fornecendo 11,9 mg de produtos esteroidais (f.e.<sub>3</sub> = 0,01%). A purificação destes produtos completou-se por cristalizações em Et<sub>2</sub>O/MeOH (1:1). As demais frações não foram estudadas.

#### *Dictyota mertensii*

Os 395,5 mg do resíduo II quando cromatografados em CHCl<sub>3</sub> forneceram 55 frações de 10 ml cada. Após a reunião das frações semelhantes, verificamos quatro manchas preponderantes no cromatograma (apenas duas foram estudadas). Destas, as frações de 10 a 14 (Dm-1 = 7,0 mg - 0,05%) mostraram-se idênticas às frações de 6 a 8 reunidas de *Dictyota dichotoma*, indicando também a presença de pachydictyol A. As frações de 18 a 28 reunidas (106,0 mg) foram recromatografadas em coluna de gel de sílica, utilizando hexano/acetona (95:5) como eluente, fornecendo um diterpeno do tipo guaiano prenilado (Dm-2 = 10,0 mg - 0,06%) característico desta espécie e uma mancha azul um pouco mais polar que Dm-2 (pouca quantidade em c.c.f.), característica da fração

esteroidal (f.e.<sub>4</sub> = 2,8 mg - 0,02%). As demais frações não foram estudadas.

#### *Dictyopteris delicatula*

Para 4,37 g de resíduo II, usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluente, 54 frações de 25 ml foram obtidas. Destas, apenas as frações 25 a 38 (219,0 mg) foram submetidas a c.c. em sílica fornecendo 54,9 mg da fração esteroidal (f.e.<sub>5</sub> = 0,03%), que por sua vez foi purificada através de cristalizações. As demais frações não foram estudadas.

#### *Dictyopteris plagiogramma*

Do primeiro fracionamento em CHCl<sub>3</sub> resultaram 66 frações de 25 ml. Apesar de existirem outras manchas com colorações características de terpenos no cromatograma, apenas as substâncias que continham o mesmo R<sub>f</sub> e coloração que o colesterol nas frações 17 a 35 foram estudadas (fração esteroidal - 1,12 g). Estas frações foram submetidas a novos fracionamentos em c.c. de sílica até a obtenção dos produtos esteroidais (f.e.<sub>6</sub> = 16,5 mg - 0,01%), que passaram pelo processo de cristalização para sua purificação final. As demais frações não foram estudadas.

#### *Sargassum filipendula*

A primeira cromatografia em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de seu resíduo II



(900,0 mg) proporcionou 57 frações de 25 ml. Destas, as frações 21 a 38 (fração esteroidal, f.e.<sub>7</sub>=45,3 mg - 0,1%) foram unidas e cristalizadas para obtenção do produto puro. As demais frações não foram estudadas.

#### *Sargassum furcatum*

Neste caso foi também empregado CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluente para a primeira cromatografia do resíduo (1,32 g) e obtivemos 43 frações de 20 ml. Destas, as frações 7 a 31 (fração esteroidal, f.e.<sub>8</sub>= 106,0 mg - 0,1%) foram cristalizadas. As demais frações não foram estudadas.

### 5.4. DADOS ESPECTRAIS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

#### 5.4.1. DITERPENOS

##### 5.4.1.1. Substância Dc-1

-UV :  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}} = 243 \text{ nm } (\epsilon = 5.850)$

(Figura 20, pág. 85)

- IV :  $\nu_{\text{filme}}^{\text{máx.}} \text{ (cm}^{-1}\text{)} = 3600, 2960, 2920, 2870, 1740, 1640, 1450, 1380, 1230, 1170, 1040, 1020, 980, 960, 910, 860, 740$

(Figura 21, pág. 86)

- RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno)

0.91 (3H,s); 1.05 (3H,d,J= 7.4), 1.09 (3H,d,J= 7.4); 1.33 (3H,s); 2.16 (3H,s); 4.80 (1H,ls); 4.85 (1H,t); 4.91 (1H,ls); 5.30 (1H,dd); 5.60 (1H,ls)

(Figura 22, pág. 87)

- RMN  $^{13}\text{C}$  (50,29 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno)

19.90 (q); 21.29 (q); 22.00 (q); 22.00 (q); 25.47 (d); 26.70 (t); 27.10 (t); 27.40 (q); 30.56 (t); 41.63 (t); 43.70 (s); 45.51 (s); 50.85 (t); 79.92 (s); 82.17 (d); 109.40 (t); 112.31 (d); 125.50 (d); 149.40 (s); 151.33 (s); 154.80 (s); 169.00 (q)

(Figura 23, pág. 88)



- RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno)

0.82 (3H,s); 1.04 (3H,d,J= 6.7 Hz); 1.07  
(3H,d,J= 6.7 Hz); 1.30 (3H,s); 2.97  
(1H,dd,J= 4.7 e 15.7 Hz); 4.68 (1H,ls);  
4.81 (1H,ls); 5.39 (1H,dd,J= 4.7 e 9.5 Hz)

(Figura 27, pág. 96)

- Espectro de RMN  $^1\text{H}$  bidimensional ( $^1\text{H}$  x  $^1\text{H}$  HOMOCOSY)

(Figura 28, pág. 97)

- RMN  $^{13}\text{C}$  (50,29 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno)

19.72 (q); 22.06 (q); 22.16 (q); 25.51  
(d); 27.39 (q); 29.69 (t); 31.98 (t);  
34.97 (t); 37.10 (t); 41.40 (s); 43.25  
(t); 45.30 (s); 50.80 (t); 79.45 (s);  
108.50 (t); 114.35 (d); 124.66 (d);  
149.71 (s); 153.80 (s); 154.01 (s)

(Figura 29, pág. 98)

- DEPT (50,29 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno)

90° - (CH)	25.51 (C-17); 114.35 (C-7); 124.66 (C-10)
135° (CH <sub>3</sub> e CH)	19.72 (Me-20); 22.06 (Me-18); 22.16 (Me-19); 25.51 (C-17); 27.39 (Me-16); 114.35 (C-7); 124.66 (C-10)
135° - (CH <sub>2</sub> )	28.90 (C-3); 31.98 (C-4); 34.97 (C-6); 37.10 (C-2); 43.25 (C-11); 50.80 (C-13); 108.50 (C-15)

(Figura 30, pág. 99)

#### 5.4.1.3. Substância Dm-2

-IV : $\nu$ (cm <sup>-1</sup> ) =	3448, 2924, 2852, 1725, 1460, 1375, 1216, 1078, 756, 677
-----------------------------------	---

(Figura 32, pág. 107)

- RMN <sup>1</sup>H (200 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , TMS como padrão interno)

1.28 (3H,s);	1.46 (3H,s);	1.54 (3H,s);
1.80 (3H,d);	2.00 (3H,s);	3.79 (1H,t,J=

7.2); 4.18 (1H,dd,J= 3.0 e 7.8); 4.75  
(2H,m,W<sub>1/2</sub>= 7.8); 5.32 (1H,m,W<sub>1/2</sub>= 6.2)

(Figura 33, pág. 108)

- RMN <sup>13</sup>C (50,29 MHz, δ, CDCl<sub>3</sub>, TMS como padrão interno)

