

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

PRODUTOS NATURAIS DE ALGAS PARDAS DA DIVISÃO
PHAEOPHYTA E SEU USO EM TAXONOMIA

por

LIANE FRANCO PITOMBO

1991

R. J. - BRASIL

PRODUTOS NATURAIS DE ALGAS PARDAS DA DIVISÃO
PHAEOPHYTA E SEU USO EM TAXONOMIA

por

LIANE FRANCO PITOMBO

Tese apresentada como um
requisito para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências,
junto ao Curso de Pós-graduação
em Química Orgânica da
Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro (UFRRJ).

1991

R. J. - BRASIL

PRODUTOS NATURAIS DE ALGAS PARDAS DA DIVISÃO
PHAEOPHYTA E SEU USO EM TAXONOMIA

Liane Franco Pitombo

Tese submetida à banca examinadora da Universidad
Federal Rural do Rio de Janeiro como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

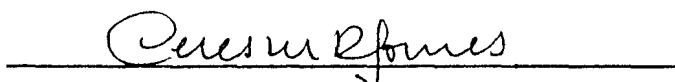
Tese aprovada em 10 de Setembro de 1991.



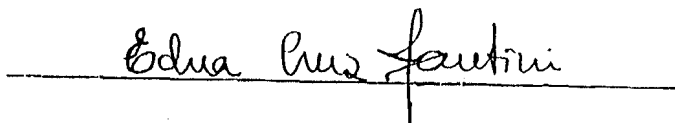
Prof. Alphonse Kelecom (UFF)

AUSENTE

Prof. Otto R. Gottlieb (USP)



Profa. Ceres Maria R. Gomes (UFRRJ)



Profa. Edna Cruz Fantini (UFRRJ)

Seropédica - R. J.

Brasil

Este trabalho foi realizado sob a orientação do Dr. Alphonse Kelecom e co-orientação da Dra. Valéria Laneuville Teixeira, ambos do Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal Fluminense - UFF.

FICHA CATALOGRAFICA:

PITOMBO, Liane Franco

Produtos Naturais de Algas Pardas da
Divisão Phaeophyta e seu Uso em Taxonomia. Rio de
Janeiro; UFRRJ; CPGQO - 1991.

xxv, 230 f.

Tese: Mestre em Ciências (Química Orgânica)

1. Algas pardas 2. Guaianos prenilados

3. Fitogeografia 4. Feromônios sexuais

I. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro -
CPGQO. II. Título.

"Deep within our souls is a place of peace and love, where there is no hate, no war, no competition. This is our true homeland - our sanctuary of the heart."

Ernie Watts.

God grant me the serenity to accept the things I can not change, the courage to change the things I can, and wisdom to know the difference.....

AGRADECIMENTOS:

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que tenham, direta ou indiretamente participado da minha vida durante o curso de Mestrado. Não vou destacar nomes, pois quando o fazemos acabamos omitindo alguém importante. Aqueles que se incluem na lista das pessoas "especiais" sabem que vão estar sempre no meu coração. Obrigada por tudo, eu amo muito vocês!!!

RESUMO:

A divisão Phaeophyta caracteriza-se pela produção de substâncias voláteis que atuam como feromônios sexuais e seu uso como marcadores taxonômicos potenciais tem sido sugerido. Por outro lado, dentre os representantes desta divisão, os gêneros *Dictyota*, *Diolophus*, *Glossophota*, *Pachydictyon*, *Stoechospermus* e *Spatoglossum* (Dictyotaceae) têm exibido uma grande variedade de diterpenos, os quais se revelaram bons marcadores taxonômicos. Entre eles, os guaianos prenilados mostraram ampla distribuição geográfica, tendo sido observados em praticamente todos os mares do mundo, faltando, no entanto, dados relativos ao oceano Atlântico.

O presente trabalho analisou o uso dos feromônios sexuais como marcadores quimiotaxonômicos e filogenéticos da divisão Phaeophyta, a distribuição geográfica dos guaianos prenilados das Dictyotaceae, bem como a sugerida sinonímia entre *Dictyota mertensii* e *D. Dentata* através do estudo fitoquímico de seus diterpenos. Para análise taxonômica foram calculados índices taxonômicos que caracterizam um dado táxon por sua composição química. Para o estudo fitoquímico foram empregados os métodos usuais de extração, isolamento e purificação de produtos naturais. Os diterpenos e demais substâncias isoladas foram identificadas com o auxílio de métodos espectroscópicos e comparados com dados da literatura.

ABSTRACT:

The Phaeophyta division is characterized by the production of volatile substances, that actuate as sexual pheromones and their use as taxonomic markers has been suggested. Among the genera of this division *Dictyota*, *Diplophus*, *Glossophora*, *Pachydictyon*, *Stoechospermum* and *Spatoglossum* (Dictyotaceae) have shown a large variety of diterpenes that appeared to be good taxonomic markers in an early study. Among them, the prenylated guaianes exhibit large geographic distribution, and they have been observed around the world, however, there is no data related to Atlantic ocean.

The present work objectives the analysis and the use of sexual pheromones as chemotaxonomic and phylogenetic markers of Phaeophyta division, the geographic distribution of prenylated guaianes in Dictyotaceae and the synonymy between *Dictyota mertensii* and *D. dentata* by phytochemical studies of its terpenes. For taxonomic analysis were used the statistic techniques that characterize a taxon by its own chemical composition. For phytochemical study were employed the usual techniques of extraction, isolation and purification of natural products. The isolated diterpenes and others substances were identified by spectroscopic methods, and compared with literature data.

LISTA DE ABREVIATURAS:

AcOEt - Acetato de Etila

MeOH - Metanol

IV - Infra-vermelho

λ - Comprimento de onda (λ)

cm^{-1} - Centímetros recíprocos

UV - Ultra-violeta

RMN^1H - Ressonância Magnética Nuclear Protônica (Hidrogênio)

RMN^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

MHz - Megahertz

TMS - Tetrametilsilano

ppm - Parte por milhão

δ - Deslocamento químico (δ)

EM - Espectro de Massas

V/V - Volume a volume

nm - Nanômetros

IO - Índice de Oxidação

IE - Índice de Esqueleto

$\overline{\text{AEO}}$ - Média dos índices de oxidação

$\overline{\text{AEE}}$ - Média dos índices de esqueleto

$\text{N}^\circ =$ - Número de ligações duplas

$\text{N}^\circ \text{C}$ - Número de Carbonos

mp - muito pequeno

TLC - Cromatografia em camada delgada.

CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

FICHA CATALOGRÁFICA.....	1
DEDICATÓRIA.....	11
AGRADECIMENTOS.....	111
RESUMO.....	1v
ABSTRACT.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	x
INDICE DE TABELAS.....	xv
INDICE DE ESQUEMAS.....	xviii
INDICE DE MAPAS.....	xx
INDICE DE ESPECTROS.....	xxi
APENDICE.....	xxv
I. INTRODUÇÃO.....	1
I. A. ASPECTOS BIOLÓGICOS.....	9
I. A. 1. REPRODUÇÃO.....	9
I. B. FILOGENIA.....	13
I. C. ASPECTOS QUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS.....	17
I. D. OBJETIVOS.....	31
II. FEROMÓNIOS SEXUAIS DE ALGAS PARDAS.....	34
II. A. ASPECTOS BIOLÓGICOS.....	35

II. B. ASPECTOS QUÍMICOS.	38
II. B. 1. RECONHECIMENTO DO FEROMÔNIO.	39
II. B. 2. ISOLAMENTO E SÍNTESE DOS FEROMÔNIOS SEXUAIS.	43
II. C. BIOSÍNTESE.	49
II. D. MÉTODOS.	58
II. E. PROPOSTA BIOSINTÉTICA PARA OS FEROMÔNIOS SEXUAIS DE ALGAS PARDAS.	66
II. F. ASPECTOS FILOGENÉTICOS.	70
III. DITERPENOS DA ORDEM DICTYOTALES.	98
III. A. GUAIANOS PRENILADOS DA FAMÍLIA DICTYOTACEAE.	113
III. A. 1. CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESQUELETO GUAIANO PRENILADO.	118
III. B. MÉTODOS.	120
III. C. PROPOSTA BIOSINTÉTICA PARA OS GUAIANOS PRENILADOS DA FAMÍLIA DICTYOTACEAE.	121
III. D. PADRÕES DE OXIDAÇÃO E ÍNDICES TAXONÔMICOS.	123
III. E. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.	124
IV. O USO DE DITERPENOS PARA O ESTABELECIMENTO DA SINONÍMIA ENTRE <i>Dictyota mertensii</i> E <i>D. dentata</i>	140
IV. A. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO <i>Dictyota</i> LAMOUROUX.	140
IV. B. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE <i>D. mertensii</i> E	

<i>D. dentata</i>	143
IV. B. 1. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>D. mertensii</i>	145
IV. C. EXPERIMENTAL.....	150
IV. C. 1. LOCAL DE COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ALGA.....	150
IV. C. 2. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DA ALGA.....	152
IV. C. 2a. FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXANICO.....	152
IV. C. 2b. FRACIONAMENTO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA.....	153
IV. C. 2c. FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO.....	156
IV. C. 2d. FRACIONAMENTO DO EXTRATO ACETÓNICO.....	158
IV. D. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES ISOLADOS DA ALGA.....	160
IV. D. 1. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTANCIA I.....	161
IV. D. 2. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTANCIAS II, III, IV, V, VII E VIII.....	161
IV. D. 3. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTANCIA VI.....	170
IV. D. 4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTANCIA IX.....	183
IV. D. 5. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTANCIA X.....	193
IV. D. 6. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTANCIA XI.....	199
IV. D. 7. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTANCIA XII.....	204
IV. D. 8. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTANCIA XIII.....	210
IV. D. 9. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTANCIA XIV... ..	213
IV. E. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	220
IV. F. CONCLUSÕES.....	221
V. MATERIAL E METODOS.....	224
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	234

FIGURA 1: Principais tipos de células móveis presentes nas Phaeophyta (segundo BOLD & WYNNE,1978)..... 12

FIGURA 2: Árvore filogenética vegetal, onde são indicadas as possíveis relações entre as diversas Divisões e Classes algais (segundo DAWES,1986)..... 16

FIGURA 3: Estruturas dos feromônios sexuais observados em algas pardas..... 41

FIGURA 4: Esquema hipotético de polarização da molécula mediante a aproximação do gameta receptor..... 42

FIGURA 5: Aparato utilizado para extração e isolamento dos feromônios sexuais de algas pardas (segundo BOLAND,et al.;1984)..... 47

FIGURA 6: Esquema sintético de Fucoserrateno (1) e do Ectocarpeno (13).....	48
FIGURA 7: Biogênese de hidrocarbonetos C ₈ e C ₁₁ , em Phaeophyta (segundo JAENICKE,1977).....	51
FIGURA 8: Proposta do mecanismo Oxigenase/Descarboxilase para a formação de hidrocarbonetos vinílicos (JAENICKE,1984).....	52
FIGURA 9: Experimentos feitos com ácidos graxos marcados isotopicamente e administrados em <i>Senecio isatideus</i> (BOLAND & MERTES,1985)(33).....	56
FIGURA 10: Comparação entre o curso estereoquímico da Lipoxigenase da planta (LO) e da formação dos feromônios através de processo enzimático (BOLAND & MERTES,1985)(33).....	57
FIGURA 11: Esquema evolutivo da Divisão Phaeophyta, segundo CHAPMAN & CHAPMAN (1981), adaptada às substâncias ativas do bouquet (feromônios sexuais).....	75
FIGURA 12: Esquema evolutivo da Divisão Phaeophyta, segundo CHAPMAN & CHAPMAN (1981), adaptada a todos os feromônios sexuais e subprodutos do bouquet.....	76

FIGURA 13: Afinidades filogenéticas da Divisão Phaeophyta (SCAGEL,1966 & NAKAMURA,1972; IN 320), onde se encontram incluídas as substâncias ativas do bouquet (feromônios sexuais).....	77
FIGURA 14: Afinidades filogenéticas da Divisão Phaeophyta (SCAGEL,1966 & NAKAMURA,1972; IN 320), onde se encontram incluídas todas as estruturas dos feromônios sexuais e subprodutos do bouquet.....	78
FIGURA 15: Feromônios sexuais de algas pardas, Índice de Oxidação (IO) x Índice de Esqueleto (IE).....	86
FIGURA 16: Hidrocarbonetos de algas pardas, Índice de Oxidação (IO) x Índice de Esqueleto (IE).....	87
FIGURA 17: Feromônios sexuais de algas pardas, I.O./I.E. x $N^{\circ}=N^{\circ}C$	88
FIGURA 18: Hidrocarbonetos de algas pardas, I.O./I.E. x $N^{\circ}=N^{\circ}C$	89
FIGURA 19: Feromônios sexuais de algas pardas (ordens), AEo x AEe	90
FIGURA 20: Feromônios sexuais de algas pardas (ordens); AEo x	

AEe (incluindo produtos-traço).....	91
FIGURA 21: Feromônios sexuais de algas pardas (ordens); AEo/AEe x N°=N°C (hidrocarb. ativos).....	92
FIGURA 22: Feromônios sexuais de algas pardas (ordens); AEo/AEe x N°=N°C (incluindo produtos-traço).....	93
FIGURA 23: Hidrocarbonetos de algas pardas; AEo/AEe x N°=N°C	94
FIGURA 24: Feromônios sexuais (incluindo sub-produtos) e hidrocarbonetos de algas pardas; I.O. x I.E.	95
FIGURA 25: Esqueleto do Azuleno (123).....	119
FIGURA 26: Numeração do esqueleto Guaiano Prenilado, segundo a literatura.....	119
FIGURA 27: Proposta biossintética dos Guaianos Prenilados observados na família Dictyotaceae (Phaeophyta).....	122
FIGURA 28: Percentagens de ocorrência do esqueleto Guaiano Prenilado nos oceanos Pacífico (P), Atlântico (A) e Mar Mediterrâneo (M).....	134

FIGURA 29: Formação das 4 regiões tropicais recentes (linhas mais grossas) pela separação da flora e fauna do Tethys 139

FIGURA 30: *Dictyota dentata*..... 144

FIGURA 31: Guaianos Prenilados isolados de *Dictyota dentata* 144

FIGURA 32: Fracionamento progressivo da Pangea ou massa continental primitiva, onde são indicadas as épocas a que se referem as diferentes reconstruções hipotéticas e sua antiguidade em relação aos tempos atuais (MARGALEF,1978) 223

TABELA I: Relação das espécies de Phaeophyta e os feromônios sexuais estudados..... 80

TABELA II: Feromônios sexuais, subprodutos do bouquet e outros hidrocarbonetos isolados de algas pardas, incluindo os valores de Índice de Oxidação (IO) e Índice de Esqueleto (IE) 83

TABELA III: Índices taxonômicos para as ordens de algas pardas..... 85

TABELA IV: Esqueletos diterpênicos do Grupo 1, observados na família Dictyotaceae..... 108

TABELA V: Esqueletos diterpênicos do Grupo 2, observados na família Dictyotaceae..... 109

TABELA VI: Esqueletos diterpênicos do Grupo 3, observados na família Dictyotaceae..... 111

TABELA VII: Guaianos Prenilados observados entre as Dictyotaceae, algas onde ocorrem e locais onde foram

coletadas.....	126
TABELA VIII: Guaianos Prenilados observados em cada uma das espécies de algas pardas estudadas, e os respectivos valores de Índice de Oxidação (IO) e Índice de Esqueleto (IE)	130
TABELA IX: Absorções observadas nos espectros no I.V. das Substâncias II, III, IV, V, VII e VIII.....	162
TABELA X: Interpretação dos dados espectrias no I.V. da Substância VI.....	171
TABELA XI: Número de CH ₃ , CH ₂ , CH e C obtidas a partir das interpretações do espectro de RMN ¹³ C de VI (6).....	172
TABELA XII: Comparação dos dados de RMN ¹ H (ESPECTRO 8) da Substância VI com a literatura (7).....	173
TABELA XIII: Sinais do espectro de RMN ¹³ C (ESPECTRO 10) comparados com dados da literatura (7).....	177
TABELA XIV: Definição do número de CH ₃ , CH ₂ , CH e C da Substância IX a partir dos dados fornecidos pelo espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50.3 MHz, δ - ESPECTRO 13).....	189

TABELA XV: Interpretação dos dados fornecidos pelo espectro de I.V. da Substância IX (ESPECTRO 14).....	189
TABELA XVI: Comparação dos dados de RMN ¹³ C de IX (ESPECTRO 13) com padrões da literatura (326,327).....	192
TABELA XVII: Deslocamentos químicos dos carbonos da Substância X.....	198
TABELA XVIII: Comparação dos dados experimentais obtidos a partir do espectro de RMN ¹ H (ESPECTRO 28) com informações da literatura (115,239).....	214
TABELA XIX: Comparação dos dados experimentais obtidos a partir do espectro de RMN ¹³ C (ESPECTRO 29) com informações da literatura (65,72).....	215

ESQUEMA I: Ciclo de vida das algas pardas pertencentes à Divisão Phaeophyta (segundo BOLD & WYNNE,1978).....	12
ESQUEMA II: Proposta biossintética para todos os feromónios sexuais de algas pardas e seus subprodutos.....	69
ESQUEMA III: Proposta biossintética dos esqueletos diterpênicos do Grupo 1 (segundo TEIXEIRA & KELECOM,1988).....	103
ESQUEMA IV: Proposta biossintética dos esqueletos diterpênicos do Grupo 2 (segundo TEIXEIRA & KELECOM,1988).....	104
ESQUEMA V: Proposta biossintética dos esqueletos diterpênicos do Grupo 3 (segundo TEIXEIRA & KELECOM,1988).....	105
ESQUEMA VI: Fracionamento do Extrato Bruto Hexânico de <i>D. mertensii</i>	154
ESQUEMA VII: Fracionamento do Extrato Bruto de Acetato de Etila.....	155

ESQUEMA VIII: Fracionamento do Extrato Metanólico Bruto de <i>D. mertensii</i>	157
ESQUEMA IX: Fracionamento do Extrato Acetônico Bruto (nova extração).....	159
ESQUEMA X: Ions (fragmentos) observados em E.M. para a Substância VI.....	179

MAPA I: Distribuição geográfica de todos os Guaianos Prenilados observados entre as Dictyotaceae e seus respectivos valores de Índice de Oxidação (IO).....	135
MAPA II: Distribuição geográfica do gênero <i>Dictyota</i> Lamouroux.....	142
MAPA III: Distribuição geográfica de <i>Dictyota mertensii</i> em águas brasileiras (segundo OLIVEIRA FILHO,1978).....	146
MAPA IV: Distribuição geográfica da alga <i>Dictyota mertensii</i> na costa oeste do continente africano (segundo PRICE,et al.;1978).....	147
MAPA V: Distribuição de <i>Dictyota dentata</i> na região do Caribe e Golfo do México.....	148
MAPA VI: Distribuição geográfica de <i>Dictyota dentata</i> (segundo TAYLOR,1955).....	149
MAPA VII: Localização geográfica das áreas de coleta de <i>Dictyota mertensii</i>	151

ESPECTRO 1: Espectro em RMN ^1H (60 MHz) da Substância I, em CCl_4 e TMS como referência interna (* bandas laterais)	163
ESPECTRO 2: Espectro no I.V. (filme) da Substância II	164
ESPECTRO 3: Espectro no I.V. (filme) da Substância III	165
ESPECTRO 4: Espectro no I.V. (filme) da Substância IV	166
ESPECTRO 5: Espectro no I.V. (filme) da Substância V	167
ESPECTRO 6: Espectro no I.V. (filme) da Substância VII	168
ESPECTRO 7: Espectro no I.V. (pastilha de KBr) da Substância VIII.....	169
ESPECTRO 8: Espectro de RMN ^1H (250 MHz) da Substância VI	

tendo como solvente CCl_4 e TMS como referência interna.....	174
ESPECTRO 9: Espectro no I.V. (filme) da Substância VI	175
ESPECTRO 10: Espectro de RMN ^{13}C (62.5 MHz) da Substância VI tendo como solvente CDCl_3 , incluindo DEPT.....	176
ESPECTRO 11: Ions fragmentários do espectro de massas da Substância VI.....	182
ESPECTRO 12: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) em CCl_4 da Substância IX tendo o TMS como referência interna.....	184
ESPECTRO 13: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz) incluindo DEPT 90° e 135° da Substância IX.....	185
ESPECTRO 14: Espectro no I.V. (filme) da Substância IX....	186
ESPECTRO 15: Espectro de Massas da Substância IX; principais ions fragmentários e percentagens.....	187
ESPECTRO 16: Espectro no U.V.(em metanol) da Substância IX	188

ESPECTRO 17: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) em CCl_4 da Substância X.....	195
ESPECTRO 18: Espectro no I.V. (filme) da Substância X	196
ESPECTRO 19: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz) em CDCl_3 da Substância X.....	197
ESPECTRO 20: Espectro no I.V. (filme) da Substância XI	200
ESPECTRO 21: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) em CCl_4 da Substância XI, tendo o TMS como referência interna.....	201
ESPECTRO 22: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz) em CDCl_3 da Substância XI.....	202
ESPECTRO 23: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) da Substância XII, tendo o TMS como referência interna.....	207
ESPECTRO 24: Espectro de Massas contendo os principais ions observados para a Substância XIII.....	208
ESPECTRO 25: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) da Substância XIII, tendo o TMS como referência interna.....	211

ESPECTRO 26: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz) da Substância XIII, contendo DEPT θ 90° e 135°	212
ESPECTRO 27: Espectro no U.V. (em metanol) da Substância XIV	216
ESPECTRO 28: Espectro de RMN ^1H (100 MHz) da Substância XIV, tendo o TMS como referência interna.....	217
ESPECTRO 29: Espectro de RMN ^{13}C (25 MHz) em CDCl_3 da Substância XIV.....	218

APÊNDICE:

No texto, algumas designações foram escritas com base na literatura, cujas origens estão vinculadas a nomes científicos de algas, outros organismos marinhos (gêneros ou espécies), ou mesmo locais de coleta. Algumas dessas palavras não encontram paralelo em nossa língua, por este motivo se encontram abaixo destacadas:

Fucoserrateno

Fusicoccinano

Finavarreno

Chromophycano

Cystophoreno

Dichotomano

Giffordeno

Dictyopterenno

Pachydictyol

..dicty...

Dolabellano

Spatano

Tethys

Stypoldiona

Dilophol

Epoxidilopholona

Occidentalano

Maaliano

I. INTRODUÇÃO

A Divisão Phaeophyta¹ inclui cerca de 250 gêneros de algas pardas, constituindo um total de aproximadamente 1500 espécies (40). Segundo WYNNE & LOISEAUX (1976) formam uma classe única Phaeophyceae, que se divide em 14 ordens. A maior parte de seus membros é litofítica², alguns podem ser endofíticos³ e outros, mais raramente, podem crescer epifiticamente⁴ sobre algumas macrófitas⁵ (104).

1. Divisão que inclui todas as algas pardas.
2. Que se desenvolve no substrato (pedra, areia, etc).
3. Que vive no interior de outro vegetal.
4. Epífita - ser que se desenvolve sobre o talo de outro vegetal, que o suporta fisicamente, mas não nutricionalmente.
5. Macroalga ou vegetal superior macroscópico que habita o meio aquático.

As algas pardas são encontradas quase exclusivamente no habitat marinho, sendo conhecidos apenas 7 gêneros em água doce (*Heribaudiella*, *Pleurocladia*, *Bodanella*, *Pseudobodanella*, *Sphacelaria*, *Lithoderma* e *Rhizocladia*) (20,39,40,164); outras espécies marinhas são observadas em água salobra e constituem parte importante da flora estuarina de todo mundo.

A maioria das algas pardas de grande porte são espécies de águas frias e formam grandes bancos ao longo das costas do Atlântico Norte (*Laminaria*, *Alaria*) e do Pacífico Norte (*Nereocystis*, *Macrocystis*) (57). A ordem Fucales é bem representada em águas frias do hemisfério Sul (Austrália, Tasmânia, Nova Zelândia e África), com alguns gêneros amplamente distribuídos nas regiões intermarés de águas temperadas. Várias algas pardas são encontradas em águas das regiões tropical e sub-tropical, sendo os membros das ordens Dictyotales (*Dictyota*, *Padina*) e Fucales (*Sargassum*, *Cystoseira*) os mais comuns (57). Com relação à costa brasileira, OLIVEIRA FILHO (1977) comenta que "embora as algas pardas apresentem uma diversidade⁶ cerca de 5 vezes menor que a das vermelhas e 2 vezes menor que das verdes, constituem o grupo mais importante em termos de biomassa", e finaliza "na costa Nordeste as Dictyotales formam o grupo mais importante, ao passo que na costa Sudeste o gênero *Sargassum* responde sozinho pela maior parte da biomassa de algas bentônicas".

As Phaeophyta, em geral, possuem alto nível de diferenciação morfológica e anatômica em relação aos demais grupos de algas (104). Não há ocorrência de organismos unicelulares ou coloniais na divisão (184). A estrutura filamentosa é considerada o tipo básico de modelo de crescimento nas algas pardas, a partir da qual se derivam os talos parenquimatoso⁷ e pseudoparenquimatoso⁸ (57).

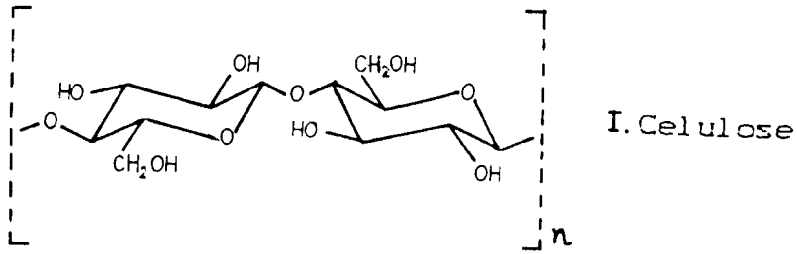
6. Variedade de gêneros ou espécies.

7. Constituído por tecido de células em geral isodiamétricas, vivas, de paredes não muito espessas, com protoplasma apressado a elas e com grande vacuolo central.

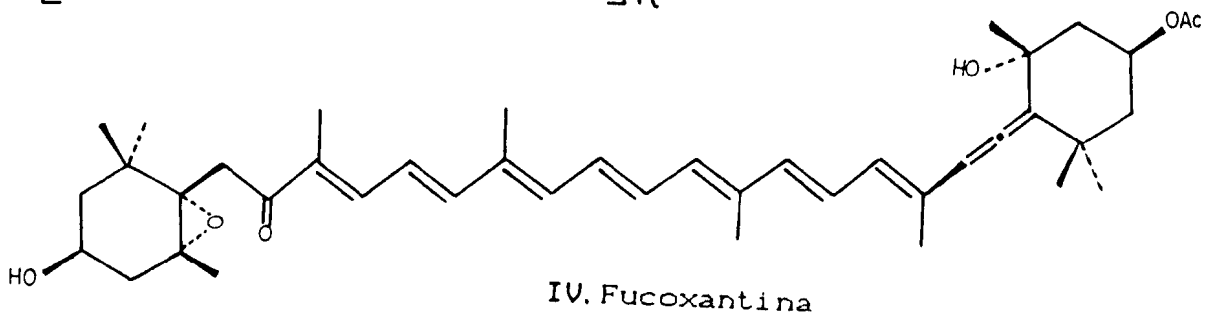
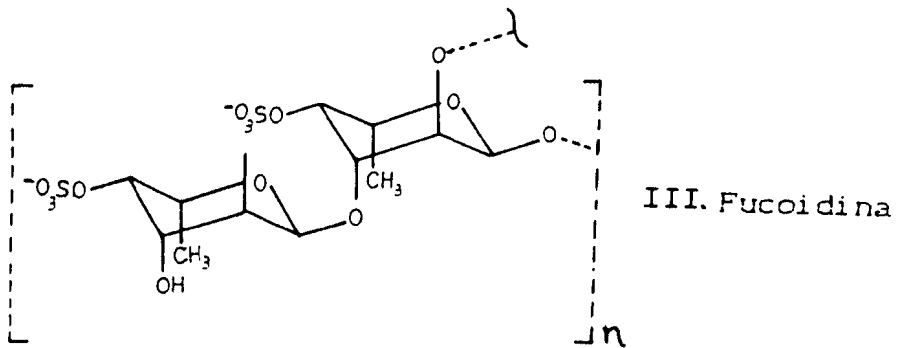
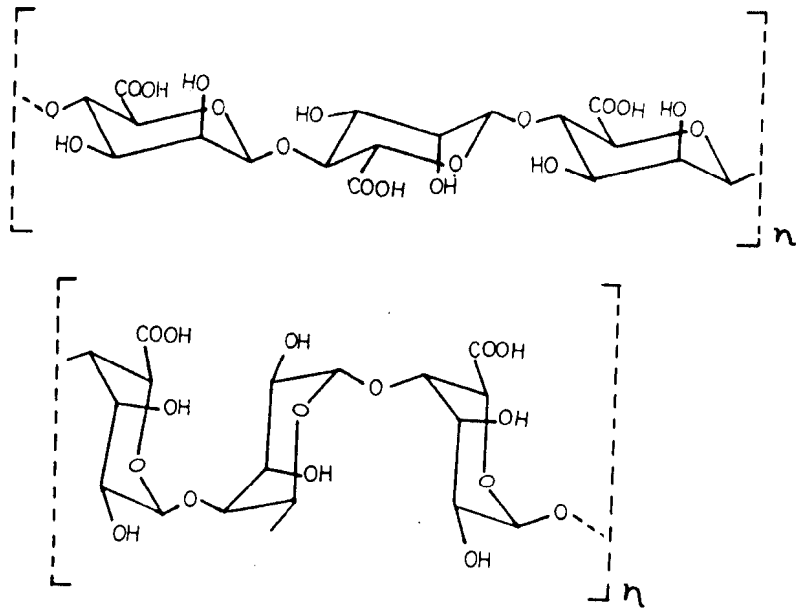
8. Que se assemelha a um tecido ou parênquima.

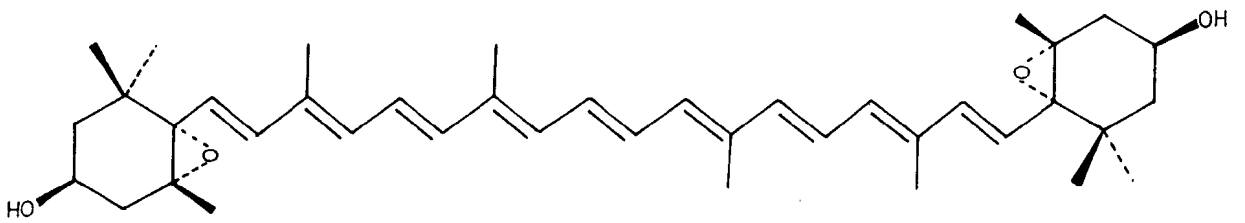
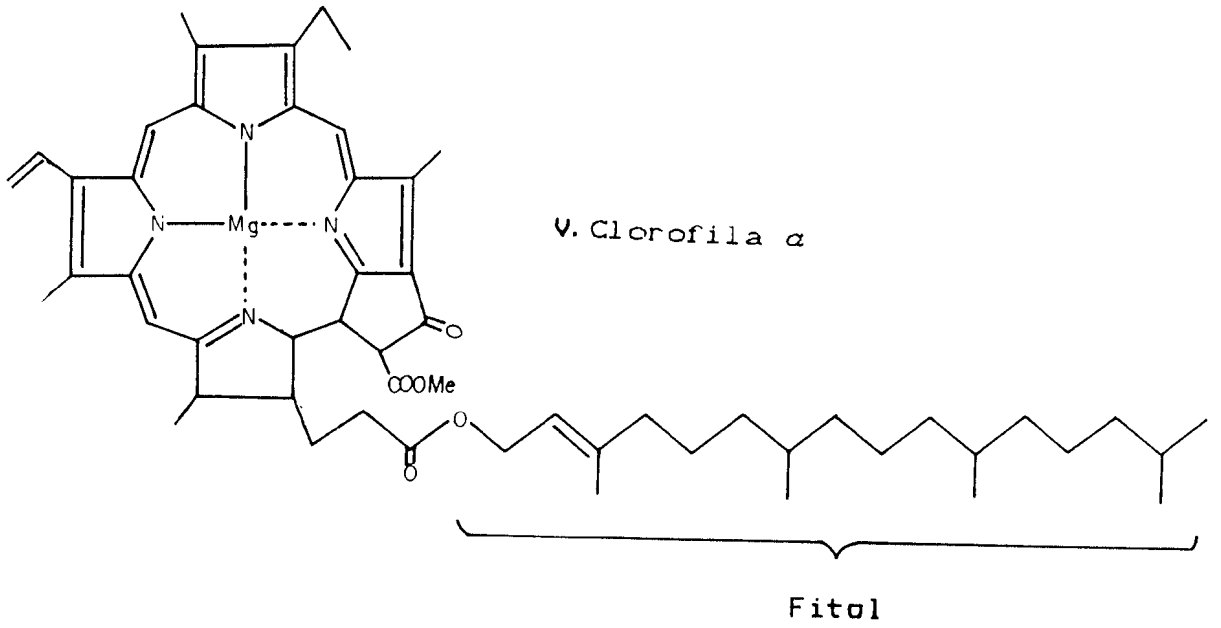
A célula vegetativa das Phaeophyta tem a parede celular diferenciada em uma porção firme, mais interna e uma porção gelatinosa, mais externa (39). O principal constituinte da porção mais interna é a Celulose (I). A porção gelatinosa é constituída por ficocolóides: o Ácido Algínico (II), que confere o aspecto gelatinoso ao talo e a Fucoidina (III) que, por ser hidrofílica previne o ressecamento da alga em períodos ocasionais de exposição ao ar (39). A coloração característica das algas pardas (de verde oliva a marrom escuro) se deve à presença de uma xantofila em particular, a Fucoxantina (IV). Além da fucoxantina, as Phaeophyta contém outros pigmentos como as Clorofilas *a* (V), *c*₁ e *c*₂ (164), xantofilas como Violaxantina (VI), Neoxantina (VII), Diatoxantina (VIII) e Diadinoxantina (IX), e carotenos, destacando-se o β,β -caroteno (X) e o β,ϵ -caroteno (XI) (57).

O amido não é observado como produto final da fotossíntese (39); o material de reserva mais abundante é a Laminarina (XII), bem como o Manitol (XIII), também amplamente distribuído entre as algas pardas. Os lípidios estão presentes em muitos gêneros, especialmente nas ordens Laminariales e Fucales, e o Fucosterol (XIV) é o esteroide mais comumente encontrado (20). A calcificação da parede celular ocorre apenas em algumas espécies de *Padina*, onde o Carbonato de Cálcio (CaCO_3) é depositado sob a forma de cristais de Aragonita em bandas concêntricas na superfície do talo (IN 164). Um grande número de espécies contém amino-ácidos

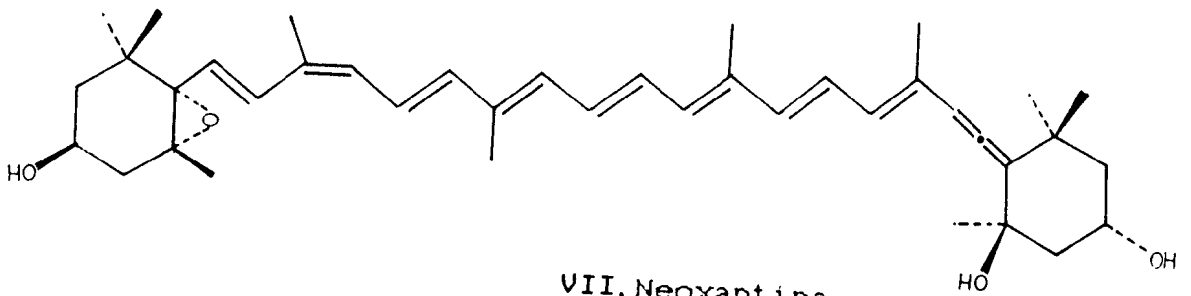


II.
Ácido Algínico

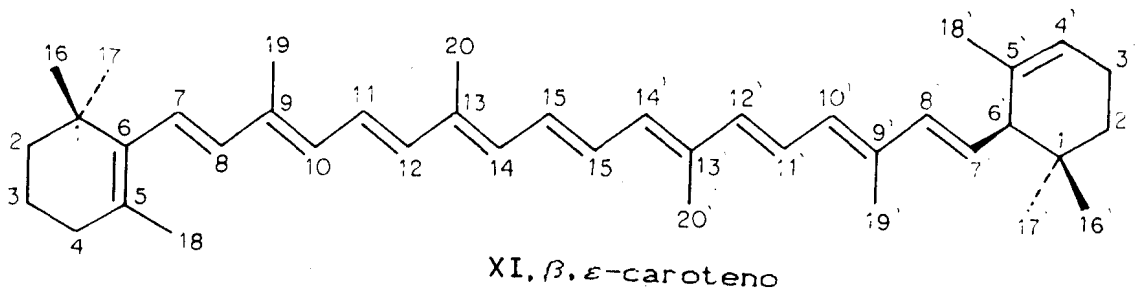
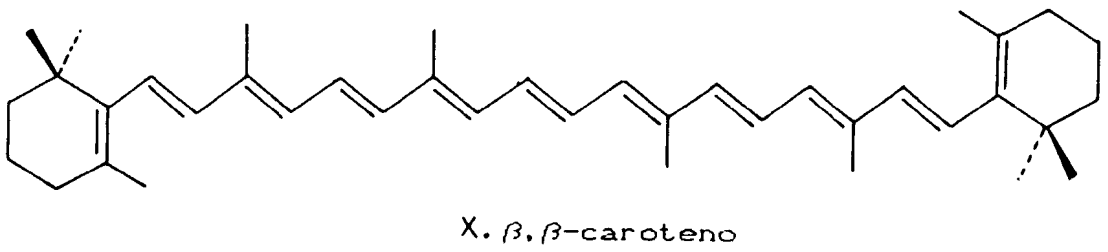
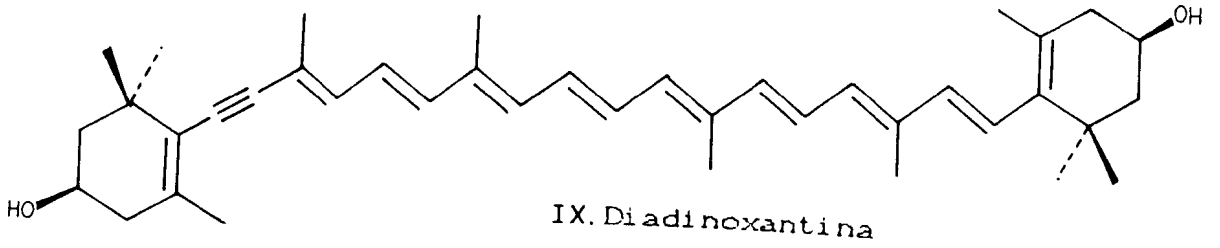
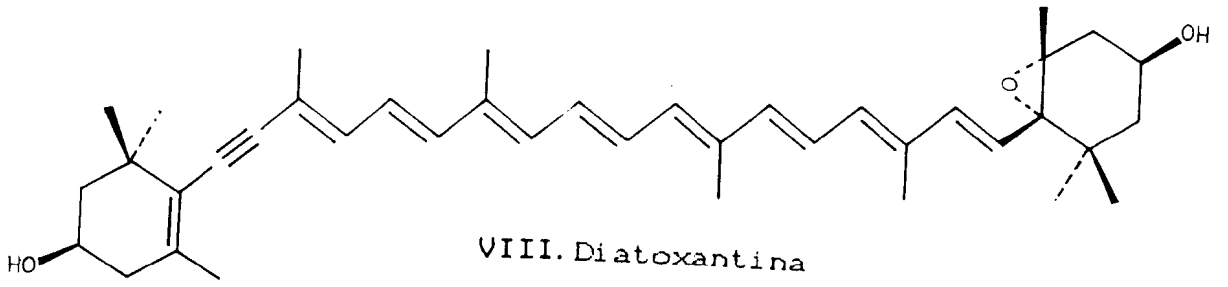


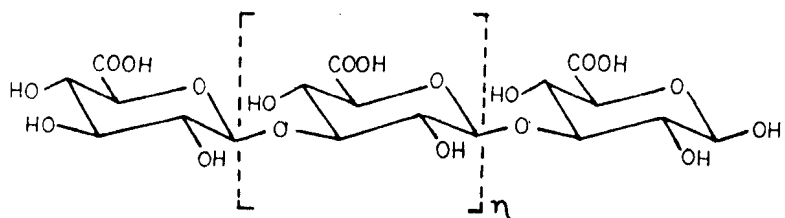


VI. Violaxantina

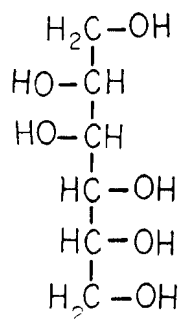


VII. Neoxantina

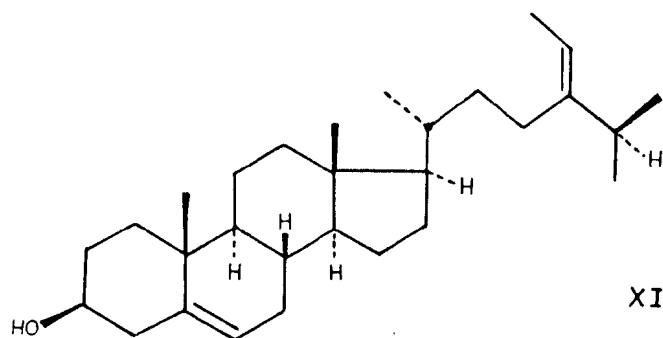




XII.
Laminarina



XIII. Manitol



XIV. Fucosterol

iodados; o Iodo livre, Potássio e alguns outros minerais também ocorrem em muitas algas pardas (20).

I. A. ASPECTOS BIOLÓGICOS

I. A. 1. REPRODUÇÃO

A reprodução assexuada, nas formas mais simples das algas pardas se processa em geral através da produção de zoósporos⁹ ou por fragmentação (104). A reprodução sexuada é caracterizada pela produção de gametas e inclui a isogamia¹⁰ (Ordens Ectocarpales, Chordariales, Dictyosiphonales), a anisogamia¹¹ (Sphacelariales, Cutleriales) e a oogamia¹² (Desmarestiales, Sporochnales, Tilopteridales, Dictyotales, Laminariales, Fucales)(57). Os esporófitos¹³ (diploides) produzem os zoósporos (haploides) que resultam da meiose, e são liberados formando a geração gametofítica. Os gametófitos¹⁴ produzem os gametas, que após a fusão formam o zigoto (ESQUEMA I). As Phaeophyta apresentam 3 tipos de alternância de geração¹⁵ :

a. isomórfico - o esporófito e o gametófito são morfológicamente idênticos, em proporção e tamanho

(Ectocarpales, Cutleriales, Dictyotales).

b. heteromórfico - o esporófito é macroscópico e bem desenvolvido em tamanho, enquanto o gametófito é pequeno ou microscópico e filamentosos (membros da ordem Laminariales).

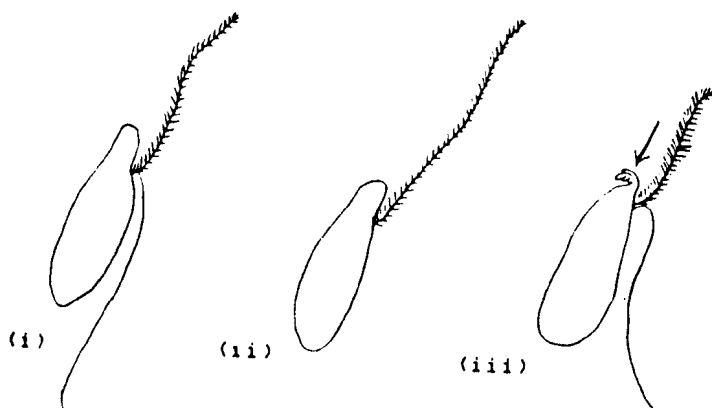
c. diplóntico - não há forma de vida independente na geração gametofítica como nos casos anteriores; o corpo vegetal é o esporófito e a etapa de redução tem lugar durante a formação dos gametas. Todos os membros da ordem Fucales como *Fucus* e *Sargassum* apresentam este tipo de ciclo de vida (104).