15.92 (q); 22.25 (q); 22.59 (q); 22.67  
(t); 22.67 (q); 24.56 (q); 25.96 (t);  
33.96 (t); 35.06 (t); 40.45 (t); 46.03  
(d); 50.06 (d); 59.43 (d); 73.40 (d);  
82.14 (s); 83.59 (d); 86.99 (s); 107.33  
(t); 123.71 (d); 142.02 (s); 152.28 (s);  
170.62 (s)

(Figura 34, pág. 108)

- DEPT (50,29 MHz, δ, CDCl<sub>3</sub>, TMS como padrão interno)

90° 46.02 (C-1); 50.06 (C-7); 59.43 (C-5);  
73.40 (C-6); 83.59 (C-14); 123.71 (C-3)

135°  
(CH<sub>3</sub> e CH) 15.92 (Me-17); 22.59 (OCOMe); 22.67 (Me-20)  
e (Me-16); 24.56 (Me-19); 46.02 (C-1);  
50.05 (C-7); 59.42 (C-5); 73.38 (C-6);  
83.59 (C-14); 123.71 (C-3)

135°  
(CH<sub>2</sub>) 22.67 (C-8?); 25.95 (C-13); 33.95 (C-2);  
35.05 (C-12); 40.44 (C-9); 107.33 (C-18)

(Figura 35, pág. 110)

**5.4.2. ESTERÓIS - EM (70 eV): m/z (% abundância relativa)**

**5.4.2.1. 22-dehidro-colesterol (22-DHC)**

384 ( $M^+$ , 75); 369 (19); 366 (17.5); 351 (25); (70); 285 (18); 282 (11); 273 (26.2)  
271 (37.5); 255 (57.5); 241 (8.5); 229 (8.7); 213 (19); 199 (12.5); 185 (10);  
173 (13.5); 160 (33.7); 145 (37.5);

(Figura 39, pág. 121)

**5.4.2.2. Colesterol**

386 ( $M^+$ , 100); 371 (41); 368 (48); 301 (47.5); 275 (45); 273 (17.5); 255 (21);  
229 (18); 213 (26); 161 (26); 145 (33);  
105 (41); 53 (57)(33);105 (41); 53 (57)

(Figura 42, pág 124)

**5.4.2.3. 5 $\alpha$ -colestan-3 $\beta$ -ol**

388 ( $M^+$ , 30); 373 (27); 370 (2); 355 (10);  
281 (7.5); 262 (8); 248 (6); 233 (41);  
215 (41); 207 (12.5); 165 (15); 95 (20);  
43 (100)

(Figura 64, pág. 148)

**5.4.2.4. Brassicasterol**

398 ( $M^+$ , 100); 383 (16); 380 (12.5); 365 (30); 337 (17.5); 314 (12.5); 300 (47.5); 273 (13); 271 (47.5); 255 (52); 229 (10); 213 (17.5); 199 (12.5); 145 (33,5); 91 (38); 55 (90)

(Figura 44, pág. 125)

**5.4.2.5. 24-deidro-24-metil-colesterol (24-DHMC)**

398 ( $M^+$ , 100); 383 (32); 380 (18); 365 (32.5); 328 (9); 314 (75); 299 (45); 273 (8); 271 (57.5); 255 (16); 229 (22.5); 213 (32); 159 (27.5); 105 (42.5); 55 (72.5)

(Figura 46, pág. 127)

**5.4.2.6. 24-metileno-colesterol (chalinasterol)**

398 ( $M^+$ , 12.5); 383 (20); 380 (5); 365 (14); 316 (4); 314 (100); 300 (38); 296 (12.5); 281 (27.5); 271 (39); 255 (7.5);



229 (21); 213 (19); 145 (24); 105 (22.5);  
91 (33.5); 55 (67.5)

(Figura 48, pág. 129)

#### 5.4.2.7. Fucosterol

412 (M<sup>+</sup>, 10); 397 (8); 379 (6); 316 (3);  
314 (100); 300 (30); 296 (12.5); 281  
(27.5); 271 (12); 255 (6); 229 (22.5);  
213 (13); 199 (7.5); 145 (17.5); 91 (25);  
55 (87.5)

(Figura 50, pág 130)

#### 5.4.2.8. mistura de 24ξ-etilcolesterol e fucosterol

414 (30); 412 (6); 399 (14); 396  
(17); 381 (15); 329 (22.5); 314 (100);  
300 (27.5); 296 (12); 281 (26); 271 (12);  
255 (14); 229 (24); 213 (17.5); 145 (17.5)  
105 (25); 55 (47.5); 43 (46)

(Figura 54, pág. 135)

#### 5.4.2.9. M 414 (desconhecido)

414 (5); 398 (18); 397 (50); 369 (21);

328 (8); 312 (19); 285 (100); 270 (18);  
245 (25); 230 (26)

(Figura 65, pág. 148)

**5.4.2.10. M 426 (desconhecido)**

426 (15); 411 (6); 408 (2.5); 393 (4);  
367 (5); 326 (3); 314 (15); 299 (15); 295  
(18); 271 (100); 253 (20); 229 (4); 213  
(12.5); 137 (17.5); 95 (38); 55 (38)

(Figura 52, pág. 131)

**5.4.3. ESTERÓIS (EM das misturas) (70 eV) m/z (% abundância  
relativa)**

**5.4.3.1. *Dictyota dichotoma***

430(15), 414(5), 412(35), 402(15),  
400(8), 398(20), 388(5), 386(40), 384(8)

(Figura 57, pág. 139)

**5.4.3.2. *Dictyopteris delicatula***

430(12), 428(20), 426(15), 414(15),

412(20), 402(15), 400(17), 398(17),  
388(8), 386(60), 384(50)

(Figura 60, pág. 143)

**5.4.3.3. *Dictyopteris plagiogramma***

414(29), 412(25), 400(30), 398(32),  
388(22), 386(85), 384(30)

(Figura 62, pág. 145)

**5.4.3.4. *Sargassum furcatum***

414(9), 412(60), 410(8), 402(8), 400(9),  
398(15), 386(45)

(Figura 68, pág. 152)

**5.5. TESTES DE HERBIVORIA**

Para os testes de pastagem, discos (20 mm de diâmetro) da alga verde *Ulva fasciata* Delile foram inicialmente pesados e recobertos com uma solução em éter dietílico dos metabólitos testados: Dm-1 (dictyol H), Dc-1 (KBV-6) e fração esteroidal

(f.e.<sub>1</sub>), de modo que as concentrações finais dos mesmos sobre a alga fossem três valores em torno da natural (geralmente: uma concentração menor que a natural, concentração natural e concentração acima da natural).

Antes de iniciar o experimento, os herbívoros crustáceos, anfípodas, *Parhyale hawaiiensis* Dala, foram deixados sem alimentação durante um período de 24 horas. Este herbívoro associado a *S. furcatum* na Praia Rasa, Búzios (RJ) foi escolhido por ser abundante nesta área de estudo.