9. Célula reprodutiva assexual móvel, que se forma a partir de um organismo imóvel.
10. União sexual de isogametas, que são células destinadas a copular com outras de idênticos caracteres morfológicos.
11. União sexual de anisogametas, em geral denominados gametas (+) e gametas (-); ambos são móveis.
12. Processo de reprodução sexual onde há união de um gameta grande, pesado e imóvel com outro pequeno, móvel, geralmente flagelado ou ciliado, da qual resulta um zigoto.
13. Organismo diplóide capaz de produzir esporos de forma alternada, durante o processo de alternância de gerações.
14. Organismos micro ou macroscópicos responsáveis pela produção de gametas.
15. Processo que consiste na formação alternada de dois tipos de indivíduos: o esporófito e o gametófito.

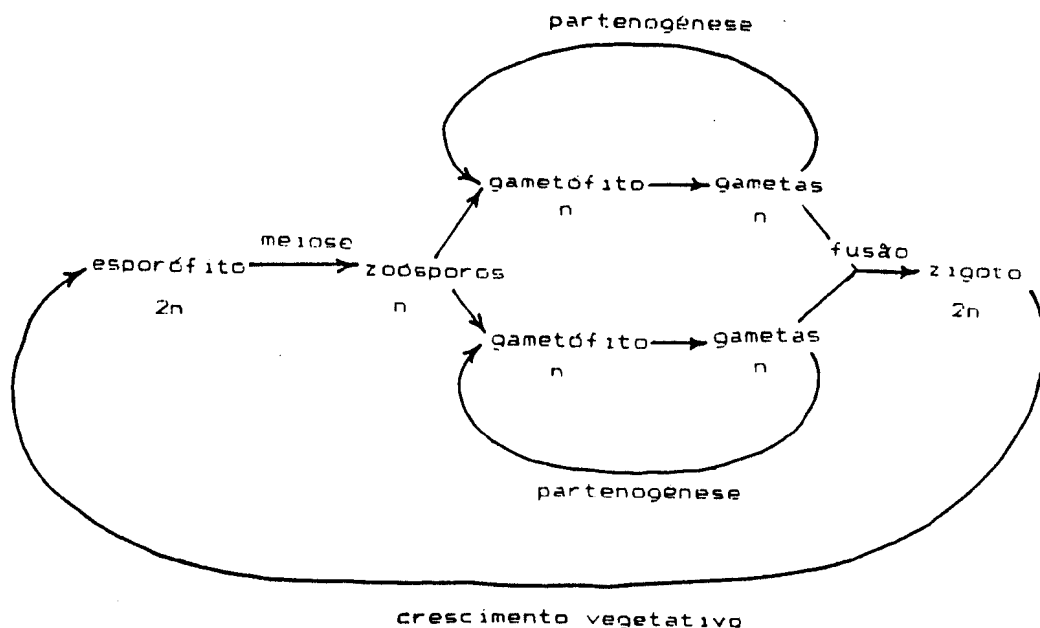
As células reprodutivas móveis (zoósporos e gametas) possuem um par de flagelos, de tamanho e organização diferentes, inseridos lateralmente (FIGURA 1) (40); são encontradas algumas diferenças no que se refere à sua morfologia, mas estas podem ser interpretadas como formas derivadas (57).

Desde a década de 70 muito tem-se estudado sobre a existência de substâncias ativas capazes de atuar na localização e atração dos gametas das algas pardas. Estas substâncias, denominadas feromônios sexuais auxiliam o processo de reconhecimento dos gametas, propiciando a fecundação e possuem importância decisiva no processo reprodutivo deste grupo de algas. Alguns dos pesquisadores dedicados ao estudo dos feromônios das Phaeophyta sugerem que os mesmos talvez possam ser utilizados como marcadores quimiotaxonômicos. No Capítulo II vamos nos deter a um estudo pormenorizado destes feromônios, investigando mais detalhadamente esta possibilidade.

FIGURA 1: Principais tipos de células móveis presentes nas Phaeophyta. (i). Gameta biflagelado típico da maioria das algas pardas; (ii). Célula modificada pela perda de um flagelo, característica da ordem Dictyotales; (iii). Gameta especializado (presença de proboscis - seta), observado na ordem Fucales (segundo BOLD & WYNNE, 1978).



ESQUEMA I: Ciclo de vida das algas pardas pertencentes à Divisão Phaeophyta (segundo BOLD & WYNNE, 1978).



I. B. FILOGENIA

As algas pardas representam um grupo muito antigo do reino vegetal; são conhecidos fósseis que datam da formação do Período Triássico, alguns talvez da Era Paleozóica (250 milhões de anos)(39). Está claro que as Phaeophyceae não foram as responsáveis pela colonização do ambiente terrestre, já que seus pigmentos são adaptados somente às condições do meio aquático.* Contudo, as algas pardas foram capazes de ampliar sua complexidade estrutural e fisiológica, que as destaca em importância no habitat marinho.

Acreditou-se que as Phaeophyceae tivessem sua origem nas algas verdes (Chlorophyta), já que ambas devem possuir um ancestral flagelado comum (20) entretanto, algumas características puseram em dúvida esta possibilidade. Nas Phaeophyceae os flagelos são do tipo heterocôntico¹⁶; a clorofila *b* está ausente; os cromatóforos¹⁷ não possuem lamelas fotossintéticas abundantes, e a estrutura das cristas mitocondriais bem como os produtos de reserva diferem significativamente das algas verdes (20).

*. Filtração através da coluna d'água.

16. Que apresenta flagelos de diferentes tamanhos.

17. Cloroplastos que contêm outros pigmentos, além do verde.

CHRISTENSEN (1964) propôs a separação dos vegetais de acordo com o tipo de pigmentação aparente, distinguindo assim os vegetais de cor predominantemente verde dos demais; segundo o autor as Phaeophyceae pertencem à divisão Chromophyta. O esquema filogenético da FIGURA 2 fornece informações sobre as possíveis relações entre as divisões e classes algais (57). Das formas vivas atuais, as Phaeophyceae parecem apresentar alguma relação apenas com as classes Chrysophyceae, Xantophyceae e Bacillariophyceae, e tais semelhanças se baseiam principalmente nos tipos de material de reserva e nos pigmentos (fotossintéticos e acessórios). No entanto, muitas diferenças estruturais e funcionais distinguem as Phaeophyceae destas classes algais, o que sugere a existência de uma ligação remota entre as mesmas (20).

Neste contexto, uma questão ainda persiste: que tipo de ciclo de vida é o mais primitivo, o isomórfico ou o heteromórfico? Ou alternativamente, se é possível que em algum estágio primitivo de sua história evolutiva, as algas tenham sido haplônticas¹⁸ (51).

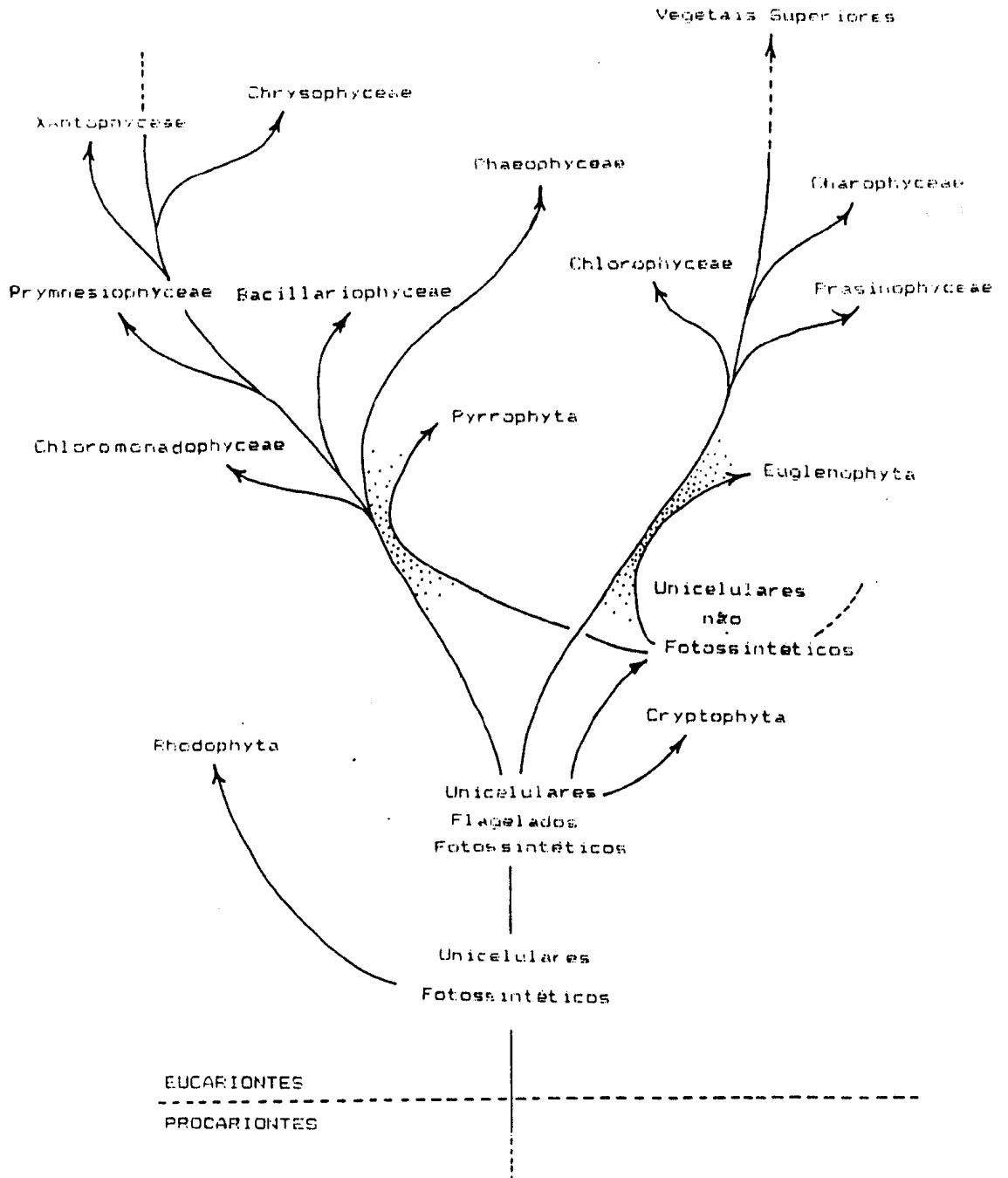
18. Que possui um complemento cromossômico simples (n), constante.

Visões tradicionais sobre a filogenia das Phaeophyta propõem a existência de um ancestral ectocarpóide, com ciclo de vida isomórfico (FRITSCH; PAPENFUSS; IN 51). Evidências recentes sustentam a hipótese das algas pardas terem evoluído a partir de Crisófitas bentônicas marinhas (O'KELLY & FLOYD; IN 51), de talo parenquimatoso (PEDERSEN; IN 51), o que reforça a possibilidade das algas pardas possuírem um ancestral com ciclo de vida do tipo heteromórfico. A este respeito, CLAYTON (1988) afirma que é provável que as linhas isomórfica e heteromórfica tenham divergido muito cedo durante a evolução das algas pardas, e que este processo tenha conduzido às várias ordens conhecidas atualmente. Veremos no CAPÍTULO II que tais considerações, eminentemente biológicas, podem ser essenciais para correta análise dos feromônios sexuais como marcadores taxonômicos ou filogenéticos.

FIGURA 2: Arvore filogenética vegetal, onde são indicadas as possíveis relações entre as diversas Divisões e Classes algais (segundo DAWES, 1986).

Tendências das Xantofilas e das Clorofilas α e c

Tendência das Clorofilas a e b

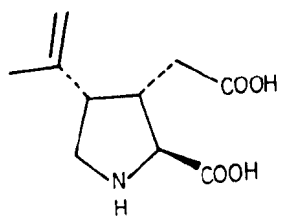


I. C. ASPECTOS QUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS

Nas últimas décadas, as pesquisas voltadas para a química de algas foram muito estimuladas devido, pelo menos em parte, à procura de substâncias bioativas para possíveis aplicações farmacológicas. É do conhecimento geral que as algas marinhas são usadas com sucesso na medicina popular, principalmente no Oriente. No entanto, muitos dos efeitos benéficos observados encontram justificativa no alto conteúdo vitamínico e de sais minerais presente nas algas (23). Por outro lado, determinadas atividades biológicas resultam da presença de substâncias particulares, como por exemplo, o ácido α -kaínico (XV), isolado da alga vermelha *Digenea simplex* e usada no Oriente há vários milênios como anti-helmíntico (23). A competição de mercado também foi responsável, por parte das indústrias, pela procura de fontes inexploradas que fornecessem moléculas capazes de satisfazer as novas necessidades do mercado consumidor. Para este fim, grande número de moléculas biodinâmicas, por vezes com estruturas exóticas vêm sendo isoladas a partir de uma enorme variedade de espécies marinhas. As substâncias isoladas são testadas através de bio-ensaios específicos, que fornecem informações sobre suas potencialidades. Entre as diversas atividades observadas destacam-se: atividade antibacteriana (18), antiviral (187), fungicida (258), antineoplásica (188), anti-helmíntica (23), tóxica e

ictiotóxica (109), moluscicida (309), deterrente (108), inibidora da mitose (131) e anti-convulsivante (153).

No contexto geral, as algas pardas se destacam por apresentarem um perfil químico muito amplo e diversificado, que varia desde hidrocarbonetos simples a terpenos de biossíntese mista, ou mesmo polifenóis. Como exemplo de substâncias do metabolismo primário podemos citar os polienos (XVI) e (XVII), isolados de *Cystophora torulosa* (101), bem como outro derivado de ácidos graxos o Heneicosa-1,6,9,12,15,18-hexaeno (XVIII), de *Fucus vesiculosus* (105). Os halofórmios (XIX), (XX) e (XXI) podem ser usados como fumigantes, e são encontrados na alga parda *Ascophyllum nodosum* (102). *Dictyopteris* é um dos gêneros de algas que possui odor ativo, e seu óleo essencial cujo conteúdo lipídico varia em torno de 40% de seu peso, é composto principalmente por hidrocarbonetos C-11 (262). Estes hidrocarbonetos apresentam estruturas lineares como o trans,cis-undeca-1,3,5-trieno (XXII), ou cíclicas como os Dictyopterenos A (XXIII) e C' (XXIV). Estes últimos também podem ser produzidos por gametas de algas pardas durante a reprodução, e são utilizados como feromônios sexuais (CAPÍTULO II). O gênero *Dictyopteris* tem se destacado como fonte de lipídeos contendo enxofre: (XXV) e (XXVI) (194). Em *Notheia anomala* foram isolados lipídeos poli-hidroxiados - o 6,9-epoxinonadec-18-eno-7,10-diol (XXVII) é um dos exemplos (315). Alguns fosfolipídeos também foram registrados entre as algas pardas (247).



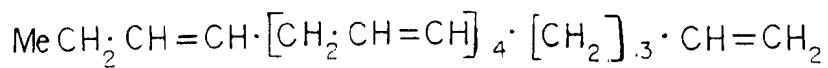
XV.



XVI.



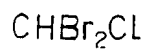
XVII.



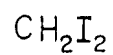
XVIII.



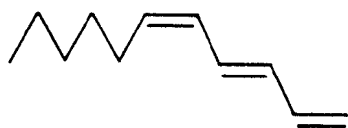
XIX.



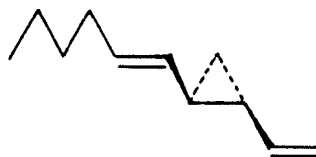
XX.



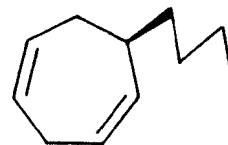
XXI.



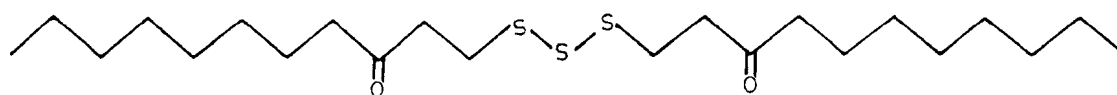
XXII.



XXIII.



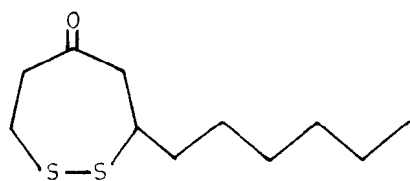
XXIV.



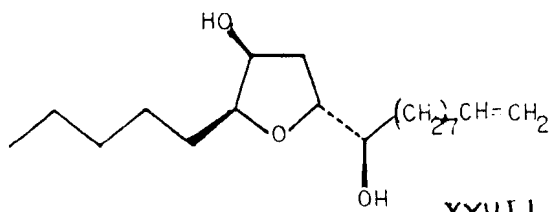
XXV.

A composição do Ácido Algínico (II) isolado de diferentes algas pardas varia substancialmente. O ácido algínico contém três tipos de polímeros: um consiste essencialmente de unidades de ácido D-manurônico, o segundo de unidades de ácido L-gulurônico, e o terceiro de resíduos alternados dos ácidos D-manurônico e L-gulurônico (89). Estas diferenças na estrutura são responsáveis pelas diferentes propriedades e funcionalidades dos alginatos. Os alginatos de K^+ , Na^+ , Mg^{++} e Fe^{++} e amônia, bem como os sais de amônia-cálcio, sódio-cálcio e o alginato-propilenoglicol são solúveis em água, se comportando como colóides hidrofílicos, e são amplamente utilizados em diversas indústrias como espessantes, emulsificantes e agentes gelificantes. Por outro lado, polissacarídeos como a Fucoidina (III) e a Laminarina (XII) têm sido alvo de muitas investigações de interesse farmacológico. Derivados sulfatados da Laminarina exibem atividade anticoagulante (154), enquanto a Fucoidina, isolada da espécie *Macrocystis pyrifera* possui atividade antiviral. E, embora o mecanismo de ação desta última não tenha sido elucidado, acredita-se que a mesma interfira na susceptibilidade de adsorção e penetração do vírus na célula hospedeira, ou interaja diretamente com a partícula viral formando complexos inibidores do vírus, diminuindo a taxa de ligação do vírus com a membrana celular (187). Já a Laminina (XXVIII), um ácido aminado encontrado nos gêneros *Laminaria*, *Heterochordaria* e *Anelipus* (71), são atribuídas atividades hipocolesterolemiantes e hipotensoras de curta duração (154).

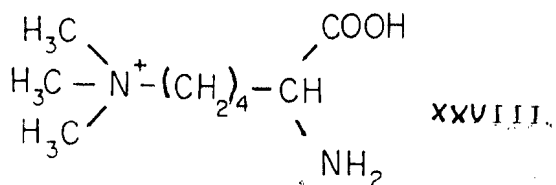
Com relação ao metabolismo secundário, as algas pardas se distinguem principalmente na produção de substâncias fenólicas e terpenoidicas. Muitos fenóis derivam do ácido chiquímico via fenilalanina ou tirosina e, por esta razão, são usualmente compostos p-hidroxiados. Nos compostos aromáticos polihidroxiados que têm sua origem no ácido chiquímico, os padrões de hidroxilação são tipicamente os observados no Catecol (XXIX), Hidroquinona (XXX) e Pirogalol (XXXI), enquanto nos fenóis derivados da via policetídica as hidroxilas são caracteristicamente dispostas de forma meta como no Resorcinol (XXXII) e no Floroglucinol (XXXIII) (114). O Alcool 3,5-dibromo-4-hidroxibenzílico (XXXIV) e o Lanosol (XXXV) são fenóis em $C_6.C_1$, isolados da alga *Zonaria tournefortii* (12,13,305); investigações posteriores forneceram mais dois novos derivados, (XXXVI) e (XXXVII) (306). Florotanino é a designação utilizada para vários tipos estruturais básicos de polifenóis: os fucóis, floretóis, fucofloretóis, fuhalóis, ecóis e floroecóis, entre outros. Os fucóis são oligômeros de Floroglucinol (XXXIII) cujos anéis são conectados por ligações C-C; o Tetrafucol (XXXVIII) de *Fucus vesiculosus* é um dos exemplos (91). Os floretóis são oligômeros cujos anéis de floroglucinol estão unidos por ligações éter. Este é o caso do Difloretol (XXXIX), detectado em vários gêneros de algas pardas: *Laminaria*, *Himanthalia*, *Cystoseira*, *Halidrys*, e *Dictyota* (91). A condensação das formas fucol e floretol dá origem a um outro tipo de florotanino - os fucofloretóis. Em *Himanthalia elongata*, substâncias como o



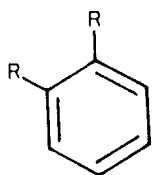
XXVI.



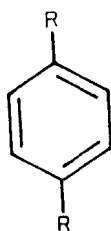
XXVII.



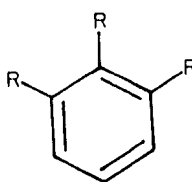
XXVIII.



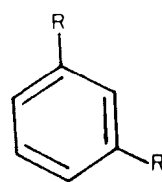
XXIX.



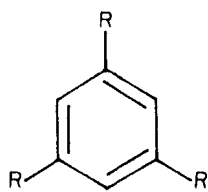
XXX.



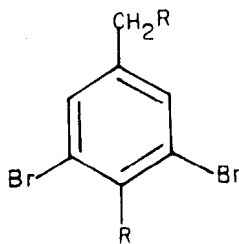
XXXI.



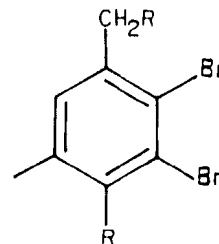
XXXII.



XXXIII.



XXXIV.

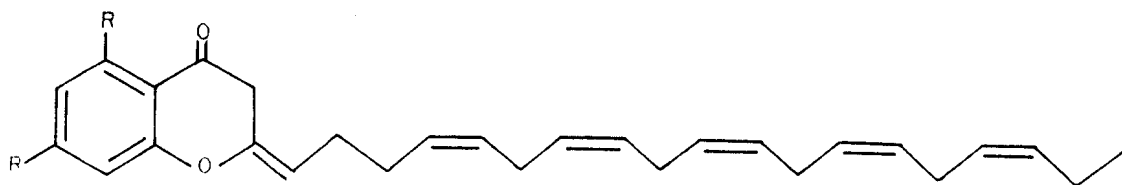


XXXV.

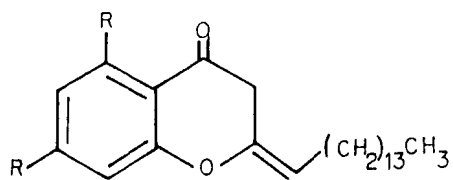
XXIX - XXXV R = OH

Fucofloretol A (XL) são consideradas como as responsáveis pela atividade antibiótica da alga (92). O quarto tipo estrutural é similar aos floretóis, mas sustenta uma ou mais hidroxilas adicionais - são os fuhalóis. O representante mais simples - Bifuhalol (XLI) - foi o primeiro isolado de *Bifurcaria bifurcata* e caracterizado através de dados espectroscópicos por GLOMBITZA & ROSNER (1974). Ecóis tais como (XLII), isolado de *Eisenia arborea* (93) são florotaninos contendo um ou vários grupos dibenzo-p-dioxano. Os floroecóis constituem uma sexta variação formada por unidades de floretóis e ecóis, um dos exemplos é o 2-floroecol (XLIII) isolado da alga parda *Ecklonia kurome*, que apresenta atividade biológica sobre componentes do plasma (86).

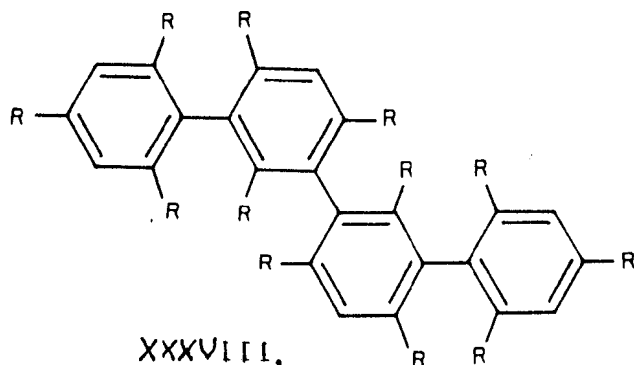
A via do isopreno, por sua vez, dá origem a substâncias terpenoidicas e esteroidicas. Sesqui e diterpenos, de origem biossintética mista ou não, são os tipos de terpenos mais frequentes em algas pardas. Os sesquiterpenos podem ser acíclicos, como o Oxocrinol (XLIV), um nor derivado isolado de *Cystoseira crinita* (78), mas são mais frequentemente cíclicos e possuem, neste caso, esqueletos conhecidos em vegetais superiores como Selinano, Cadinano, Elemano, Cubebano e Copaano. O δ -cadineno (XLV) é apenas um exemplo de sesquiterpeno obtido de *Dictyopteris divaricata* (161,292). Os diterpenos são infinitamente mais diversificados que os sesquiterpenos. Os diterpenos acíclicos, mono, bi, e policíclicos, de origem biossintética mista ou não, foram isolados e caracterizados em várias



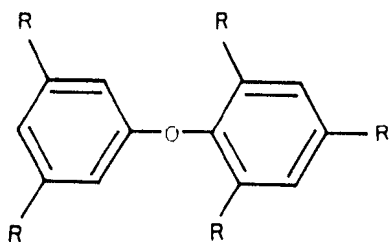
XXXVI.



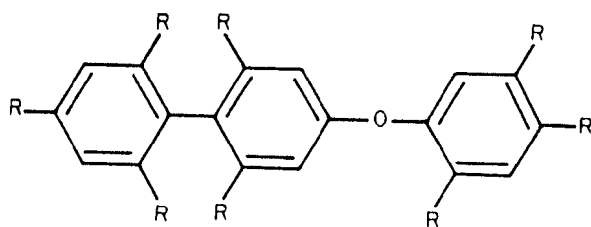
XXXVII.



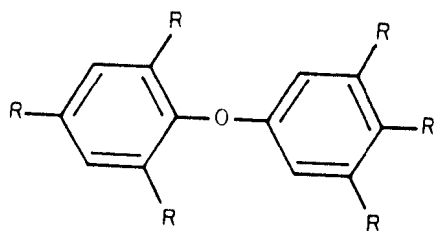
XXXVIII.



XXXIX.

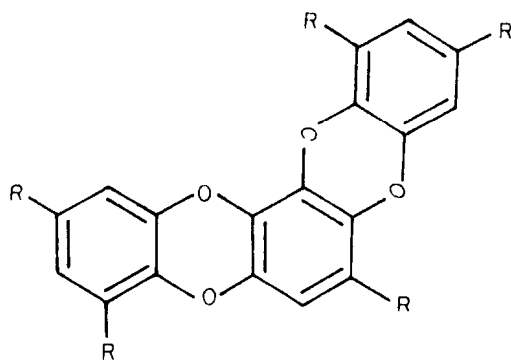


XL.



XLI.

XXXVI-XLII R = OH

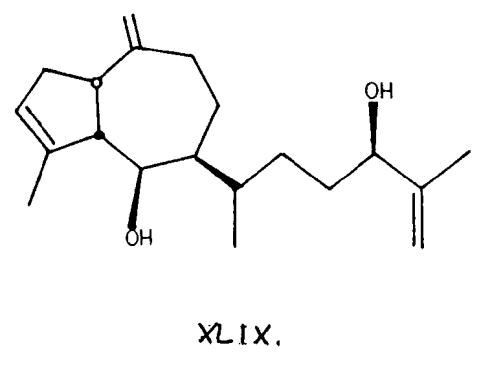
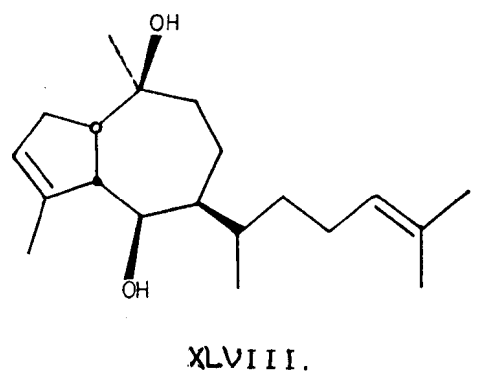
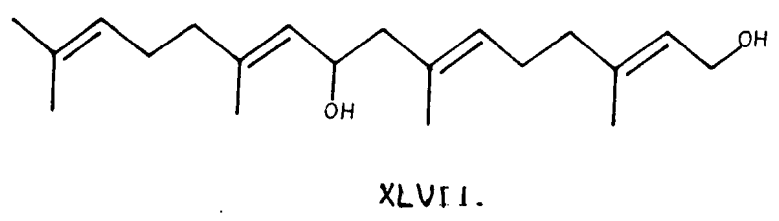
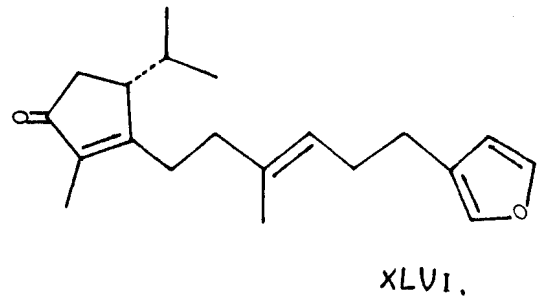
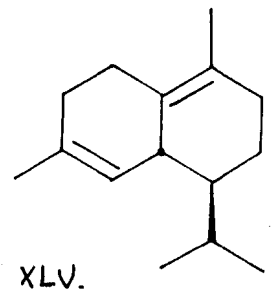
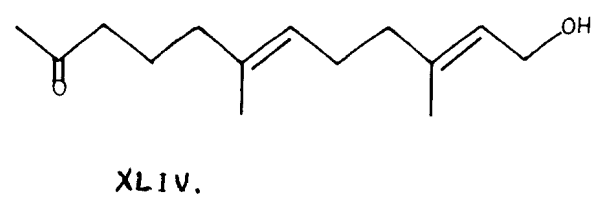
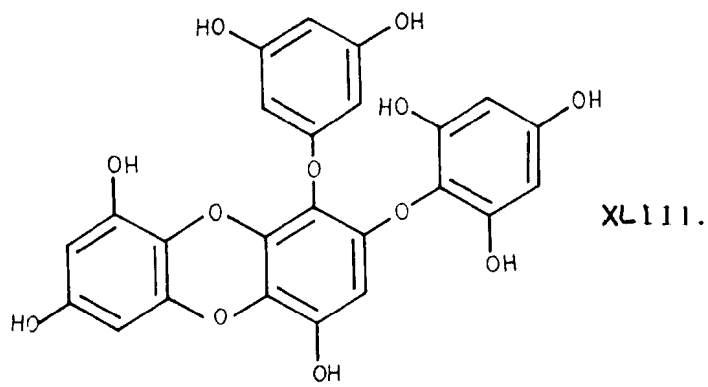


XLII.

ordens de Phaeophyceae. Muitos destes metabólitos possuem atividade biológica. Taonianona (XLVI) é um diterpeno de estrutura única, isolado a partir de *Taonia australasica* (223). *Sargassum tortile* produz diterpenos lineares como o Crinitol (XLVII) que inibe o crescimento do inseto *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera, Noctuidae - lagarta rosada do algodão), e da bactéria Gram negativa *Escherichia coli* (159). Diterpenos cíclicos observados no gênero *Dictyota*, tais como Dictyol C (XLVIII) e Dictyol F (XLIX) têm se destacado como inibidores da atividade dos microorganismos *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Candida albicans*, entre outros (74). Amijitrienol (L) e 14-desoxisoamijiol (LI) têm moderada atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Mucor mucedo* (234), enquanto os isômeros Dictytriol (LII) e Isodictytriol (LIII) apresentam atividade anti-inflamatória (226).

Os triterpenos são raros em algas pardas; testes realizados com o Esqualeno (LIV) isolado a partir de *Fucus vesiculosus*, revelaram propriedades bactericidas e fungicidas (118).

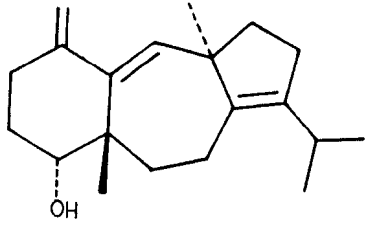
Os extratos das algas *Cystoseira barbata*, *Pelvetia wrightii*, *Sargassum muticum*, *Fucus evanescens* e *Fucus gardneri* possuem propriedades lipolíticas e hipoglicemiantes; tais extratos correspondem a misturas complexas de esteróis, como o Fucosterol (XV), Saringosterol (LV), Desmosterol (LVI), 24-metilenocolesterol (LVII) e Sargasterol (LVIII) (IN 154).



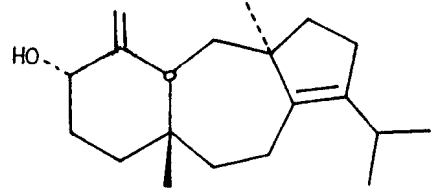
Os terpenos de biossíntese mista também são bastante comuns entre as Phaeophyta. Sesquiterpenos de origem biossintética mista são conhecidos em algas pardas, e pertencem a dois tipos principais: as Triprenil-hidroquinonas (LIX) encontradas em *Dictyopteris undulata* (=zonarioides) do Japão e os Drimanos condensados com uma P-hidroquinona (LX) (199). Estes terpenóides podem apresentar atividade biológica, como é o caso do Zonarol (LXI) e do Ácido Zonaróico (LXII) de *Dictyopteris undulata* (=zonarioides) (158). Os diterpenos (LXIII), (LXIV), (LXV) e o Poliprenilcromano (LXVI), isolados de *Cystoseira elegans* (19), *Cystoseira mediterranea* (41,85), *Cystoseira stricta* (14) e *Cystophora torulosa* (101) respectivamente, são alguns dos exemplos.

Styopodium zonale tem sido apontado como tóxico para algumas espécies de peixes (230), sendo o Ácido Atomárico (LXVII) ^{um dos} principais responsáveis por esta atividade (87). Já a Styopoldiona (LXVIII) isolada da mesma espécie de alga, mostrou forte atividade antimitótica em embriões de ouriços do mar (131). A alga parda *Bifurcaria galapagensis* produz a Bifurcarenona (LXIX) que também apresenta atividade antimitótica (290).

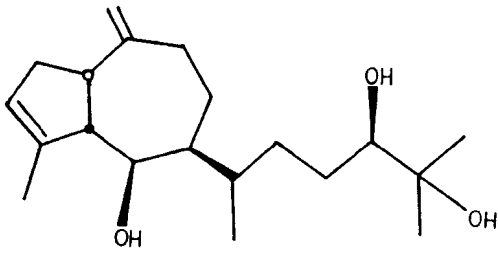
Alguns produtos de oxidação de carotenóides como o Loliolido (LXX) têm sido isolados das algas pardas *Sargassum crassifolium* (180) *Undaria pinnatifida* (293) e *Cystophora moniliformis* (254). Esta substância também foi registrada em



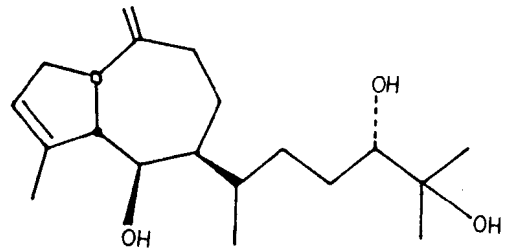
L.



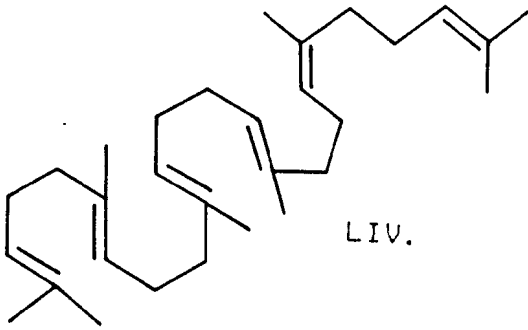
LI.



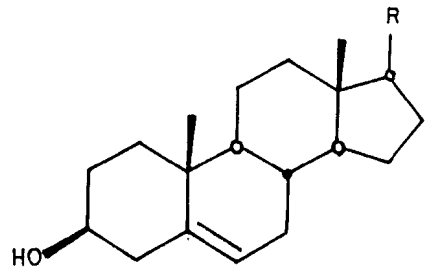
LII.



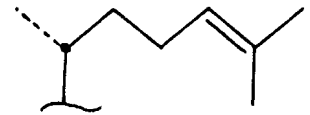
LIII.



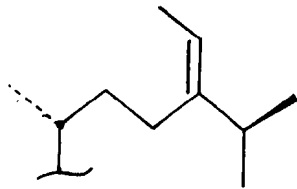
LIV.



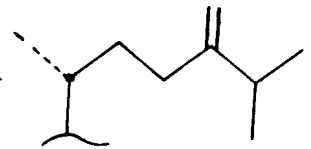
LVI. R =



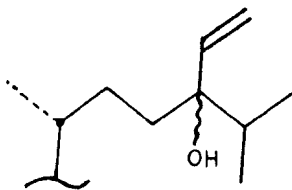
XIV. R =



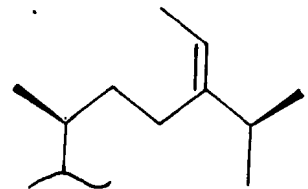
LVII. R =

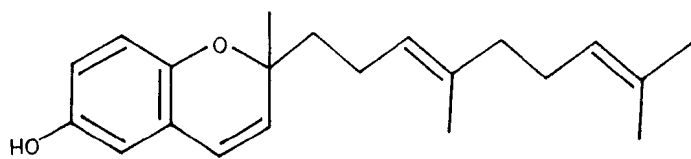


LV. R =

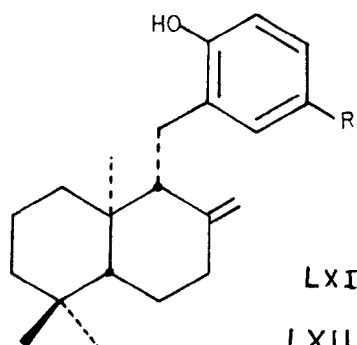


LVIII. R =



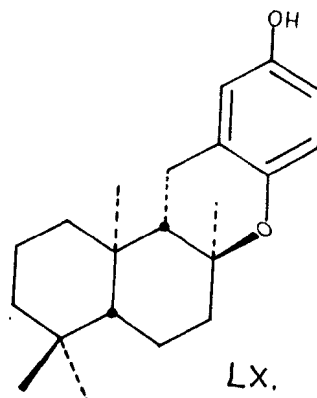


LIX.

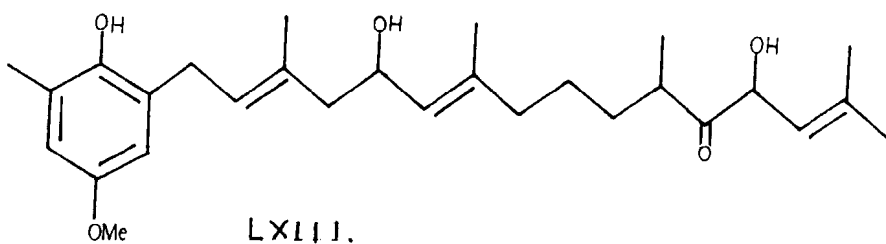


LXI, R=OH

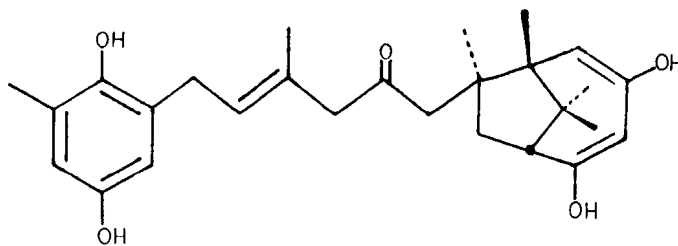
LXII, R=COOH



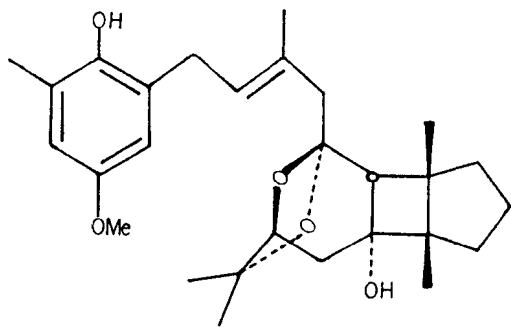
LX.



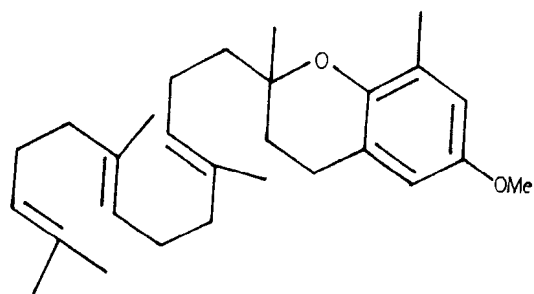
LXIII.



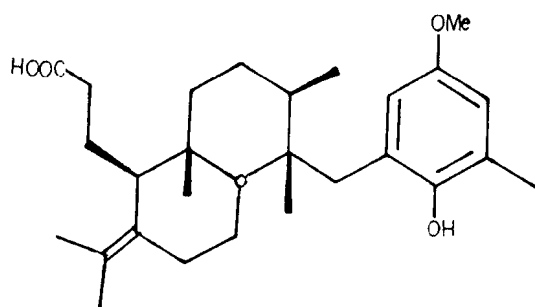
LXIV.



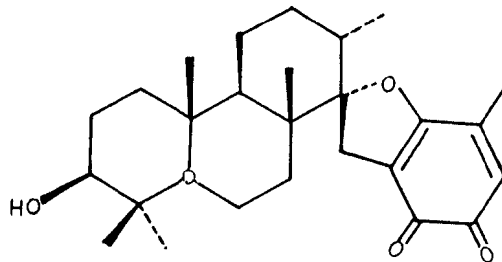
LXV.



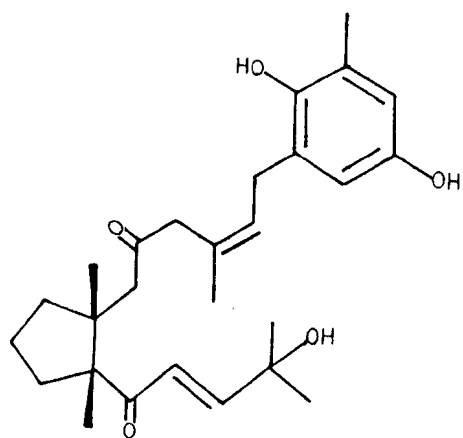
LXVI.



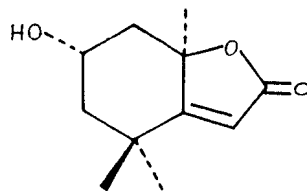
LXVII.



LXVIII.



LXIX.



LXX.

outros organismos marinhos como no molusco *Dolabella ecaudata* (243) e na esponja *Tedania ignis* (271), e mostrou uma potente inibição da germinação de semente da alface *Lactuca sativa* var. *capitata* LINN., em baixas concentrações (180).

Muitas outras algas pardas têm sido testadas, mas apenas foram registradas as atividades referentes aos extratos brutos das mesmas (17,18,76,185,186,197,251,283,285).

I. D. OBJETIVOS

Apesar da grande extensão da nossa costa e da diversidade da flora marinha brasileira, muito pouco se sabe a respeito do seu potencial como fonte de substâncias pertencentes aos metabolismos primário e secundário. Ao contrário do que se tem observado em outras partes do mundo, como na região Indo-Pacífica, Mar Mediterrâneo e Atlântico Norte, onde a pesquisa sobre a química de algas marinhas se encontra bastante desenvolvida, no Brasil, os estudos têm se limitado principalmente a caracterizações sistemáticas (140,239) e taxonômicas (237,323).