Estes testes foram efetuados em vinte aquários (3 l) aerados contendo dez anfípodas cada e ciclo natural de luz. Quinze aquários continham, cada um, um disco de alga condicionado com o produto testado (5 aquários para cada concentração) e 10 anfípodas; outros cinco foram utilizados como aquários para controle, ou seja, alga sem produto e com anfípodas. Foi utilizado mais um aquário com alga sem produto e sem anfípodas com o objetivo de corrigir a determinação da massa úmida inicial de todas as algas para que pudéssemos controlar possíveis mudanças que por ventura não fossem causadas pelos herbívoros.

Após 24 hs de experimento, as algas foram retiradas dos aquários e novamente pesadas a fim de determinar a possível perda de biomassa causada pelos predadores e as variações autogênicas.

### 5.5.1. Tratamento dos dados

Os resultados foram analisados estatisticamente através da aplicação do Teste t (de Student). Este teste compara duas médias, relativas à mesma variável quantitativa, referindo-se a duas populações cujas variâncias, embora desconhecidas, são iguais (o experimentador, técnicas utilizadas e a preparação das amostras foram as mesmas, não havendo motivo para supor que as populações sejam diferentes). Este teste indica se as médias são iguais ou diferentes dentro de uma determinada margem de significância ( $p < 0,05\%$ ).<sup>244</sup>

As fórmulas empregadas são:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right] \cdot S^2}}, \text{ onde:}$$

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1) \cdot S_1^2 + (n_2 - 1) \cdot S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}, \text{ e } S_1^2 = \frac{\sum (x_1^i - \bar{x}_1)^2}{n_1 - 1}$$

$\bar{x}_1$  é a média dos  $n_1$  valores  $x_1^i$  medidos no experimento 1 (seja um dos testes de herbivoria); os valores com subscrito 2 se referem ao experimento 2 (seja o controle), e se definem analogamente.)

## **CAPÍTULO 6**

### **CONCLUSÕES**

A primeira vista, a grande quantidade e diversidade de herbívoros nos mares tropicais deveria levar à produção abundante e diversificada de defesas químicas por parte das algas.

Entretanto, nem sempre estas expectativas têm sido constatadas. Nas algas pardas de mares tropicais temos verificado reduções nas concentrações e/ou variedade das classes de metabólitos secundários produzidos, em comparação as mesmas algas em ambientes temperados.

Nossos resultados fitoquímicos indicaram um balanço na produção de três classes de substâncias: taninos, terpenos e esteróis. As algas com alto teor de esteróis (Fuciales) não possuem terpenos ou apenas pequenas quantidades deles, enquanto as Dictyotales, que são ricas em terpenos, apresentam baixos níveis de esteróis. Por outro lado, os taninos, surpreendentemente, têm sido encontrados em baixos níveis de concentração em nosso ecossistema, o que difere drasticamente do que ocorre em regiões temperadas.

Por que será que determinadas rotas biossintéticas agem mais, ou menos intensamente em cada caso? Que fatores podem ter causado o desvio destas rotas?

É difícil responder a estas questões. Os desvios encontrados nas rotas biossintéticas das ordens Dictyotales e Fucales deveriam estar relacionados com diferentes estratégias de defesas químicas destas algas contra os predadores. No entanto, os testes de herbivoria realizados neste estudo mostraram que as substâncias empregadas (metabólitos secundários destas algas) são inativas frente à pastagem pelo anfípoda *P. hawaiiensis* (empregado como representante dos predadores destas algas). Muito pouco podemos comentar sobre este fato. Os estudos em ecologia química marinha estão apenas se iniciando em nosso país<sup>51</sup> e, além disso, não existem estudos que demonstrem que os anfípodas ou qualquer outro herbívoro tenham exercido uma pressão seletiva na produção de metabólitos secundários nas macroalgas. Pelo contrário, há razões para acreditar que esses anfípodas são dos poucos herbívoros marinhos capazes de especializarem-se em seus hábitos de pastagem. Portanto, é possível que a escolha desta classe de herbívoro não tenha sido das mais adequadas. Deste modo, é provável que estes mesmos metabólitos sejam ativos frente a outros predadores potenciais encontrados no mesmo ecossistema. Com base nestes resultados, podemos sugerir também que outros fatores ambientais, além da herbivoria, podem estar influenciando a produção destas substâncias.



É importante lembrar que substâncias estruturalmente similares podem diferir drasticamente nos efeitos sobre a preferência alimentar dos herbívoros.

Por outro lado, será que existe alguma relação entre a produção destas substâncias e a posição filogenética destas ordens?

Como mencionado anteriormente, **Dictyotales** e **Fucales** são consideradas ordens morfologicamente evoluídas. Ao contrário da ordem **Fucales**, com características morfo-fisiológicas típicas de formas sucessionais avançadas (Tabela 2, pág. 18) e ciclo biológico haplobiôntico (com planta macroscópica diplóide e gametas haplóides), a ordem **Dictyotales** apresenta características de ambas categorias (oportunistas e sucessionais avançadas) e um ciclo de vida com formação de duas plantas, uma haplóide e outra diplóide, macroscópicas. A princípio nenhuma correlação aparente parece existir. Deve-se ressaltar, no entanto, que ambas são evoluídas e produtoras de terpenos, embora existam variações na sua capacidade de síntese.

Os resultados quimiosistemáticos obtidos para estas ordens comprovaram a utilização dos terpenos, sejam eles de origem biossintética mista ou não, como bons marcadores taxonômicos.

Será que as espécies produtora de meroterpenos podem ser consideradas as mais evoluídas da divisão? Será que a produção destas substâncias podem estar relacionadas com estratégias de defesa frente aos predadores? Será que a produção dos

meroterpenos está relacionada com determinadas situações geográficas especiais?

Inicialmente, sugerimos a divisão da ordem Dictyotales em três famílias distintas devido a grande diferença dos seus constituintes químicos. O grupo "Dictyota" caracteriza-se pela produção de diterpenos simples, o grupo "Dictyopteris", por sesquiterpenos simples ou de origem biossintética mista e o grupo "Taonia", por meroditerpenos. Por outro lado, apenas duas famílias, dentre as sete existentes para ordem Fucales, foram estudadas fitoquimicamente. Os diterpenos de Cystoseiraceae mostraram ser bons marcadores desta família distinguindo efetivamente os gêneros. A análise quantitativa de *Cystoseira* retratou claramente que as espécies capazes de produzir meroditerpenos irregulares, *C. stricta*, *C. mediterranea* e *C. tamariscifolia*, são as mais evoluídas.

Nossos resultados além de relacionar fortemente com os dados botânicos, corroboraram a Teoria de Evolução Micromolecular que afirma que níveis de oxidação e complexidade estrutural mais altos são característicos de componentes mais avançados dentro de um táxon (Primeira parte do segundo princípio de evolução Micromolecular).

Torna-se evidente a necessidade de estudos sobre a defesa química de algas em diferentes regiões geográficas, com diferentes tipos de herbívoros, com diferentes concentrações e com diferentes especificidades estruturais.

**CAPITULO 7**

**BIBLIOGRAFIAS**

1. GAUTHIER, M.J. & AUBERT, M. (1981) in. **Marine Natural Products: evolution, composition, interactions and chemistry of organic matter in seawater** (Duursma, E. K & Dawson, R. ed.), p.225, Elsevier, Amsterdam.
2. SOLÉ-CAVA, A. & KELECOM, A (1988). **Ciência Hoje**, 8, 46.
3. HARBONE, J.B. (1986). **Nat. Prod. Rep.**, 3(1), 323.
4. FAULKNER, D.J. (1984). **Nat. Prod. Rep.**, 1(3), 251.
5. LANGENHEIM, J.H. (1984) in. **Physiological ecology of plants of the wet tropics** (Medina, H. A. & Vásquez-Yánes, eds.), p.189.
6. GOTTLIEB, O.R. (1982) in. **Micromolecular evolution systematics and ecology: an essay into a novel botanical discipline**, Springer-Verlag, ed., Berlin.
7. BARBIER, M. (1981) in **Marine Natural Products: biological and chemical perspectives** (Scheuer, P. J., ed.), Chap. 4, p. 147, Academic Press, New York.
8. WHITTAKER, R.H. & FEENY, P.P. (1971). **Science**, 171, 757.

9. BAKUS, G.J., TARGETT, N.M. , SCHULTE, B. (1986). *J. Chem Ecol*, 12(5), 951., 951.
10. NAYLOR, S. (1984). *Chem Br.*, 20, 118.
11. WOOD, W.F. (1983). *J. Chem Educ.*, 60(7), 531.
12. ROUND, (1983) in. *Biologia das algas*, Guanabara Dois, Rio de Janeiro.
13. TRAINOR, F.R. (1978) in. *Introductory Phycology*, Wiley, New York.
14. LITTLER, M.M. & LITTLER, D.S. (1985) in. *Handbook of phycological methods* (Littler, M.M. & Littler, D.S., eds.), vol. IV, Cambridge Univ. Press, New York.
- 15 HAY, M.E., FENICAL, W., GUSTAFSON, K. (1987). *Ecology*, 68(6), 1581.
16. LITTLER, M.M., LITTLER, D.S., TAYLOR, P.R. (1983a). *J. Phycol*, 19, 223.
17. HAY, M.E. (1981b). *Aq. Bot.*, 10, 97.
18. ADEY, W.H. & VASSAR, J.M. (1975). *Phycologia*, 14, 55.
19. LUBCHENCO, J. & CUBIT, J. (1980). *Ecology*, 61, 676.
20. LITTLER, M.M. & LITTLER, D.S. (1980). *Am Nat.*, 116(1), 25.
21. PAUL, V.J., LITTLER, M.M., LITTLER, D.S., FENICAL, W. (1987). *J. Chem Ecol*, 13(5), 1171.
22. FENICAL, W. (1975). *J. Phycol*, 11, 245.
23. NORRIS, J.N. & FENICAL, W. (1982). *Smithson. Contrib. Mar. Sci.*, 12, 417.
24. TEIXEIRA, V.L., KELECOM, A, GOTTLIEB, O.R. (1991). *Química*

Nova, 15, no prelo.

25. FAULKNER, D.J. (1977). **Tetrahedron**, **33**, 1421.
26. HASLAM, E. (1986). **Nat. Prod. Rep.**, **3**(1), 217.
27. LOBBAN, G.S., HARRISON, P.J., DUNCAN, M.J. (1985) in. **The physiological ecology of seaweeds** (Cambridge University, eds.), Chap. 7, p.129, London.
28. GEISSMAN, T.A. & CROUT, D.H.G. (1969) in. **Organic chemistry of secondary plant metabolism** p. 592, Freeman, Cooper and Company, San Francisco.
29. MANN, J. (1987) in. **Secondary metabolites** (Oxford University Press, ed.), 2 ed., New York.
- 30a FIGLIUOLO, R. (1988). Apresentado na X RESEM, realizado na UFPB, João Pessoa (PB)
- 30b.SCHULTZ, J.C. (1983), **Natural History**, **5**, 12.
31. FRAENKEL, G.S. (1959). **Science**, **129**, 1466.
32. EHRLICH, P.R. & RAVEN, P.H. (1984). **Evolution**, **18**, 586.
33. JANZEN, D.H. (1969). **Evolution**, **23**, 1.
34. WHITTAKER, R.H. (1970a) in. **Chemical ecology** (Sondheimer, E. & Simeone, J.B., eds.), p. 43 Academic Press, New York.
35. HARBONE, J.B. (1972) in. **Phytochemical ecology**, Academic Pres, New York.
36. HARBONE, J.B. (1978) in. **Biochemical aspects of plant and animal coevolution**, Academic Press, New York.
37. WALLACE, J.W. & MANSELL, R.L. (1976) **Recent Adv. Phytochem.**,  
10.

38. FEENY, P. (1976). **Recent Adv. Phytochem**, 10, 1.
39. RHOADES, D.F. & GATES, R.G. (1976). **Rec. Adv. Phytochem**, 10, 168.
40. RHOADES, D.F. (1979) in. **Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites** (Rosenthal, G.A. & Janzen, D.J., eds.), p.3-54, Academic Press, New York.
41. FOX, L.R. (1981). **Amer. Zool.**, 21, 853.
42. YANCEY, P.H., CLARK, M.E., HAND, S.C., BOWLUS, R.D., SOMERO, G.N. (1982). **Science**, 217(24), 1214.
43. TUOMI, J. (1984). **Oecologia**, 61, 208.
44. GRIME, J.P. (1977). **Amer. Nat.**, 111, 1169.
45. COLEY, P.D., BRYANT, J.P., CHAPIN, F.S. III (1985). **Science**, 230, 895.
46. HAY, M.E. & FENICAL, W. (1988). **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, 19, 111.
47. STEINBERG, P.D. (1989). **Oecologia**, 78, 373.
- 48a.HAY, M.E., DUFFY, J.E., FENICAL, W. (1990). **Ecology**, 71(2), 733.
- 48b.HAY, M.E., DUFFY, J.E., PFISTER, G.A., FENICAL, W. (1987), **Ecology**, 68 (6), 1567.
49. STEINBERG, P.D. & PAUL, V.J. (1990). **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, 58, 253.
50. HAY, M.E., DUFFY, E., FENICAL, W. (1988). **Proc. 6th Int. Coral Reef Symp.**, 3, 43.
51. PEREIRA, R.C. (1990) **Desenvolvimento de *Sargassum furcatum***

**Kuetzing "in vitro" e significância ecológica dos florotaninos para a defesa e taxonomia de Phaeophyceae.**

Tese de Mestrado, UFRJ.

52. HAY, M.E., DUFFY, J.E., FENICAL, W., GUSTAFSON, K. (1988).  
Mar. Ecol. Prog. Ser. 48, 185.
53. STEINBERG, P.D. (1985). *Ecological Monographs*, 55(3), 333.
54. PEREIRA, R.C., VALENTIN, Y.Y., TEIXEIRA, V.L., KELECOM, A.  
(1990). *Insula*, no prelo.
- 55a. PAPENFUSS, G.F. (1977). *Bull. Jp. Soc. Phycol.*, 25, suppl:  
271.
- 55b. PAPENFUSS, G.F. (1951) in. *Phaeophyta: Manual of phycology*  
(Smith, G.M., ed.), p.119, Waltham.
56. FENICAL, W. (1980) in. *Pacific seaweed aquaculture* (Abott,  
I.A., Foster, M.S., Ecklund, L.F., eds.), p.144, California  
Sea Grant College Program, La Jolla.
57. TEIXEIRA, V.L., TOMASSINI, T., KELECOM, A. (1985). *Química  
Nova*, 8(4), 302.
58. TEIXEIRA, V.L. & KELECOM, A. (1988). *Sci. Tot. environ.* 75,  
271.
59. TEIXEIRA, V.L. & KELECOM, A. (1990). *Insula*, no prelo.
60. SUN, H.H., McCONNELL, O.J., FENICAL, W., HIROTSU, K., CLARDY,  
J. (1981). *Tetrahedron*, 37, 1237.
61. PETTIT, G.R., ODE, R.H., HERALD, C.L., von DREELE, R.B.,  
MICHEL, C. (1976). *J. Am. Chem. Soc.*, 98(15), 4677.
62. TEIXEIRA, V.L., TOMASSINI, T., FLEURY, B.G., KELECOM, A.