O estudo pioneiro de extração e caracterização de metabólitos secundários de algas do litoral brasileiro envolveu a identificação de diterpenos da alga parda *Dictyota cervicornis* KUTZING (TEIXEIRA;1985). Neste trabalho foi proposta a utilização deste grupo de terpenos como marcadores quimiotaxonômicos. Tais resultados vêm estimulando a pesquisa na área de química de produtos naturais de algas e, atualmente, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos visando a caracterização de terpenóides (ALMEIDA;FLEURY;1991), esteróis (FLEURY;1991) e substâncias fenólicas em algas pardas da costa do Brasil (PEREIRA,1990). Algumas destas substâncias estão sendo testadas como redutores da atividade predatória de algas por herbívoros marinhos (PEREIRA;1989).

Dando continuidade a esta linha de pesquisa foi proposta a realização deste trabalho que compreende três partes principais:

- 1) a avaliação dos feromônios sexuais de algas pardas como possíveis marcadores taxonômicos e/ou filogenéticos;
- 2) o estudo de todos os guaianos prenilados encontrados na divisão Phaeophyta, incluindo proposta biossintética geral e análise biogeográfica;
- 3) e o estudo fitoquímico da alga parda *Dictyota mertensii* visando a análise da possível sinonímia com *Dictyota dentata* do Caribe.

Cada assunto portanto, será tratado em separado, e os métodos de análise e resultados de cada tópico serão discutidos nos Capítulos correspondentes.

II. FEROMONIOS SEXUAIS DE ALGAS PARDAS

Estudos realizados por THURET (1854) sobre o comportamento de gametas da alga parda do gênero *Fucus*, o levaram a concluir que "algum impulso particular dirige os anterozóides até os corpos que eles devem fecundar". Um século depois, COOK et al. demonstraram que os anterozóides¹⁹ eram atraídos por uma substância volátil secretada pelas oosferas²⁰ maduras, em várias espécies de *Fucus*. Esta atração entre gametas de algas pardas marinhas é um fenômeno geral, desencadeado pela liberação de mediadores químicos, em concentrações mínimas, conhecidos como feromônios sexuais²¹.

19. Célula sexual masculina móvel e, em geral pequena.

20. Célula sexual feminina, em geral grande e imóvel.

21. Substâncias secretadas por um indivíduo para o meio externo e, quando captadas por um segundo indivíduo da mesma espécie, este libera uma reação específica (151).

No que se segue, descreveremos detalhadamente o que se sabe atualmente sobre feromônios sexuais de algas pardas, já que estas informações se tornam imprescindíveis para um bom entendimento das considerações quimiotaxonômicas.

II. A. ASPECTOS BIOLÓGICOS

Nas algas pardas, os feromônios sexuais são responsáveis pela liberação dos gametas e, em algumas ordens tais como Desmarestiales, Laminariales e Sporochnales (178,211), pelo rompimento do anterídio²² (138), favorecendo a emissão sincronizada das células reprodutivas. Em geral, os gametas femininos secretam diferentes produtos simultaneamente, no entanto, um só componente desta mistura conhecida como "bouquet" parece agir como atrativo sexual, tendo um raio de ação de aproximadamente 1 milímetro em torno da fonte emissora (204). Estudos realizados em laboratório mostraram que os gametas masculinos reagem ao estímulo químico através da modificação do padrão de batimento do flagelo (138,213), e vários padrões de resposta quimiocinética foram observados, dependendo do grau evolutivo da alga considerada (176).

O desenvolvimento morfológico e reprodutivo (isogamia ↔ anisogamia ↔ oogamia) parece estar intimamente ligado ao sistema de reconhecimento do feromônio (138,176). Este fato foi evidenciado através do estudo comparativo dos sistemas de percepção do feromônio sexual nas ordens Ectocarpales (isogamia), Cutleriales (anisogamia) e Fucales (oogamia)(138,176,204). O gênero *Ectocarpus* possui isogamia morfológica, acompanhada pela diferenciação fisiológica entre os gametas, e contém o mais primitivo sistema de diferenciação sexual conhecido entre as Phaeophyceae (206). Neste caso, um sistema de comunicação química de eficiência moderada atua na atração e reconhecimento dos gametas (138). Por outro lado, a forte anisogamia observada no gênero *Cutleria* pode ser interpretada como um avanço filogenético, devido ao aumento de tamanho de um dos gametas e à presença de maior quantidade de material de reserva como fonte adicional de energia para o zigoto; no entanto, este fato implica num decréscimo do número de gametas (+) produzidos. As chances destas poucas células serem fertilizadas podem ser ampliadas de duas maneiras: 1) pelo aumento do número de gametas (-) (de menor tamanho) e/ou 2) pelo aprimoramento da capacidade de atração entre os dois tipos de gametas. Este aprimoramento parece ter ocorrido a nível do sítio receptor do feromônio (176). Já em Fucales, (mais evoluída) observa-se uma oogamia muito característica, com a produção de oosferas de grande tamanho e anterozóides diminutos (relação de massa entre gametas de *Fucus serratus* - 20000:1)(137). Ao contrário do que ocorre em *Ectocarpus* e

Cutleria, em *Fucus* a partenogênese²³ não se processa. Tudo indica que a necessidade vital de uma fertilização bem sucedida na ordem Fucales pode ter sido acompanhada por um sistema de atração de gametas mais eficiente (218).

Ao que parece, a especialização evolutiva da resposta quimiocinética dos gametas masculinos tende a caminhar paralelamente ao estabelecimento da anisogamia, ou seja, as diferenças no sistema de reconhecimento dos feromônios sexuais evoluíram, aparentemente, de acordo com a diversificação filogenética (138). Entretanto, nenhum aprimoramento adicional significativo do sistema de reação do gameta masculino parece acompanhar o passo evolutivo da anisogamia para a oogamia, exceto por um discreto aumento de sensibilidade deste último (138).

22. Gametângio masculino, isto é, órgão em que se formam células sexuais masculinas.

23. Processo pelo qual um indivíduo dá origem a outro sem que haja produção de gametas ou esporos.

II. B. ASPECTOS QUÍMICOS

Os feromônios sexuais são hidrocarbonetos mais ou menos insaturados com 8 ou 11 átomos de carbono, voláteis, de natureza lipofílica e possuem estruturas químicas e propriedades físicas semelhantes, tais como solubilidade e momento dipolar (FIGURA 3). Estes hidrocarbonetos podem ser classificados em quatro grupos, com relação a sua estrutura molecular: olefinas acíclicas (1-4), ciclopropanos (5-6), ciclopentenos (7-10) e cicloheptadienos (12-18). Uma só substância, Aucanteno (11), possui um anel de seis membros e, embora esteja biogeneticamente relacionada aos demais feromônios, não tem apresentado atividade quimiocinética. Alguns autores (139) sugerem que o Aucanteno possua uma função adaptativa modificada como tem sido demonstrado em alguns insetos, capaz de potencializar a ação de outra substância. No entanto, ainda não foi caracterizado efeito modulador dos componentes secundários do "bouquet" sobre a eficiência da emissão ou atração dos gametas (IN 139).

Os feromônios cíclicos são substâncias quirais e para algumas algas pardas ambos enantiômeros foram observados, porém possuem propriedades organolépticas diferentes: (-)-Hormosireno (5) tem o "cheiro do mar", ao passo que (+)-Hormosireno tem cheiro de gordura (68). Similarmente, os pares de enantiômeros não são igualmente ativos:

(+)-Multifideno (8) é 100 vezes mais ativo em *Cutleria multifida* do que o enantiômero levorotatório (29,277); *Syringoderma phynneyi* é 10 vezes mais sensível ao (+)-Viridieno (7) que ao (-)-Viridieno (29,34). Ambos os enantiômeros de hormosireno são encontrados em algas pardas; em *Xiphophora chondrophylla* (-)-Hormosireno (5) é dominante (80%), ao passo que em *Haplospora globosa* (+)-Hormosireno é o mais representativo (83%). Já em *Durvillaea potatorum* observa-se uma mistura quase racêmica dos dois enantiômeros (35) e todos os testes têm indicado que os gametas desta espécie são mais sensíveis à mistura racêmica do que a cada enantiômero separadamente. É possível que este seja mais um dos mecanismos desenvolvidos para a prevenção de cruzamentos interespecíficos (veja mais detalhadamente no item II.B.1.).

II. B. 1. RECONHECIMENTO DO FEROMÔNIO

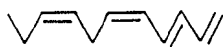
Diversos grupos de algas filogeneticamente isolados emitem e utilizam uma mesma substância como feromônio sexual. Isto se deve, provavelmente, ao número limitado de modificações estruturais possíveis (FIGURA 3) por restrições na biossíntese (30) e, principalmente, ao caráter necessariamente conservativo dos sistemas de reconhecimento

dos feromônios. Com base nestas considerações nos é possível antecipar que os feromônios sexuais dificilmente poderão ser utilizados como marcadores taxonômicos. Como uma completa especificidade não pode ser esperada (206), a interação entre espécies diferentes poderia ser favorecida, com a conseqüente formação de híbridos na Natureza (136,204). Experimentos realizados em laboratório vieram comprovar a possibilidade de cruzamentos interespecíficos (41). No entanto a formação de híbridos no ambiente natural é aparentemente rara, embora não completamente impossível (266). Feromônios comuns ou relacionados estruturalmente, proximidade espacial e época de reprodução coincidente são considerados pré-requisitos absolutos para tais intercruzamentos (176). Além destes, outros fatores como temperatura da água, fotoperíodo, qualidade e intensidade de luz ou mesmo ritmos circadianos (172,196) e ciclo lunar (207) parecem interferir no processo reprodutivo destas algas.

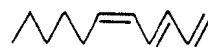
FIGURA 3: Estruturas dos feromônios sexuais observados em algas pardas.



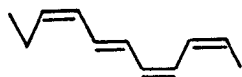
1. Fucoserrateno



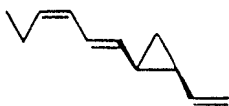
2. Finavarreno



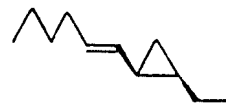
3. Cystophoreno



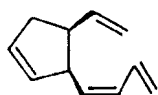
4. Giffordeno



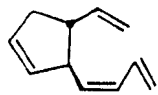
5. Hormosireno



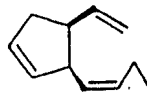
6. Dictyopterenol A



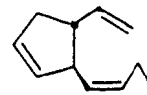
7. Viridieno



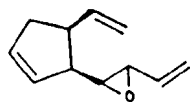
7'. Trans-7



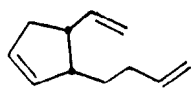
8. Multifideno



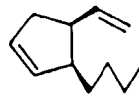
8'. Trans-8



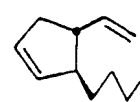
9. Caudoxireno



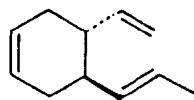
sem nome



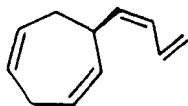
10.
3-butil-4-vinil
-ciclopenteno



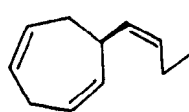
sem nome



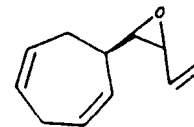
11. Aucanteno



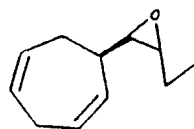
12. Desmaresteno



13. Ectocarpeno



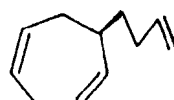
14. Lamoxireno



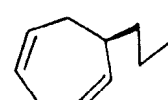
15.



16.



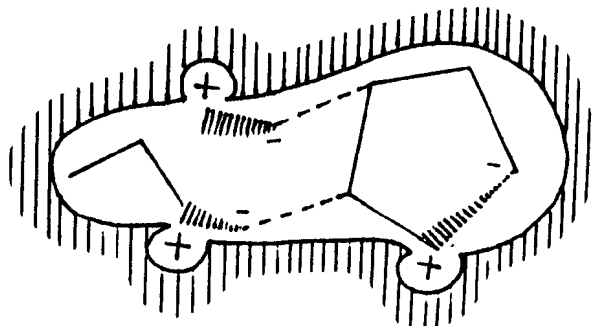
17.



18. Dictyopterenol C'

É provável que mecanismos ligados a fatores ambientais e ao isolamento pós-zigótico estejam envolvidos direta ou indiretamente na reprodução das algas pardas. As evidências parecem confirmar que a fertilização cruzada é prevenida por componentes espécie-específicos, envolvidos no reconhecimento dos gametas a nível da membrana citoplasmática ou dos flagelos (167,176,221). A análise de modelos moleculares dos diversos feromônios sexuais e comparação das respostas obtidas com moléculas homólogas (139,213) levaram a diversas conjecturas a respeito do tipo de receptor dos feromônios. Presumivelmente as moléculas dos feromônios ligam-se a sítios receptores, os quais devem estar localizados na membrana citoplasmática do gameta receptor (208,217). Observações minuciosas a cerca do limiar de atividade de uma série de homólogos sintéticos sugerem que os receptores possuem grupos eletrofilicos posicionados de maneira complementar às ligações duplas da molécula sinal, induzindo a polarização da mesma (FIGURA 4). Este processo permitiria a transmissão e o processamento do estímulo químico (213).

FIGURA 4: Esquema hipotético de polarização da molécula mediante a aproximação do gameta receptor, caso do Multifideno 8 (MÜLLER,1978).



II. B. 2. ISOLAMENTO E SÍNTESE DE FEROMÔNIOS SEXUAIS

Os feromônios sexuais estão presentes em concentrações ínfimas. Por esta razão, para o isolamento dos feromônios, as secreções de gametas são enriquecidas cerca de 100.000 em um sistema fechado, no qual o ar circula através de uma suspensão de gametas e arrasta as substâncias voláteis, que são adsorvidas em uma pastilha de carvão ativo (FIGURA 5). Após a desorção com diclorometano, o eluato é submetido a cromatografia gás-capilar e análise em CG-EM (176). Sabe-se que esta técnica não é muito eficiente, e apenas uma pequena parte do material volátil é adsorvido e/ou recuperado do carvão ativo (222); isto impede qualquer análise comparativa do "bouquet" em termos quantitativos, e dos produtos-traço ou subprodutos, em termos qualitativos.

Apesar das estruturas serem bastante simples, as informações obtidas através desta técnica (CG-EM) não são, em geral, suficientes para a determinação estrutural completa. Esta dificuldade é superada através da síntese das estruturas dos possíveis "candidatos", até que os índices de Kovats se igualem (em diferentes colunas capilares em CG), e seja observada uma perfeita identificação no Espectrômetro de Massas (222). A geometria das ligações duplas é determinada por síntese total e comparação das atividades biológicas dos isômeros sintéticos (30,138,144). A síntese dos diversos

feromônios permite a confirmação das novas estruturas propostas, bem como o estabelecimento da configuração absoluta dos mesmos pela determinação do limiar das atividades de ambos os enantiômeros em comparação com o feromônio natural. Recentemente, tem sido possível a utilização de técnicas de HPLC, usando fase quiral, para determinar a configuração absoluta dos feromônios (33,35).

Foram sintetizadas misturas racêmicas e/ou ambos enantiômeros isoladamente de Fucoserrateno (1) (FIGURA 6 - ESQUEMA I) (135,178,279); Finavarreno (2) (182); Cystophoreno (3) (224); Giffordeno (4) (38), Hormosireno (5) (3,68,277) e Dictyoptereo A (6) (53,144,235); Viridieno (7) (27,29) e Multifideno (8) (24,26,43,55); Caudoxireno (9) (317); Aucanteno (11) (169,181); Desmaresteno (12) (27); Ectocarpeno (13) (FIGURA 6 -ESQUEMA II) (132,146,246,272); Lamoxireno (14) (183) e Dictyoptereo C' (18) (21,53,133,278).

O Fucoserrateno (1), por exemplo, pode ser sintetizado através de um pequeno número de passos reacionais e com o uso de matéria prima facilmente disponível, como ilustrado na FIGURA 6 - ESQUEMA I. SCHNEIDER & GOLDBACH (1980) utilizaram como substrato o ácido (E)-2,4-pentadienóico (19), este foi reduzido a (E)-2,4-pentadienol (20), com Hidreto de Lítio e Alumínio (LiAlH_4), que por sua vez foi oxidado a (E)-2,4-pentadienal (21) com Clorocromato de Piridina (CCP). A reação de Wittig Z-estereoseletiva de (21) com o n-propilidenotrifetilfosfina

forneceu o (E,Z)-1,3,5-octatrieno, com um rendimento de $97 \pm 2\%$ (CG) e com configuração Z em Δ^5 (272). Este octatrieno é idêntico ao Fucoserrateno (1), incluindo atividade biológica.

Devido à facilidade de obtenção do Fucoserrateno (1), os autores deram continuidade ao processo sintético dos Dictyopterenos B e D' (Hormosireno 5 e Ectocarpeno 13, respectivamente), utilizando (1) como substrato (FIGURA 6 - ESQUEMA II). A ciclo-adição 1,3-dipolar de (22) a (1) forneceu a mistura de cis,trans-1-pirazolinas (23), tendo o Pirazol (24) como produto resultante da ciclização intramolecular de (22).

As Pirazolinas (23) são particularmente instáveis, perdendo facilmente N_2 (a $0^\circ C$). A termólise (nC_8H_{14} , refluxo 3h) ou fotólise (nC_8H_{14} , filtro pirex, $15^\circ C$) de (23) produz a mistura de (5) e (13), sendo este último formado por rearranjo de Cope espontâneo a partir do produto (25), sob estas condições (272). Por outro lado, a fotólise a baixa temperatura ($-40^\circ C$; $\lambda \geq 310$ nm; $CDCl_3-CD_2Cl_2$) de (23) fornece a mistura de (5) e (25). Quando esta mistura reacional chega à temperatura ambiente, observa-se o rearranjo de (25) a (13). FICKENHAGEN, et al. (1973) sugerem que o intermediário (25) não seja detectado devido à sua baixa estabilidade térmica. No entanto, SCHNEIDER & GOLDBACH ressaltam que este método, ao contrário de outros processos, fornece apenas o isômero (5), já que a estereoquímica das ligações duplas em C-3 e C-5 de (1) é totalmente mantida no decorrer da síntese

(272). É interessante frizar que (5) é termicamente estável até aproximadamente 80°C, mas sofre rápido rearranjo a temperaturas superiores a 100°C, se transformando em (13) (244). Se portanto, a mistura de (5) e (13) produzida por termólise ou fotólise de (23) for aquecida a aproximadamente 125°C por 1,5h, (13) é o único produto obtido. Assim, partindo-se de (1) e (22), e seguindo-se o isolamento de (23) ou (5), o método de fato constitui uma síntese estereo-específica (de apenas um passo) na produção de Ectocarpeno racêmico (272). (5) e (13) podem ser separados por CG e são idênticos às substâncias de origem natural; a atividade biológica de (13) foi comprovada através de bio-ensaios.

FIGURA 5: Aparato utilizado para extração e isolamento dos feromônios sexuais de algas pardas, onde A = amostra biológica: gametas ou gametófitos maduros; F = filtro adsorvente de carvão ativo (1-2mg); B = bomba de ar miniaturizada (segundo BOLAND, et al., 1984) (31).

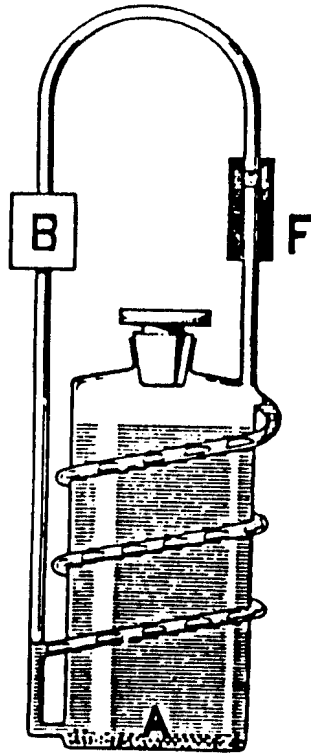
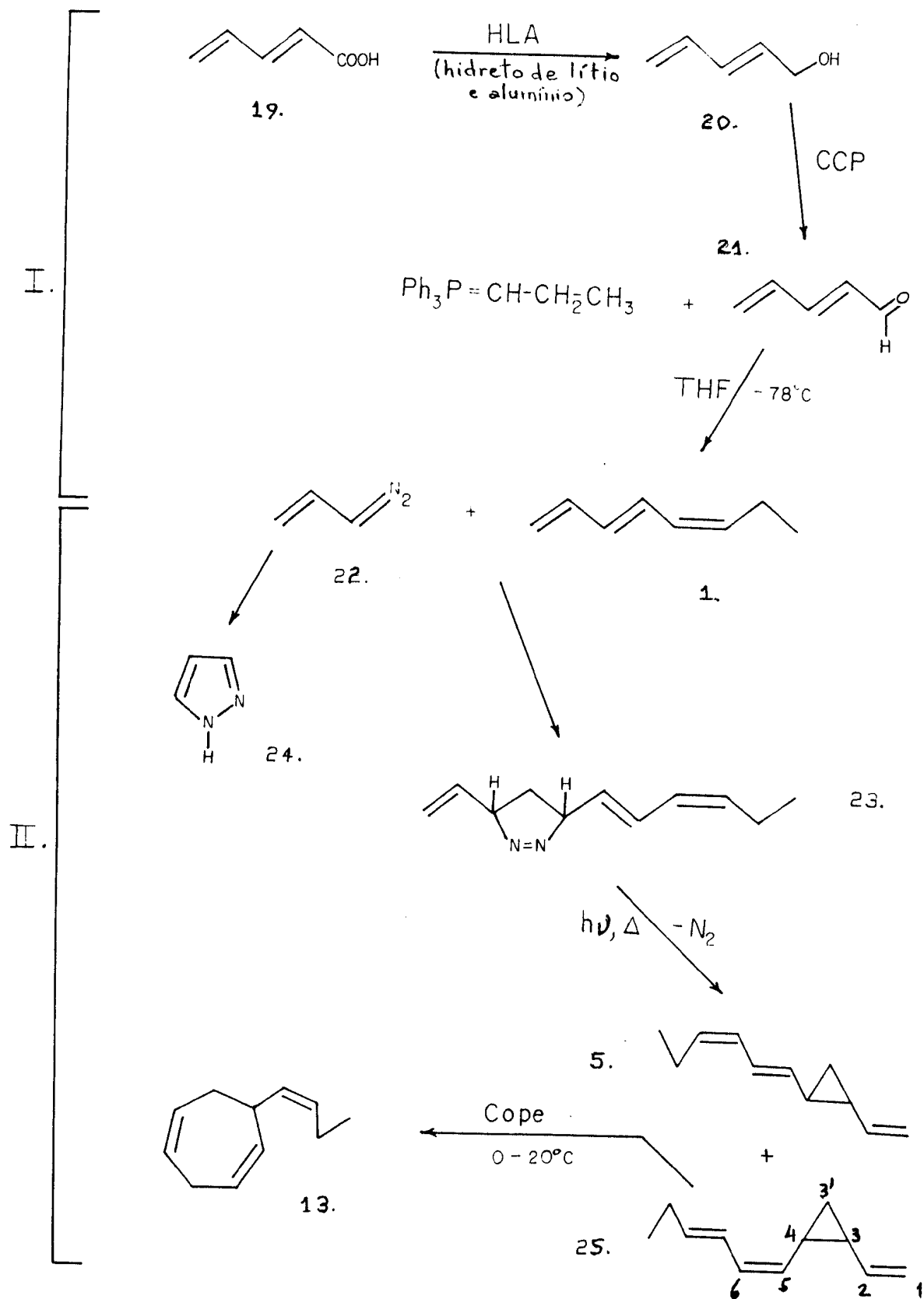


FIGURA 6: Esquema sintético do Fucoserrateno (1) e Ectocarpeno (13) (SCHNEIDER & GOLDBACH, 1980).



II. C. BIOSÍNTESE

A co-ocorrência de diferentes hidrocarbonetos nos "bouquets" e a similaridade do padrão de insaturação (Viridieno 7/Desmaresteno 12 e Multifideno 8/Ectocarpeno 13) bem como o fato de alguns feromônios exibirem o dieno 1,4-homoconjugado, característico dos ácidos graxos polinsaturados, fornecem indicações sobre as possíveis vias de formação dos feromônios sexuais de algas pardas (FIGURA 3). A partir daí, muito tem-se especulado sobre os passos reacionais envolvidos em sua biossíntese.

Uma das primeiras propostas (136) (FIGURA 7) sugere o Ácido Linolênico como precursor do Ácido (Z,Z,Z)-3,6,9-dodecatrienóico (26), gerado através de 3 β -oxidações consecutivas. Descarboxilação e oxidação de (26) fornece o 1,5Z,8Z-undecatrien-3-ol (27). A perda de HO^- gera um carbocátion alílico, cuja carga fica parcialmente deslocalizada entre os Carbonos 1 e 3 (28). Este carbocátion pode sofrer dois tipos de reações: a) perda de H^+ , que leva ao hidrocarboneto (2); ou b) eliminação de H^+ com ciclizações envolvendo as demais ligações duplas da molécula. Explica-se deste modo a origem dos hidrocarbonetos cíclicos Ectocarpeno (13), Hormosireno (5) e seu isômero (29), Multifideno (8) e Aucanteno (11), via ciclização α -1,7; α -3,5; α -3,7 e α -3,8, respectivamente.

Embora estas reações não tenham sido estudadas em sistemas biológicos, experimentos biomiméticos têm demonstrado a viabilidade deste esquema (279).

Posteriormente, JAENICKE (1984) (139) sugeriu que uma cadeia de reações radicalares estivessem envolvidas na formação dos feromônios sexuais de algas pardas, como ilustra a FIGURA 8. A ação da Lipoxigenase sobre o grupo divinilmetano produz um radical alílico; o radical migra através da molécula, via sistema de ligações duplas, e fecha o anel na posição apropriada para as estruturas cíclicas encontradas nos respectivos feromônios, e produz simultaneamente, com o radical hidroperóxido presente, um peroxiácido.

Após a redução, o hidroxí-ácido sofre 3 β -oxidações e dá origem a um 3-hidroxí-ácido, o qual é finalmente fragmentado em CO_2 e o hidrocarboneto vinílico. A força condutora (driving force) do processo pode ser a eliminação de H_2O , como formulado na FIGURA 8.

FIGURA 7: Biogênese de hidrocarbonetos C_8 e C_{11} , em Phaeophyta (segundo JAENICKE, 1977) (136).

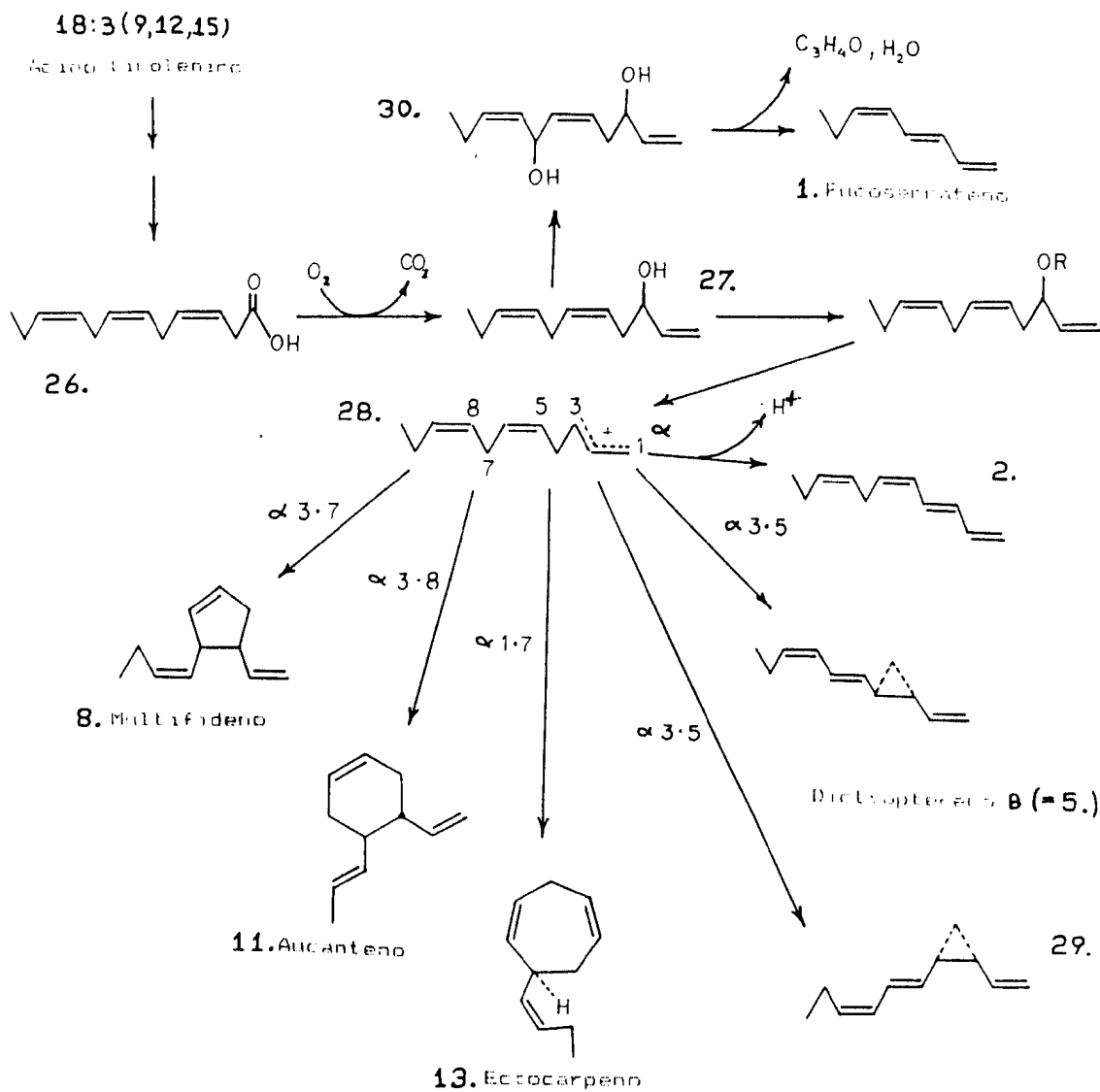
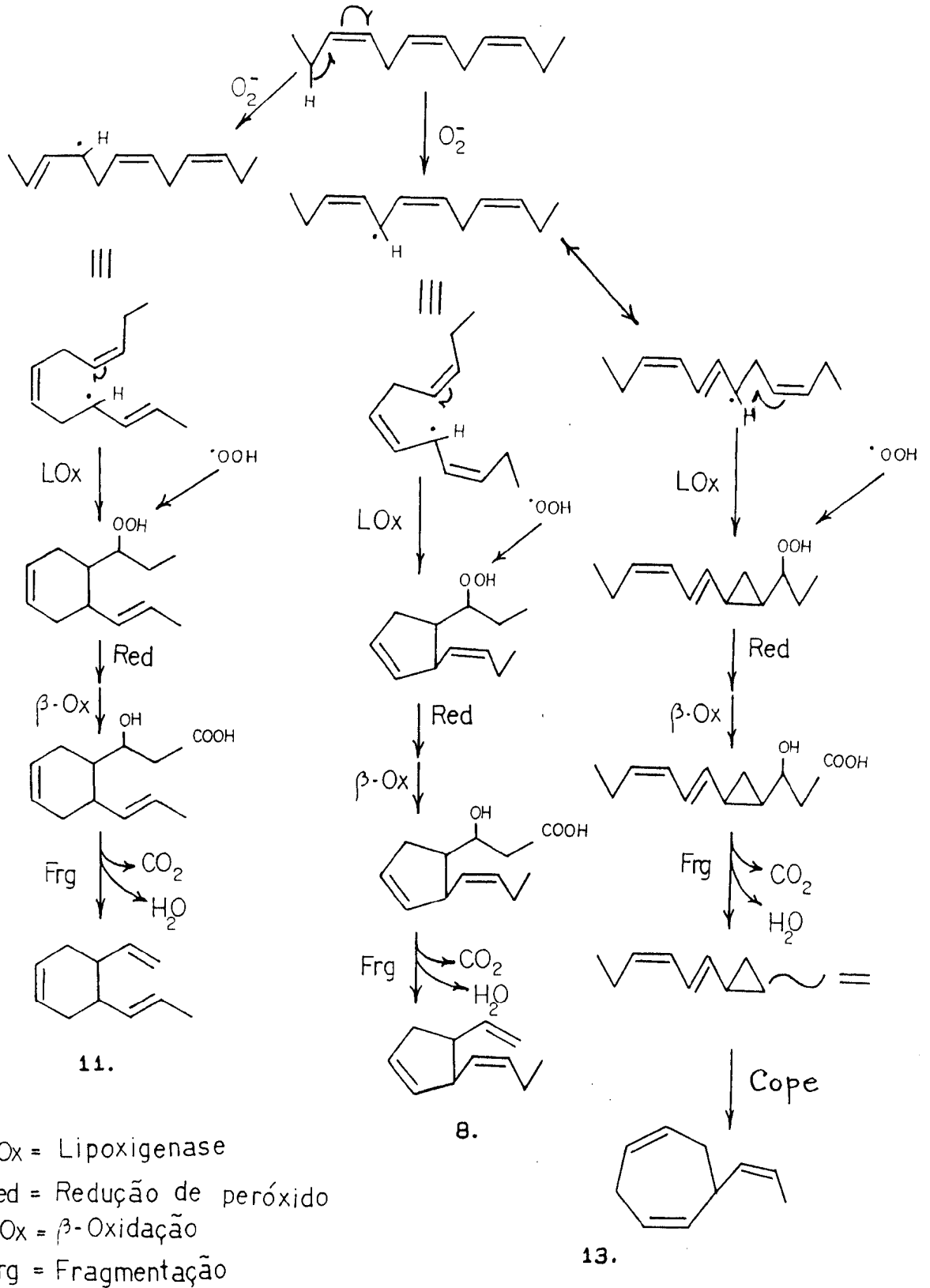


FIGURA 8 : Proposta do mecanismo Oxigenase/Descarboxilase para a formação de hidrocarbonetos vinílicos (JAENICKE,1984) (139).



A realização de estudos biossintéticos dos feromônios com os próprios gametas das algas pardas tem sido limitada pelas pequenas quantidades de material disponível (222). No entanto, o isolamento de S(+)-Ectocarpeno da Asteraceae sul-africana *Senecio isatideus* tornou possível a realização de um estudo biossintético modelo.

Além do Ectocarpeno (13), *Senecio isatideus* produz muitas outras olefinas conhecidas como feromônios de algas pardas, tais como 6-butil-1,4-cicloheptadieno (= Dictyopterenol C' - 18), Hormosirenol (5), Desmarestenol (12) e Finavarrenol (2) (28,138) e, embora estejam presentes em concentrações ínfimas, sua presença deve apontar para uma origem biogenética comum, o que abre a possibilidade do estudo de sua biossíntese com o auxílio de precursores marcados isotopicamente (33).

No intuito de evitar perda de precursores através de outros canais metabólicos, o ácido [³H]dodeca-3,6,9-trienóico, que não constitui um substrato comum ao metabolismo dos ácidos graxos, foi preparado e administrado na cutícula de *Senecio* (FIGURA 9). Este procedimento levou à incorporação de radioatividade no Ectocarpeno (13) (FIGURA 9 - EQUAÇÃO I). Quando o ácido [3,4,6,7,9,10-²H]undeca-3,6,9-trienóico foi administrado pela mesma via, observou-se a formação do 6-(1Z-propenil)-1,4-cicloheptadieno (FIGURA 9 - EQUAÇÃO II), que manteve todas as marcações deuteradas. Isto não apenas

documentou a conexão direta entre os ácidos graxos oferecidos como precursores, como indicou que nenhum dos hidrogênios das ligações duplas estava envolvido no passo de ativação por perda de um H radical, durante a ciclização do Ectocarpeno (13) (33).

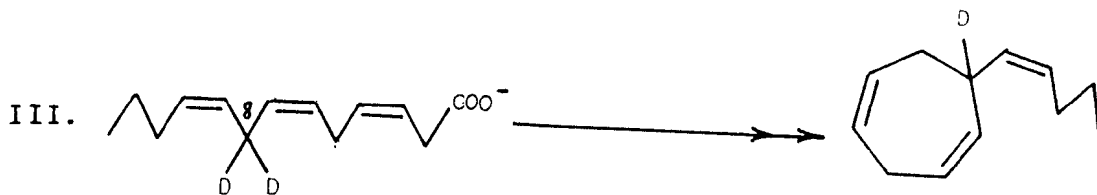
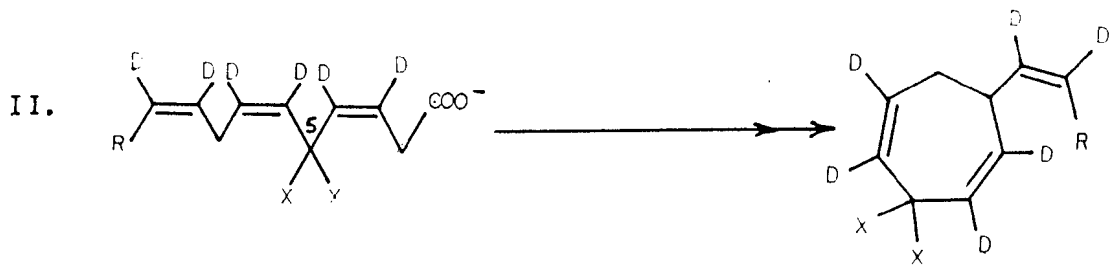
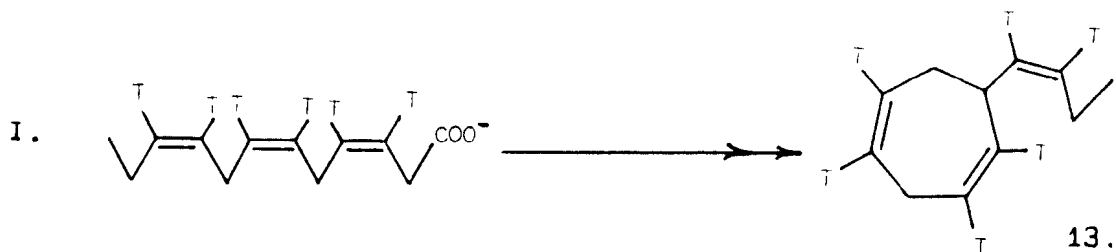
No entanto, quando o ácido [6,8'-²H]trideca-3,6,9-trienóico foi administrado na mesma planta, um dos deutérios desapareceu (FIGURA 9 - EQUAÇÃO III). Esta foi uma indicação clara de que a ciclização de Ectocarpeno (13) implica na abstração de um hidrogênio da posição-8 e concomitante descarboxilação (33). Os autores destacam ainda a administração do ácido [3,4,6,7-²H]nona-3,6-dienóico na cutícula de *Senecio*, já que a mesma resultou na produção do 1,3E,5Z-octatrieno ou Fucoserrateno (1), idêntico ao feromônio produzido por diversas espécies da ordem Fucales (FIGURA 9 - EQUAÇÃO IV). O Fucoserrateno (1) não é encontrado originariamente entre os hidrocarbonetos comuns a planta testada (33).

O esquema comparativo entre o curso estereoquímico da lipoxigenase de *Senecio* e da formação dos feromônios sexuais de algas pardas é ilustrado na FIGURA 10. Segundo BOLAND, et al. (1985) (33), a lipoxigenase ataca o segmento 1,4-pentadienil dos ácidos graxos livres, por abstração de um H radical. Esta etapa é seguida por ressonância do radical pentadienil, o qual, por sua vez, reage com Oxigênio dando origem ao peróxido correspondente (rota A). Se o H' for

abstraido do grupo metilênico carbono 5 do ácido nona-3,6-dienóico, o radical resultante pode ser convertido a um grupo vinil (rota B). Ao contrário das reações catalizadas pela lipoxigenase, onde a adição do Oxigênio determina o final da sequência (rota A), a oxidação do radical primário a íon carbênio orienta a biogênese dos feromônios através da formação de olefinas (rota B). O cation formado age sobre o grupo carbonil via ligação dupla, como ilustra a FIGURA 10.

O sistema é estabilizado por perda de CO_2 e subsequente formação do octatrieno (1). Ambos produtos são energeticamente favorecidos e constituem a força condutora (driving force) necessária para o processo de fragmentação espontânea. O rearranjo do sistema π envolvido procede com geometria *E*, como é comum aos rearranjos de ligações duplas alílicas (88).

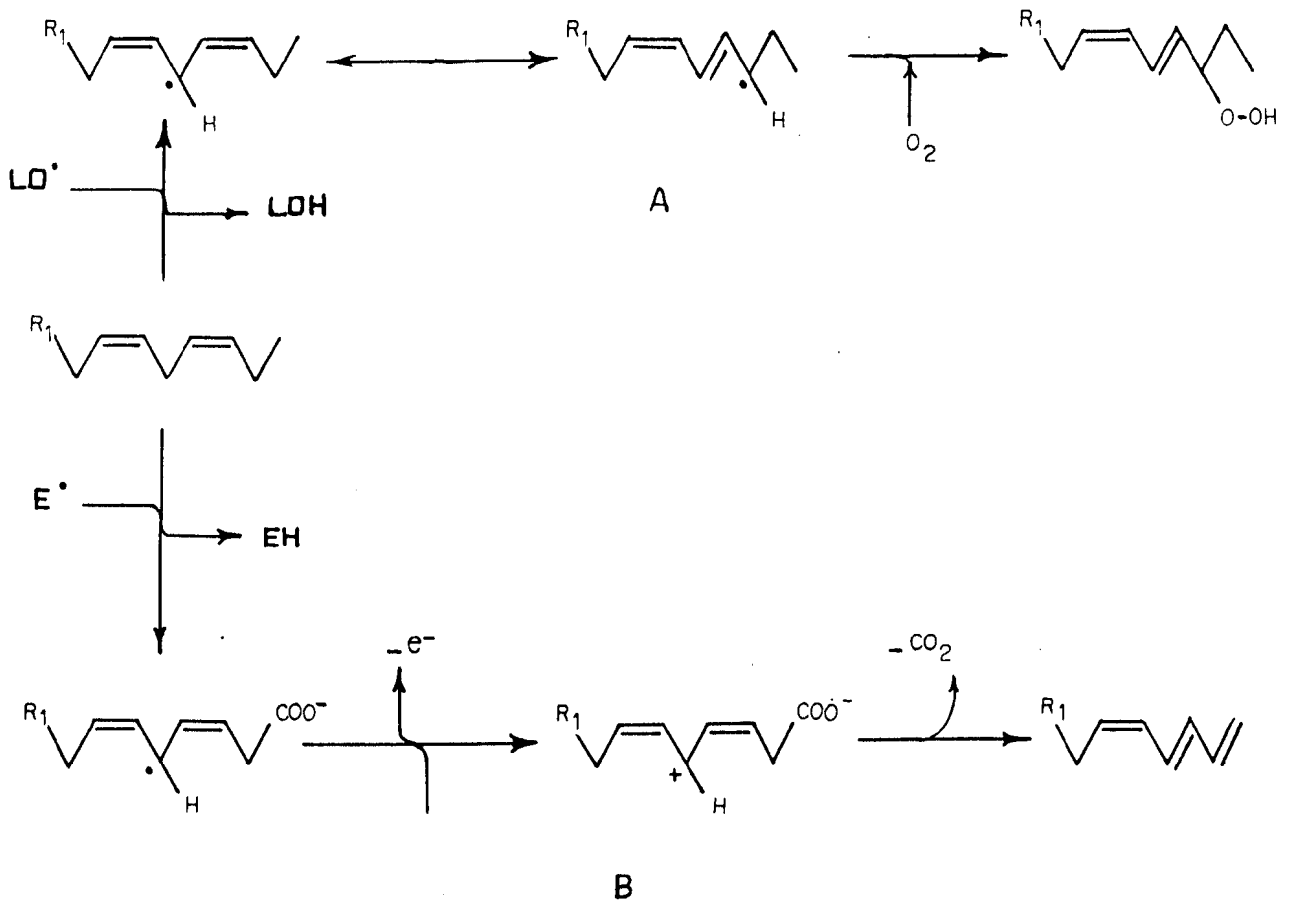
FIGURA 9: Experimentos feitos com ácidos graxos marcados isotopicamente e administrados em *Senecio isatideus* (BOLAND & MERTES, 1985) (33).



X = H, D

R = CH₃, C₃H₇

FIGURA 10: Comparação entre o curso estereoquímico da Lipoxigenase da planta (LO) e da formação dos feromônios através de processo enzimático (BOLAND & MERTES, 1985) (33).



OCTATRIENO (1). R₁ = CH₃
 UNDECATETRAENO (2). R₁ = C₄H₇
 UNDECATRIENO (3). R₁ = C₄H₉

II. D. MÉTODOS

A ampla distribuição dos feromônios sexuais em algas pardas levou alguns autores a sugerirem seu uso como marcadores taxonômicos (195). Por outro lado, outros autores afirmam que não há maneira de conciliar o padrão de distribuição das moléculas de feromônio com a taxonomia das espécies (222). Para apurar as verdadeiras bases desta controvérsia, procedemos um levantamento geral dos hidrocarbonetos descritos para as algas pardas até Dezembro de 1990 (descrição de feromônios e produtos-traço), gerando a TABELA I.

Se as informações obtidas através dos estudos com a *Asteraceae Senecio isatideus* forem extensivas às algas pardas, elas sugerem que os feromônios sexuais devam ser formados a partir de um "pool" de ácidos graxos polinsaturados (provavelmente ácidos linoléico, linolênico e/ou seus catabólitos), que via β -oxidações podem levar à formação dos ácidos dodeca-3,6-dienóico, dodeca-3,6,9-trienóico ou dodeca-3,6,9,12-tetraenóico. A partir desta etapa o mesmo mecanismo básico deve ser o responsável pela produção de todo o grupo de feromônios. Com base nestas linhas de raciocínio, propomos um esquema geral de formação dos diferentes feromônios sexuais de algas pardas e seus sub-produtos (ESQUEMA II).

A ocorrência de um mesmo feromônio em diversas espécies taxonomicamente distantes, seja como componente ativo ou subproduto do "bouquet" tem dificultado qualquer correlação a nível específico. No entanto, este panorama tende a se modificar quando trabalhamos a nível hierárquico superior. Numa primeira abordagem, as estruturas dos feromônios ativos foram introduzidas no esquema evolutivo do grupo Phaeophyta proposto por CHAPMAN & CHAPMAN (1981) (FIGURA 11), enquanto na FIGURA 12, além dos próprios feromônios sexuais foram também incluídas as estruturas dos subprodutos do "bouquet".

TABELA I: Listagem das espécies de Phaeophyta e os feromônios estudados.

ORDENS	FAMILIAS	ESPECIES(REF.)	FEROMÔNIOS
Ectocarpales	Ectocarpaceae	<i>Ectocarpus fasciculatus</i> (153,206)	Ectocarpeno
		<i>E. draparnaldioides</i> (153,206)	Ectocarpeno
		<i>E. siliculosus</i> (200,221)	Ectocarpeno Multifideno Hormosireno Dictyopterenos C'
		<i>Giffordia sp.*</i> (36,38)	Giffordeno
Sphacelariales	Sphacelariaceae	<i>Cladostephus spongiosus</i> (119)	Desmaresteno
		<i>Sphacelaria rigidula</i> (176)	Ectocarpeno
	Syringodermataceae	<i>Syringoderma phinneyi</i> (32,34,209)	Viridieno Multifideno
Tilopteridales	Tilopteridaceae	<i>Haplospora globosa*</i> (35)	Hormosireno
Cutleriales	Cutleriaceae	<i>Cutleria multifida</i> (30,55,134,202)	Multifideno Aucanteno Ectocarpeno
		<i>Dictyota dichotoma</i> (176,207)	Dictyopterenos C'
Dictyotales	Dictyotaceae	<i>D. prolifera*</i> (303)	Dictyopterenos C'
		<i>Dictyopteris sp*</i> (176)	Finavarreno
		<i>Desmarestia aculeata</i> (34,211)	Desmaresteno Viridieno Ectocarpeno

		<i>D. viridis</i> (34,211)	Desmaresteno Viridieno Ectocarpeno
Dictyosiphonales	Dictyosiphonaceae	<i>Dictyosiphon foeniculaceus</i> (176,242)	Finavarreno Cystophoreno Ectocarpeno
	Punctariaceae	<i>Adenocystis utricularis</i> (213)	Ectocarpeno
	Scytosiphonaceae	<i>Colpomenia peregrina</i> (35,214)	Hormosireno Dictyopterenos A
		<i>Scytosiphon lomentaria</i> (35,214)	Hormosireno Dictyopterenos A
Laminariales	Phyllariaceae	<i>Saccorhiza dermatodea</i> (177)	Ectocarpeno Dictyopterenos C'
		<i>S. polyschides</i> (177)	Hormosireno Ectocarpeno
	Chordariaceae	<i>Chorda filum*</i> (177,217)	semelhante ao Lamoxireno
		<i>C. tomentosa</i> (175,177)	Multifideno Ectocarpeno Dictyopterenos C'
			3-butil-4-vinil- ciclopenteno Hormosireno
	Alariaceae	<i>Alaria crassifolia</i> (217)	Lamoxireno
		<i>A. esculenta</i> (177,217)	Lamoxireno Ectocarpeno Desmaresteno Dictyopterenos C'
			Viridieno trans-(7)
		<i>A. marginata</i>	Lamoxireno

	(217)	
	<i>Ecklonia radiata</i>	Lamoxireno
	(217)	
	<i>Eisenia arborea</i>	Lamoxireno
	(177,217)	Ectocarpeno
		Desmaresteno
		Dictyoptereno C'
		Viridieno
		Multifideno
		trans-(7)
	<i>Pterygophora californica</i>	Lamoxireno
	(217)	
	<i>Undaria pinnatifida</i>	Lamoxireno
	(177,217)	Ectocarpeno
		Desmaresteno
		Dictyotereno C'
		Multifideno
		Viridieno
		trans-(7)
		3-butil-4-vinil-
		ciclopenteno
Laminariaceae	<i>Agarum cribosum</i>	Lamoxireno
	(217)	
	<i>Cymathere triplicata</i>	Lamoxireno
	(217)	
	<i>Hedophyllum sessile</i>	Lamoxireno
	(217)	
	<i>Kjellmaniella gyrata</i>	Lamoxireno
	(217)	
	<i>Laminaria augustata</i>	Lamoxireno
	(217)	
	<i>L. digitata</i>	Lamoxireno
	(177,178,205,217)	Ectocarpeno
		Desmaresteno

	Dictyopterenos C'
	Multifideno
	Viridieno
	3-butil-4-vinil-
	ciclopenteno
	Estrutura 15
	Estrutura 16
	Estrutura 17
<i>L. groenlandica</i>	Lamoxireno
(177,217)	Ectocarpeno
	Dictyopterenos C'
<i>L. hyperborea</i>	Lamoxireno
(217)	Ectocarpeno
	Desmaresteno
<i>L. japonica</i>	Lamoxireno
(177,217)	Ectocarpeno
	Desmaresteno
	Dictyopterenos C'
	Multifideno
	Viridieno
	trans-(7)
	trans-(8)
	trans-(10)
<i>L. saccharina</i>	Lamoxireno
(217)	
<i>L. sinclairii</i>	Lamoxireno
(217)	
<i>Pleurophycus gardneri</i>	Lamoxireno
(177,217)	Ectocarpeno
Lessoniaceae	<i>Dictyoneuroopsis reticulata</i> Lamoxireno
	(217)
	<i>Lessonia variegata</i> Lamoxireno
	(217)
	<i>Lessoniopsis littoralis</i> Lamoxireno

		(217)	
		<i>Macrocystis integrifolia</i>	Lamoxireno
		(217)	
		<i>M. pyrifer</i>	Lamoxireno
		(177,217)	Ectocarpeno
			Desmaresteno
			Dictyopteren
			Multifideno
			Viridieno
			trans-(7)
			Estrutura 18
			Estrutura 17
			Hormosireno
		<i>Nereocystis luetkeana</i>	Lamoxireno
		(177,217)	Ectocarpeno
		<i>Pelagophycus porra</i>	Lamoxireno
		(217)	
Durvilleales	Durvilleaceae	<i>Durvillea antarctica</i>	Hormosireno
		(35,214)	Dictyopteren A
		<i>D. potatorum</i>	Hormosireno
		(35,214)	Dictyopteren A
		<i>D. willana</i>	Hormosireno
		(35,214)	Dictyopteren A
Chordariales	Spermatochneaceae	<i>Spermatochneus paradoxus*</i>	Finavarreno
		(208)	
Sporochneales	Sporochneaceae	<i>Peritallia caudata</i>	Caudoxireno
		(215,220)	Viridieno
			Multifideno
			3-butil-4-vinil-
			ciclopenteno
Fucales	Cystophoraceae	<i>Cystophora siliquosa</i>	Cystophoreno
		(214)	
	Fucaceae	<i>Ascophyllum nodosum</i>	Finavarreno
		(210)	

	<i>Fucus distichus*</i> (176)	Fucoserrateno
	<i>F. evanescens*</i> (145,148)	Fucoserrateno
	<i>F. serratus</i> (138,145,201)	Fucoserrateno
	<i>F. spiralis</i> (216)	Fucoserrateno
	<i>F. vesiculosus</i> (138,139,203)	Fucoserrateno
	<i>Hesperophycus harveyanus</i> (216)	Fucoserrateno
	<i>Pelvetia fastigiata</i> (176,216)	Fucoserrateno
	<i>P. wrightii</i> (145,148)	Fucoserrateno
	<i>Pelvetiopsis limitata</i> (176,216)	Finavarreno
	<i>Xiphophora chondrophylla</i> (35,214)	Hormosireno Dictyoptereno A
	<i>X. gladiata</i> (35,214)	Hormosireno Dictyoptereno A
Hormoseiraceae	<i>Hormosira banksii</i> (35,212)	Hormosireno Dictyoptereno A
Sargassaceae	<i>Sargassum horneri*</i> (142,143)	Fucoserrateno

*-Espécies com secreção conhecida, mas sem atividade biológica confirmada.

- Os feromônios ativos se encontram ao lado do nome da espécie, as demais substâncias listadas correspondem aos subprodutos do bouquet.

II.E. PROPOSTA BIOSSINTÉTICA PARA OS FEROMÔNIOS SEXUAIS DE ALGAS PARDAS

O Ácido Linolênico (31) foi considerado o precursor primário da maior parte dos feromônios sexuais conhecidos, e através de 3 β -oxidações consecutivas, dá origem ao ácido dodecatrienóico (32). A partir daí, as vias biossintéticas se separam, já que a enzima E' poderá abstrair um H radical de diferentes posições da molécula. Os feromônios lineares são formados da seguinte maneira: a oxidação do radical ω -5 fornece o carbocátion correspondente, cuja descarboxilação dá origem ao Finavarrreno (2), e o Cystophoreno (3) é formado através da redução da ligação dupla do carbono 8 de (2); após rearranjo do carbocátion de ω -5 para ω -6, descarboxilação, e saída de um próton, forma-se o Giffordeno (4). Numa outra via, a enzima E' abstrai um H radical da posição ω -11. A oxidação produz um carbocátion na mesma posição, cuja descarboxilação e rearranjo das ligações duplas propiciam a formação de uma ligação carbono-carbono entre C-3 e C-8. O feromônio obtido é o Aucanteno (11). A última via a utilizar o ácido dodecatrienóico (32) se subdivide em duas rotas principais, dependendo da conformação adotada pelo carbocátion em ω -8: uma delas é responsável pela origem dos ciclopentenos, enquanto a outra, pela formação dos feromônios com ciclos de 3 e 7 átomos de carbono, respectivamente. Entretanto, ambas obedecem ao processo básico de ativação

através da enzima E' na posição ω -8. Após descarboxilação (etapa seguinte), os caminhos biossintéticos se separam definitivamente. Na primeira via a descarboxilação origina uma ligação entre os carbonos 3 e 7 (Multifideno 8), e na segunda, a ligação se forma entre C-3 e C-5 (Hormosireno 5).

De acordo com a primeira via de ω -5, a redução da ligação dupla C-8 do Multifideno (8) é responsável pela formação do 3-butil-4-vinilciclopenteno (10); também sugerimos a formação do Viridieno (7) a partir de (8). Os mecanismos de desidrogenação não são completamente conhecidos, mas parecem proceder via oxidação ou uma eliminação *syn* concertada de um par de hidrogénios vicinais pró-R, sem a interferência de espécies oxigenadas (179). Mais adiante este mesmo mecanismo será utilizado para explicar outras desidrogenações deste tipo. Ainda nesta via é sugerida a obtenção do Caudoxireno (9) através da oxidação da ligação π em C-8, a partir de (7). Note-se que em (7) a ligação é *cis* enquanto em (9) o epóxido se encontra em posição *trans*, o que deve indicar a interferência de um componente capaz de proceder a isomerização *cis-trans* da ligação. Pode também ocorrer epoxidação.

Na segunda via, o Hormosireno (5) é o primeiro componente formado, e a redução da ligação dupla em C-8 dá origem ao Dictyoptereno A (6). O isômero *cis* de (5), por ser termicamente instável forma o Ectocarpeno (13), através de um Rearranjo de Cope, enquanto uma redução da ligação dupla da

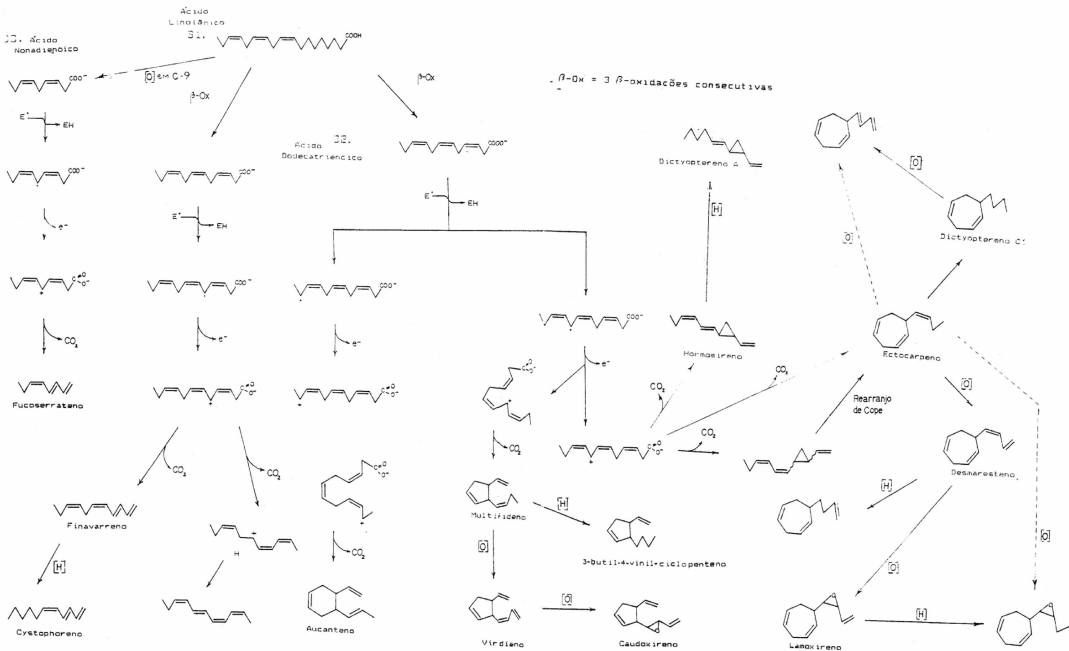
cadeia lateral de (13) forma o Dictyopterenol (18). Este, através do mesmo mecanismo citado acima sofre duas desidrogenações na cadeia lateral originando a Estrutura (16). Já o Desmaresteno (12) é obtido pela abstração de dois hidrogênios das posições C-10 e C-11 do Ectocarpeno (13). Uma redução envolvendo ainda os carbonos 8 e 9 irá formar a Estrutura (17). O Lamoxireno (14) decorre de uma epoxidação da ligação dupla em C-8 do Desmaresteno (12), e a Estrutura (15) de uma redução da ligação dupla terminal de (14).

Podemos observar que nesta última via os carbonos 3 e 8 foram os mais comumente envolvidos na formação dos componentes do "bouquet", o que os destaca em importância durante a formação dos hidrocarbonetos com ciclos de 5 e 7 membros. Deve-se também ressaltar que o carbono 3 está envolvido em quase todos os processos de estabilização de carga na formação direta dos feromônios com anéis de 3, 5 e 6, e indireta dos feromônios com anéis de 7 membros.

O Fucoserrateno (1) é, até a presente data, o único feromônio sexual com 8 átomos de carbono. Apesar disso, é provável que seu processo biossintético obedeça o mesmo padrão descrito para os demais feromônios sexuais, diferindo destes apenas no que se refere ao substrato - ácido nonadienólico (33) (ESQUEMA II).

ESQUEMA II: Proposta biosintética para todos os feromônios

sexuais de algas pardas e seus sub-produtos



II. F. ASPECTOS FILOGENETICOS

Como foi dito anteriormente, os dados obtidos na literatura sobre a ocorrência dos feromônios sexuais nas espécies de Phaeophyta encontram-se resumidos na TABELA I, que indica a presença destas substâncias em 68 espécies pertencentes a 45 gêneros de algas pardas. Nesta TABELA pode-se observar que feromônios sexuais idênticos ou biogeneticamente relacionados têm sido isolados em grupos taxonômicos distantes. MULLER, et al. (1986) (219) acreditam que este tipo de comunicação deva datar de, pelo menos 800 milhões de anos (Pré-Cambriano). Tendo em vista este imenso espaço-tempo geológico, as modificações observadas nas estruturas, e conseqüentemente nos seus receptores são extraordinariamente pequenas (177). Este caráter eminentemente conservativo reflete o fundamental significado da reprodução sexuada e, em particular, das interações através do uso dos feromônios no ciclo de vida e na filogenia das algas pardas marinhas (176). Devido à ampla ocorrência de Ectocarpeno (13) como atrativo sexual ou possível intermediário inativo de outros feromônios, alguns autores (218) acreditam que ele possa ser o exemplo do mais antigo atrativo sexual das Phaeophyta, a partir do qual outros sistemas se derivaram durante a diversificação filogenética.

Ao analisarmos a FIGURA 11 separadamente, podemos

observar as seguintes tendências: a) as ordens mais próximas à origem do grupo Phaeophyta produzem, mais frequentemente, hidrocarbonetos com ciclos de 5 e/ou 7 átomos de carbono; b) as ordens Fucales e Durvilleales (ambas bastante evoluídas) utilizam vias biossintéticas que levam à formação de olefinas acíclicas ou hidrocarbonetos contendo ciclos de três membros. Ou seja, os processos reprodutivos envolvendo iso e anisogamia parecem estar relacionados principalmente com feromônios que possuam anéis ciclopentênicos ou ciclo-heptadiênicos. Já nas ordens onde a oogamia predomina, os feromônios ativos são frequentemente lineares ou contêm um anel ciclopropânico. Apenas nos gêneros *Fucus* e *Sargassum* foi observado um feromônio com 8 átomos de carbono, o qual parece derivar de uma rota biossintética diferente (como proposto acima), mas que também se inclui no grupo dos hidrocarbonetos lineares.

Já na FIGURA 12, que inclui todos os componentes minoritários do "bouquet", as tendências observadas, em comparação com a FIGURA anterior (11), não são tão claras, e por vezes se confundem. Para amenizar as dúvidas geradas até aqui devemos considerar um dado importante: estudos realizados até o momento presente indicam falta de especificidade enzimática durante a formação dos feromônios e subprodutos do "bouquet" (222), o que justificaria a ocorrência tanto de hidrocarbonetos cíclicos quanto lineares em várias ordens taxonomicamente distantes. No entanto, é possível notar que em Isogeneratae as estruturas lineares ou com ciclos de 3 membros são menos frequentes, quando comparados com Heterogeneratae. Tais

considerações nos trazem de volta à questão sobre os verdadeiros mecanismos que levaram as algas pardas a uma diversificação tão discreta no que se refere a um grupo de metabólitos importantes na sobrevivência das espécies como um todo. Para testar a aplicabilidade da nossa tentativa em confrontar as Ordens de algas pardas com as estruturas dos feromônios sexuais, comparamos os resultados obtidos nas FIGURAS 11 e 12 com uma proposta evolutiva diferente.

Para esta outra proposta (FIGURA 13), nas diversas Ordens a semelhança estrutural dos feromônios não é evidente; apesar disso, Cyclosporidae se encontra de maneira mais ou menos destacada com relação à Phaeophycidae. E este padrão se torna ainda mais nítido na FIGURA 14. Com isso, as ordens em Phaeophycidae parecem não apresentar nenhuma relação taxonômica significativa com os feromônios sexuais. Mas após uma apreciação minuciosa dos feromônios nos foi possível observar o seguinte comportamento: nos feromônios ou produtos-traço do "bouquet" com ciclos de 5 ou 7 membros as ligações duplas conjugadas não são frequentes, as únicas exceções são o Viridieno (7) e o Desmaresteno (12). O mesmo não acontece com os feromônios lineares ou que apresentam anéis de 3 membros, como no caso do Fucoserrateno (1), Finavarreno (2), Cystophoreno (3), Giffordeno (4), Hormosireno (5) e Dictyopterenos A (6). Depois de diversos testes com homólogos dos feromônios sexuais de *Adenocystis*, *Ectocarpus* e *Sphacelaria*, MÜLLER, et al. (1985) (213) concluíram que o mecanismo de reconhecimento

da molécula do feromônio por polarização mútua do receptor e do mensageiro tem sido modificado através do desenvolvimento individual e, desta forma expresso na filogenia.

Estas informações nos incitaram a especular sobre o significado evolutivo das transformações estruturais nas moléculas dos feromônios sexuais das algas pardas e, tudo leva a crer que estas substâncias possam ser utilizadas não como marcadores taxonômicos (como se tem sugerido), mas sim como marcadores filogenéticos pois, em geral, metabólitos intimamente ligados a funções vitais (neste caso a reprodução) determinam modificações profundas ocorridas nos organismos e acompanham de maneira mais ou menos linear os processos de avanço filogenético. É também provável que a especificidade no reconhecimento do feromônio e sua própria biossíntese tenham caminhado de maneira complementar uma à outra, à medida em que a competição por espaço e os obstáculos ambientais pressionavam as espécies em seu habitat.

Por outro lado, os próprios componentes do "bouquet" nos dão base para especular sobre a razão da existência de dois ou mais produtos nas secreções dos gametas das algas pardas. Com algumas exceções, os "bouquets" são compostos por substâncias cujas estruturas estão relacionadas entre si, por exemplo: gametas masculinos de *Ferithalia caudata* são intensamente atraídos pelo Caudoxireno (9) (produto de maior atividade) (317). No entanto, além deste mais dois produtos

são encontrados em seu "bouquet" - Viridieno (7) e Multifideno (8). Uma análise do processo biossintético tendo o Multifideno (8) como ponto de partida, indica o Viridieno (7) e o Caudoxireno (9) (epoxi-grupo na configuração trans) como produtos pertencentes à mesma via biogenética (ESQUEMA II). Esta tendência é também observada em espécies da Ordem Laminariales que utilizam o Lamoxireno (14) como feromônio ativo (ESQUEMA II). Em muitos outros casos, os componentes do "bouquet", assim como o próprio componente ativo, parecem pertencer a uma mesma via biossintética, fato que justificaria a presença de mais de um composto da secreção de gametas.

Isso parece sugerir que a presença do Ectocarpeno (13) em algumas espécies mais evoluídas (dentro de Phaeophyta) talvez não deva ser interpretada como uma reminiscência filogenética (218), mas como um componente indispensável à biossíntese de outros feromônios cicloheptadiênicos.* O mesmo acontecendo com o Hormosireno (5), quando presente como subproduto em espécies consideradas menos evoluídas. Os feromônios sexuais, bem como seus produtos-traço tem sido usados para reforçar a existência de várias linhas evolutivas entre as Laminariales (149,171,174).

* ou mesmo como um artefato de isolamento nos "bouquets".

FIGURA 11: Esquema evolutivo da divisão Phaeophyta, segundo CHAPMAN & CHAPMAN (1981), adaptada às substâncias ativas do "bouquet" (feromônios sexuais).

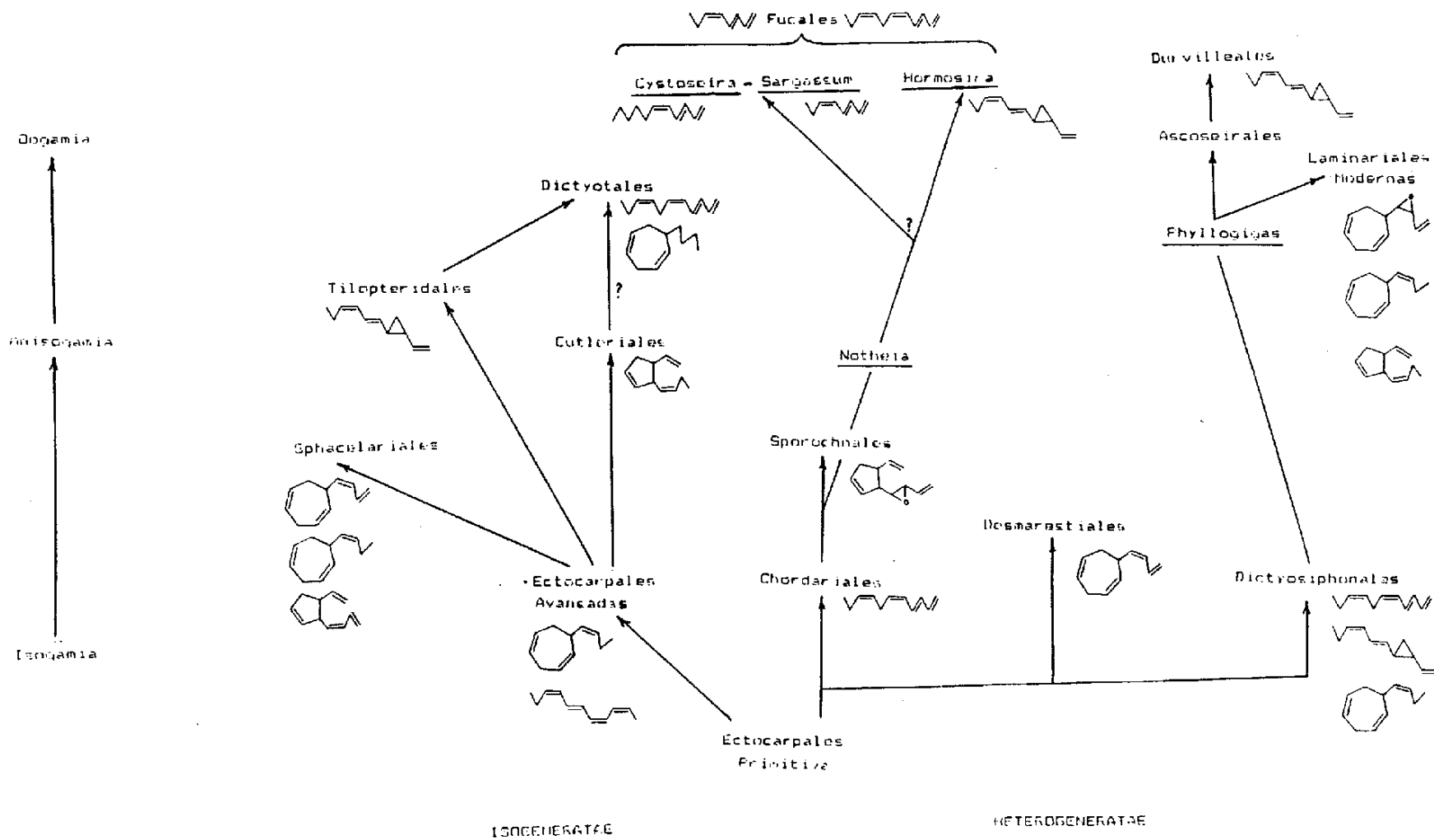


FIGURA 12: Esquema evolutivo da Divisão Phaeophyta, segundo CHAPMAN & CHAPMAN (1981), adaptada a todos os feromônios sexuais e subprodutos do "bouquet".

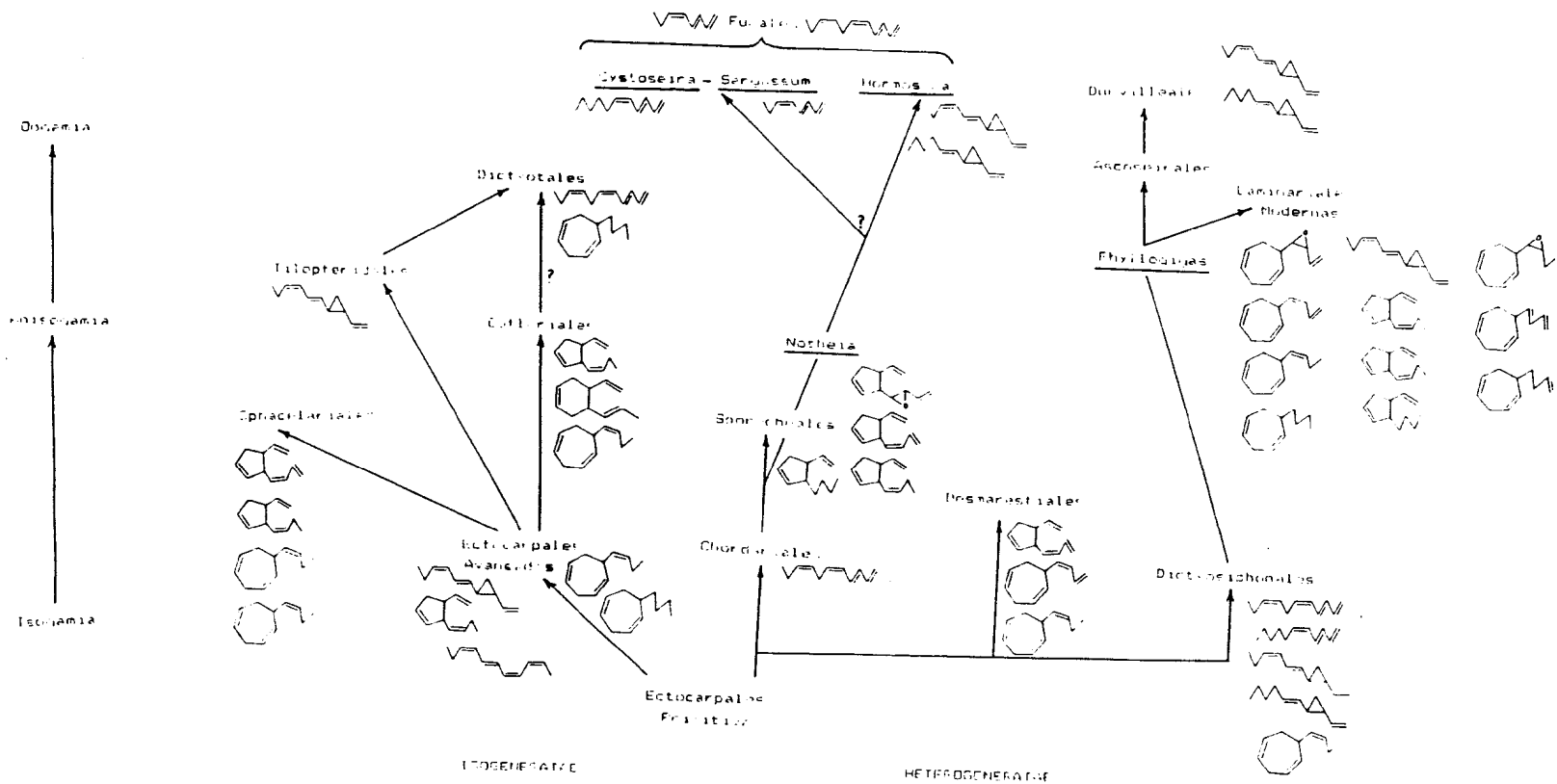


FIGURA 13: Afinidades filogenéticas da Divisão Phaeophyta (SCAGEL, 1966 & NAKAMURA, 1972 ;IN 320), onde se encontram incluídas as substâncias ativas do "bouquet" (feromônios sexuais).

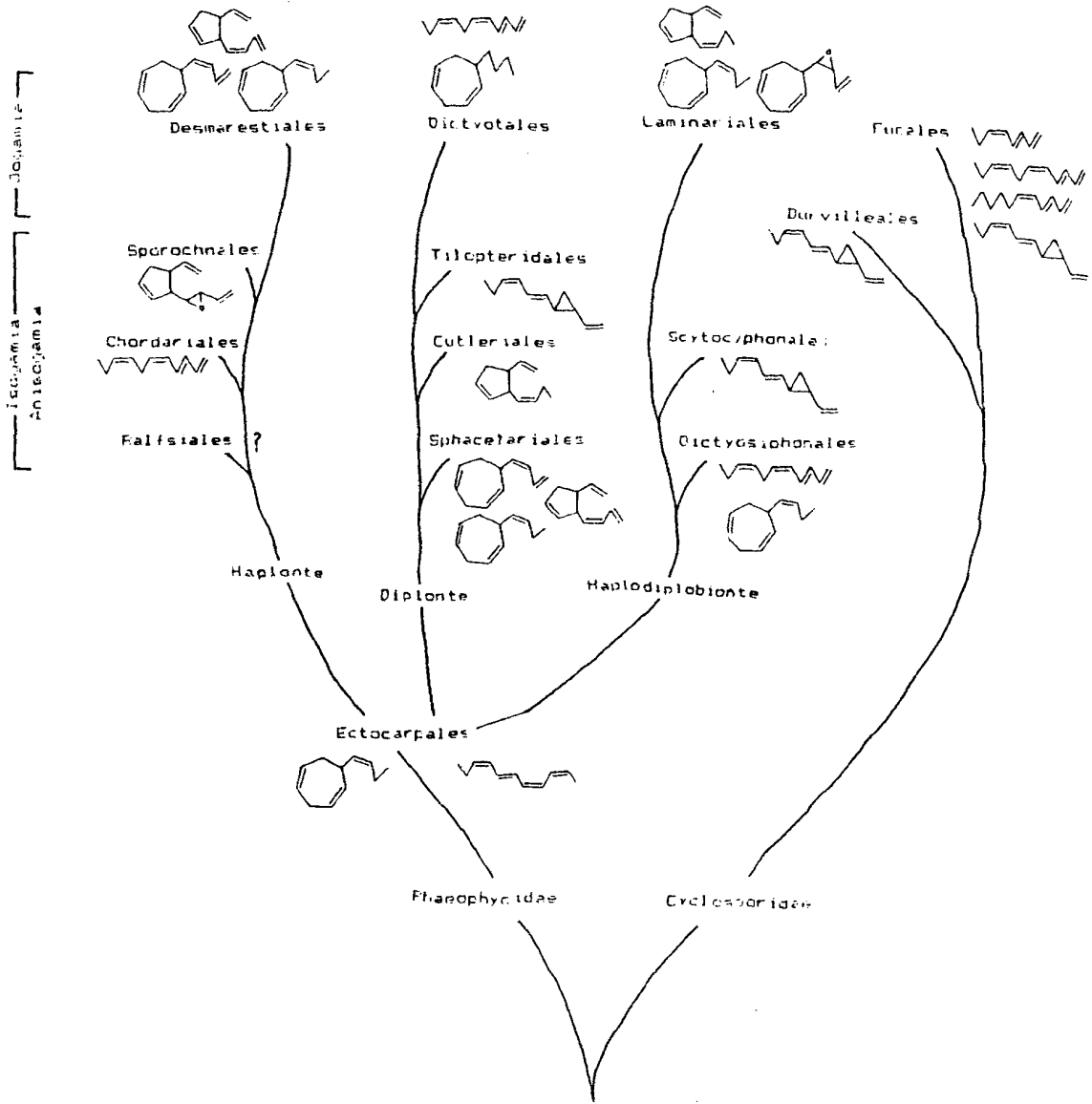
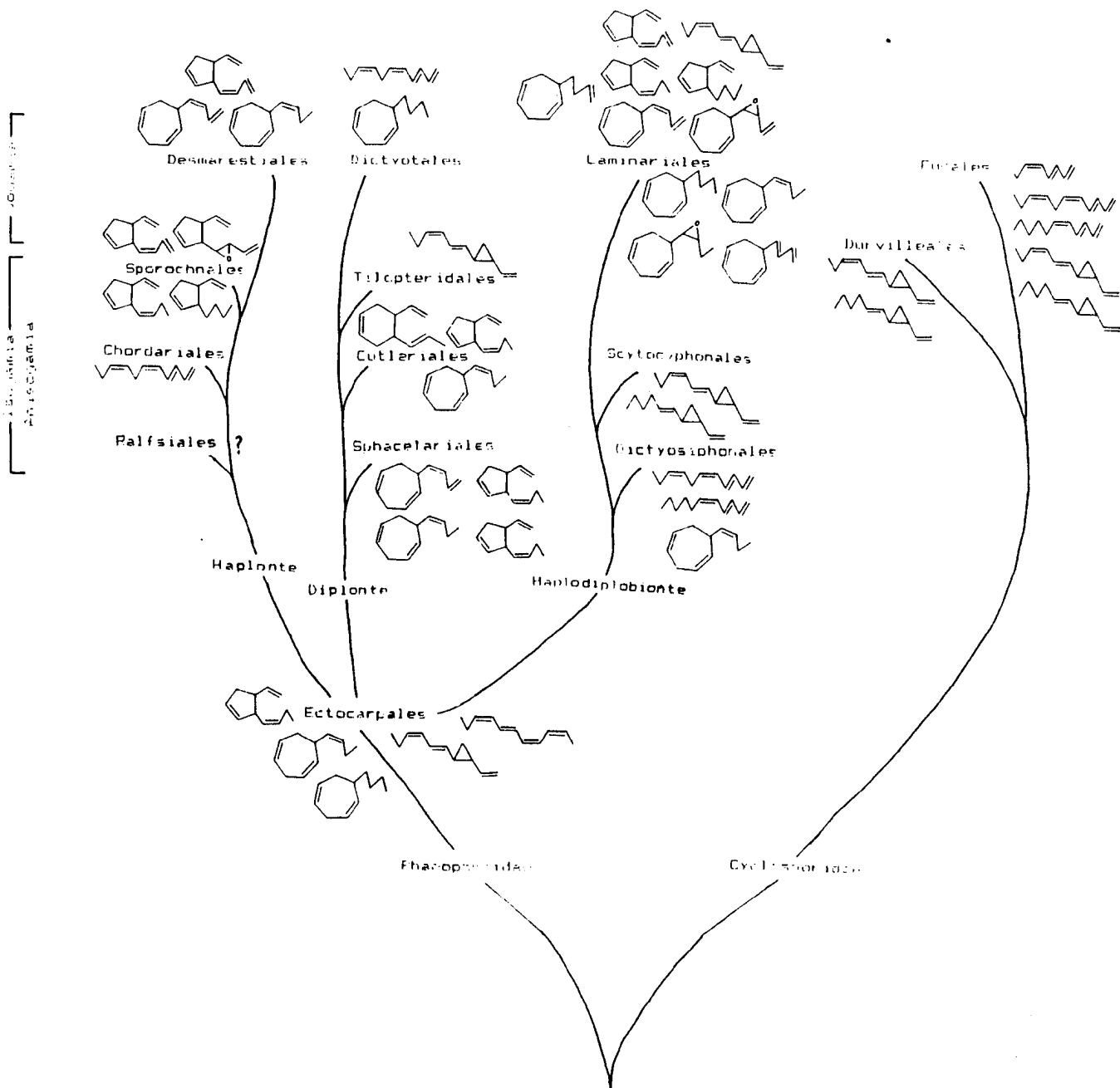


FIGURA 14: Afinidades filogenéticas da Divisão Phaeophyta (SCAGEL, 1966 & NAKAMURA, 1972; IN 320). onde se encontram incluídas todas as estruturas dos feromônios sexuais e subprodutos do "bouquet".



A observação e a comparação das propostas biossintéticas (FIGURAS 7 e 8; ESQUEMA II) e evolutivas (FIGURAS 11,12,13 e 14) apresentadas acima, nos trouxe uma outra pergunta: o que caminhará paralelamente à evolução, a diversificação ou a simplificação dos passos biossintéticos que dão origem aos feromônios sexuais?

Segundo GOTTLIEB (1982) ambas, a diferença seria quanto à hierarquia. Dentro deste raciocínio a evolução, em níveis hierárquicos superiores é acompanhada pela contração dos passos reacionais e oxidação, enquanto nos níveis inferiores é acompanhada pela expansão dos passos reacionais e redução (100). GOTTLIEB defende ainda a existência de dois conceitos básicos de evolução: o primeiro princípio determina que a evolução, a partir dos precursores primários, procede pelo bloqueio de passos reacionais, os quais levam a novas linhas químicas; o segundo princípio afirma que a evolução das micromoléculas ocorre através da oxidação.

Apesar da simplicidade estrutural dos feromônios sexuais ser evidente, as proposições acima nos estimularam a fazer uso das técnicas estatísticas desenvolvidas por GOTTLIEB para outros grupos de substâncias do metabolismo secundário vegetal. De acordo com as mesmas, a cada substância corresponde um valor referente ao Índice de Oxidação (IO) e ao Índice de Esqueleto (IE), calculados como se segue:

$$IO = \frac{-A + B}{C} \quad \text{e} \quad IE = \sum \frac{D}{C}$$

onde: A = número de ligações C-H (um ponto cada).

B = número de ligações C-O (um ponto cada).

C = número total de Carbonos.

D = número teórico de passos reacionais (ligações C-C estabelecidas ou rompidas) a partir do precursor.

Os pontos da variável D são atribuídos da seguinte maneira:

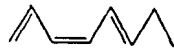
- um ponto para cada átomo de Carbono de uma ligação C-C, formada ou cindida;
- zero ponto para a quebra ou formação de ligação C-H e π ;
- um ponto para cada átomo de Carbono envolvido em ligações com hetero-átomos em fechamento ou abertura de anel;
- um ponto para cada átomo de Carbono do esqueleto que se ligar a um Carbono adicional.

Na TABELA II encontram-se listados os feromônios sexuais, subprodutos do "bouquet", e outros hidrocarbonetos C_8 e C_{11} isolados das algas pardas, bem como os respectivos valores de Índice de Oxidação (IO) e de Esqueleto (IE).

Por se tratarem de estruturas muito pouco elaboradas, as variações dos valores para (IO) e (IE) não pareceram muito significativas. Numa outra abordagem foram plotados, para cada Ordem, os valores referentes às médias dos Índice de Oxidação (\overline{AEO}) e médias dos Índices de Esqueleto (\overline{AEe}) (TABELA III). Os Gráficos obtidos a partir dessas TABELAS se encontram nas FIGURAS 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22.



34



35



36



37



38



39



40



41



42



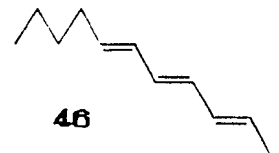
43



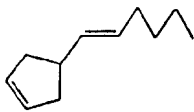
44



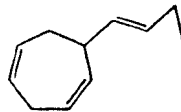
45



46



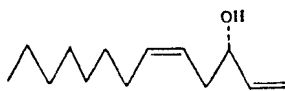
47



48



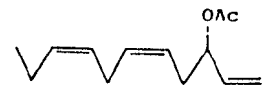
49



50



51



52

$C_{15}H_{32}$

53

TABELA II: Feromônios sexuais, subprodutos do bouquet e outros hidrocarbonetos isolados de algas pardas, incluindo os valores de Índice de Oxidação (IO) e Índice de Esqueleto (IE). N° = : numero de ligações duplas; $N^{\circ}C$: numero de Carbonos.