- (1986a). *J. Nat. Prod.*, **49**(4), 570.
63. TEIXEIRA, V.L., TOMASSINI, T., KELECOM, A. (1986b). *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **95**, 263., 263.
64. KELECOM, A. & TEIXEIRA, V.L. (1988). *Phytochemistry*, **27**, 2907.
65. KELECOM, A., TEIXEIRA, V.L. & PITOMBO, L.F. (1991). *Anais Ass. Bras. Química*, no prelo.
66. PETTUS JR., J.A. & MOORE, R.E. (1971). *J. Am. Chem. Soc.*, **93**(12), 3087.
67. MOORE, R.E., PETTUS JR., J.A., MISTYSYN, J. (1974). *J. Org. Chem.*, **39**(15), 2201.
68. MOORE, R.E. (1971). *J. Chem. Soc. D*, **19**, 1168.
69. PITOMBO, L., TEIXEIRA, V.L., KELECOM, A. (1990). *Insula*, no prelo.
70. CIMINO, G., De STEFANO, S., FENICAL, W., MINALE, L., SIMS, J.J. (1975). *Experientia*, **31**(11), 1250.
71. FENICAL, W. & McCONNELL, O. (1975). *Experientia*, **31**(9), 1004.
72. DAVE, M., KUSUMI, T., ISHITSUKA, M., IWASHITA, T., KAKISAWA, H. (1984). *Heterocycle*, **22**(10), 2301.
73. OCHI, M., KOTSUKI, H., INOWE, S., TANIGUCHI, M., TOKOROYAMA, T. (1979). *Chem. Lett.*, 831.
74. OCHI, M., KOTSUKI, H., MURAOKA, K., TOKOROYAMA, T. (1979). *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **52**(2), 629.
75. FENICAL, W. & SIMS, J.J. SQUATRIO, D., WING, R.M., RADLICK, P. (1973). *J. Org. Chem.*, **38**(13), 2383.

76. FENICAL, W., SIMS, J.J., WING, R.M., RADLICK, P.C.  
(1972). *Phytochemistry*, **11**, 1161.
77. SUZUKI, M., KOWATA, N., KUROSAWA, E. (1981). *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**(8), 2366.
78. KUROWAWA, E., IZAWA, M., YAMAMOTO, K., MASAMUNE, T., IRIE, T.  
(1966). *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **39**, 2509.
79. IRIE, T., YAMAMOTO, K., MASAMUNE, T. (1964). *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **37**(7), 1053
80. SCHEUER, P.J. (1989). *Med. Res. Rev.*, **9**(4), 535.
81. GONZALEZ, A.G., DARIAS, J., MARTÍN, J.C., NORTE, M. (1974).  
*Tetrahedron Lett.*, **45**, 3951.
82. GONZALEZ, A.G., DARIAS, J., MARTÍN, J.D. (1971). *Tetrahedron Lett.*, 2729.
83. GONZALEZ, A.G., MARTIN, J.D., PEREZ, C., ROVIROSA, J., TAGLE, B., CLARDY, J. (1984). *Chem. Lett.*, (10), 1649.
84. GONZALEZ, A.G., DARIAS, J., MARTIN, J.D., PASCUAL, C.  
(1973). *Tetrahedron*, **29**, 1605.
85. GONZALEZ, A.G., ALVAREZ, M.A., MARTÍN, J.D., NORTE, M., PEREZ, C., ROVIROSA, J. (1982). *Tetrahedron*, **38**(5), 719.
86. MURPHY, P.T., MARCH, G., WELLS, R.J. (1981). *Tetrahedron Lett.*, **22**(16), 1555.
87. GERWICK, W.H., FENICAL, W., FRITSCH, N., CLARDY, J. (1979).  
*Tetrahedron Lett.*, 145.
88. GERWICK, W.H., FENICAL, W., NORRIS, J.N. (1985).  
*Phytochemistry*, **24**(6), 1279.

89. O'BRIEN, E.T., WHITE, S., JACOBS, R.S., BODER, G.B., WILSON, L. (1984). *Hidrobiologia*, 116/117, 141.
90. GERWICK, W.H. & FENICAL, W. (1981). *J. Org. Chem.*, 46, 22.
91. OLIVEIRA-FILHO, E.C. (1977). *Algas marinhas bentônicas do Brasil*. Tese de Livre-Docência, USP, 407p.
92. GERWICK, W. & FENICAL, W. (1982). *Phytochemistry*, 21(3), 633.
93. WELLS, R.J. (1979). *Pure & Appl Chem.*, 51, 1829.
94. COMBAUT, G. (1983) in. *Chimie Marine pour le développement* (Kornprobst, J.M., ed.), p. 214, Faculté des Sciences-Dakar, enda-Unesco.
95. AMICO, V., NERI, P., ORIENTE, G., PIATTELLI, M. (1989), *Phytochemistry*, 28(1), 215.
96. AMICO, V., CUNSOLO, F., PIATTELLI, M., RUBERTO, G., MAYOL, L. (1987). *J. Nat. Prod.* 50(3), 449.
97. AMICO, V., CUNSOLO, F., PIATTELLI, M., RUBERTO, G. (1987). *Phytochemistry*, 26(6), 1719.
98. AMICO, V., CUNSOLO, F., PIATTELLI, M., RUBERTO, G. (1984). *Phytochemistry*, 23(9), 2017.
99. AMICO, V., ORIENTE, G., PIATTELLI, M., RUBERTO, G. (1984). *Gazz. Chim. Ital.*, 114, 169.
100. ISHITSUKA, M., KUSUMI, T., NOMURA, Y., KONNO, T., KAKISAWA, A. (1979). *Chem. Lett.*, 1269.
101. SEGAWA, M. & SHIRAHAMA, H. (1987). *Chem. Lett.*, 1365.
102. AMICO, V., CUNSOLO, F., PIATTELLI, M., RUBERTO, G. (1985). *Phytochemistry*, 24(11), 2663.