NOME/ N° DA ESTRUTURA	FÓRMULA MOLECULAR	I. O.	I. E.	I. O. / I. E.	$N^{\circ} = / N^{\circ}C$
Fucoserrateno (1)	$C_8 H_{12}$	-1.5	0.125	-12.0	0.375
Finavarrreno (2)	$C_{11} H_{16}$	-1.454	0.091	-15.978	0.363
Cystophoreno (3)	$C_{11} H_{18}$	-1.636	0.091	-17.978	0.273
Giffordeno (4)	$C_{11} H_{16}$	-1.454	0.091	-15.978	0.363
Hormosireno (5)	$C_{11} H_{16}$	-1.454	0.273	-5.326	0.273
Dictyoptereno A (6)	$C_{11} H_{18}$	-1.636	0.273	-5.992	0.182
Viridieno (7)	$C_{11} H_{14}$	-1.273	0.273	-4.663	0.363
Multifideno (8)	$C_{11} H_{16}$	-1.454	0.273	-5.326	0.273
Caudoxireno (9)	$C_{11} H_{14} O$	-1.091	0.454	-2.403	0.273
3-butil-4-vinil -ciclopenteno (10)	$C_{11} H_{18}$	-1.636	0.273	-5.992	0.182
Aucanteno (11)	$C_{11} H_{16}$	-1.454	0.273	-5.326	0.273
Desmaresteno (12)	$C_{11} H_{14}$	-1.273	0.545	-2.336	0.363
Ectocarpeno (13)	$C_{11} H_{16}$	-1.454	0.545	-2.666	0.273
Lamoxireno (14)	$C_{11} H_{14} O$	-1.091	0.727	-15.50	0.273
Estrutura (15)	$C_{11} H_{16} O$	-1.273	0.727	-1.751	0.182
Estrutura (16)	$C_{11} H_{14}$	-1.273	0.545	-2.336	0.363
Estrutura (17)	$C_{11} H_{16}$	-1.454	0.545	-2.666	0.273
Dictyoptereno C' (18)	$C_{11} H_{18}$	-1.636	0.545	-3.002	0.182
Hidrocarboneto (34)	$C_8 H_{12}$	-1.5	0.125	-12.0	0.375

Hidrocarboneto (35)	$C_8 H_{12}$	-1.5	0.125	-12.0	0.375
Hidrocarboneto (36)	$C_8 H_{12}$	-1.5	0.125	-12.0	0.375
Hidrocarboneto (37)	$C_8 H_{12}$	-1.5	0.125	-12.0	0.375
Hidrocarboneto (38)	$C_{11} H_{18}$	-1.636	0.091	-17.978	0.273
Hidrocarboneto (39)	$C_{11} H_{18}$	-1.636	0.091	-17.978	0.273
Hidrocarboneto (40)	$C_{11} H_{18}$	-1.636	0.091	-17.978	0.273
Hidrocarboneto (41)	$C_{11} H_{16}$	-1.454	0.091	-15.978	0.363
Hidrocarboneto (42)	$C_{11} H_{16}$	-1.454	0.091	-15.978	0.363
Hidrocarboneto (43)	$C_{11} H_{16}$	-1.454	0.091	-15.978	0.363
Hidrocarboneto (44)	$C_{11} H_{16}$	-1.454	0.091	-15.978	0.363
Hidrocarboneto (45)	$C_{11} H_{16}$	-1.454	0.091	-15.978	0.363
Hidrocarboneto (46)	$C_{11} H_{18}$	-1.636	0.091	-17.978	0.273
Hidrocarboneto (47)	$C_{11} H_{18}$	-1.636	0.273	-5.982	0.182
Hidrocarboneto (48)	$C_{11} H_{16}$	-1.454	0.545	-2.668	0.273
Hidrocarboneto (49)	$C_{12} H_{24} O$	-1.833	0.083	-22.084	0.0
Hidrocarboneto (50)	$C_{19} H_{25} O$	-1.692	0.077	-21.974	0.154
Hidrocarboneto (51)	$C_{19} H_{22} O_2$	-1.384	0.077	-17.974	0.154
Hidrocarboneto (52)	$C_{19} H_{20} O_2$	-1.231	0.077	-15.987	0.231
Hidrocarboneto (53)	$C_{15} H_{92}$	-2.133	0.066	-32.318	0.0

TABELA III: Índices taxonômicos para as ordens de algas pardas. AEO = média dos valores de IO; AEe = média dos valores de IE.

ORDENS	PRODUTOS	AEO	AEe	AEO/AEe	$N^2 = 1/N^2C$
Ectocarpales	só ativos	-1.454	0.361	-4.572	0.318
Ectocarpales	todos	-1.490	0.345	-4.319	0.273
Dictyosiphonales	só ativos	-1.454	0.318	-4.572	0.318
Dictyosiphonales	todos	-1.514	0.242	-6.256	0.303
Scytosiphonales	só ativos	-1.454	0.273	-5.326	0.273
Scytosiphonales	todos	-1.545	0.273	-5.659	0.227
Laminariales	só ativos	-1.333	0.515	-2.588	0.273
Laminariales	todos	-1.388	0.479	-2.878	0.273
Sphacelariales	só ativos	-1.333	0.454	-2.936	0.333
Sphacelariales	todos	-1.363	0.409	-3.332	0.318
Cutleriales	só ativos	-1.454	0.273	-5.326	0.273
Cutleriales	todos	-1.454	0.363	-4.005	0.273
Tilopteridales	ativos	-1.454	0.273	-5.326	0.273
Dictyotales	ativos	-1.545	0.318	-4.858	0.272
Chordariales	ativos	-1.454	0.091	-15.978	0.363
Sporochnales	só ativos	-1.091	0.454	-2.403	0.273
Sporochnales	todos	-1.363	0.318	-4.286	0.273
Desmarestiales	ativos	-1.333	0.454	-2.936	0.333
Durvilleales	só ativos	-1.454	0.273	-5.326	0.273
Durvilleales	todos	-1.545	0.273	-5.659	0.227
Fucales	só ativos	-1.511	0.145	-10.120	0.321
Fucales	todos	-1.536	0.170	-9.035	0.293
Hidrocarbonetos	saturados	-1.983	0.074	-26.797	0.0
	dienos	-1.570	0.142	-11.056	0.163
	trienos	-1.523	0.147	-10.380	0.309
	tetraenos	-1.454	0.091	-15.978	0.363
	com oxigênio	-1.535	0.076	-20.197	0.135

FIGURA 15: Feromônios sexuais de algas pardas. Índice de Oxidação (IO) x Índice de Esqueleto (IE).

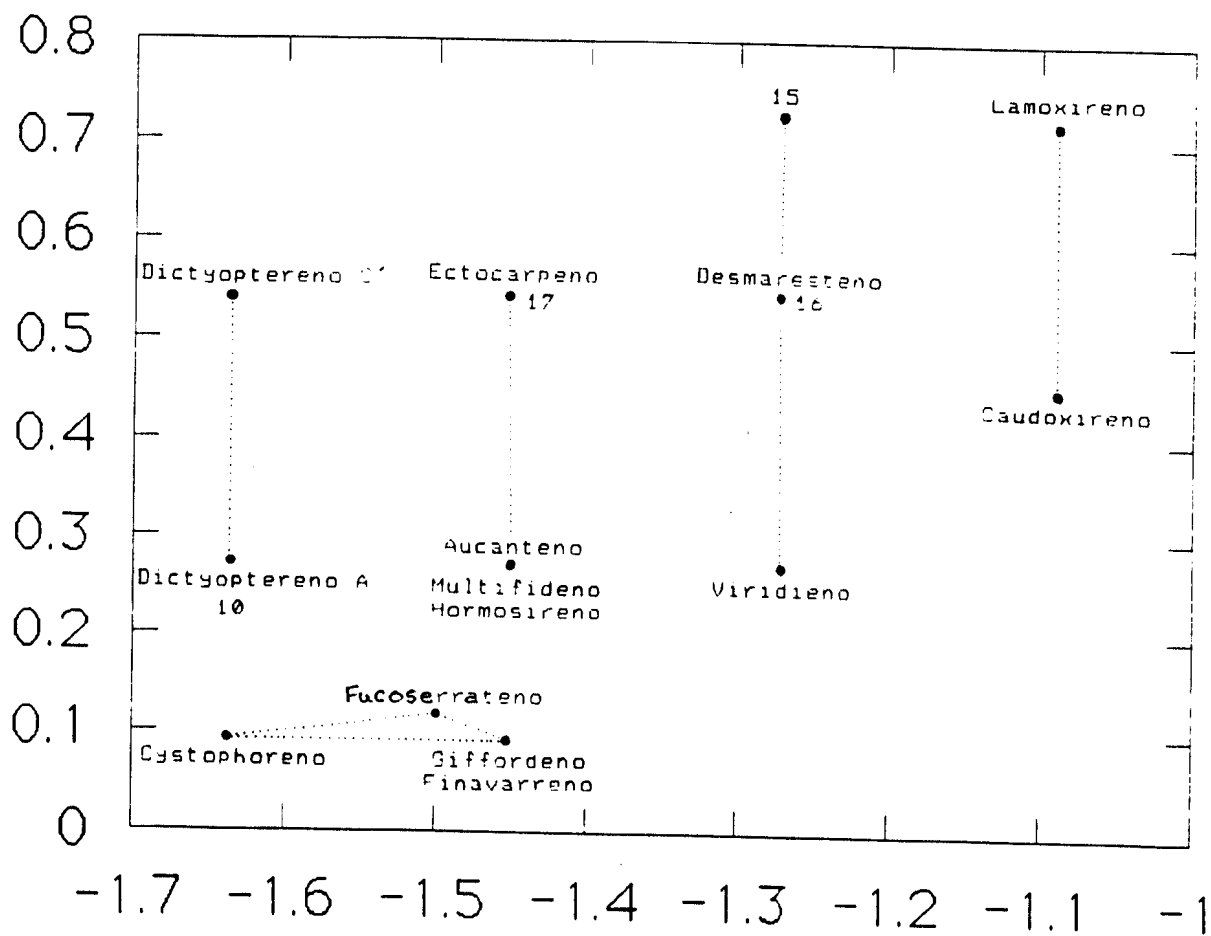


FIGURA 16: Hidrocarbonetos de algas pardas, Índice de Oxidação (IO) x Índice de Esqueleto (IE).

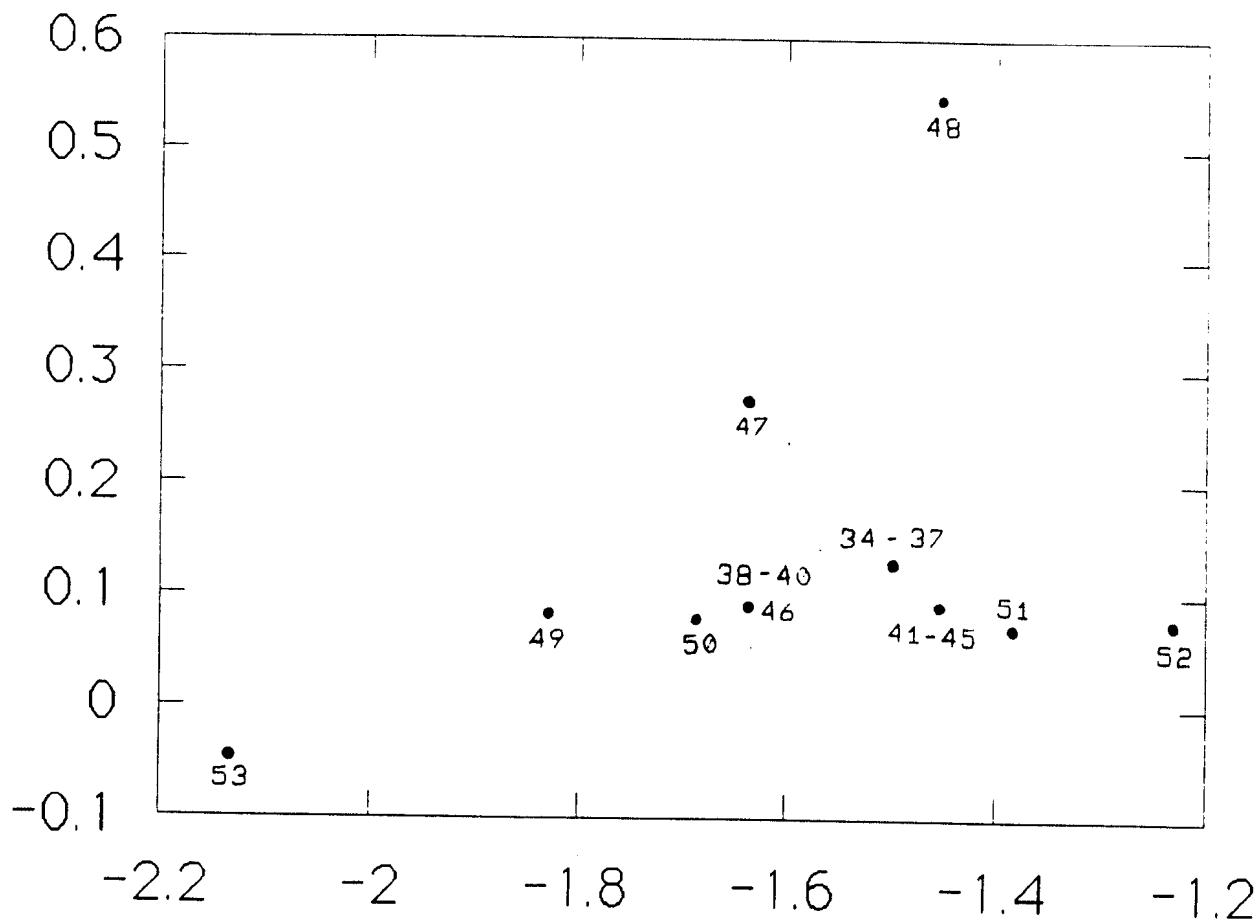


FIGURA 17: Feromônios sexuais de algas pardas, I.O./I.E. x N^c=/N^c.

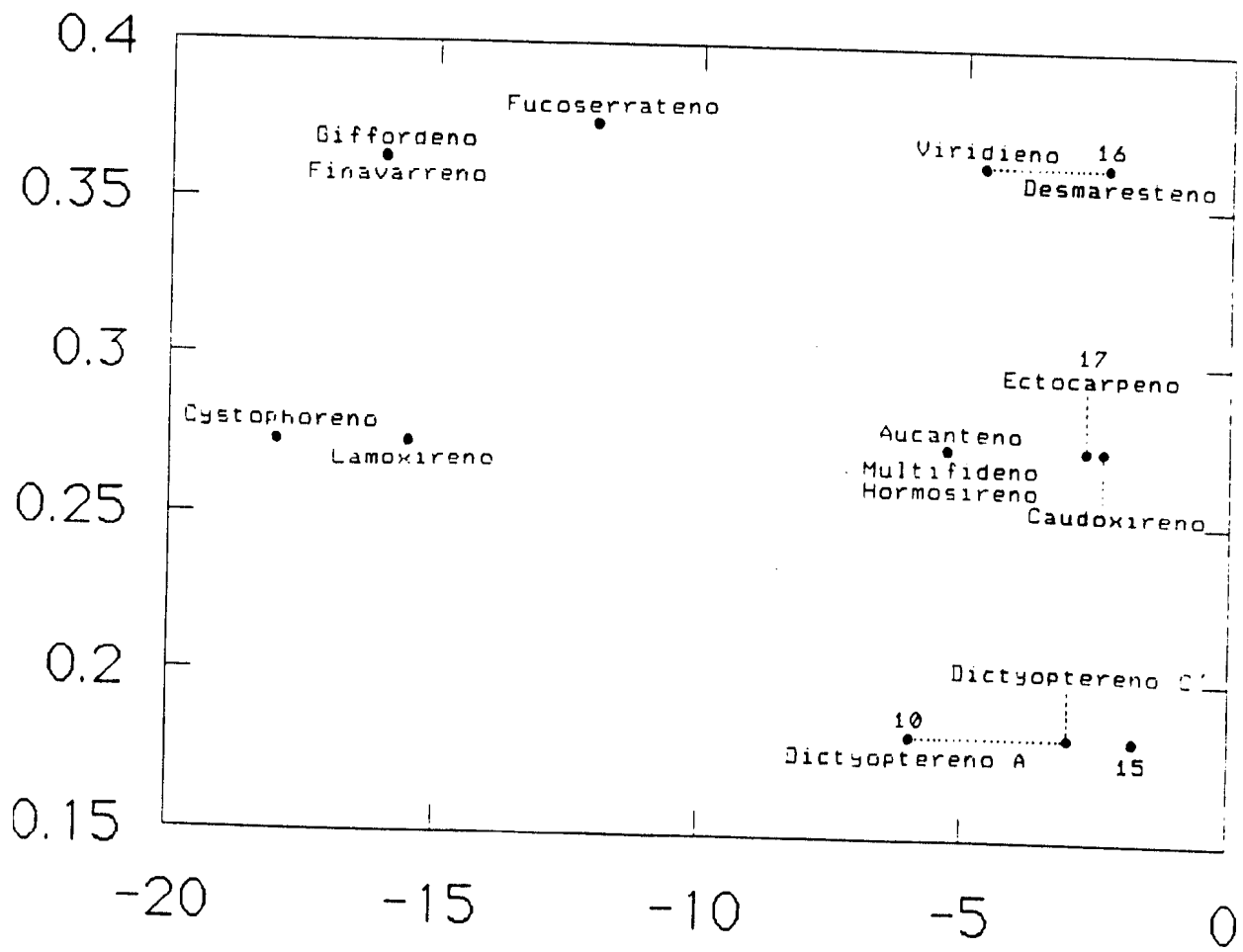


FIGURA 18: Hidrocarbonetos de algas pardas, I.O./I.E. \times
 $N^{\circ} = N^{\circ}C.$

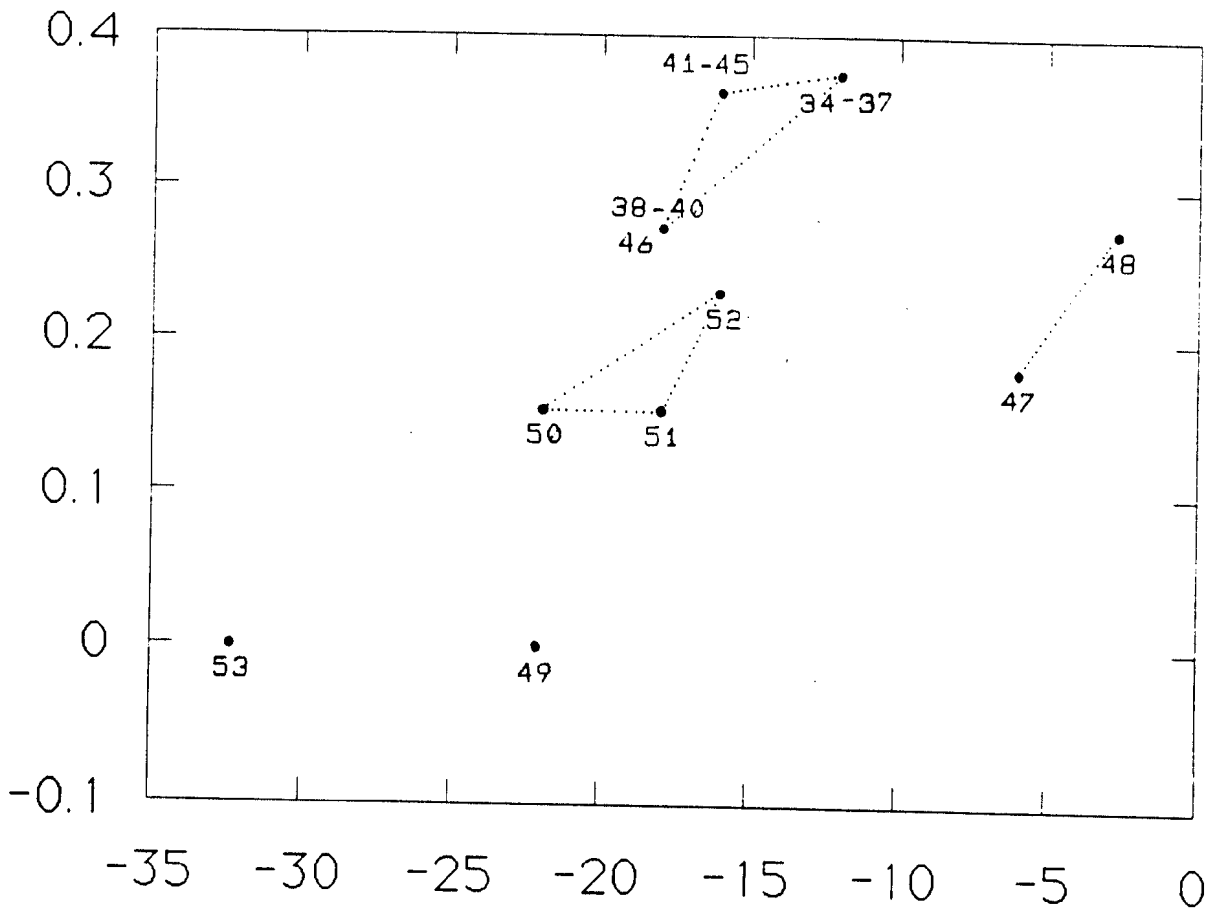


FIGURA 19: Feromônios sexuais de algas pardas (ordens). $\bar{A}\bar{E}o \times A\bar{E}e$.

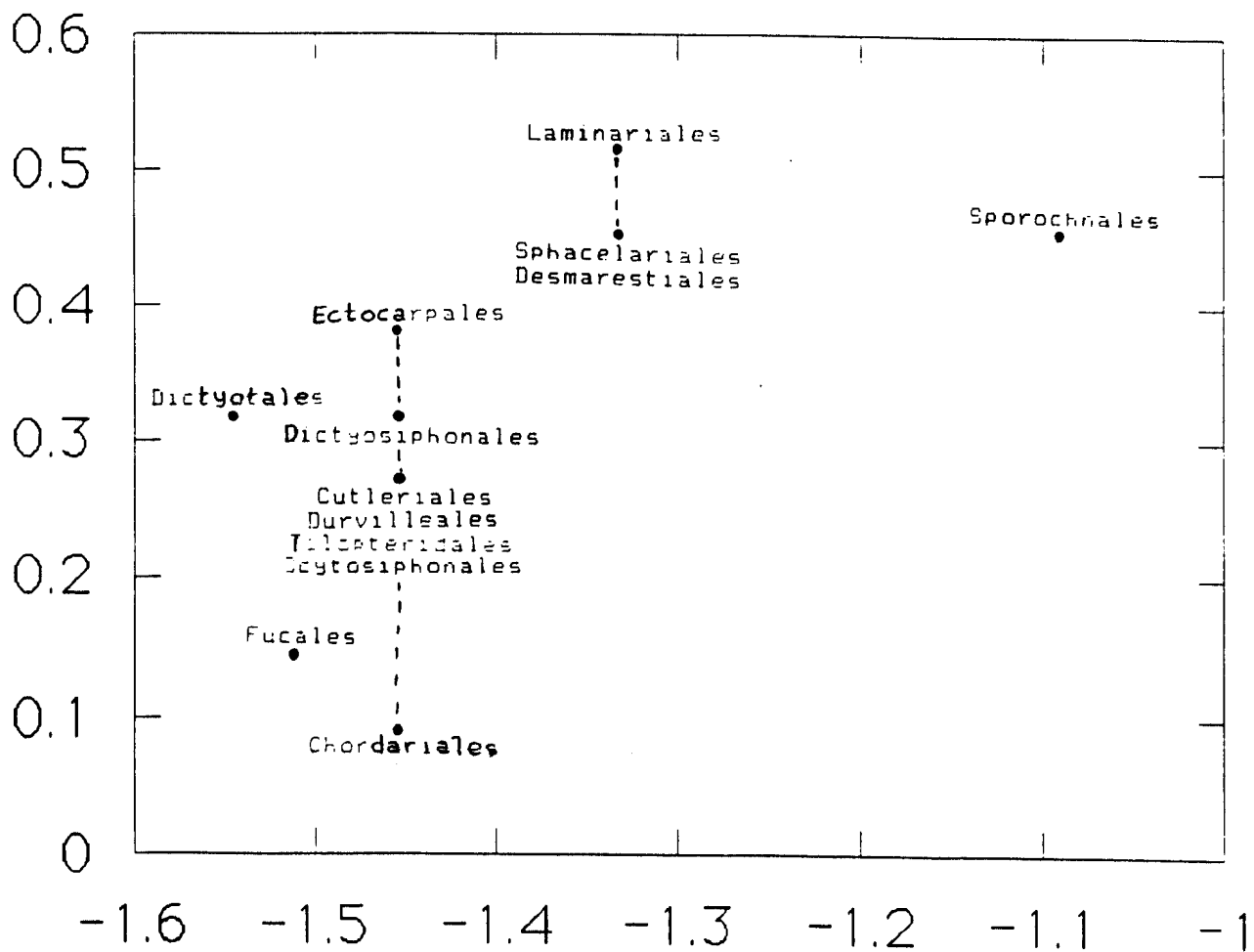


FIGURA 20: Feromônios sexuais de algas pardas (ordens); $\overline{AE}_o \times \overline{AE}_e$ (incluindo produtos-traço).

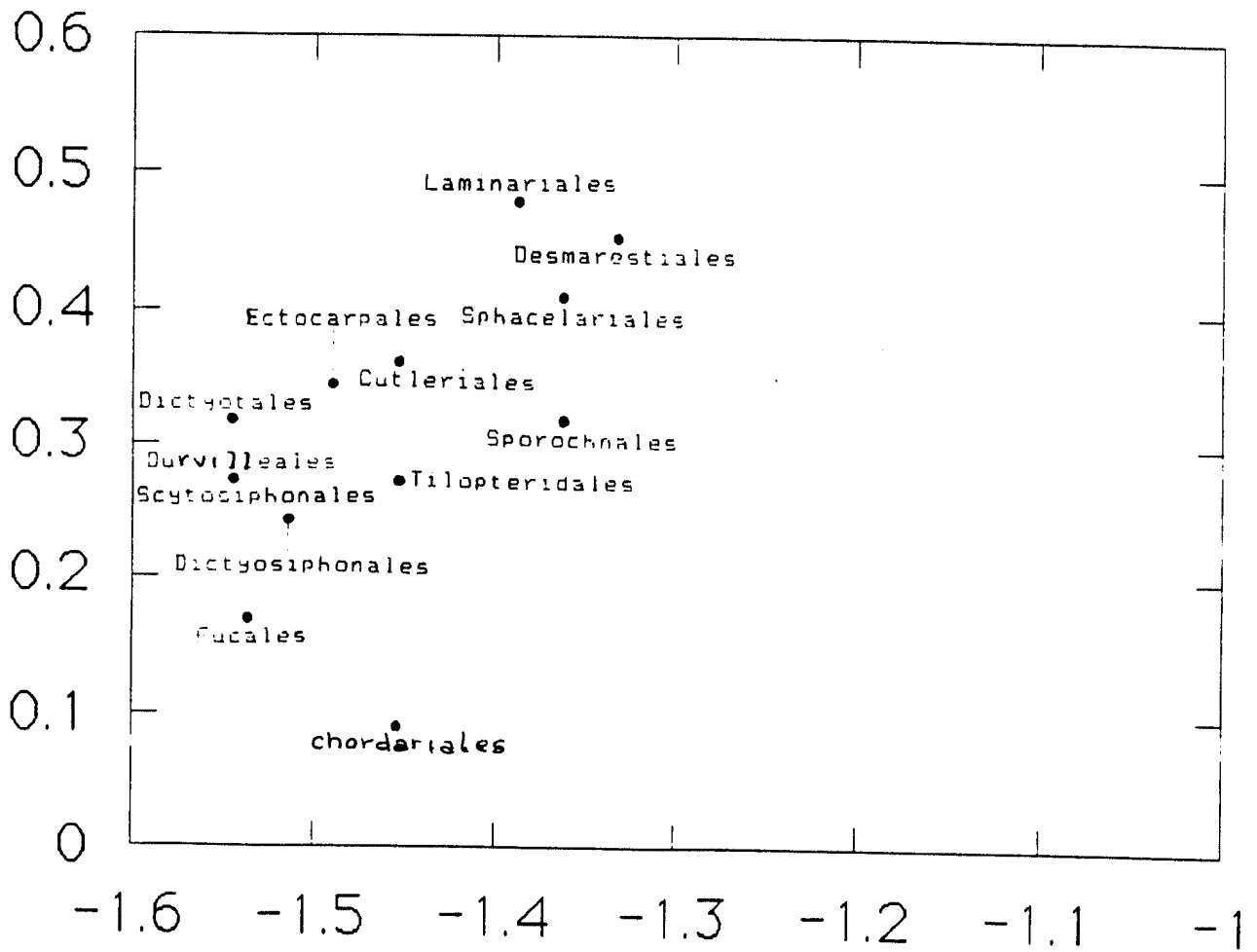


FIGURA 21: Feromônios sexuais de algas pardas (ordens);
 $\bar{A}\bar{E}o/\bar{A}\bar{E}e \times N^o = N^c$ (hidrocarb. ativos).

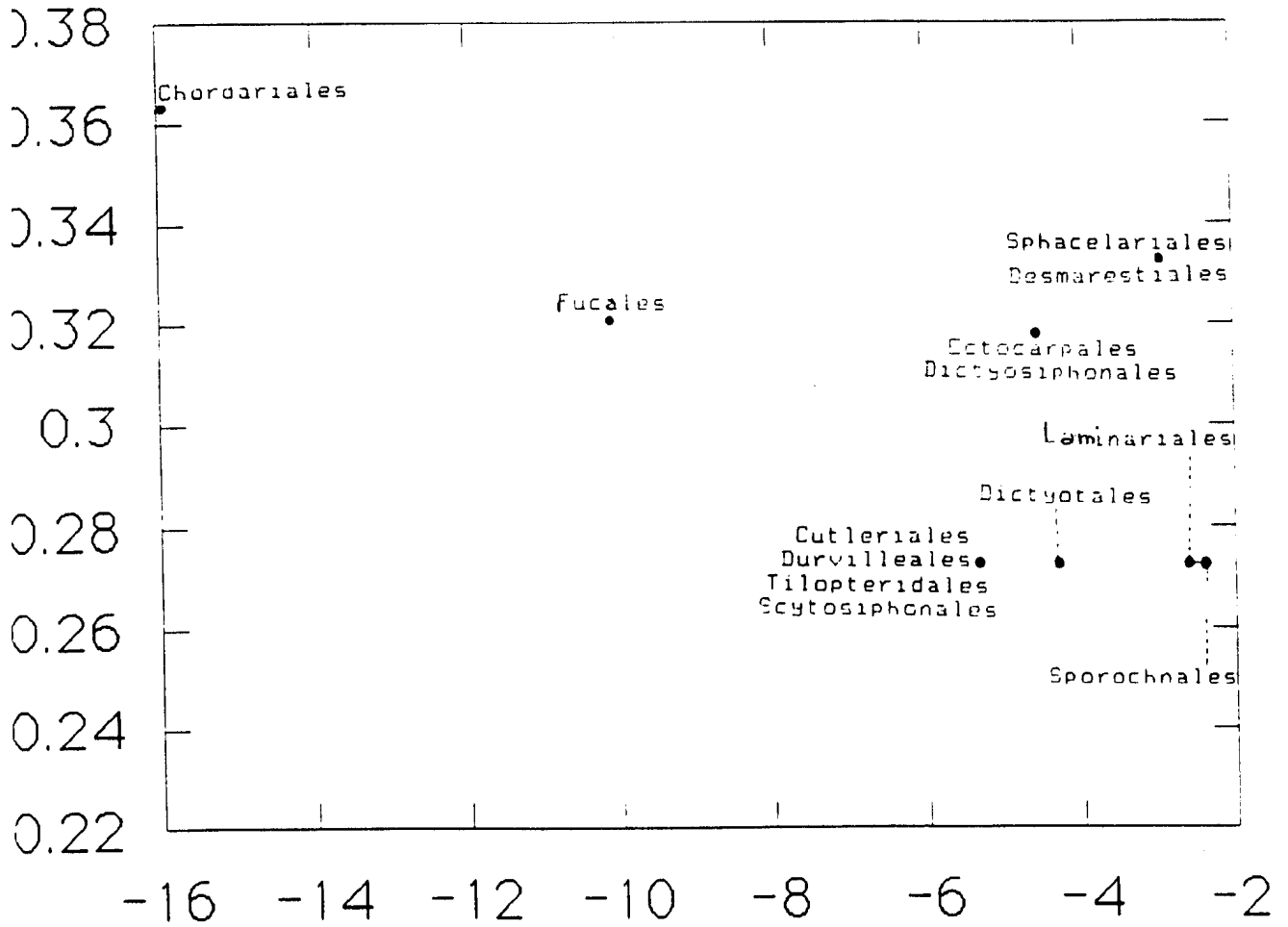


FIGURA 22: Feromônios sexuais de algas pardas (ordens);
 $\overline{AE_o}/\overline{AE_e} \times N^o = /N^oC$ (incluindo produtos-traço).

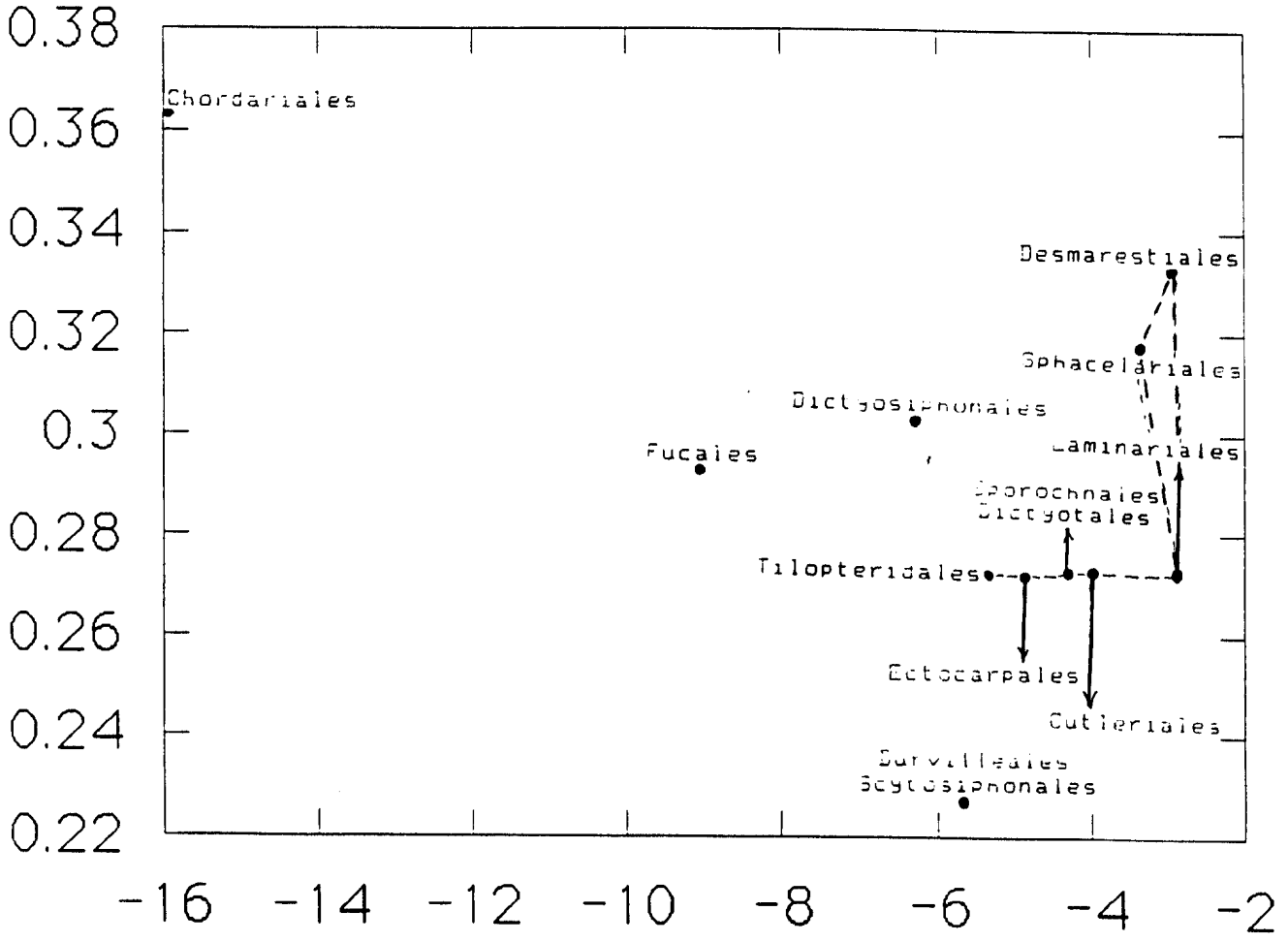


FIGURA 23: Hidrocarbonetos de algas pardas; $\overline{A\bar{E}o}/\overline{A\bar{E}e} \times N^{\circ} = /N^{\circ}C.$

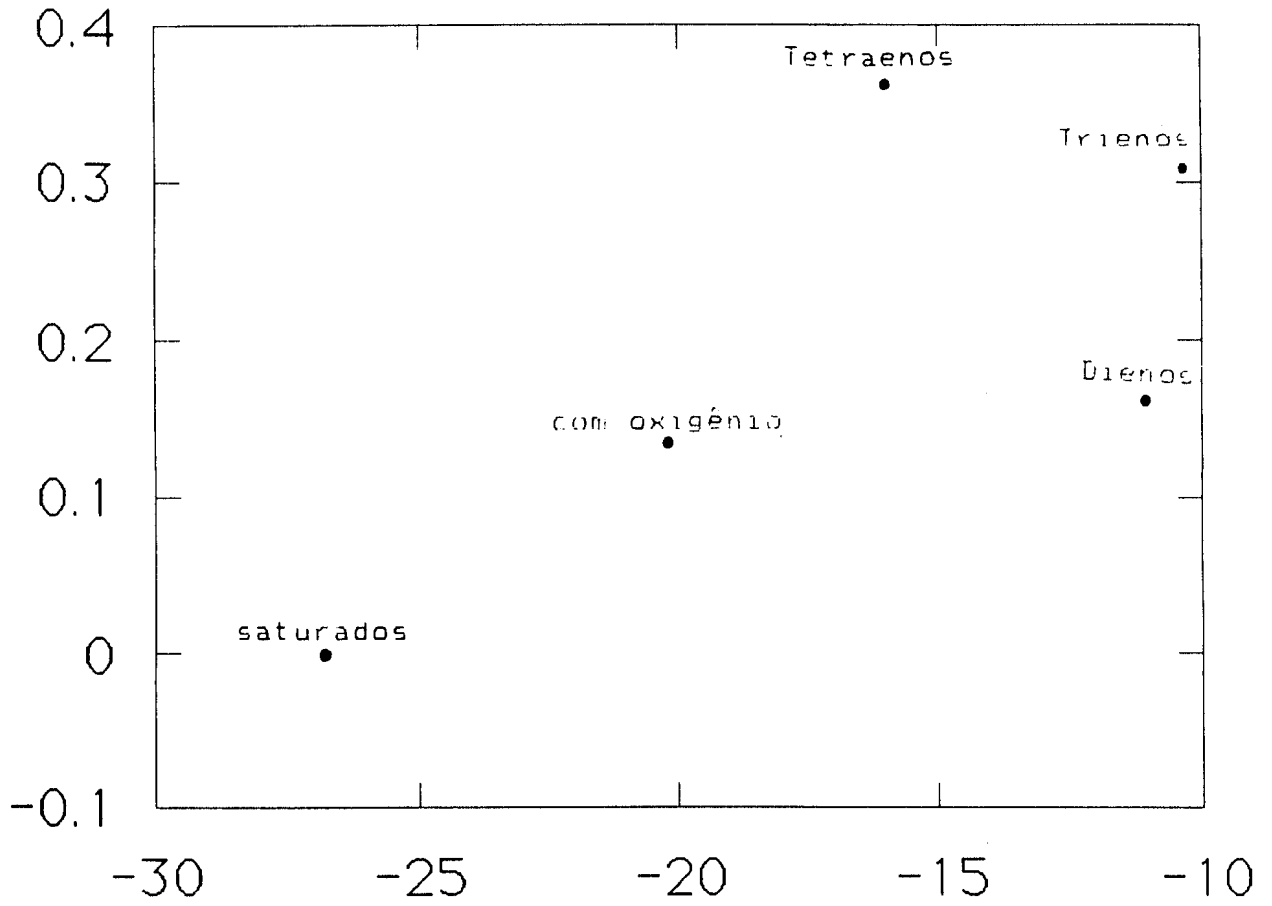
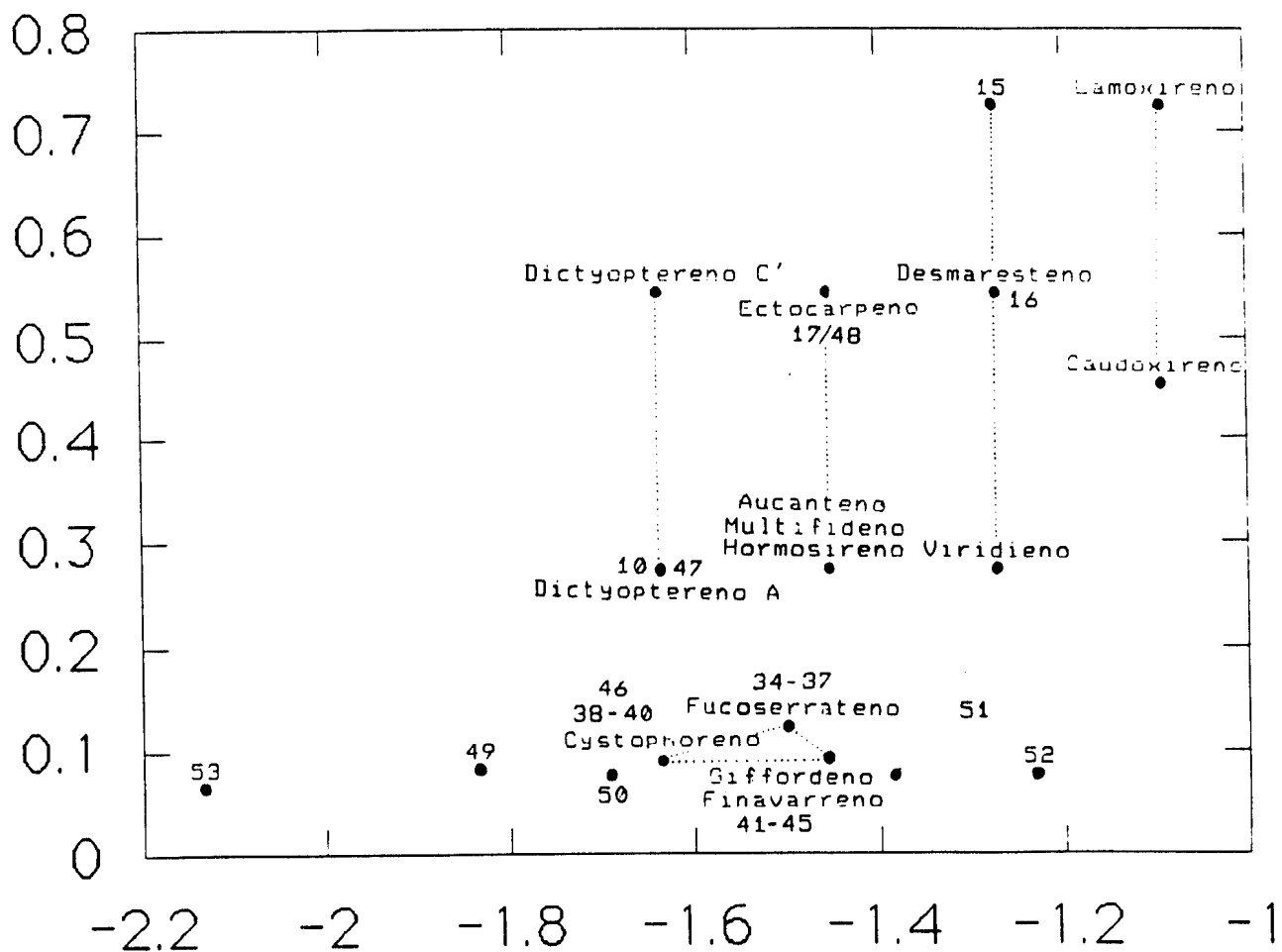


FIGURA 24: Feromônios sexuais (incluindo subprodutos) e hidrocarbonetos de algas pardas; I.O. x I.E..



Podemos observar que na base da FIGURA 15 destacam-se os feromônios lineares, na linha mediana encontram-se as estruturas contendo anel de 3 membros, seguindo-se os anéis de 5, 6 e 7 membros próximos ao limite superior da figura. As linhas pontilhadas indicam a relação entre as cadeias laterais mais saturadas (Dictyopterenos A e C', Estrutura **10**), com uma insaturação (Ectocarpeno, Estrutura **17**, Aucanteno e Multifideno), com 2 insaturações ou epóxido (Desmaresteno e Viridieno, Estruturas **15** e **16**), e com uma insaturação e um epóxido (Lamoxireno e Caudoxireno). O mesmo comportamento se repete na FIGURA 24, somam-se apenas as estruturas dos produtos-traço.

A FIGURA 16, assim como as FIGURAS 18 e 23, não são de fácil interpretação, já que os pontos se encontram dispersos de forma mais ou menos irregular, não obedecendo a nenhum padrão elucidativo. Na FIGURA 17 destaca-se apenas a relação entre o Aucanteno, o Multifideno e o Hormosireno (como na FIGURA 15).

Na FIGURA 19 (ordens: $\bar{A}\bar{E}o \times \bar{A}\bar{E}e$) pode-se observar a linearidade vertical entre as ordens Laminariales/Desmarestiales.Sphacelariales, bem como das ordens Ectocarpales/Dictyosiphonales/Cutleriales.Durvilleales.Tilopteridales.Scytosiphonales/Chordariales; os pontos referentes às ordens Sporochnales, Dictyotales e Fucales encontram-se mais afastados dos demais. Já na FIGURA 22 (ordens: $\bar{A}\bar{E}o/\bar{A}\bar{E}e \times N^o=N^oC$), as ordens Tilopteridales/Ectocarpales/Dictyotales.Sporochnales/Cutleriales/Laminariales apresentam uma relação linear horizontal, enquanto Durvilleales e Scytosiphonales parecem intimamente ligadas; as demais ordens se encontram em pontos distantes. Ao compararmos ambas as

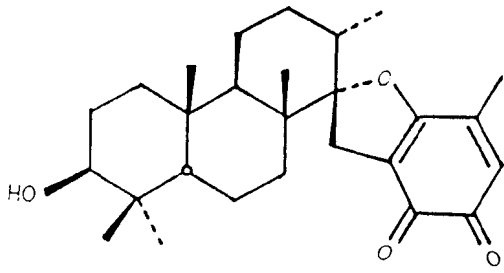
FIGURAS (19 e 22), o que se observa é que Durvilleales e Scytosiphonales (apesar da diferente disposição no gráfico) continuam ligadas a um único ponto; as ordens Ectocarpales/Tilopteridales/Cutleriales repetem sua relação linear; Desmarestiales, Sphacelariales e Laminariales ainda apresentam alguma relação.

Apesar dos dados ainda se apresentarem fragmentários e pouco elucidativos, é possível que num futuro próximo, tais relações venham a se tornar mais claras; no momento presente, a utilização dos feromônios sexuais de algas pardas como marcadores quimiotaxonômicos nos parece precoce. A precisão questionável dos métodos de extração traz dúvidas quanto a verdadeira composição dos "bouquets" e sobre a possibilidade da existência de outras estruturas minoritárias importantes não detectadas. O aprimoramento técnico dos métodos de extração, bem como a análise de secreções de algas ainda não estudadas serão indispensáveis para a viabilização de estudos quimiotaxonômicos mais esclarecedores.

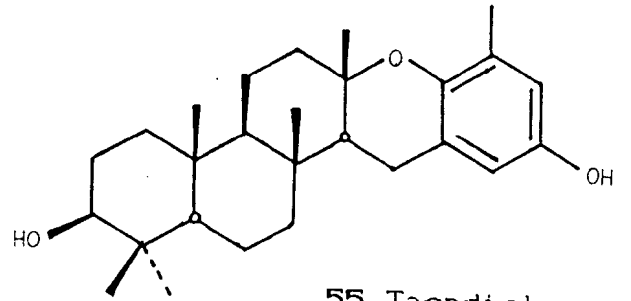
III. DITERPENOS DA ORDEM DICTYOTALES

As algas pardas da ordem Dictyotales apresentam diterpenos com uma grande variedade de estruturas e sistemas cíclicos, o que tem favorecido a utilização dos diterpenos simples e de biossíntese mista como marcadores quimiotaxonômicos (82,290). Entre os diterpenos de biossíntese mista estão Stypoldiona (54) e Taondiol (55), isolados dos gêneros *Styopodium* (87) e *Taonia* (94) respectivamente. Estes gêneros são, até o momento, os únicos representantes da ordem Dictyotales a apresentar diterpenos formados a partir de duas vias metabólicas distintas.

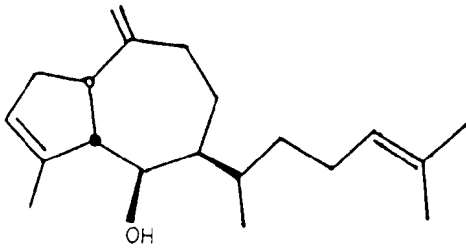
Alguns dos esqueletos diterpênicos elaborados pelas Dictyotaceae (única família da ordem Dictyotales) podem ser considerados como derivados prenilados de sesquiterpenos conhecidos (252). Pachydictyol A (56) por exemplo, cuja ocorrência é observada nos gêneros *Pachydictyon* (115), *Dictyota* (7,239,290), *Dilophus* (9) e *Glossophora* (288) esta



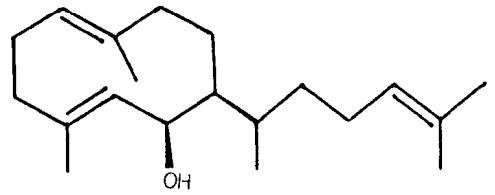
54. Stypoldiona



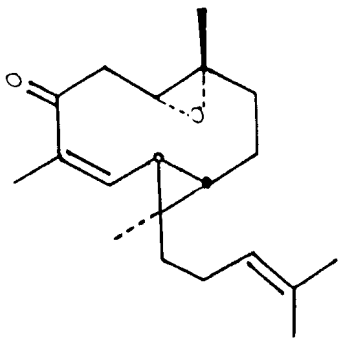
55. Taondiol



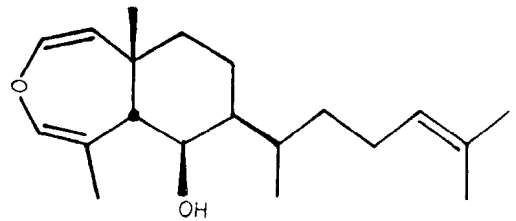
56. Pachydictyol A



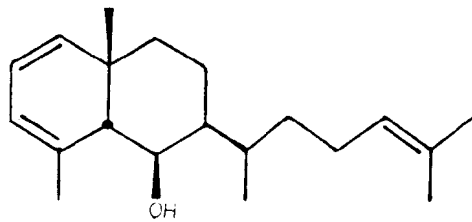
57. Dilophol



58. Epoxidilopholona



59. Dictyoxepina



60. Dictyoleno

relacionado aos sesquiterpenos da série Guaiano. Dilophol (57) encontrado em *Dilophus ligulatus* (9) é o homólogo dos sesquiterpenos da série Germacrano, Epoxidilopholona (58), que ocorre no mesmo género, possui estreita relação com o esqueleto Biciclogermacrano. Dictyoxepina (59) isolada a partir de *Dictyota acutiloba* (287) corresponde a um Elemano prenilado, e outros diterpenos tais como Dictyoleno (60) relacionam-se ao esqueleto Occidentalano (287).

No entanto, nem todos os diterpenos observados entre as Dictyotaceae possuem equivalentes sesquiterpênicos. Segundo TEIXEIRA e KELECOM (1968), os diterpenos simples podem ser divididos em três grupos relacionados entre si pela primeira ciclização do precursor pirofosfato de ϵ -geranil-geraniol (61).

O Grupo 1 (ESQUEMA III) inclui esqueletos resultantes da ciclização 1,10 do pirofosfato de geraniol-geraniol (61), que leva à formação do derivado prenilado do Germacrano (62), e cujo rearranjo dá origem ao Epi-elemano prenilado (63). As ciclizações em 2,7 e 2,6 de (62) são responsáveis pela formação dos homólogos prenilados dos esqueletos Occidentalano (64) e Guaiano (65), respectivamente. Ciclizações nas posições 1,6 e 1,14 de (65) dão origem aos esqueletos Cicloguaiano prenilado (66) ou Dictyotano (67), respectivamente. A ligação transanular do esqueleto Guaiano (65) em 1,7 produz o Spatano (68), ao passo que o rompimento da ligação 6,7 deste último fornece o Seco-spatano (69).

Ainda no Grupo 1, é sugerida a existência de uma via paralela derivada da ciclização 1,10 + 1,11 a partir de (61); o Bicciclogermacrano prenilado (70) resulta desta ciclização. Os intermediários Maaliano (71) e Gorgonano (72) prenilados, apesar de não serem registrados entre as algas pardas, e sim em octocorais como sesquiterpenos (311), são sugeridos como precursores do esqueleto Dictalano (73).

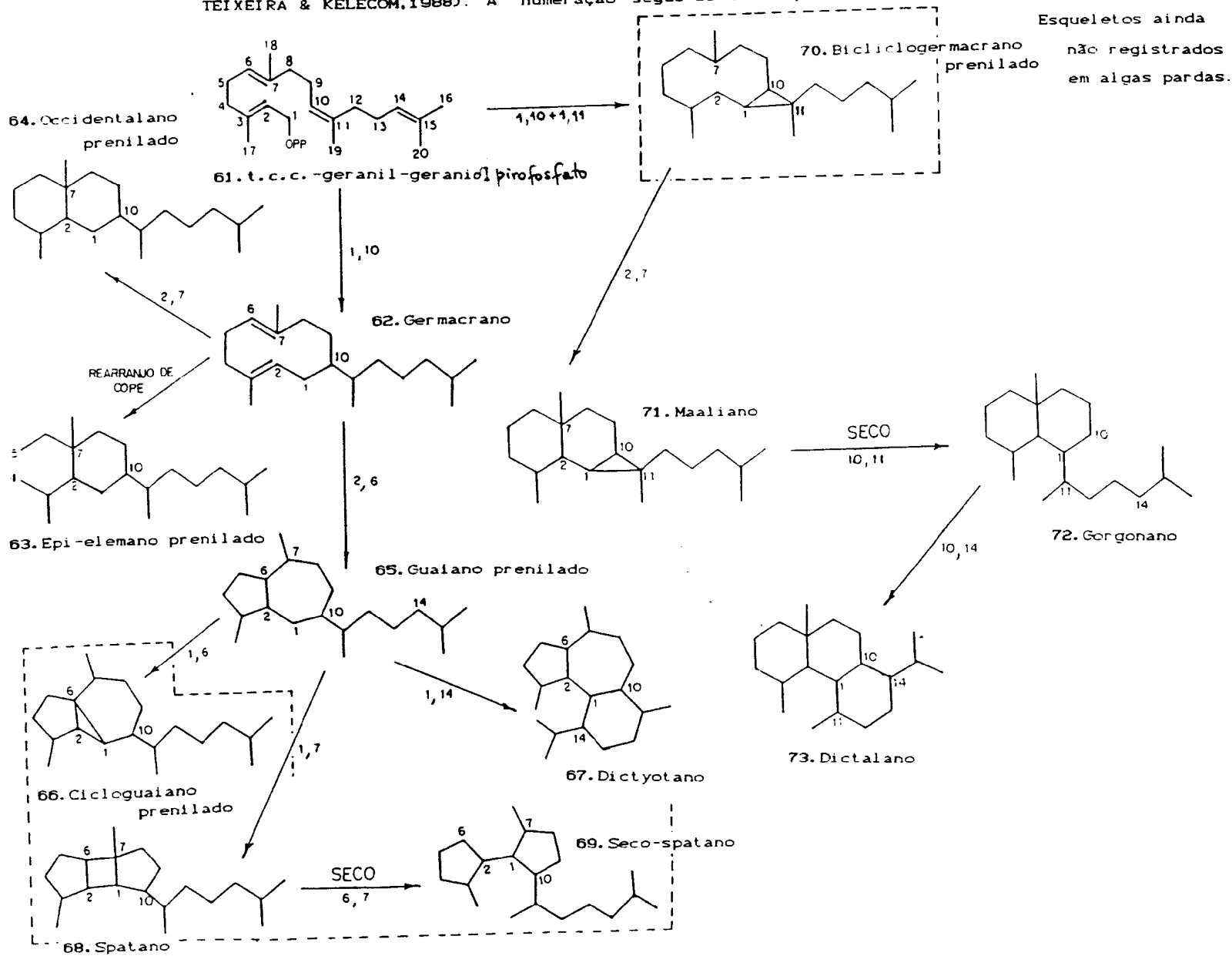
O Grupo 2 (ESQUEMA IV), com 8 tipos de esqueletos, deriva da ciclização 1,11 do precursor (61). O intermediário (74) não tem representantes conhecidos. A ciclização de (74) na posição 10,14 origina o esqueleto Dolabellano (75), observado tanto em algas pardas (84), quanto em lesmas do mar do gênero *Dolabella* (126,288) e hepáticas (184). Ciclizações transanulares de (75) em 2,8, 2,6 ou 2,7 produzem o Dictyoxetano (76), Dictymano (77), ou Dolastano (78), respectivamente. Mas é importante citar que existem dúvidas a respeito da formação de (78) a partir de (75), por razões estereoquímicas e pelo fato de ambos esqueletos, Dolabellano (75) e Dolastano (78) nunca ocorrerem numa mesma espécie das Dictyotales. São sugeridas duas vias de obtenção do Seco-dolastano (79): uma através da ciclização 2,7 do intermediário (74), e outra pela clivagem da ligação 10,14 do Dolastano (78). O esqueleto Fasciolano (80) decorre da ciclização 3,5 do Dictyoxetano (76), ao passo que o Seco-fusicoccinano (81) é obtido através da clivagem da ligação 8,9 do Dictyotano (77). O Chromophycano (82) tem sua origem a partir do rearranjo da metila 19 de C-11 para C-1,

no Dolastano (78).

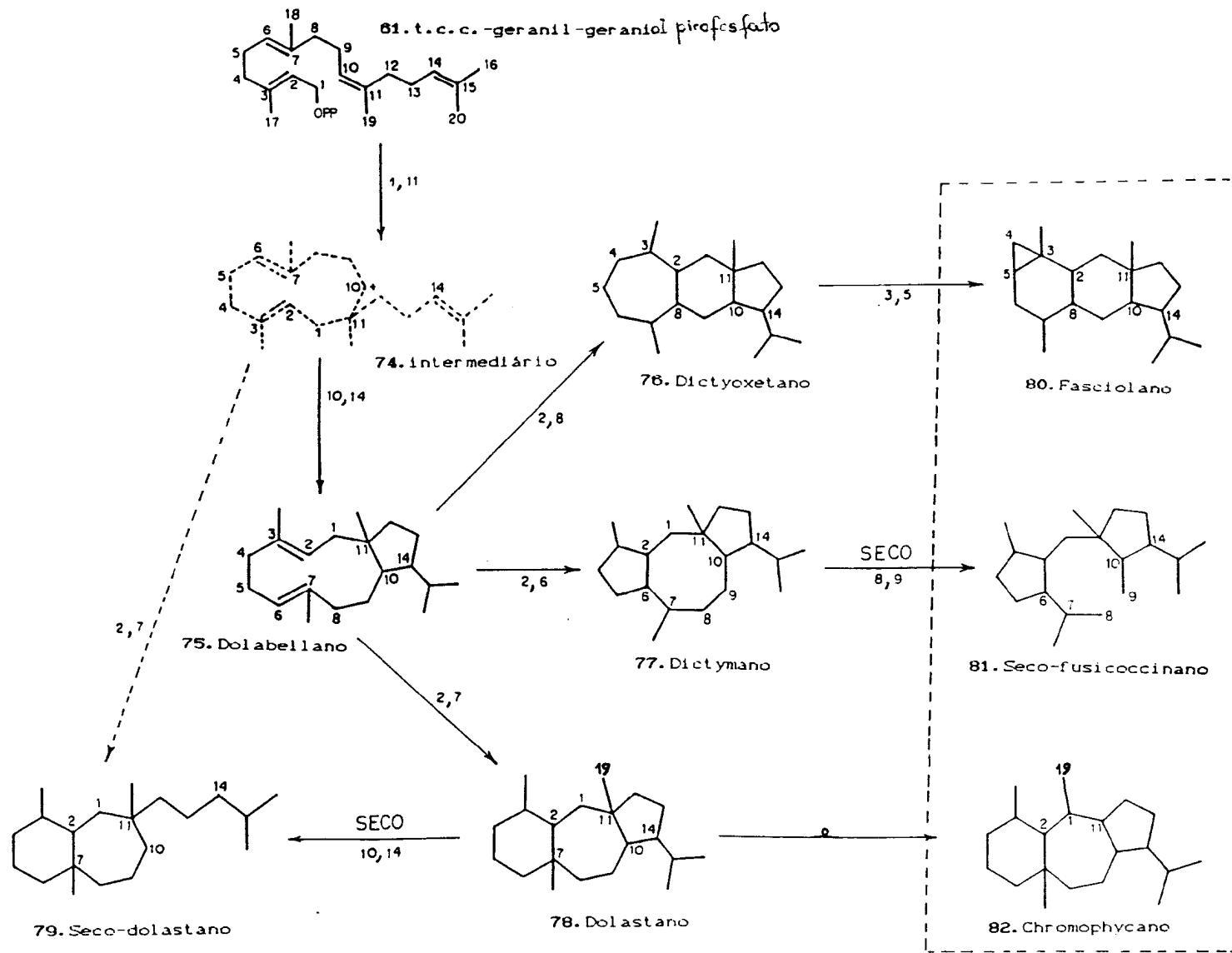
No Grupo 3 (ESQUEMA V), a aparente ciclização 2,10 do pirofosfato de geranil-geraniol leva a formação do esqueleto Xeniano (83), isolado originariamente de octocorais do gênero *Xenia* (152,312), mas bem representado entre as algas pardas (71,294). Ciclizações transanulares de (83) em 1,6 ou 2,7 serão responsáveis pelos esqueletos Crenulano (84) ou Cicloxeniano (85). Os intermediários hipotéticos (86) e (87) dão origem a mais dois esqueletos: o Dichotomano (88), que deriva do rearranjo 5,6 \leftrightarrow 5,7 de (86), e o Triciclodictyotano (89), obtido através de ciclização 4,17 de (87). Já o Crenulidano (90) resulta da ciclização 4,6 do Xeniano (83), enquanto o Coriacenano (91) é formado pela ciclização 1,17 de (83).

Nas TABELAS III, IV e V encontram-se representadas algumas estruturas pertencentes a estes grupos. Estruturas isoladas recentemente e que possuem esqueletos novos não fazem parte da última proposta sugerida pelos autores (302), por esta razão se encontram destacados nas TABELAS V, VI e VII e nos ESQUEMAS III, IV e V.

ESQUEMA III: Proposta biossintética dos esqueletos diterpênicos do Grupo 1 (segundo TEIXEIRA & KELECOM, 1988). A numeração segue-se a do precursor por razões didáticas. *



ESQUEMA IV: Proposta biossintética dos esqueletos diterpênicos do Grupo 2 (segundo TEIXEIRA & KELECOM, 1988). A numeração segue-se a do precursor por razões didáticas.



ESQUEMA V: Proposta biossintética dos esqueletos diterpênicos do Grupo 3 (segundo TEIXEIRA & KELECOM, 1988). A numeração segue-se a do precursor por razões didáticas.

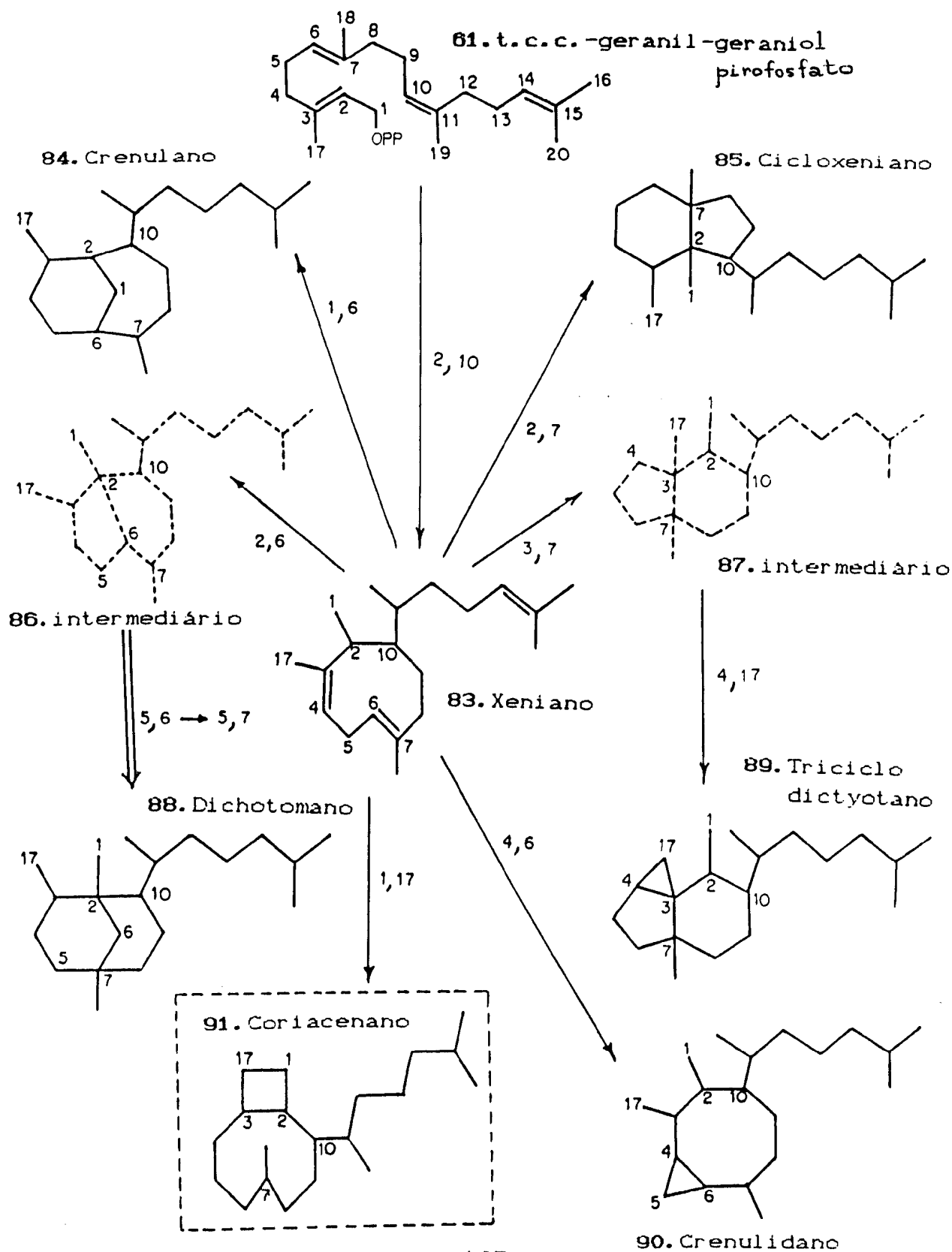
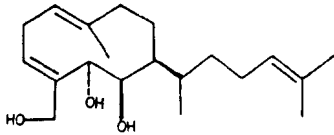
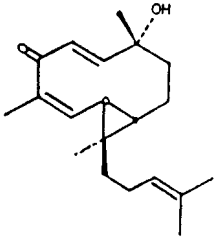
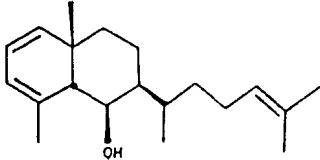
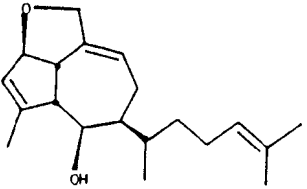


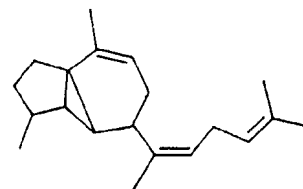
TABELA IV: Esqueletos diterpênicos do Grupo 1, observados na família Dictyotaceae.

ESQUELETO	ESPECIES/EXEMPLO	NOME/REFERENCIA/ESTRUTURA
<p>Germacrano</p> <p> prenilado</p>	<i>Dictyota dichotoma</i>	<p>Pachytriol (155)</p> 
<p>Biciclogermacrano</p> <p> prenilado</p>	<i>Dilophus prolificans (intermedius)</i>	<p>Dilopholona (23)</p> 
<p>Occidentalano</p> <p> prenilado</p>	<i>Dictyota acutiloba</i>	<p>Dictyoleno (28)</p> 
<p>Gualano</p> <p> prenilado</p>	<i>Dictyota dichotoma</i>	<p>Dictyol A (58)</p> 

Cicloguaiano
prenilado

Dilophus marginatus

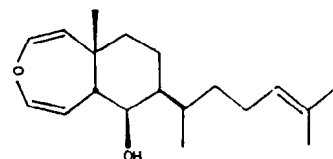
Cicloguaiano A (246)



Epi-elemano
prenilado

Dictyota acutiloba

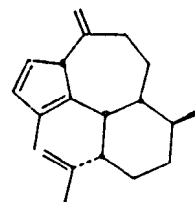
Dictyoxepina (28)



Dictyotano

Dictyota sp

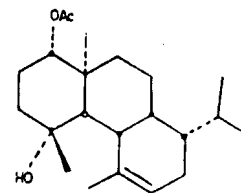
Dictyotetraeno (30)



Dictalano

Dictyota sp

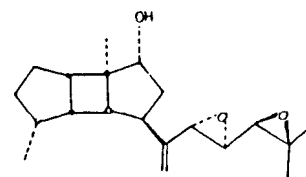
α -dictalediol mono-acetato
(31,196)



Spatano

Spatoglossum schimitii

Spatol (186)



Seco-spatano

Dilophus marginatus

10-oxo-4,10-secospata-2,3,
13,17-tetraen-12-al (246)

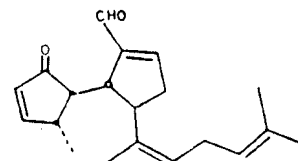
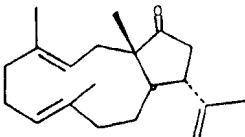
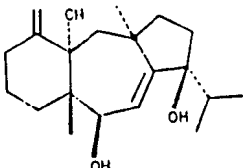
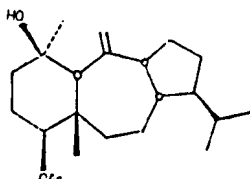
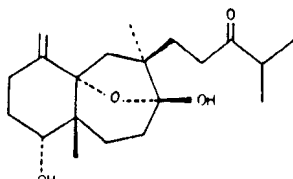


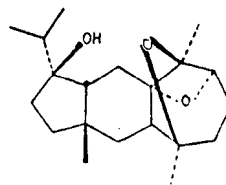
TABELA V: Esqueletos diterpênicos do Grupo 2, observados na família Dictyotaceae.

ESQUELETO	ESPECIES	NOME/REFERENCIA/ESTRUTURA
Dolabellano	<i>Dictyota dichotoma</i>	14-oxo-3,7,18-dolabelatrieno (11) 
Dolastano	<i>Dictyota divaricata</i>	Dolatriol (291) 
Chromophycano	<i>Dictyota sp</i>	Mono-acetato de Chromophycadiol (50) 
Seco-dolastano	<i>Dictyota cervicornis</i>	Isolinearol (300) 

Dictyoxetano

Dictyota dichotoma

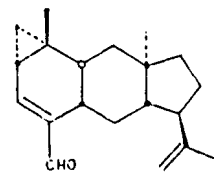
Dictyoxetano (294)



Fasciolano

Dilophus fasciola

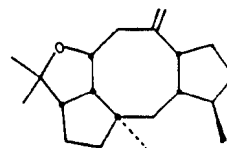
Fasciola-7,16-dien-17-al
(307)



Dictymano

Dictyota dichotoma

Epoxidictymeno (73)



Seco-fusicoccinano

Dictyota dichotoma

Dictymal (280)

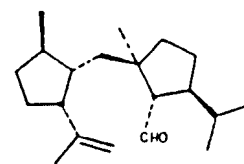
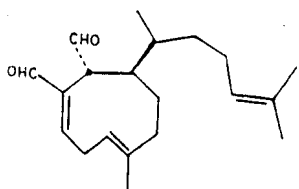
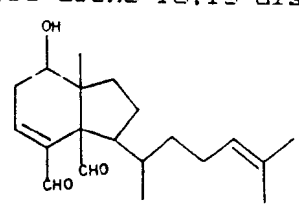
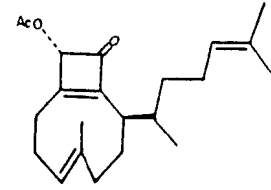
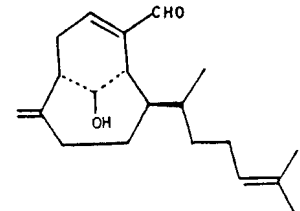
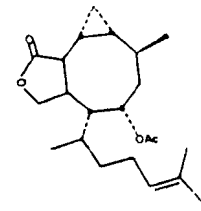


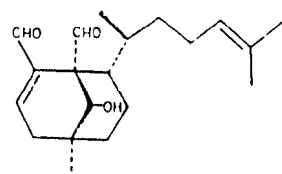
TABELA VI: Esqueletos diterpênicos do Grupo 3, observados na família Dictyotaceae.

ESQUELETO	ESPECIES	NOME/REFERÊNCIA/ESTRUTURA
Xeniano	<i>Dictyota flabelata</i>	Dictyodial (81) 
Cicloxeniano	<i>Dictyota dichotoma</i>	7-hidroxi-2,6-cicloxenica-9,13-dieno-18,19-dial (22) 
Coriacenano	<i>Pachydictyon coriaceum</i>	Acetilcoriacenona (129) 
Crenulano	<i>Pachydictyon coriaceum</i>	Sanadaol (127) 
Crenulidano	<i>Dictyota crenulata</i>	Acetoxicrenulido (290) 

Dichotomano

Dictyota dichotoma

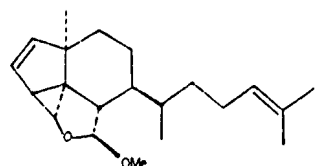
9-hidroxi-dichotom-2,14-
dieno-19,20-dial (22)



Triciclodictyotano

Dictyota dichotoma

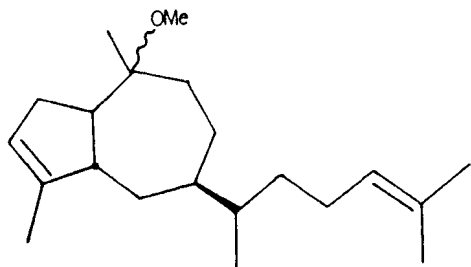
Triciclodictyofurano C (75)



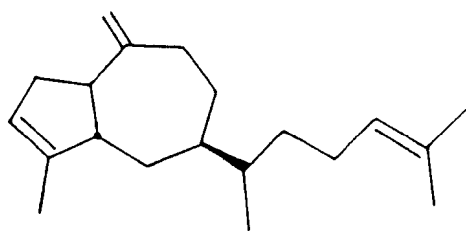
III. A. GUAIANOS PRENILADOS DA FAMÍLIA DICTYOTACEAE

Nos últimos anos, a família Dictyotaceae vem se distinguindo, entre as algas pardas, como fonte de diterpenos policíclicos do tipo guaiano prenilado, cuja ocorrência é observada exclusivamente no ambiente marinho (129).

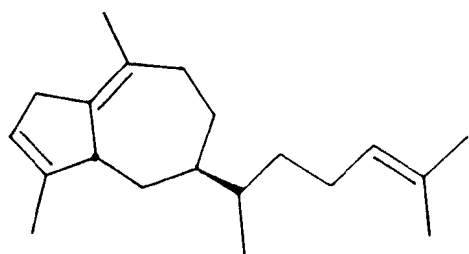
Em toda a família foi caracterizado um total de trinta e uma substâncias pertencentes a este esqueleto (ESTRUTURAS 31 e 92-122), as quais se encontram distribuídas nos gêneros *Dictyota* (95), *Dilophus* (10), *Glossophora* (228) e *Pachydictyon* (115). Alguns destes diterpenos - Dictyol A (116), B (101), C (98), D (102) e E (103), e Pachydictyol A (95) - têm sido também isolados da glândula digestiva do herbívoro marinho *Aplysia depilans* (Gastropoda, Opisthobranchia) (56, 193). Este fato, associado a ocorrências similares (48, 98, 125, 126, 192, 255, 284), tem evidenciado a importância dos terpenos na cadeia alimentar e supostamente no sistema de defesa química das algas pardas marinhas.



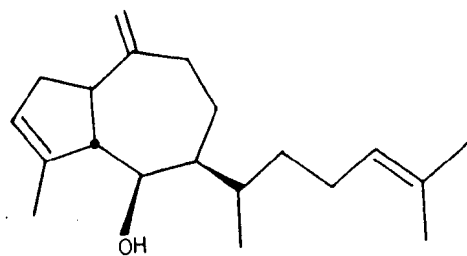
92. Metoxidictyodieno



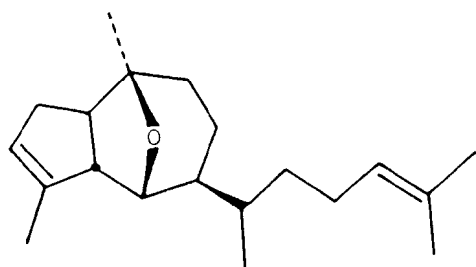
93. Dictytrieno A



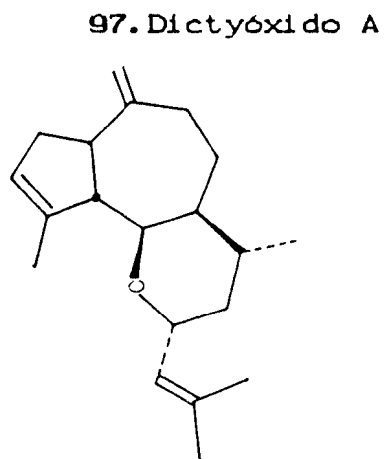
94. Dictytrieno B



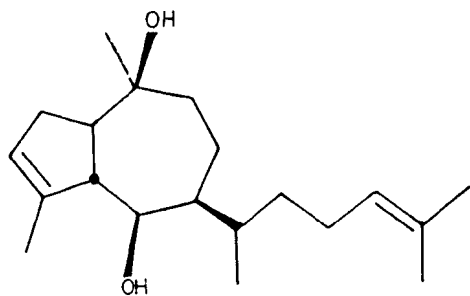
95. Pachydictyol A



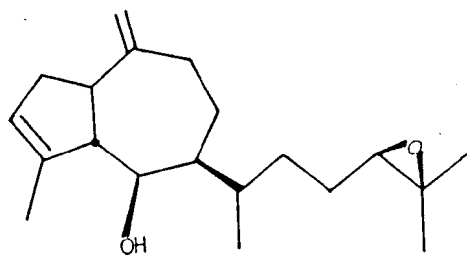
96. Dictyóxido



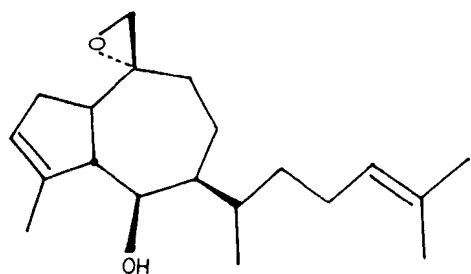
97. Dictyóxido A



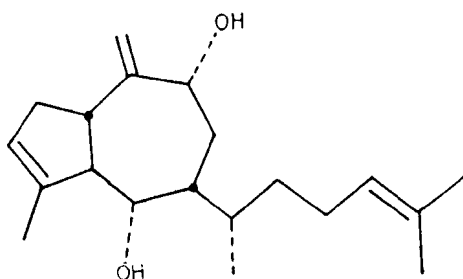
98. Dictyol C



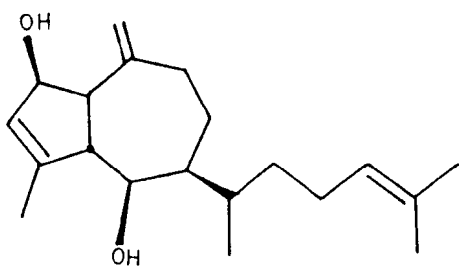
99. Epoxipachydictyol A



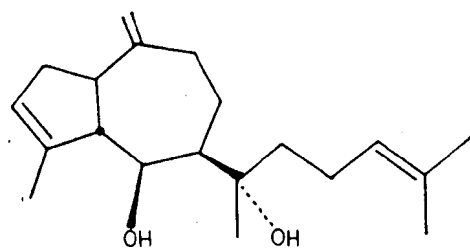
100. Epóxido de Pachydictyol



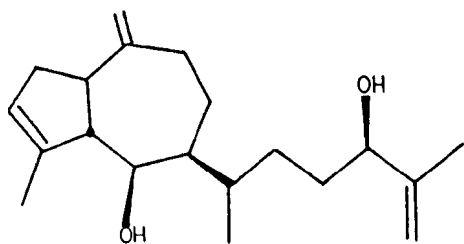
101. Dictyol B



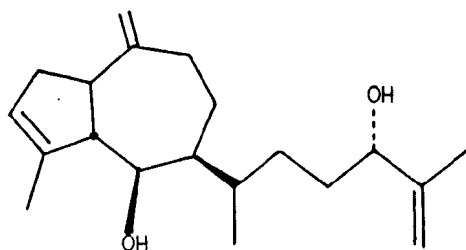
102. Dictyol D



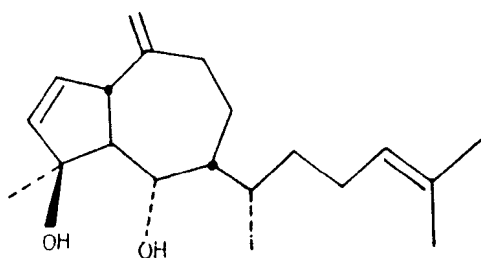
103. Dictyol E



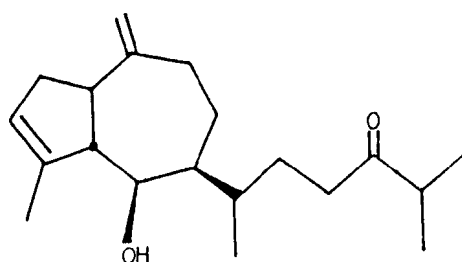
104. Dictyol F



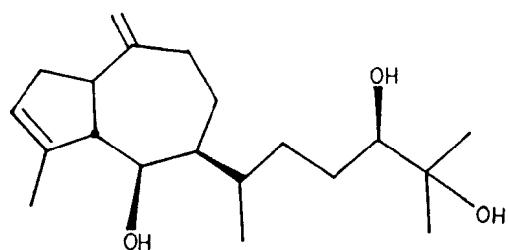
105. Epidictyol F



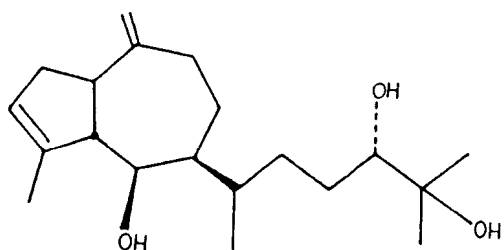
106. Dictyotadiol



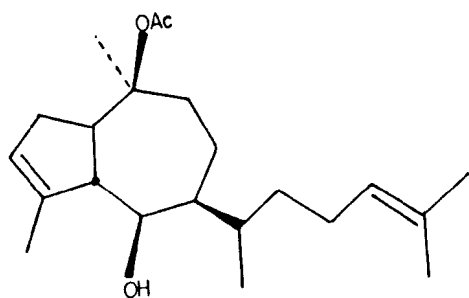
107. Dictyona



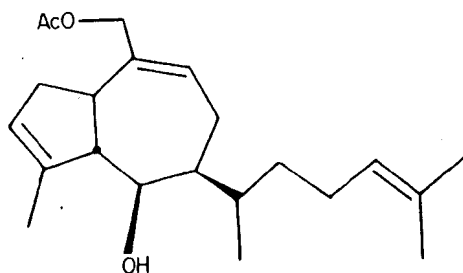
108. Dictytriol



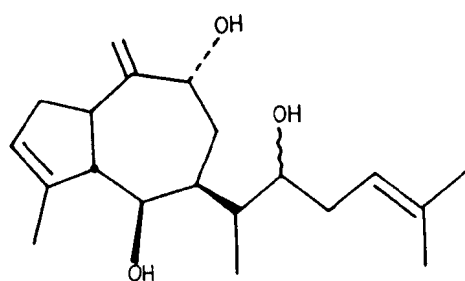
109. Isodictytriol



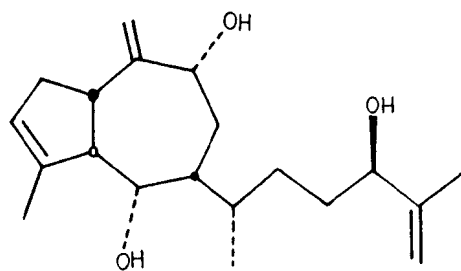
110. Acetildictyol C



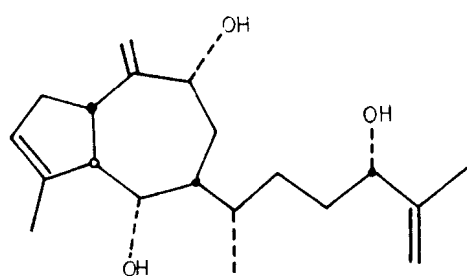
111. Acetato de Dictyol I



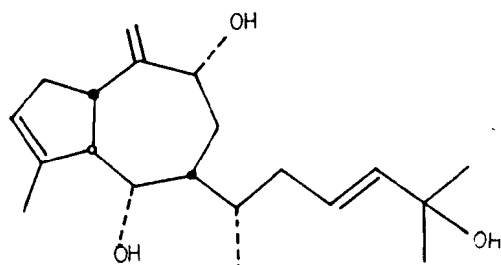
112. Dictyotriol A



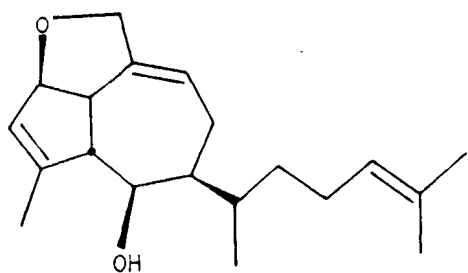
113. Dictyotriol C



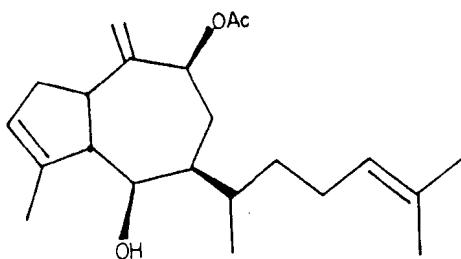
114. Dictyotriol D



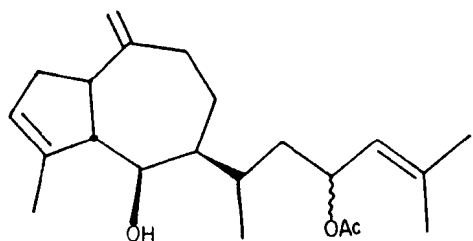
115. Dictyotriol E



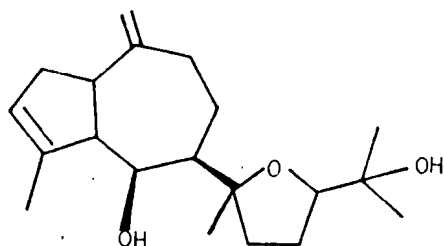
116. Dictyol A



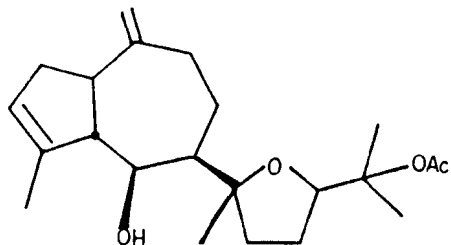
117. Acetato de Dictyol B



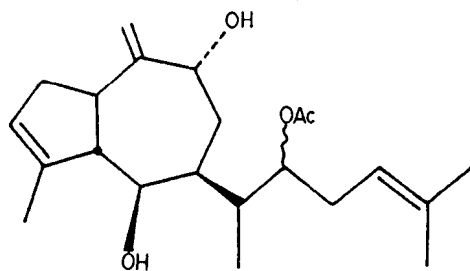
118. Acetato de Dictyol G



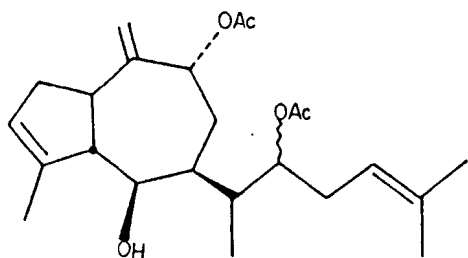
119. Dictyol X



120. Dictyol H



121. Mono-acetato de Dictyotriol A.



122. Di-acetato de Dictyotriol A

III. A. 1. CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESQUELETO GUAIANO PRENILADO

Na literatura são registradas mais de três denominações diferentes para este esqueleto. Devido a sua semelhança estrutural com a de outro composto - Azuleno (123) (FIGURA 25), alguns autores se referem a ele como diterpeno hidroazulenóide (72), peridroazuleno (10,259), ou simplesmente hidroazuleno (74,77). Outros autores adotam uma nomenclatura menos genérica como guaiano prenilado (79,252,300), com base no próprio esqueleto sesquiterpênico guaiano. Entretanto, estas designações algumas vezes são usadas como sinônimos (65). Damos preferência ao termo guaiano prenilado por acreditarmos ser este o mais indicado, já que o esqueleto básico é formado pela mesma via metabólica do isopreno. Já a numeração do esqueleto tem se mostrado bem uniforme (7,56,65,163,259) (FIGURA 26). Os carbonos são numerados de acordo com o sesquiterpeno correspondente. A cadeia lateral ligada ao C-7 é numerada de maneira idêntica, sendo que a metila trans ao grupo propilideno equivale ao C-16. A metila ligada ao C-4 recebe o número 17, por ser a metila do carbono de menor número; o mesmo acontece com as metilas em C-10, C-11 e C-15 (cis em relação ao grupo propilideno), que correspondem aos carbonos 18, 19 e 20, respectivamente.