103. COMBAUT, G., CODOMIER, L, TESTE, J. (1981). *Phytochemistry*, 20(8), 2036.
104. GREGSON, R.P., KAZLAUSKAS, R., MURPHY, P.T., WELLS, R.J. (1977). *Aust. J. Chem.*, 30, 2527.
105. KAZLAUSKAS, R., KING, L, MURPHY, P.T., WARREN, R.G., WELLS, R.J. (1981). *Aust. J. Chem.*, 34(2), 439.
106. RAVI, B.N., MURPHY, P.T., LIDGARD, R.O., WARREN, R.G., WELLS, R.J. (1982). *Aust. J. Chem.*, 35, 171.
107. KAZLAUSKAS, R., MURPHY, P.T., WELLS, R.J. (1978). *Experientia*, 34(2), 156.
108. CAPON, R.J., GHISALBERTI, E.L., JEFFERIES, P.R. (1981). *Phytochemistry*, 20(11), 2598.
109. van ALTENA, I.A. (1988). *Aust. J. Chem.*, 41, 49.
110. KUSUMI, T., ISHITSUKA, M., NOMURA, Y., KONNO, T., KAKISAWA, H. (1979). *Chem. Lett.*, 1181.
111. BIARD, J.F., VERBIST, J.F., LETOUMEUX, Y., FLOCH, R. (1980). *Planta Medica*, 40, 288.
112. BIARD, J.F., VERBIST, J.F., FLOCH, R., LETOURNEUX, Y. (1980). *Tetrahedron Lett.*, 21(19), 1849.
113. VALLS, R., BANAIGS, B., FRANCISCO, C., CODOMIER, L, CAVE, A. (1986). *Phytochemistry*, 25(3), 751.
114. COMBAUT, G. & PIOVETT, L. (1983). *Phytochemistry*, 22(8), 1787.
115. SUN, H.H., FERRARA, N.M., McCONNELL, O.J., FENICAL, W. (1980). *Tetrahedron Lett.*, 21(33), 3123.

116. MORI, K, UNO, T., KIDO, M. (1990). *Tetrahedron*, **46**(12), 4193.
117. FRANCISCO, G., BANAIGS, B., TESTE, J., CAVE, A. (1986). *J. Org. Chem.*, **51**(7), 1115.
118. FRANCISCO, G., BANAIGS, B., RAKBA, M., TESTE, J., CAVE, A. (1986). *J. Org. Chem.*, **51**, 2707.
119. HGGs, M.D. & MULHEIRN, L.J. (1981). *Tetrahedron*, **37**(18), 3209.
120. KATO, T., KUMANIRENG, A.S., ICHINOSE, I., KITAHARA, Y., KAKINUMA, Y., KATO, Y. (1975). *Chem. Lett.*, (4), 335.
121. KIKUCHI, T., MORI, Y., YOKOI, T., NAKAZAWA, S., KURODA, H., MASADA, Y., KITAMURA, K., UMEZAKI, I. (1975). *Chem. Pharm. Bull.*, **23**(3), 690.
122. KATO, T., KUMANIRENG, A.S., ICHINOSE, I., KITAHARA, Y., KAKINUMA, Y., NISHIHARA, M., KATO, M. (1975). *Experientia*, **31**(4), 433.
123. SHIZURI, Y., MATSUKAWA, S., OJIKI, M., YAMADA, K. (1982). *Phytochemistry*, **21**(7), 1808.
124. DJERASSI, C. (1981). *Pure & Appl. Chem.*, **53**, 873.
125. MINALE, L. & SODANO, G. (1977) in *Marine Natural Products Chemistry* (Faulkner & Fenical, eds.), **4**(1), 87. Nato Conference series, New York/London.
126. GOAD, L.J. (1978) in *Marine Natural Products* (Scheuer, P.J., ed.), vol. 2, p.75, Academic Press, New York.
127. SCHIMITZ, F.J. (1978) in *Marine Natural Products* (Scheuer, P.J., ed.), vol. 1, p.241, Academic Press, New York.

128. SCHEUER, P.J. (1973) in **Chemistry of Marine Natural**, p.201, Academic Press, New York.
129. DJERASSI, G., THEOBALD, N., KOKKE, W.C.M.C., PAK, C.S., CARLSON, R.M.K. (1979). **Pure & Appl. Chem.**, 51, 1815.
130. NES, W.R. (1977). **Adv. in Lipid Research**, 15, 233.
131. MORRIS, R.J. & CULKIN, F. (1977). **Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.**, 15, 73.
132. HEFTMAN, E. (1975). **Phytochemistry**, 14, 891.
133. HEFTMAN, E. (1971). **Lipids**, 6(2), 128.
134. VOLKMAN, J.K. (1986). **Org. Geochem.**, 9(2), 83.
135. PATTERSON, G.W. (1970). **Lipids**, 6(2), 120.
136. BOUTRY, J.L., SALIOT, A., BARBIER, M. (1979). **Experientia**, 35(12), 1541.
137. NES, W.R., KREVITZ, K., JOSEPH, J., NES, W.D., GIBBONS, G.F. (1977). **Lipids**, 12(6), 511.
138. GOAD, L.J., LENTON, J.R., KNAPP, F.F., GOODWIN, T.W. (1974). **Lipids**, 9(8), 582.
139. ANDO, T., BARBIER, M. (1975). **Biochem. Syst. Ecol.**, 3, 245.
140. SHIMIZU, Y., ALAIN, M., KOBAYASHI, A. (1976). **J. Am. Chem. Soc.**, 98, 1059.
141. WITHERS, N. (1983) in **Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives** (Scheuer, P., ed.), vol. V, Academic Press, New York.
142. NEWBURGER, J.D., UEBEL, J.J., IKAWA, M., ANDERSEN, K.K., GAGOSIAN, R.B. (1979). **Phytochemistry**, 18(12), 2042.

143. DUPERON, R., THIERSAULT, M., DUPERON, P. (1983).  
**Phytochemistry**, 22(2), 535.
144. ARTAUD, J., IATRIDES, M.C., TISSE, G., ZAHRA, J.P., ESTIENNE,  
J. (1980). **Analisis**, 8(7), 277.
145. SAFE, L.M., WONG, C.J., CHANDLER, R.F. (1974). **J. Pharm**  
**Sci.**, 63(3), 464.
146. IATRIDES, M.C., ARTAUD, J., DERBESY, M., ESTIENNE, J. (1978).  
**Ann. Fals. Exp. Chim.**, 71(768), 291.
147. IKEKAWA, N., MORISAKI, N., TSUDA, K., YOSHIDA, T. (1968).  
**Steroids**, 12(1), 41.
148. TYSUDA, K., AKAGI, S., KISHIDA, Y., HAYATSU, R., SAKAI, K.  
(1958). **Chem Pharm Bull.**, 6(6), 724.
149. TYSUDA, K., HAYATSU, R., KISHIDA, YU., AKAGI, S. (1958). **J.**  
**Am Chem Soc.**, 80, 921.
150. AKAGI, S., KISHIDA, Y., HAYATSU, R. (1957). **Chem Pharm**  
**Bull.**, 5(1), 85.
151. (1973). **Bot. Mar.**, 16(1), 49.
152. GUEVEN, K.C., HAKYEMEZ, G. (1975). **Eczacilik Bulteni**, 17(6),  
94.
153. COMBAUT, G., YACOUBOU, A., PIOVETTI, L., KORNPORST, J.M.  
(1985). **Phytochemistry**, 24(3), 618.
154. FRANCISCO, C., COMBAUT, G., TESTE, J., MAUME, B.F. (1977).  
**Biochem Biophys. Acta**, 487(1), 115.
155. KURATA, K., TANIGUCHI, K., SHIRAISHI, SUZUKI, M. (1990).  
**Phytochemistry**, 29(11), 3678.