FIGURA 25: Esqueleto do Azuleno.

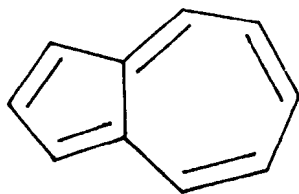
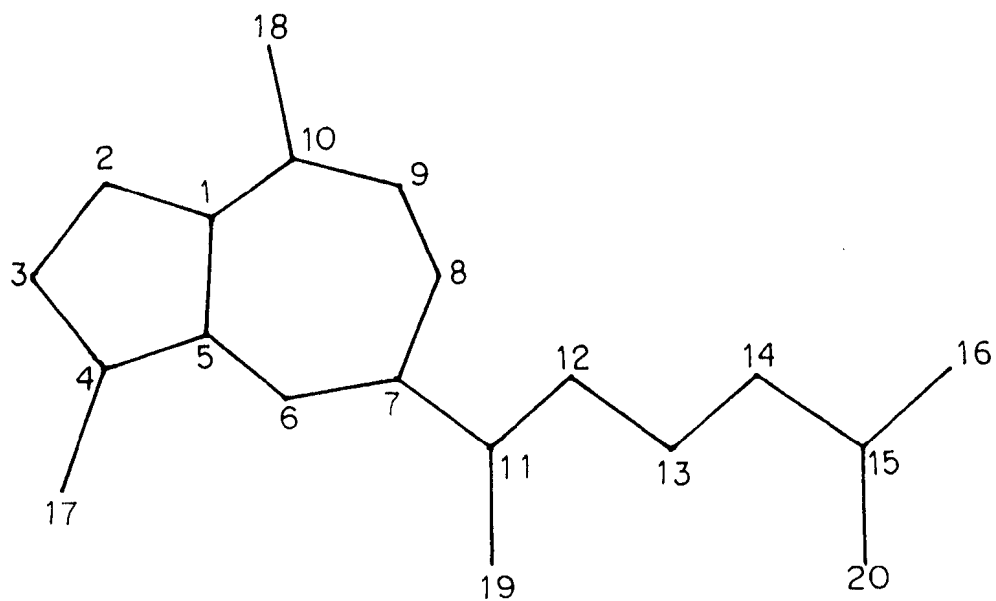


FIGURA 26: Numeração do esqueleto Guaiano Prenilado, segundo a literatura.



III. B. MÉTODOS

Paralelamente à proposta biossintética geral dos esqueletos diterpênicos das Dictyotales, foi elaborado um mapa biossintético apenas para os guaianos prenilados isolados destas algas. O esquema da FIGURA 27 é auto-explicativo, mas deve-se ressaltar que as estruturas pontilhadas não possuem representantes conhecidos, sendo consideradas, por esta razão, intermediários hipotéticos.

Os dados sobre os guaianos prenilados das Dictyotaceae foram obtidos a partir da literatura (1960-1990) e encontram-se reunidos nas TABELAS VII e VIII. A primeira refere-se aos nomes vulgares dos guaianos prenilados conhecidos, às espécies de onde foram isolados e os respectivos locais de coleta. A TABELA VIII lista as espécies estudadas, o nome dos guaianos prenilados isolados e os valores relativos aos índices taxonômicos dos mesmos (IO e IE), calculados segundo o método descrito nas páginas 79 e 80. Os padrões de oxidação dos guaianos prenilados foram analisados mais minuciosamente com o intuito de identificar possíveis relações entre os gêneros estudados e facilitar a visualização de variações biogeográficas. Para este estudo foi construído um gráfico que indica os percentuais de representação destes diterpenos nos oceanos Pacífico, Atlântico e Mar Mediterrâneo e um mapa de distribuição

geográfica do esqueleto.

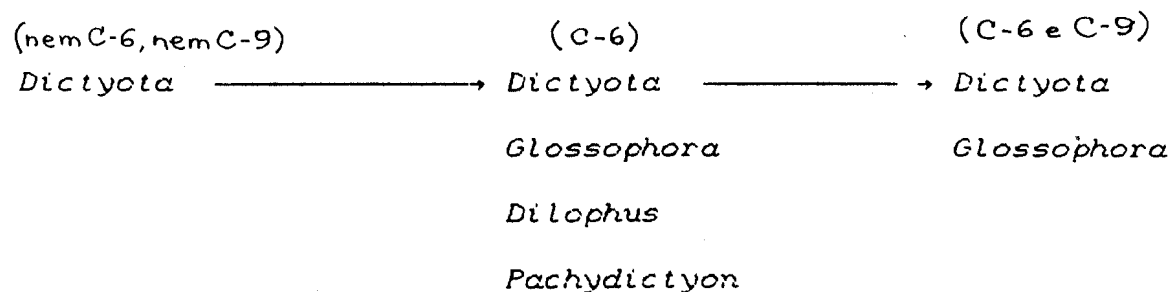
III.C. PROPOSTA BIOSINTÉTICA PARA OS GUAIANOS PRENILADOS DA FAMILIA DICTYOTACEAE

A descoberta da rota do ácido mevalônico (ácido 3-metil-3,5-diidroxi-pentanóico) na biossíntese de substâncias esteroidais abriu caminho para as pesquisas que têm auxiliado a elucidação dos passos biogénéticos responsáveis pela síntese de substâncias terpenóides de todos os tipos. O ácido mevalônico é um composto de seis átomos de carbono derivado a partir da condensação de três moléculas de ácido acético, e dá origem às chamadas "unidades isoprénicas" (C_5) por perda simultânea de água e CO_2 .

A combinação de quatro unidades de pirofosfato C_5 (124) ligadas na sequência cabeça-cauda, dá origem a um esqueleto C_{20} , como ilustra a FIGURA 27. O pirofosfato de geranyl-geranyl (61) é considerado o precursor primário de um grande número de terpenóides C_{20} conhecidos como diterpenos, por esta razão foi sugerido como estrutura básica na biossíntese de todos os guaianos prenilados isolados de espécies da família Dictyotaceae. A proposta biossintética encontra-se ilustrada na FIGURA 27, que se segue.

III.D. PADRÕES DE OXIDAÇÃO E INDICES TAXONOMICOS

Com base no mapa biossintético e nas tabelas foi proposta uma correlação entre os quatro gêneros estudados, no que se refere à presença ou ausência de oxidação nos carbonos 6 e 9 (de acordo com a FIGURA 27). As únicas estruturas não oxidadas em C-6 e/ou C-9 são 92,93 e 94 isoladas do gênero *Dictyota*; 101, 112, 113, 114, 115, 117, 121 e 122 são oxidadas em ambas posições e ocorrem somente nos gêneros *Dictyota* e *Glossophora*; as demais estruturas apresentam, pelo menos, uma oxidação em C-6, ocorrendo em todos os gêneros estudados (*Dictyota*, *Dilophus*, *Glossophora* e *Pachydictyon*). Os padrões de oxidação em relação aos carbonos 6 e 9 podem ser assim resumidos:



Se, de fato, a evolução do esqueleto guaiano prenilado estiver relacionada à oxidação como um todo, ou a graus de oxidação específicos (no caso dos carbonos 6 e 9) é possível que a mesma possua vínculos mais profundos com a idade das algas, ou seja, que esteja relacionada ao aparecimento de determinados gêneros no meio ambiente.

Através dos dados apresentados na TABELA VIII, pode-se observar que foram obtidos 28 guaianos prenilados de 16 táxons de *Dictyota* (15 espécies e 1 variedade), 4 guaianos de 2 espécies de *Dilophus*, 6 guaianos de 2 espécies de *Glossophora*, e 3 guaianos de apenas 1 espécie de *Pachydictyon*. Estes resultados refletem a maior ocorrência, na literatura, de dados sobre os diterpenos das espécies do gênero *Dictyota*. Os índices taxonômicos observados para os gêneros *Dictyota* (AEo=-1.42 e AEe=0.26), *Dilophus* (AEo=-1.42 e AEe=0.24), *Glossophora* (AEo=-1.31 e AEe=0.20) e *Pachydictyon* (AEo=-1.42 e AEe=0.20) refletem o estágio atual do conhecimento sobre a química destas algas. De acordo com os dados, observa-se que os valores para AEo dos gêneros *Dictyota*, *Dilophus* e *Pachydictyon* são idênticos, apenas o gênero *Glossophora* apresenta valor de média menor. As médias calculadas para IE (AEe) separam em três valores diferentes, mas ainda assim não é possível, apenas com esta informação, tirar conclusões mais precisas sobre as relações entre os gêneros.

III.E.DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

As Tabelas VII e VIII foram utilizadas, primeiramente, para a construção da FIGURA 28, que indica os valores percentuais de ocorrência do esqueleto guaiano nos oceanos

Indo-Pacífico, Atlântico e Mar Mediterrâneo. De acordo com as informações disponíveis, ao buscarmos neste gráfico, uma visão panorâmica da dispersão do esqueleto guaiano, a região Indo-Pacífica seria a mais indicada, por apresentar um maior número de ocorrências do esqueleto com relação às outras duas regiões consideradas no gráfico. Dando continuidade a esta linha de raciocínio, a região do Atlântico aparece como a segunda região com maior valor percentual, e poderia ser sugerido que ela seria a segunda região ser colonizada a partir do centro de dispersão e utilização do esqueleto, estando o Mar Mediterrâneo na posição de colonização mais recente.

Deve-se ter em mente que, todas as considerações são apenas hipotéticas, mas que obedecem uma certa linearidade em termos geográficos, como será feito adiante.

Posteriormente, as mesmas Tabelas VII e VIII geraram o MAPA I, onde foram plotados os valores de IO para cada uma das diversas regiões geográficas, indicando, ao todo, 81 locais de coleta diferentes. As variações para os valores de IE (para os guaianos prenilados) ficou entre 0.20 e 0.30, não apresentando valores intermediários, o que impossibilitou a elaboração de rotas de distribuição com alguma lógica, por esta razão, os valores não foram incluídos no mapa.

TABELA VII: Guaianos prenildados observados entre as Dictyotaceae, algas onde ocorrem e locais onde foram coletadas.

NOME DA ESTRUTURA	ESPÉCIES ONDE OCORRE	LOCAL/REFERENCIA
Metoxidictydieneo	<i>Dictyota dichotoma</i>	Hokkaido, Japão(74)
Dictyotrieno A	<i>Dictyota dichotoma</i>	Hokkaido, Japão(72)
Dictyotrieno B	<i>Dictyota dichotoma</i>	Hokkaido, Japão(72)
Pachydictyol A	<i>Dictyota bartayresii</i>	Belize, G. México(230)
	<i>D. binghamiae</i>	Br. Columbia, Canada(239)
	<i>D. crenulata</i>	G. California, México(290)
	<i>D. dentata</i>	Barbados, Caribe(7)
	<i>D. dichotoma</i>	Austrália(22)
		Hokkaido, Japão(72)
		R. Janeiro, Brasil(5)
		Gales do Sul, U.K.(79)
	<i>D. dichotoma var. implexa</i>	Rovinj, Yugoslavia(85)
	<i>D. flabellata</i>	Sonora, México(280)
	<i>D. hespera</i>	não registrado(IN 190)
	<i>Dictyota sp 1</i>	Tenerife, I. Canarias(97)
	<i>Dictyota sp 2</i>	Tenerife, I. Canarias(95)
	<i>Dictyota sp 3</i>	Okinawa, Japão(162)
<i>Dictyota sp. 4</i>	Ilhas Canarias(313)	

	<i>Dictyota mertensii</i>	R. Janeiro, Brasil(✱)
	<i>D. spinulosa</i>	Okinawa, Japão(162)
	<i>Dilophus ligulatus</i>	Sicilia, Itália(9)
	<i>Glossophora galapagensis</i>	I. Española, Ecuador(268)
	<i>Pachydictyon cortaceum</i>	California, USA(115)
Dictyoxido	<i>Dictyota binghamiae</i>	B. Columbia, Canada(239)
	<i>D. dichotoma</i>	Hokkaido, Japão(74)
	<i>Dictyota sp. 1</i>	Tenerife, I. Canarias(97)
	<i>Dictyota sp. 3</i>	Okinawa, Japão(162)
	<i>Dilophus ligulatus</i>	Sicilia, Itália(10)
Dictyol C	<i>Dictyota dentata</i>	Barbados, Caribe(7)
	<i>D. dichotoma</i>	Hokkaido, Japão(74)
		Sicilia, Itália(11)
		Napoles, Itália(56)
		Gales do Sul, U.K. (79)
	<i>Dictyota sp. 4</i>	Ilhas Canarias(313)
Dictyoxido A	<i>Dictyota binghamiae</i>	B. Columbia, Canada(239)
Epoxipachydictyol A	<i>Dictyota dichotoma</i>	Hokkaido, Japão(74)
Pachydictyol A epoxido	<i>Dictyota flabellata</i>	Sonora, México(280)
Dictyol B	<i>Dictyota dichotoma</i>	Austrália(22)
	<i>D. dichotoma var. implexa</i>	Mediterrâneo(77)
	<i>Dictyota sp. 1</i>	Tenerife, I. Canarias(97)

	<i>Dictyota sp. 2</i>	Tenerife, I. Canárias(95)
	<i>Dictyota sp. 4</i>	Ilhas Canárias(313)
Dictyol D	<i>Dictyota dichotoma</i>	Napoles, Itália(56)
Dictyol E	<i>Dictyota sp. 1</i>	Tenerife, I. Canárias(97)
	<i>Dictyota sp. 2</i>	Tenerife, I. Canárias(95)
	<i>D. dichotoma</i>	Austrália(22)
		Sicília, Itália(11)
	<i>Dilophus guineensis</i>	Vega Baja, P. Rico(270)
	<i>D. ligulatus</i>	Napoles, Itália(56)
	<i>Glossophora galapagensis</i>	I. Española, Equador(288)
	<i>Pachydictyon coriaceum</i>	Japão(127)
Dictyol F	<i>Dictyota dichotoma</i>	Hokkaido, Japão(74)
Epidictyol F	<i>Dictyota dichotoma</i>	Hokkaido, Japão(74)
Dictyotadiol	<i>Dictyota sp. 4</i>	Ilhas Canárias(313)
	<i>D. dichotoma</i>	Gales do Sul, U. K. (79)
Dictyona	<i>Dictyota sp. 3</i>	Okinawa, Japão(162)
	<i>D. dichotoma</i>	Hokkaido, Japão(72)
Dictyotriol	<i>Dictyota dichotoma</i>	Hokkaido, Japão(72)
	<i>D. indica</i>	Mar Amarelo, China(226)
	<i>D. spinulosa</i>	Okinawa, Japão(162)
	<i>Glossophora kuntii</i>	Horcone Bay, Chile(259)

Isodictyotriol	<i>Dictyota indica</i>	Mar Amarelo, China(226)
(= Dictyotriol B)	<i>D. dichotoma</i>	Okinawa, Japão(163)
Dictyotriol A	<i>Glossophora kuntii</i>	Horcone Bay, Chile(259)
Dictyotriol C	<i>Dictyota sp. 4</i>	Ilhas Canárias(313)
Dictyotriol D	<i>Dictyota sp. 4</i>	Ilhas Canárias(313)
Dictyotriol E	<i>Dictyota sp. 4</i>	Ilhas Canárias(313)
Acetilidictyol C	<i>Fachydictyon coriaceum</i>	I-S. Beach, Japão(128)
Dictyol I acetato	<i>Dictyota dichotoma</i> var. <i>implexa</i>	Rovinj, Yugoslavia(65)
Dictyol A	<i>Dictyota dichotoma</i> var. <i>implexa</i> <i>Dilophus ligulatus</i>	Mediterrâneo(77) Sicilia, Itália(10)
Dictyol X	<i>Dictyota sp. 5</i>	Austrália (325)
Dictyotriol A mono-acetato	<i>Glossophora kuntii</i>	Horcone Bay, Chile(259)
Dictyol B acetato	<i>Dictyota sp. 2</i> <i>D. dichotoma</i> var. <i>implexa</i> <i>D. dichotoma</i>	Tenerife, I. Canárias(95) Rovinj, Yugoslavia(65) Gales do Sul, U.K.(79)
Dictyol G acetato	<i>Dictyota binghamiae</i>	B. Columbia, Canada(239)
Dictyol H	<i>Dictyota dentata</i> <i>D. mertensii</i>	Barbados, Caribe(7) R. de Janeiro, Brasil(*)
Dictyotriol A di-acetato	<i>Dictyota binghamiae</i> <i>Glossophora kuntii</i>	B. Columbia, Canada(239) Horcone Bay, Chile(259)

TABELA VIII: Guaianos prenilados observados em cada uma das espécies de algas pardas estudadas, e os respectivos valores de Índice de Oxidação (IO) e Índice de Esqueleto (IE).

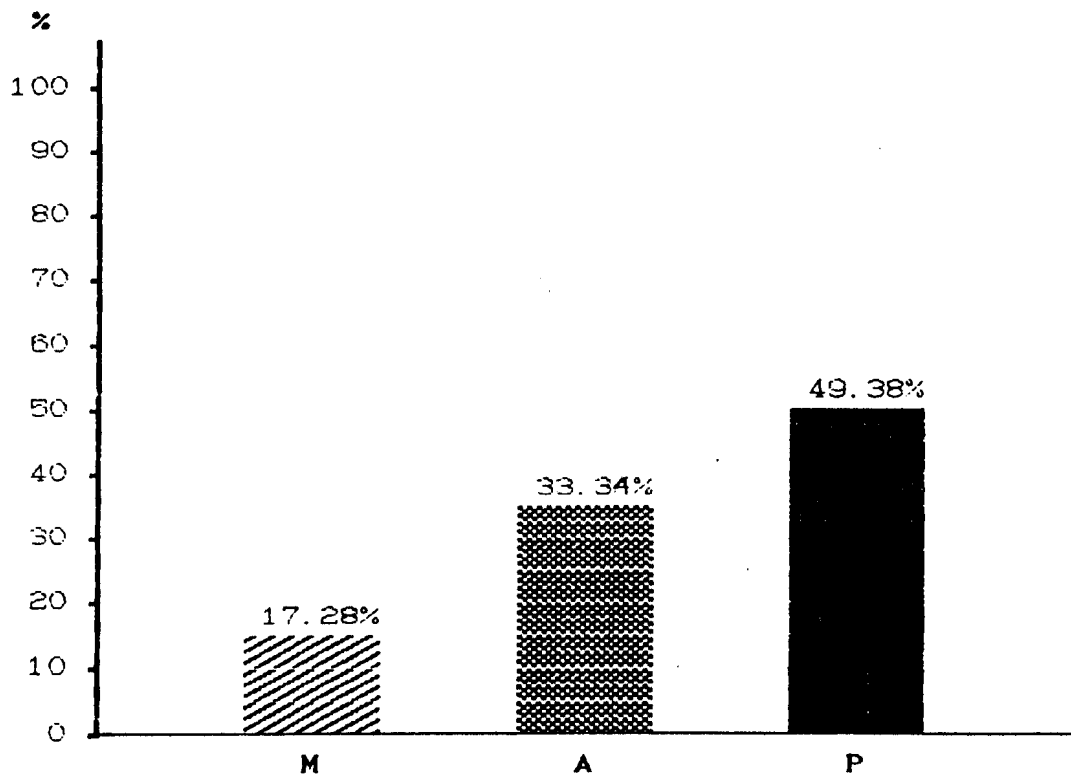
ESPECIE	NOME DA ESTRUTURA/REFERENCIA	I. O	I. E.
<i>Dictyota bartayresii</i>	Pachydictyol A (230)	-1.500	0.20
<i>Dictyota binghamiae</i>	Pachydictyol A (239)	-1.500	0.20
	Dictyoxido (239)	-1.500	0.30
	Dictyoxido A (239)	-1.400	0.30
	Dictyol G acetato (239)	-1.273	0.20
	Dictyotriol A di-acetato (239)	-1.083	0.20
<i>Dictyota crenulata</i>	Pachydictyol A (290)	-1.500	0.20
<i>Dictyota dentata</i>	Pachydictyol A (7)	-1.500	0.20
	Dictyol C (7)	-1.500	0.20
	Dictyol H (7)	-1.182	0.30
<i>Dictyota dichotoma</i>	Metoxidictydieno (74)	-1.619	0.20
	Dictytrieno A (72)	-1.600	0.20
	Dictytrieno B (72)	-1.600	0.20
	Pachydictyol A (5,22,72,79)	-1.500	0.20
	Dictyoxido (74)	-1.500	0.30
	Dictyol C (11,58,74,79)	-1.500	0.20

	Epoxi-pachydictyol A (74)	-1.400	0.30
	Dictyol B (22,77)	-1.400	0.20
	Dictyol D (56)	-1.400	0.20
	Dictyol E (11,22)	-1.400	0.20
	Dictyol F (74)	-1.400	0.20
	Epidictyol F (74)	-1.400	0.20
	Dictytriol (72)	-1.400	0.20
	Isodictytriol (163)	-1.400	0.20
	Dictyona (72)	-1.400	0.20
	Dictyotadiol (79)	-1.400	0.20
	Dictyol A (77)	-1.300	0.30
	Dictyol B acetato (79)	-1.273	0.20
<i>Dictyota dichotoma</i>			
<i>var. implexa</i>	Pachydictyol A (65)	-1.500	0.20
	Dictyol B (77)	-1.400	0.20
	Dictyol I acetato (65)	-1.364	0.20
	Dictyol A (77)	-1.300	0.30
	Dictyol B acetato (65)	-1.273	0.20
<i>Dictyota flabellata</i>	Pachydictyol A epoxido (260)	-1.400	0.30
<i>Dictyota hespera</i>	Pachydictyol A (190)	-1.500	0.20
<i>Dictyota indica</i>	Dictytriol (226)	-1.400	0.20
	Isodictytriol (226)	-1.400	0.20
<i>Dictyota mertensii</i>	Pachydictyol A	-1.500	0.20

	Dictyol H	-1.182	0.30
<i>Dictyota spinulosa</i>	Pachydictyol A (162)	-1.500	0.20
	Dictyotriol (162)	-1.400	0.20
<i>Dictyota sp. 1</i>	Pachydictyol A (97)	-1.500	0.20
	Dictyoxido (97)	-1.500	0.30
	Dictyol B (97)	-1.400	0.20
	Dictyol E (97)	-1.400	0.20
<i>Dictyota sp. 2</i>	Pachydictyol A (95)	-1.500	0.20
	Dictyol B (95)	-1.400	0.20
	Dictyol E (95)	-1.400	0.20
	Dictyol B acetato (95)	-1.273	0.20
<i>Dictyota sp. 3</i>	Pachydictyol A (162)	-1.500	0.20
	Dictyoxido (162)	-1.500	0.30
	Dictyona (162)	-1.400	0.20
<i>Dictyota sp. 4</i>	Pachydictyol A (313)	-1.500	0.20
	Dictyol C (313)	-1.500	0.20
	Dictyol B (313)	-1.400	0.20
	Dictyotadiol (313)	-1.400	0.20
	Dictyotriol C (313)	-1.400	0.20
	Dictyotriol D (313)	-1.400	0.20
	Dictyotriol E (313)	-1.400	0.20
<i>Dictyota sp. 5</i>	Dictyol X (325)	-1.300	0.30

<i>Dilophus guineensis</i>	Dictyol E (270)	-1.400	0.20
<i>Dilophus ligulatus</i>	Pachydictyol A (9)	-1.500	0.20
	Dictyoxido (10)	-1.500	0.30
	Dictyol E (56)	-1.400	0.20
	Dictyol A (10)	-1.300	0.30
<i>Glossophora galapagensis</i>	Pachydictyol A (288)	-1.500	0.20
	Dictyol E (288)	-1.400	0.20
<i>Glossophora kuntii</i>	Dictyotriol (259)	-1.400	0.20
	Dictyotriol A (259)	-1.300	0.20
	Dictyotriol A mono-acetato (259)	-1.182	0.20
	Dictyotriol A di-acetato (259)	-1.083	0.20
<i>Pachydictyon coriaceum</i>	Pachydictyol A (115)	-1.500	0.20
	Dictyol E (127)	-1.400	0.20
	Acetildictyol C (128)	-1.364	0.20

FIGURA 28: Percentagens de ocorrência do esqueleto Guaiano Prenilado nos oceanos Pacífico (P), Atlântico (A) e Mar Mediterrâneo (M). 100% = Total de guaianos.



Número de Estruturas e percentagens de ocorrência para cada oceano considerado:

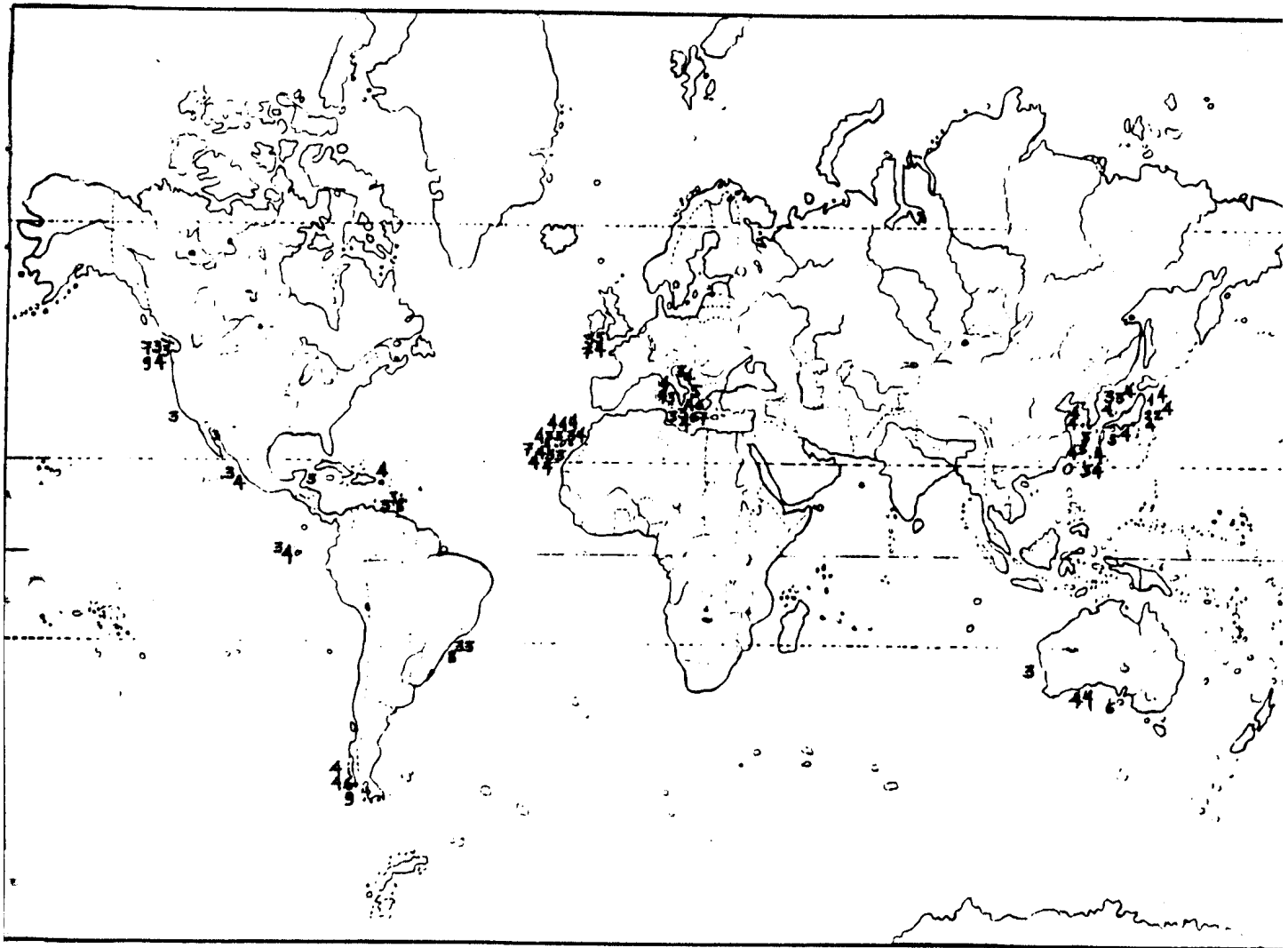
O. Pacífico - 40 = 49.38% (inclui o O. Índico)

O. Atlântico - 27 = 33.33%

M. Mediterrâneo - 14 = 17.28%

Foram obtidos 40 guaianos prenilados em algas coletadas no oceano Pacífico (49.38%), 27 no Atlântico (33.34%) e 14 no Mar Mediterrâneo (17.28%).

MAPA I: Distribuição geográfica de todos os Guaianos Prenilados observados entre as Dictyotaceae e seus respectivos valores de Índice de Oxidação (IO).



- | | |
|------------|------------|
| 1 = -1.619 | 6 = -1.300 |
| 2 = -1.600 | 7 = -1.273 |
| 3 = -1.500 | 8 = -1.182 |
| 4 = -1.400 | 9 = -1.083 |
| 5 = -1.364 | |

Sabe-se que, quanto menor o valor para IO (ele está sempre com sinal negativo), quanto menos oxidada é a substância em questão; considera-se que substâncias cuja via biossintética seja mais antiga sejam menos oxidadas, pois sua origem datam de épocas em que os níveis de oxigênio na atmosfera eram menores. Com base nestas indagações, as informações contidas no MAPA I podem ser resumidas como se segue:

- Pacífico Oriental (Japão): -1.619 a -1.364.
- Região Indo-Pacífica (Austrália): -1.300.
- Atlântico Ocidental (Costa Africana): -1.500 a -1.273.
- Mar Mediterrâneo: -1.500 a -1.273.
- Atlântico Oriental (Brasil e Caribe): -1.500 a -1.182.
- Pacífico Ocidental (Costa Pacífica EUA): -1.500 a -1.083.

Cabe destacar que os maiores valores de IO (substâncias mais oxidadas) para os guaianos prenilados são encontrados em regiões temperadas do Pacífico Ocidental, que representam os limites de distribuição do esqueleto. Até o momento, o esqueleto vem sendo bem representado em regiões sub-tropicais e frias do globo.

Os percentuais de ocorrência do esqueleto guaiano prenilado nos representantes da família Dictyotaceae em todo o mundo (FIGURA 28) parecem indicar que o esqueleto teve sua origem no oceano Pacífico, alcançando o oceano Atlântico e, mais tarde, o Mar Mediterrâneo. Estas rotas poderiam estar relacionadas à viabilidade adaptativa do esqueleto no ambiente marinho. Entretanto, ao analisarmos os valores de IO para cada região separadamente (vide acima), os dados

parecem indicar uma região ainda mais precisa para a origem do esqueleto. No oceano Pacífico observamos os menores valores de I \bar{O} (Japão), bem como os maiores (costa pacífica dos EUA), em regiões distintas geograficamente. Ou seja, existem fortes evidências de que para as algas pardas, este esqueleto tenha tido sua origem no oceano Pacífico, mas numa região mais ou menos diferenciada, próxima ao Japão. A costa Pacífica do continente americano apresenta valores bem maiores de I \bar{O} , o que sugere uma colonização mais recente, tendo o continente australiano como uma região de transição.

Os dados referentes ao oceano Atlântico parecem se comportar de modo semelhante: a costa americana, incluindo Golfo do México e Caribe, possui valores de I \bar{O} maiores do que as costas da África e da Grã-Bretanha. No Mar Mediterrâneo, os valores de I \bar{O} são idênticos aos observados na costa ocidental do oceano Atlântico, variando entre -1.500 e -1.273.

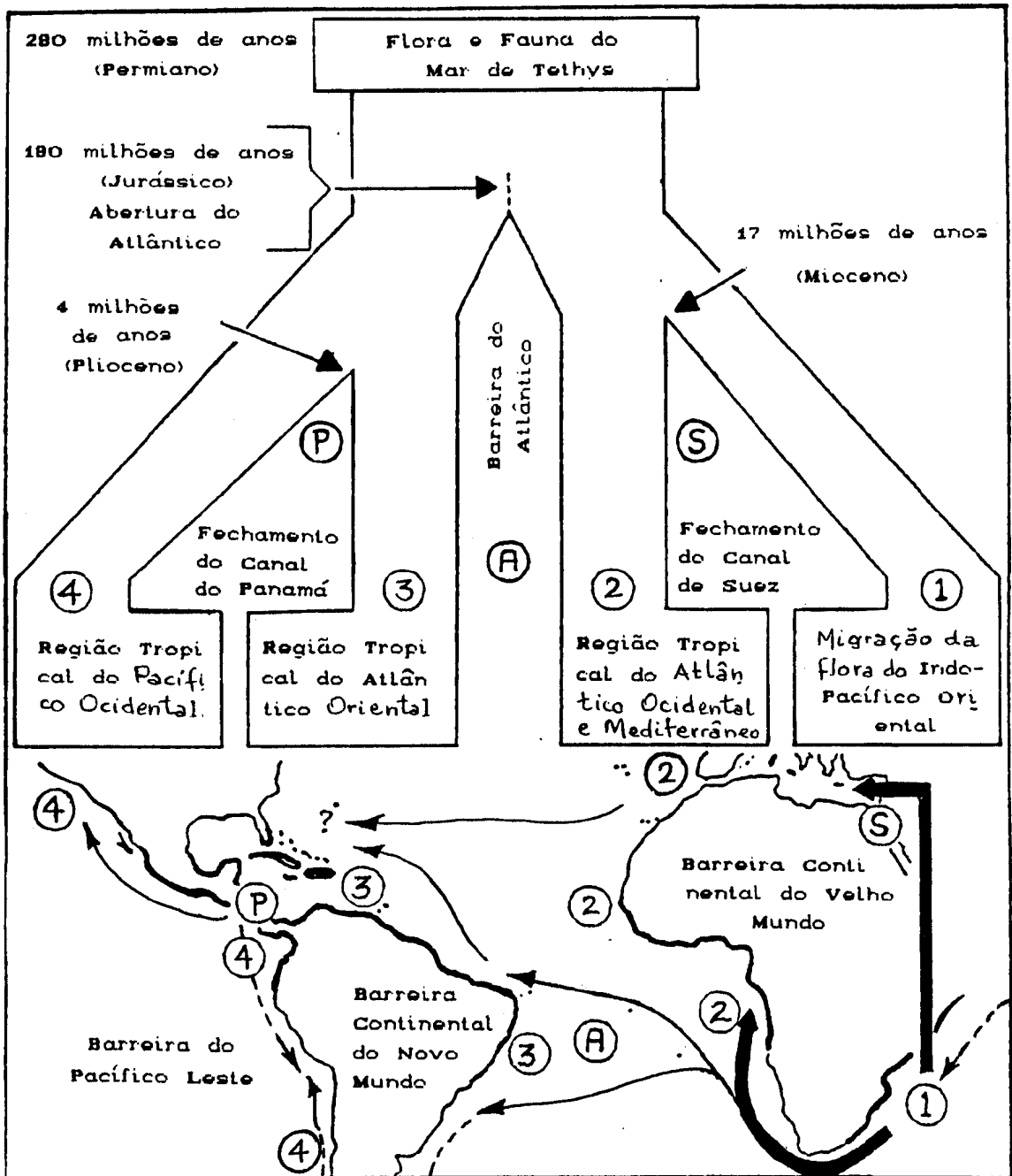
Como podemos observar na FIGURA 29, a conexão entre o Mar Mediterrâneo e o oceano Índico (via Mar Vermelho) foi interrompida no período Terciário, durante o Mioceno (aproximadamente 17 milhões de anos), quando a África e a Arábia entraram em contato com a Eurásia. Depois dessa época, as floras tropicais se desenvolveram separadamente no oceano Índico por um lado, e no Mar Mediterrâneo por outro (173). Muito mais tarde, algumas espécies indo-pacíficas migraram novamente, através do canal de Suez (período de Ramsés II). Outras migrações como esta se repetiram mais vezes, em outras épocas em que o canal de Suez manteve esta conexão possível.

Ainda na FIGURA 29 podemos visualizar as rotas de migração propostas para o esqueleto guaiano prenilado, que teria início no Pacífico Oriental, alcançando o oceano Índico, daí para as costas africanas e para o Mar Mediterrâneo. Sugerimos que a partir do Índico tenham sido utilizadas duas rotas paralelas de migração, uma em direção ao Atlântico, contornando o extremo sul do continente africano, e outra em direção ao Mediterrâneo, pela região do canal de Suez. A proposição destas rotas de migração da flora marinha pode justificar a similaridade dos padrões de oxidação de ambas as regiões.

A partir daí, as setas indicam que o esqueleto guaiano prenilado foi utilizado nas costas do continente americano, podendo ter migrado para o oceano Pacífico através do canal do Panamá ou contornando o extremo sul do continente americano (Chile), apesar desta região ser de difícil acesso a floras não adaptadas a baixas temperaturas e ao alto índice de batimento. O limite de distribuição do esqueleto até a presente data é mais ao norte, no Pacífico ocidental (EUA).

O crescente número de trabalhos voltados para a identificação de terpenos de algas pardas viabilizará, num futuro próximo, estudos mais minuciosos a este respeito.

FIGURA 29: Formação das 4 regiões tropicais recentes (linhas mais grossas) pela separação da flora e fauna do Mar de Tethys; mapa adaptado às rotas de migração e utilização do esqueleto guaiano prenilado pelas algas da família Dictyotaceae (setas) (modificado a partir de 173). **P** - Canal do Panamá; **A** - Oceano Atlântico; **S** - Canal de Suez



IV. O USO DE DITERPENOS PARA O ESTABELECIMENTO DA SINONIMIA
ENTRE *Dictyota mertensii* E *D. dentata*

IV. A. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO *Dictyota* LAMOUROUX

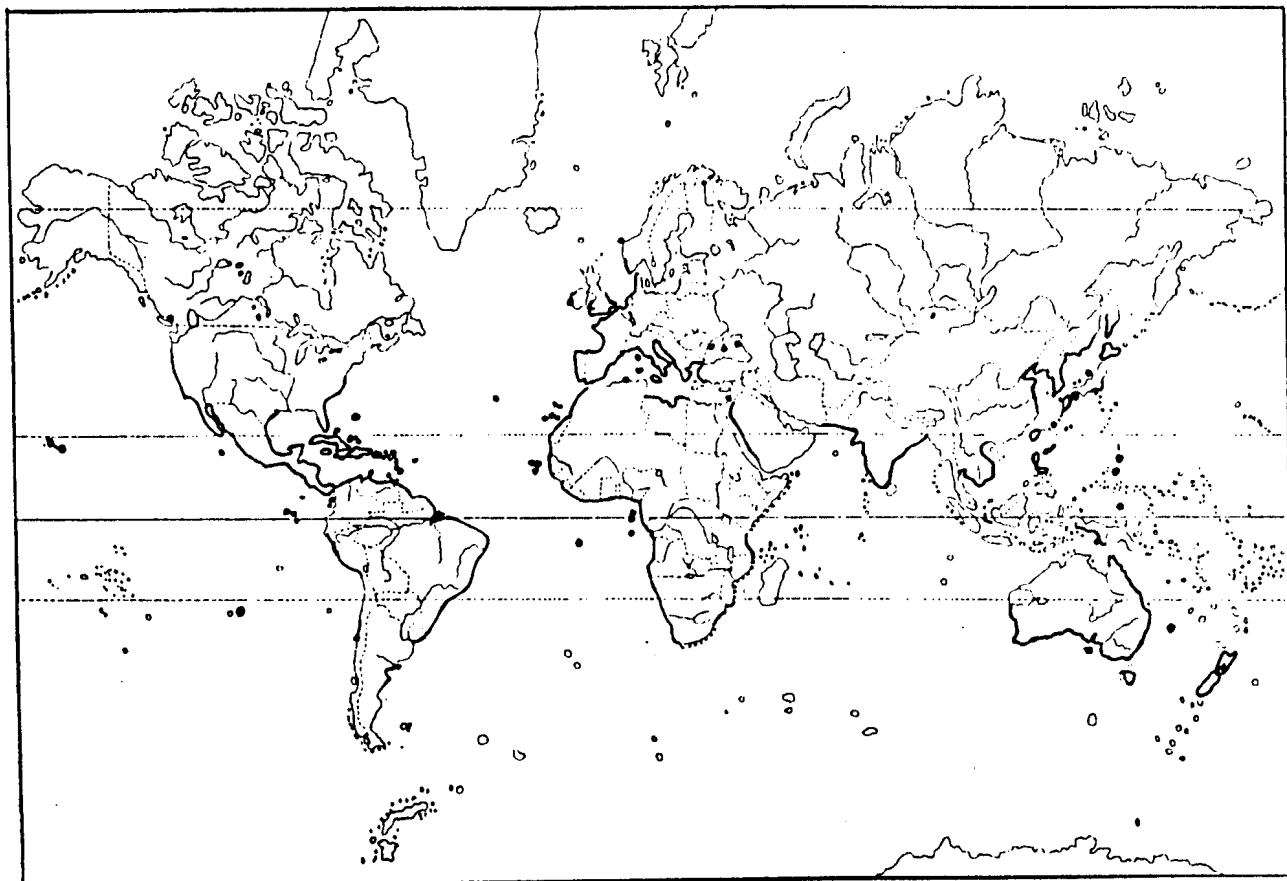
Embora os estudos da vegetação algal de várias partes do mundo tenham sido iniciados durante o último século, nosso conhecimento presente sobre as diferentes regiões florísticas marinhas é ainda, em muitos aspectos, incompleto e fragmentado (264).