156. RIGUERA, R., CASTEDO, L, QUINTELA, J.M., VILALTA,R. (1985).  
**An. Quim., 81(2), 113.**
157. IATRIDES, M.C., ARTAUD, J., VICENTE, N. (1983). **Oceanol  
Acta, 6(1), 73.**
158. COMBAUT, G., BRUNEAU, Y., JEANTY, G., FRANCISCO, C., TESTE,  
J., CODOMIER, L. (1976). **Phycologia, 15(3/4), 275.**
159. FINDLAY, J.A., PATIL, A.D. (1985). **Phytochemistry, 24(2),  
366.**
160. CMETAHUNA, O., *et al* (1978). **Khim Prir. Soedin, 6, 812.**
161. IKEKAWA, N., TSUDA, K., MORISAKI, N. (1966). **Chem Ind.,  
1179.**
162. GUEVEN, K.C., KIZIL, Z. (1983). **Eczacilick Bulteni, 25(4),  
71.**
163. (1984). **Kyoyobu Kenkyu Hokoku (Gifu Daigaku), 19, 57.**
164. (1985). **Jpn. Kokai Tokkyo Koho Jp., (3), 53.**
165. (1983). **Kyoyobu Kenkyu Hokoku (Gifu Daigaku), 18, 53.**
166. BANO, S., PERVEEN, S., AHMAD, V.V., SHAFIUDDIN., BANO, N.,  
SHAMEEL, M. (1987). **Bot. Mar., 30(5), 371.**
167. IKEKAWA, N., MORBAKI, M., HIRAYAMA, K. (1972).  
**Phytochemistry, 11(7), 2317.**
168. GOAD, L.J., GOODWIN, T.W. (1969). **Eur. J. Biochem., 7(4),  
502.**
169. NES, W.R., CASTLE, M., McCLANAHAN, J.L., SETTINE, J.M.  
(1966). **Steroids, 8(5), 655.**
170. HEILBRON, I., PHIPERS, R.F., WRIGHT, H.R. (1934). **J. Chem.**



- Soc. (C), (2), 1572.
171. MATSUHIRO, B., URZUA, A. (1984). *Biochem Syst. Ecol*, 12(2), 145.
172. PATTERSON, G.W. (1968). *Comp. Biochem Physiol*, 24, 501.
173. SHIMADATE, T., ROSENSTEIN, F.U., KIRCHER, H.W. (1977).  
*Lipids*, 12(2), 241.
174. MOTZFELDT, A.M. (1970). *Acta Chem Scand.*, 24(5), 1846.
175. SMITH, L.L., DHAR, A.K., GILCHRIST, J.L., LIN, Y.Y. (1973).  
*Phytochemistry*, 12(11), 2727.
176. KOBAYASHI, M., HASEGAWA, A., MITSUHASHI, H. (1985). *Chem Pharm Bull*, 33(9), 4012.
177. AKAGI, S., KISHIDA, Y., HAYATSU, R. (1957). *U.D.C.*, 5(1), 85.
178. McK. HALKET, J., LISBOA, B.P., PINHEIRO-JOVENTINO, F. (1976),  
16 (2), 177.
- 179 RAGAN, M.A. & GLOMBITZA, K.W. (1986) in *Prog. Phycol. Res.*  
(Round, F.E., Chapman, D.J., eds.), vol. 4, p.129,  
Biopress, England.
180. STHAL, E. (1969) in. *Thin-layer cromatography, a laboratory handbook*, Springer Verlag, 1041 p.
181. MATOS, A.F.J. (1980) in. *Introdução à fitoquímica experimental* (Apostila do Curso de Pós-graduação de Química Orgânica do Dep. Química Orgânica e Inorgânica da UFCE), Fortaleza.
182. PITOMBO, L. (1991). *Produtos Naturais de algas pardas e seu uso na quimiotaxonomia*, Tese de Mestrado, em andamento,

UFRRJ (RJ).

183. KELECOM, A. & TEIXEIRA, V.L. (1989). *Química Nova*, 12(1), 22.
184. GONZALEZ, A.G., MARTIN, J.D., NORTE, M., RIVERA, P., PERALES, A., FAYOS, J. (1983). *Tetrahedron*, 39(20), 3355
185. CREWS, P., KLEIN, T.E., HOGUE, E.R., MYERS, B.L. (1982). *J. Org. Chem.*, 47(5), 811
186. SUN, H.H., McCONNELL, O.J., FENICAL, W., HIROTSU, K., CLARDY, J. (1981). *Tetrahedron*, 37, 1237
187. CREWS, P., KLEIN, T.E., HOGUE, E.R., MYERS, B.L. (1987). *Tetrahedron Lett.*, 28(47), 5945
188. ALVARADO, A.N. & GERWICK, W.H. (1985). *J. Nat. Prod.*, 48(1), 132.
189. ALMEIDA, S.A.S. (1991). *Tese de mestrado, em andamento, Geoquímica, UFF.*
190. GONZALEZ, A.G., MARTIN, J.D., GONZALEZ, B., RAVELO, J.L., PÉREZ, C., RAFII, S. & CLARDY, J. (1984). *J. Chem. Soc., Chem Commun.*, 10, 669.
191. VASQUEZ, J., CHANG, M., NAKANISHI, K., MANTA, E., PERÉZ, C. & MARTIN, J.D. (1988). *J. Org. Chem.*, 53(20), 4797.
192. PATHIRANA, C. & ANDERSEN, R.J. (1984). *Can. J. Chem.*, 62(9), 1666.
193. SUN, H.H., Mc ENROE, F.J. & FENICAL, W. (1983). *J. Org. Chem.*, 48, 1903.
194. GONZALEZ, A.G., MARTÍN, J.D., PERÉZ, C. & ROVIROSA, J. (1982). *Bol. Soc. Chil. Quím.*, 27(2), 280.

195. KUSUMI, T., MUANZA-NKONGOLO, D., GOYA, M., ISHITSUKA, M., IWASHITA, T. & KAKISAWA, H. (1986). *J. Org. Chem.*, 51(3), 384.
196. DEMATTE, B., GUERRIERO, A. & PIETRA, F. (1985). *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 391.
197. BLOUNT, J.F., DUNLOP, R.W., ERICKSON, K.L. & WELLS, R.J. (1982). *Aust. J. Chem.*, 35, 145.
198. ENOKI, N., ISHIDA, R., URANO, S., OCHI, M., TLKOROYAMA, T. & MATSUMOTO, T. (1982). *Chem. Lett.*, 1837.
199. De ROSA, S., De STEFANO, S. & ZAVODNIK, N. (1986). *Phytochemistry*, 25(9), 2179.
200. FAULKNER, D.J., RAVI, B.N., FINER, J. & CLARDY, J. (1977). *Phytochemistry*, 16, 991
201. TEIXEIRA, V.L., ALMEIDA, S.A.S., KELECOM, A. (1990). *Biochem. Syst. Ecol.*, 18(2/3), 87.
202. FENICAL, W. (1978) in *Marine Natural Products: Chemical and biological perspectives* (Scheuer, P., ed), p.173, vol. II, Academic Press, New York.
203. KAJIWARA, T., KODAMA, K., HATANAKA, A. (1980). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46(6), 771.
204. ZUCHER, von R.F. (1963). *Helvetica Chimica Acta*, 46(6), 2055.
205. BUDZIKIEWICZ, H., DJERASSI, C., WILLIAMS, D.H. (1964). in *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry: Steroids, terpenoids, sugars, and miscellaneous classes* HoldenDay, Inc., San Francisco.

206. BUDZIKIEWICZ, H. (1971). in. **Biochemical Applications of Mass Spectrometry** (Walter, G.R., ed.), p.251, Wiley-Interscience, New York.
207. WYLLIE, S.G. & DJERASSI, C. (1968). **J. Org. Chem.**, **33**(1), 305.
208. PEREIRA, R.G., ALMEIDA, S.A.S., KELECOM, A. & TEIXEIRA, V.L. (1989). **Congresso Brasil-China**, dez., Rio de Janeiro.
209. SOERENSEN, T. (1948). **K. Danske Vidensk. Selsk.** **5**, 1.
210. HRUBY, T. (1975). **J. Ecol.** **63**, 881.
211. FLEURY, B.G., TEIXEIRA, V.L., KELECOM, A. (1990). **Insula**, no prelo.
212. AMICO, V., GIACCONE, G., PITTELLI, M., RUBERTO, G. (1988). **Phytochemistry**, **27**(4), 1069.
213. AMICO, V., GUNSOLO, F., NERI, P., PIATTELLI, M., RUBERTO, G. (1988). **Phytochemistry**, **27**(5), 1327.
214. AMICO, V., PIATTELLI, M., NERI, P., RUBERTO, G., MAYOL, L. (1986). **Tetrahedron**, **42**(21), 6015.
215. AMICO, V., ORIENTE, G., NERI, P., PIATTELLI, M., RUBERTO, G. (1987). **Phytochemistry**, **26**(6), 1715.
216. AMICO, V., PIATTELLI, M., GUNSOLO, F., NERI, P., RUBERTO, G. (1989). **J. Nat. Prod.**, **52**(5), 962.
217. AMICO, V., GUNSOLO, F., PIATTELLI, M., RUBERTO, G., FRONCZEK, F. R. (1984). **Tetrahedron**, **40** (10), 1721.
218. BANAIGS, B., FRANCISCO, C., GONZALEZ, E., FENICAL, W. (1983). **Tetrahedron**, **39**(4), 629.

219. FRANCISCO, C., BANAIGS, B., CODOMIER, L., CAVE, A. (1985).  
**Tetrahedron Lett.**, 26(40), 4919.
220. AMICO, V., PIATTELLI, M., CUSOLO, F., NERI, P., RUBERTO, G.  
(1988). **Gazz. Chim. Ital.**, 118(3), 193.
221. AMICO, V., PIATTELLI, M., NERI, P., RUBERTO, G. (1989). **Gazz.  
Chim. Ital.**, 119, 467.
222. AMICO, V., CUNSOLO, F., ORIENTE, G., PIATTELLI, M., RUBERTO,  
G. (1984). **J. Nat. Prod.**, 47(6), 947.
- 223a. AMICO, V., PIATTELLI, M., CUNSOLO, F., RUBERTO, G., BRUNO, G.  
(1988). **Acta Cryst.**, C44, 686.
- 223b. FRANCISCO, C., BANAIGS, B., VALLS, R., CODOMIER, L (1985).  
**Tetrahedron Lett.**, 26(22), 2629.
224. AMICO, V., NERI, P., PIATTELLI, M., RUBERTO, G. (1987).  
**Phytochemistry**, 26(9), 2637.
225. FATTORUSSO, E., MAGNO, S., MAYOL, L, SANTACROCE, C., SICA,  
D., AMICO, V., ORIENTE, G., PIATTELLI, M., TRINGALI, C.  
(1976). **Tetrahedron Lett.**, (12), 937.
226. AMICO, V., ORIENTE, G., PIATTELLI, M., RUBERTO, G., TRINGALI,  
C. (1981). **Phytochemistry**, 20(5), 1085.
227. AMICO, V., ORIENTE, G., PIATTELLI, M., RUBERTO, G., TRINGALI,  
C. (1980). **Phytochemistry**, 19, 2759.
228. COMBAUT, G., FRANCISCO, C., PIOVETTI, L, GONZALEZ, E., TESTE,  
J., CODOMIER, L, (1980). **Bull. Soc. Chim. Belg.**, 89(12),  
1063.
229. BANAIGS, B., MARCOS, B., FRANCISCO, C., GONZALEZ, E.,

- FENICAL, W. (1983). *Phytochemistry*, 22(12), 2865.
230. BANAIGS, B., FRANCISCO, C., GONZALEZ, E., CODOMIER, L,  
FENICAL, W. (1982). *Tetrahedron Lett.*, 23(32), 3271.
231. FRANCISCO, C., COMBAUT, G., TESTE, J., PROST, M. (1978).  
*Phytochemistry*, 17, 1003.
232. AMICO, V., ORIENTE, G., PIATTELLI, M., RUBERTO, G., TRINGALI,  
C. (1982). *J. Chem. Research (S)*, 262.
233. AMICO, V., ORIENTE, G., PIATTELLI, M., RUBERTO, G., TRINGALI,  
C. (1982). *Phytochemistry*, 21(2), 421.
234. AMICO, V., ORIENTE, G., PIATTELLI, M., RUBERTO, G. (1983).  
*Gazz. Chim. Ital.*, 113, 217.
- 235a. AMICO, V., PIATTELLI, M., NERI, P., RUBERTO, G. (1988). *J.*  
*Nat. Prod.*, 51(1), 191.
- 235b. ROBERTS, M. (1978). in *Modern Approaches to the Taxonomy of*  
*Red and Brown Algae* (Irvine, D.E.G. & Price, J.H., eds.),  
p.399, Academic Press, New York.
236. AMICO, V., CUNSOLO, F., PIATTELLI, M., RUBERTO, G. (1985).  
*Phytochemistry*, 24(5), 1047.
237. AMICO, V., PIATTELLI, M., CUNSOLO, F., RECUPERO, M., RUBERTO,  
G. (1990). *Gazz. Chim. Ital.*, 120, 9.
238. AMICO, V., PIATTELLI, M., NERI, P., RUBERTO, G. (1990). *J.*  
*Nat. Prod.*, 53(2), 517.
239. GIACCONE, G. & BRUNI, A. (1971). *Ann. Univ. Ferrara (N.S.)*  
*Sez. IV-Bot.*, 4(3), 45.
240. TEIXEIRA, V.L. (1990). *O uso de carotenóides como marcadores*

**quimiotaxonômicos e filogenéticos de algas. Tese de doutorado, IQ, USP.**

241. RAGAN, M.A. & JENSEN,A. (1977). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 30, 209.
242. STEINBERG, P.D. (1988). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 120, 221.
243. GROB, K. (1986a). **Classical split and splitless injection in capillary GC.** Heidelberg, Huethig, 324p.
244. VIEIRA, S. (1989) in **Introdução à Bioestatística** (Campus Ltda., ed.), 293p.