Ao contrário do que se tem observado, dados relativos ao gênero *Dictyota* Lamouroux encontram-se muito bem documentados, indicando uma ampla distribuição do gênero em todo o mundo (MAPA II) (1, 2, 4, 6, 7, 16, 18, 22, 42, 44, 45, 52, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 65, 67, 69, 73, 75, 79, 95, 96, 97, 103, 106, 111, 112, 113, 117, 118, 119, 120, 121, 130, 150, 166, 170, 173, 197, 225, 226, 227, 228,

229,233,234,236,239,245,248,249,250,252,255,256,257, 260,261, 267,268,269,273,274,275,276,281,283,285,286,287,289, 290,291, 294,295,296,297,298,304,307,310,314,316, 317, 319, 321, 324). Mas sabe-se que a composição da flora algal de certas regiões não pode ser explicada apenas através de fatores climáticos ou hidrogeográficos, fatores geológicos e históricos também devem ser considerados, já que as algas são vegetais muito antigos (LEVRING,1979). Na literatura, os trabalhos voltados para a descrição das espécies mais representativas em determinadas regiões (2,191) e para o estudo de regiões climáticas marinhas e isotermas, que tendem a influenciar direta ou indiretamente os limites de distribuição das algas (8,141,191,264) são observados com mais frequência.

Mas paralelamente a este panorama, alguns autores (70,156,173,231,232) vêm desenvolvendo estudos mais aprofundados, visando um maior entendimento das biotas marinhas e dos processos responsáveis pela dispersão dos organismos através dos mares e oceanos. Tais estudos são muito úteis em avaliações fitogeográficas.

MAPA II: Distribuição geográfica do gênero *Dictyota* Lamouroux.



IV. B. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE *D. mertensii* E *D. dentata*

Grande parte dos problemas taxonômicos se baseiam em aspectos morfológicos e/ou nomenclaturais. Em muitos gêneros, algumas espécies se encontram tão intimamente relacionadas que os próprios taxonomistas encontram dificuldade quanto à determinação dos caracteres seletivos relevantes. Este é o caso do gênero *Dictyota* Lamouroux, que ainda hoje apresenta problemas de definição dos limites entre algumas espécies (58,236).

Existe, em alguns trabalhos ficológicos (236,248,286,324), ampla discussão em torno da sinonímia entre as espécies *Dictyota mertensii* (Martius) Kützing e *D. dentata* Lamouroux (FIGURA 30). Trabalhos fitoquímicos realizados com *D. dentata* (7) da Ilha de Barbados (Hemisfério Norte), revelaram a presença de três diterpenos com esqueleto do tipo guaiano prenilado: Pachydictyol A (95), Dictyol C (98) e Dictyol H (120) (FIGURA 31), sendo este último de ocorrência única entre os representantes da ordem Dictyotales. Como os diterpenos têm se mostrado ferramentas valiosas como marcadores quimiotaxonômicos das algas pardas da ordem Dictyotales (TEIXEIRA,1985), e em particular do gênero *Dictyota*, procedemos ao estudo fitoquímico de

D. mertensii, no intuito de auxiliar o esclarecimento desta dúvida taxonômica.

FIGURA 30: *Dictyota dentata*.

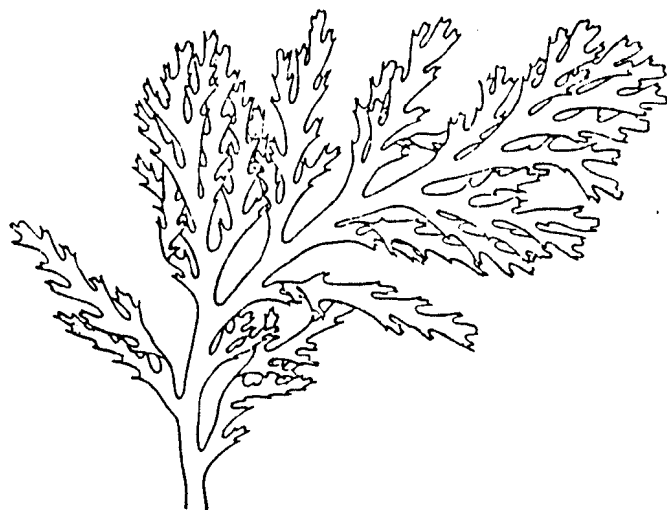
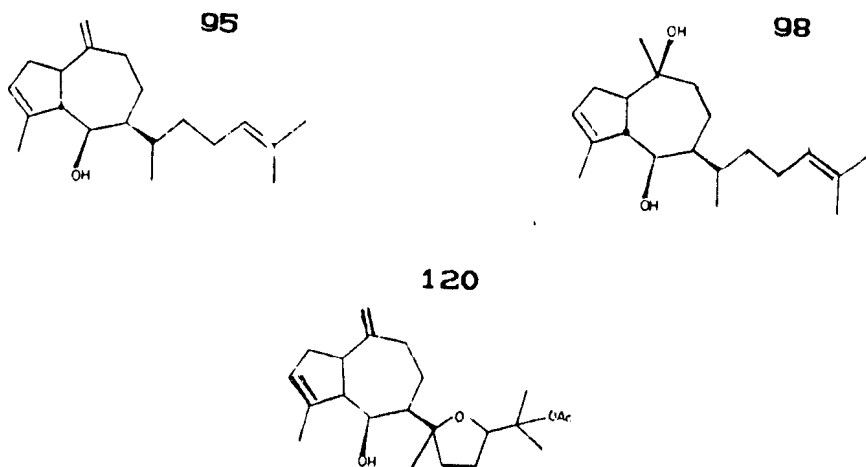


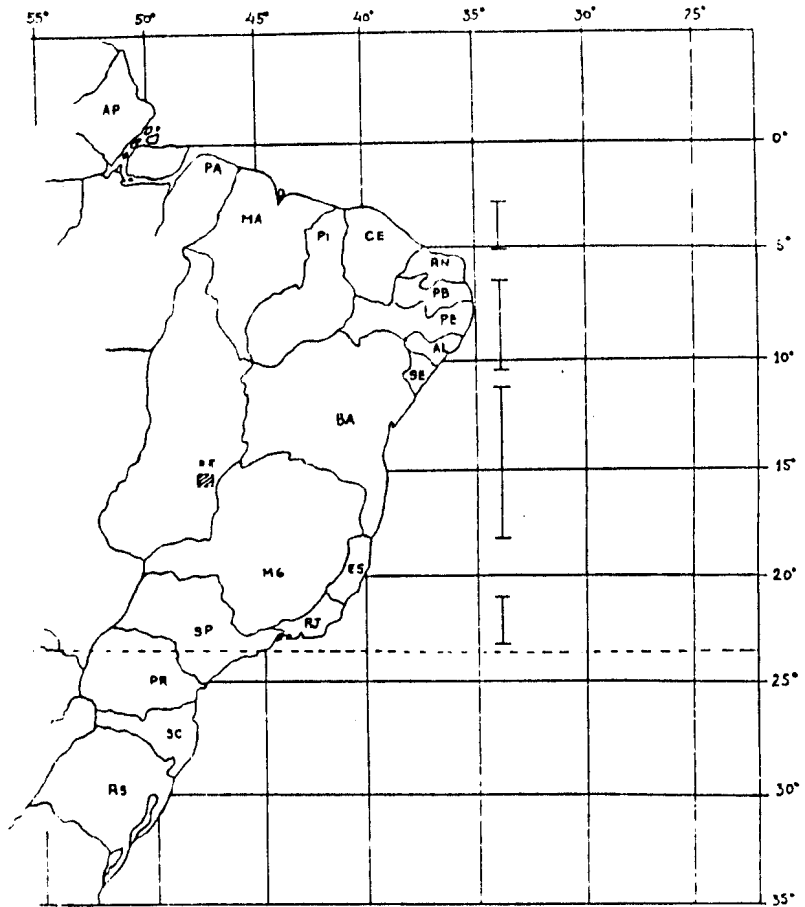
FIGURA 31: Guaianos prenilados isolados de *Dictyota dentata*.



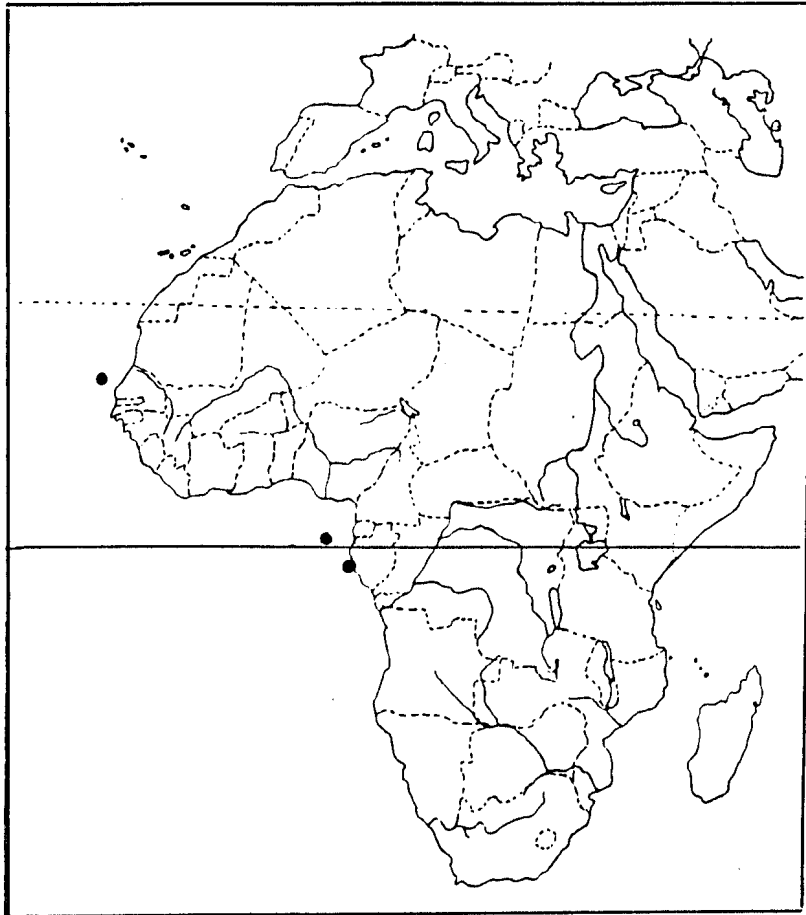
IV. B. 1. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *D. mertensii*

D. mertensii é uma espécie do infralitoral, comum na costa tropical do Brasil (MAPA III) (236,324) e na costa oeste do continente Africano (MAPA IV) (248). *Dictyota dentata* tem sido registrada na costa africana (Ilhas de S. Tomé e Cabo Verde) (111,112,286), e ainda no Golfo do México e Caribe (MAPA V) (42,45,61,67,69,103,111, 112,119,248,256,267,274,286,296,298,299), embora outros autores sugiram que sua distribuição alcance as costas do Uruguai (MAPA VI) (297).

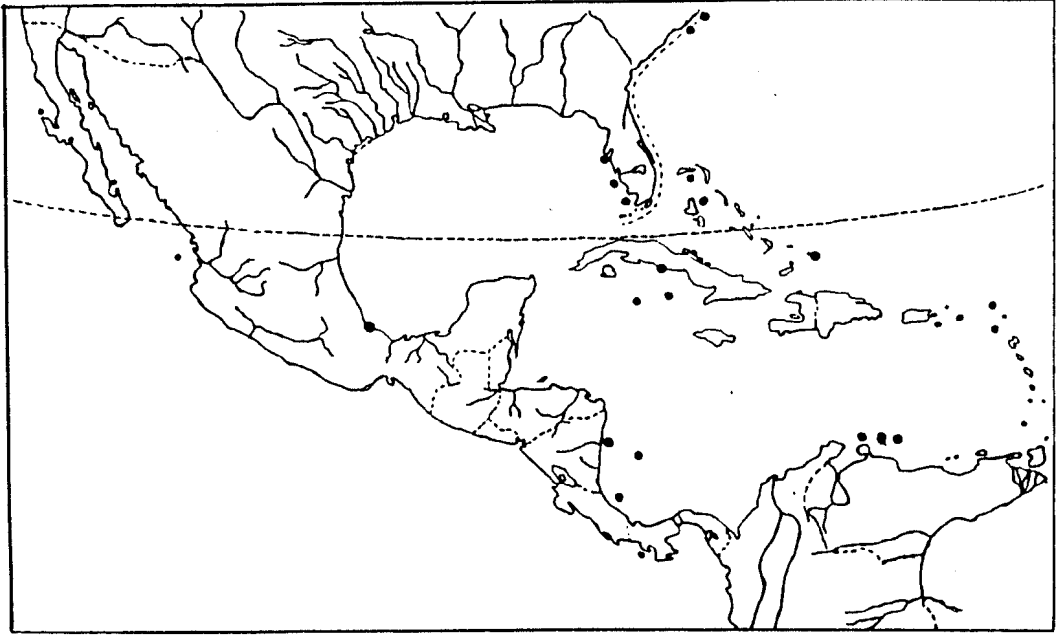
MAPA III: Distribuição de *Dictyota mertensii* em águas brasileiras (segundo OLIVEIRA FILHO, 1978).



MAPA IV: Distribuição da alga *Dictyota mertensii* na costa oeste do continente africano (segundo PRICE, et al.;1978).



MAPA V: Distribuição geográfica da alga *Dictyota dentata* na região do Caribe e Golfo do México.



MAPA VI: Distribuição geográfica de *D. dentata* (segundo TAYLOR, 1955). * Dados incertos.



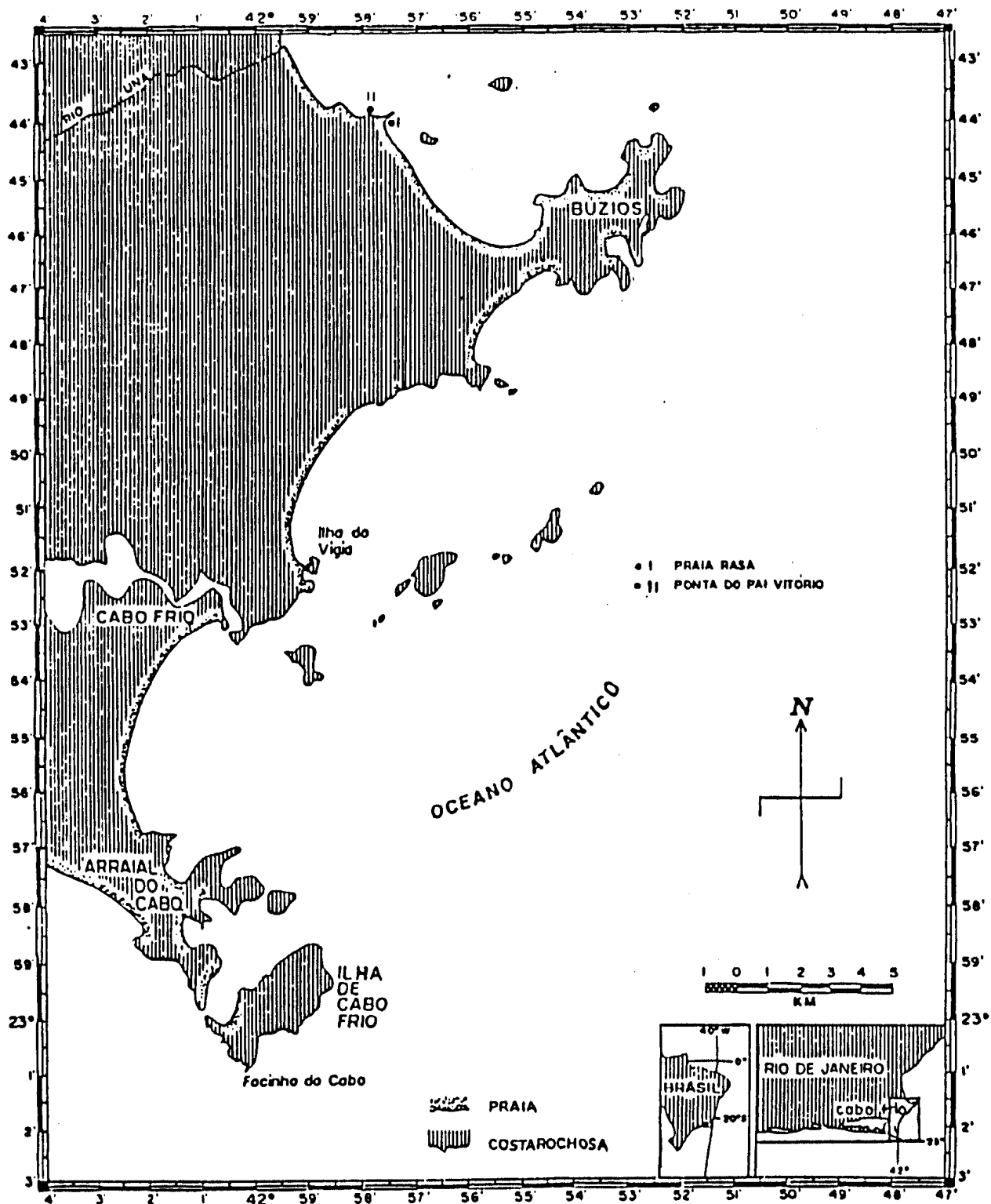
IV. C. EXPERIMENTAL

IV. C. 1. LOCAL DE COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ALGA

Dictyota mertensii (Martius) Kützting foi coletada na região do infralitoral durante o mês de Janeiro de 1987, na Praia Rasa e Ponta do Pai Vitório, nas proximidades de Búzios, R.J. (MAPA II). Segundo YONESHIGUE (1985), este local corresponde ao limite de sua distribuição meridional. O material foi coletado durante a maré baixa, entre 1-2 metros de profundidade, com o auxílio da técnica de mergulho livre. A alga foi observada sob a forma de pequenos tufos junto às pedras; todo o talo da alga apresentava-se bastante refringente, principalmente nas extremidades. A espécie não era abundante e foi encontrada com frequência próxima aos talos de outra alga parda, *Dictyopteris delicatula* Lamouroux. Não foi observada a presença de organismos epífitos.

Após a coleta as espécimes foram lavadas com água do mar e, em seguida, separadas do sedimento e outras algas e organismos associados. As algas foram triadas no próprio local e identificadas pelos botânicos Prof. Renato Crespo Pereira e Dr. Roberto Campos Villaça, familiarizados com a flora marinha bentônica da região.

MAPA VII: Localização geográfica das áreas de coleta de *Dictyota mertensii* (Búzios - RJ).



IV. C. 2. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DA ALGA

A secagem do material foi realizada com o auxílio de um sistema refrigerador/dessecador, em substituição ao método de secagem à sombra, que apresentou pouca eficiência. Ao término do processo foram obtidos 850 gramas de alga seca, que após trituração foram exaustivamente extraídos com solventes orgânicos (hexano, acetato de etila e metanol ou acetona*), de acordo com o grau crescente de polaridade. Em todas as percolações, a evaporação dos solventes forneceu um resíduo viscoso de coloração marrom-esverdeada.

* para a alga úmida.

IV. C. 2a. FRACIONAMENTO DO EXTRATO HEXÂNICO

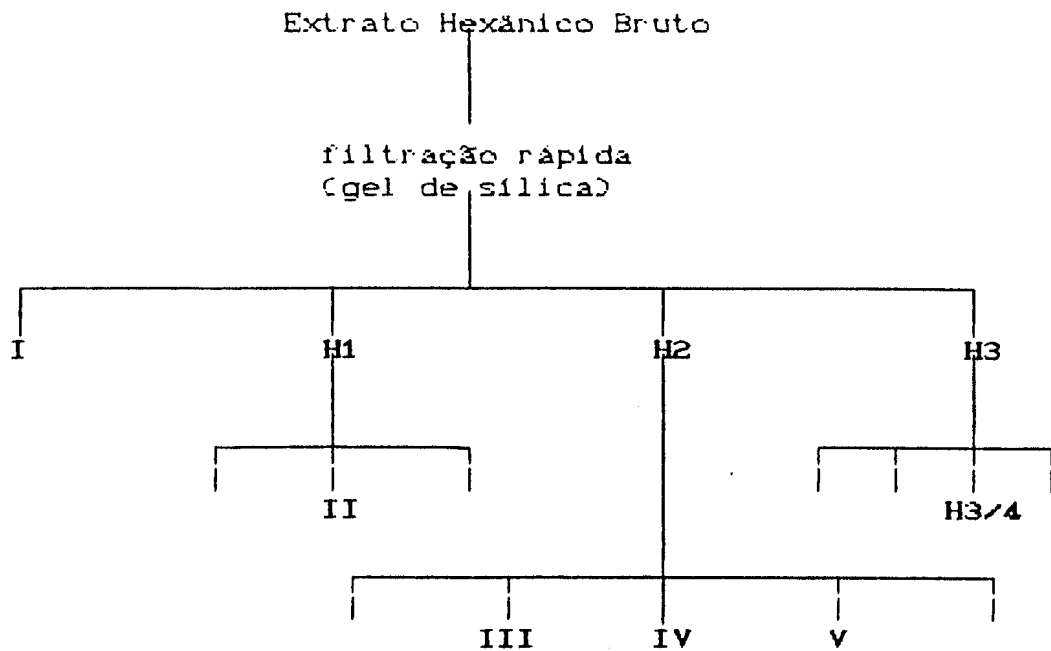
O Extrato Hexânico Bruto (9,523 g) foi submetido a uma filtração rápida em gel de sílica, utilizando-se misturas sucessivas de solventes em gradientes crescentes de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol) (ESQUEMA VI). Este tratamento forneceu a substância I e as frações H1, H2 e H3. Estas últimas frações foram submetidas a cromatografias de adsorção em coluna de gel de sílica, usando

como eluente a mistura de hexano e acetato de etila. A fração H1 forneceu a substância II; H2 forneceu as substâncias III, IV e V, e H3 forneceu a sub-fração H3/4, formada por uma mistura com quantidade insuficiente para análise.

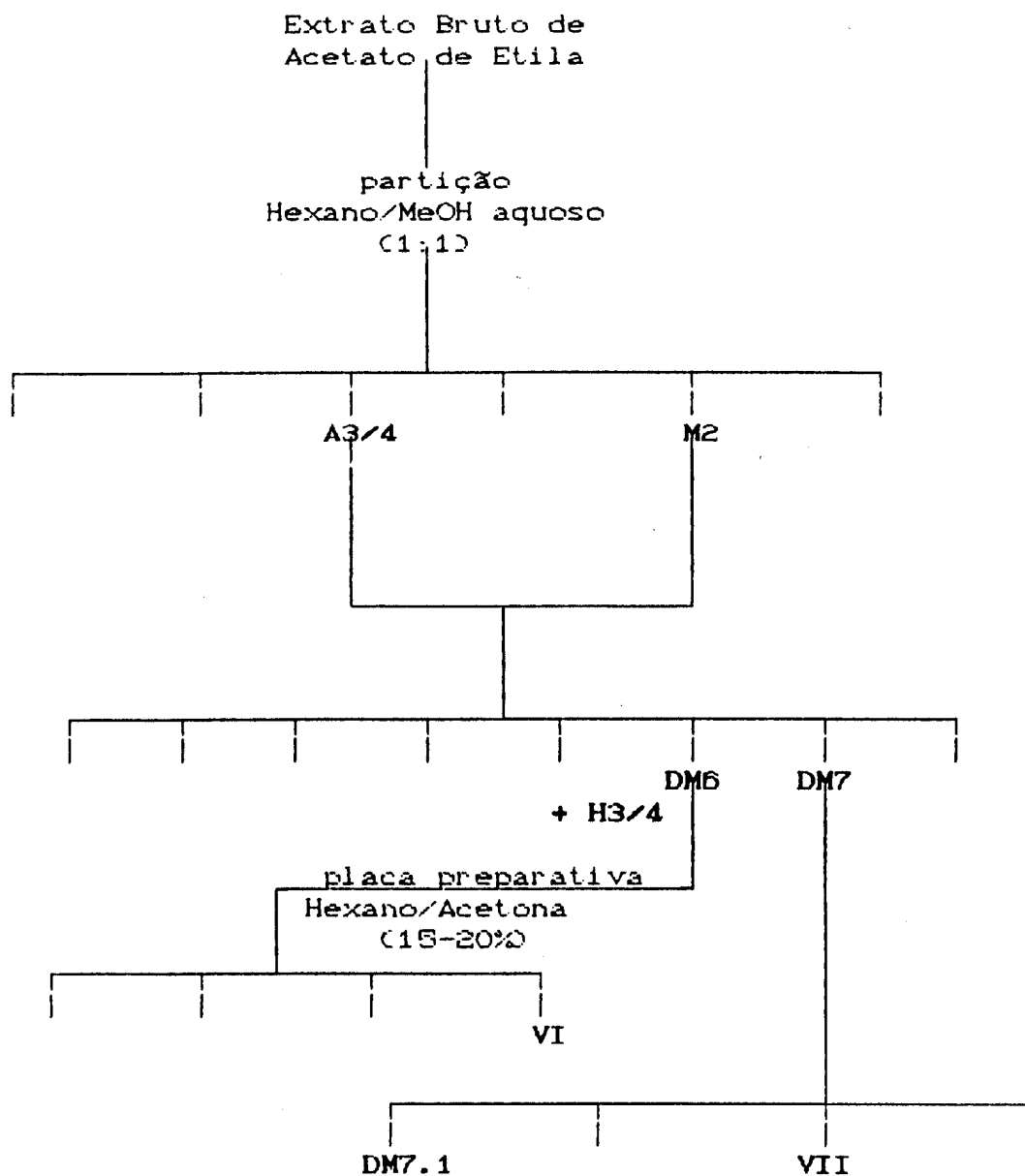
IV. C. 2b. FRACIONAMENTO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA

O residuo da extração com acetato de etila (22,768 g) foi submetido à partição hexano-metanol aquoso a 10% (1:1). Após observação do comportamento das frações em cromatografia em camada delgada, as mesmas foram agrupadas de acordo com sua composição (ESQUEMA VII). As frações A3/4 e M2, depois de reunidas, foram submetidas a quatro fracionamentos sucessivos em colunas de gel de sílica (a primeira coluna eluída com clorofórmio, as demais com misturas de hexano e acetato de etila), fornecendo DM6 e DM7. As frações DM6 e H3/4 foram purificadas em Placa Preparativa eluída com a mistura hexano/acetona (de 15 a 20%), apresentando duas faixas que, após raspagem e extração com clorofórmio, acetato de etila e metanol (1:1:1 respectivamente), forneceram VI. DM7 foi recromatografada em coluna de gel de sílica (hexano/acetato de etila como eluentes) e dela foram obtidos VII e DM7.1.

ESQUEMA VI: Fracionamento do Extrato Hexânico Bruto de *Dictyota mertensii*.



ESQUEMA VII: Fracionamento do Extrato Bruto de Acetato de Etila.

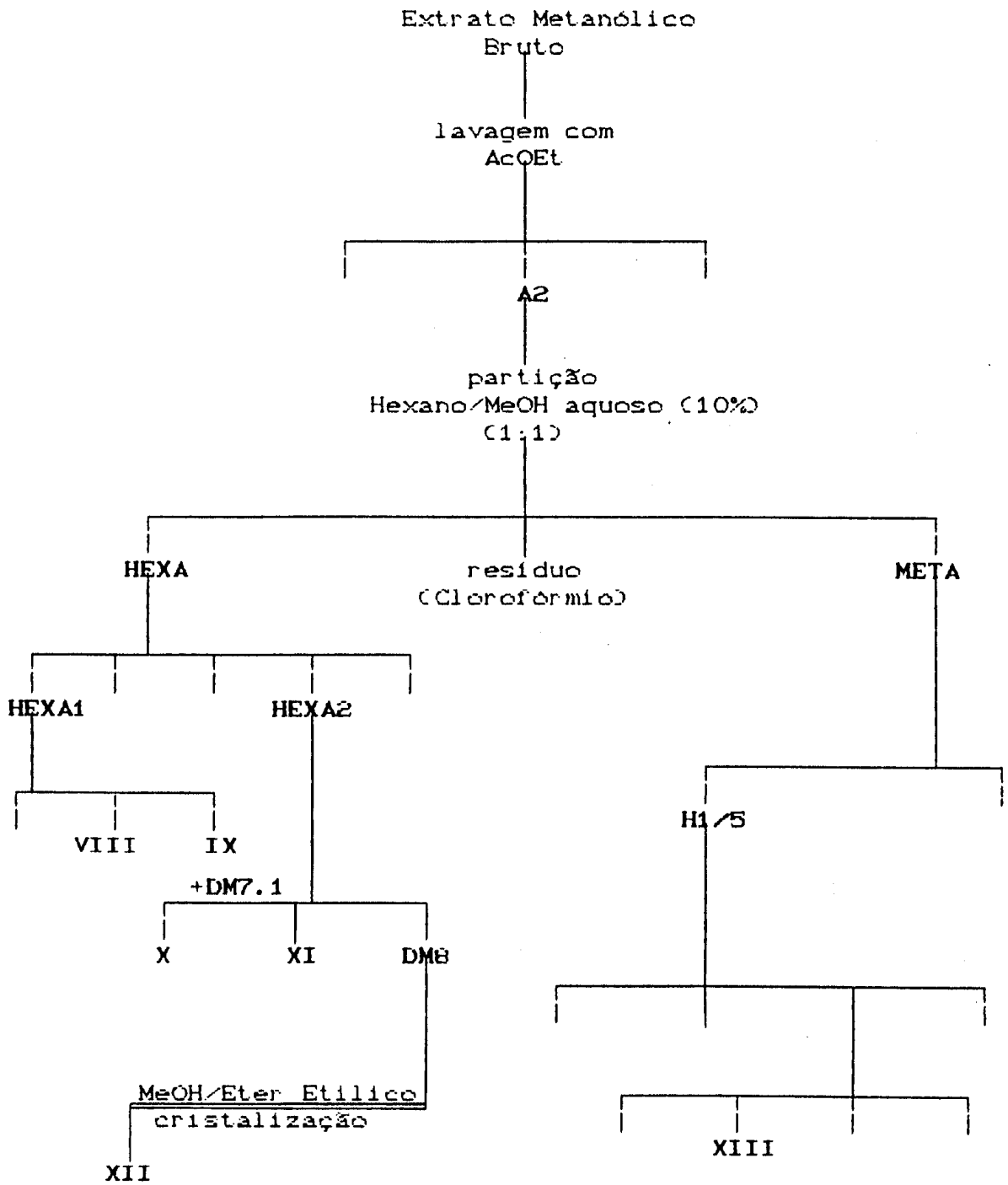


IV. C. 2c. FRACIONAMENTO DO EXTRATO METANÓLICO

O resíduo do extrato metanólico foi exaustivamente lavado com acetato de etila para retirar a água e o sal marinho. A evaporação do solvente forneceu um resíduo verde escuro pastoso (A2: 8,225 g) (ESQUEMA VIII). A partição em hexano-metanol aquoso a 10% (1:1) de A2 forneceu as frações hexânica (HEXA), metanólica (META) e a um resíduo insolúvel que, posteriormente, foi dissolvido em clorofórmio. A fração HEXA foi cromatografada em sucessivas colunas de gel de sílica, eluídas com a mistura hexano/acetato de etila, fornecendo VIII, IX e a sub-fração HEXA.2. Esta última foi reunida a DM7.1 e cromatografada em coluna de gel de sílica usando como eluente hexano e acetato de etila. Este tratamento forneceu as substâncias X, XI e uma mistura desconhecida DM8. DM8 foi cristalizada em éter etílico/metanol (1:1), fornecendo a mistura cristalina XII.

A fração metanólica foi adicionada água (v:v) até 10% e submetida a uma partição com hexano puro que forneceu a fração H1/5. Esta fração foi cromatografada duas vezes em colunas de gel de sílica; a primeira eluída com a mistura hexano/acetato de etila e a seguinte em diclorometano puro, de onde se obteve a substância XIII.

ESQUEMA VIII: Fracionamento do Extrato Metanólico Bruto.

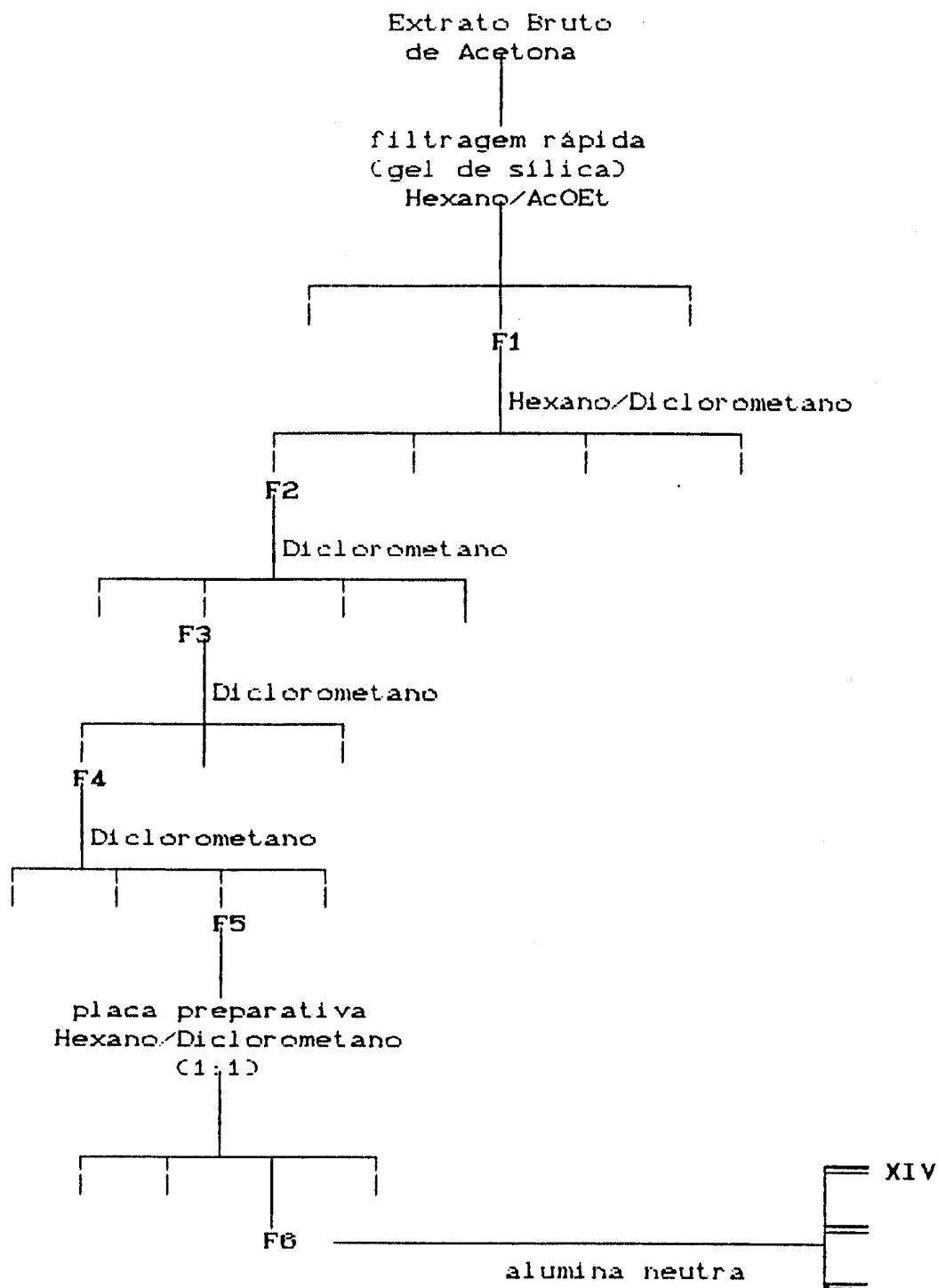


IV. C. 2d. FRACIONAMENTO DO EXTRATO ACETÔNICO

A posteriori, foi realizada uma segunda extração da mesma alga* em acetona (sob condições ligeiramente diferentes), com o objetivo de facilitar o isolamento e a identificação das substâncias isoladas em pequenas quantidades a partir de outros extratos. Este extrato bruto (não quantificado), após evaporação foi submetido a uma filtração rápida em gel de sílica em vários gradientes de misturas dos solventes hexano e acetato de etila. A partir desta separação obteve-se a fração F1 que foi cromatografada em coluna de gel de sílica (usando-se como eluente a mistura hexano/diclorometano), fornecendo a fração F2. Seguiram-se várias separações cromatográficas (como indicado no ESQUEMA IX) até a obtenção de F5. A fração F5 foi submetida a fracionamento em placa preparativa tendo como eluente a mistura hexano/diclorometano (1:1). Deste fracionamento a fração F6 forneceu quantidade suficiente para análise, e por esta razão foi recromatografada em alumina neutra usando como eluentes hexano puro e hexano/acetona a 2%. Este tratamento permitiu o isolamento da substância XIV.

* de nova coleta (material úmido).

ESQUEMA IX: Fracionamento a partir do Extrato Bruto de Acetona (nova extração).



IV.D. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DA ALGA *DICTYOTA MERTENSII*

A intenção inicial do trabalho consistia apenas no isolamento e determinação estrutural de substâncias terpenóidicas da espécie em questão, porém outras substâncias foram também isoladas durante o processo de purificação; em alguns casos os dados espectrométricos não foram suficientes para a determinação estrutural de todas elas, sendo possível apenas determinar a classe da substância isolada.

Dictyota mertensii (Martius) Kützing constituiu-se numa alga muito prolífica na produção de alcanos e ácido graxos; esta classe de substância foi identificada com facilidade através da inspeção dos espectros de IV como sendo ácidos graxos livres ou esterificados. A avaliação dos espectros é tratada de forma a simplificar o entendimento dos detalhes estruturais mais relevantes. Os diterpenos, bem como esteróis foram estudados mais minuciosamente.

IV.D.1. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA I

Trata-se de um alcano linear; os dados de RMN ^1H indicam a existência de dois sinais em δ 0,95 (bs) e δ 0,97 (bs) referentes a duas metilas terminais, e outro sinal em δ 1,43 (s), correspondente a $(\text{CH}_2)_n$ (ESPECTRO 1).



IV.D.2. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS II, III, IV, V, VII E VIII

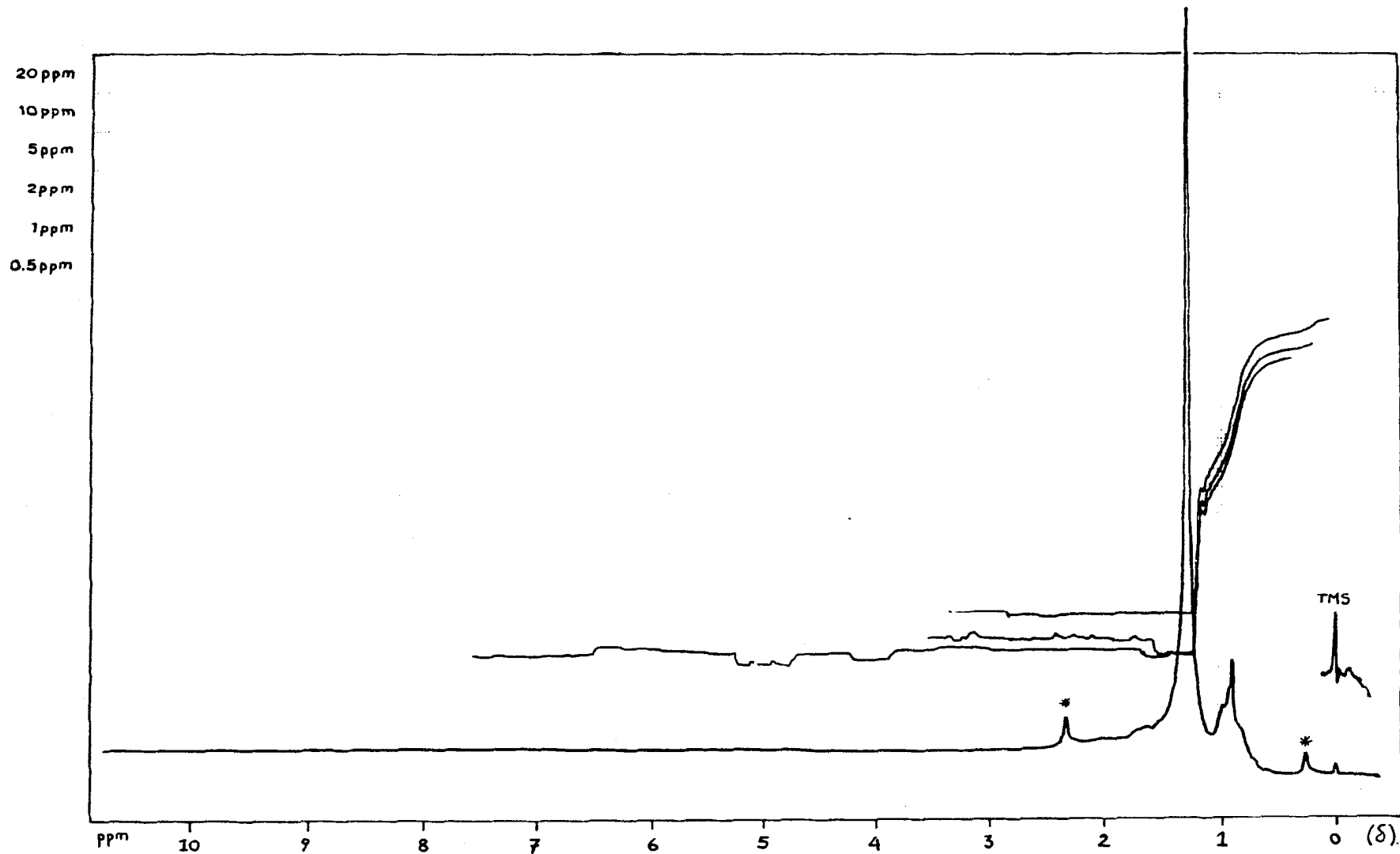
Devido às semelhanças estruturais, as substâncias acima serão analisadas conjuntamente. A interpretação dos espectros de I.V. de todas as substâncias acima indicou tratar-se de ácidos graxos mais ou menos insaturados; os espectros de RMN ^1H não foram conclusivos, por esta razão não foram incluídos nesta seção. As bandas comuns em torno de $750\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ correspondem ao estiramento $=\text{C-H}$ das moléculas, as bandas localizadas entre $1.190\text{-}1.280\text{ cm}^{-1}$ referem-se às deformações C-O, enquanto aquelas em torno de $1.400\text{-}1.420\text{ cm}^{-1}$

correspondem a estiramento C-H alifático (ESPECTROS 2 a 8). Em alguns destes espectros foram também identificados as absorções em 1.070 cm^{-1} (deformação axial C-O-C) (Substância II) e em 1.260 cm^{-1} (estiramento C-O) (Substâncias II e V - ESPECTROS 2 E 5), enquanto outros apresentaram absorções correspondentes a estiramento de hidroxila (3.450 cm^{-1}) (Substâncias III, IV e VII - ESPECTROS 3, 4 e 6). Observou-se ainda a presença de absorções em 1.626 cm^{-1} (estiramento C=C) e em torno de 3.000 cm^{-1} (deformação C-H olefínico) nos espectros das Substâncias V e VIII (ESPECTROS 5 e 7) (TABELA IX).

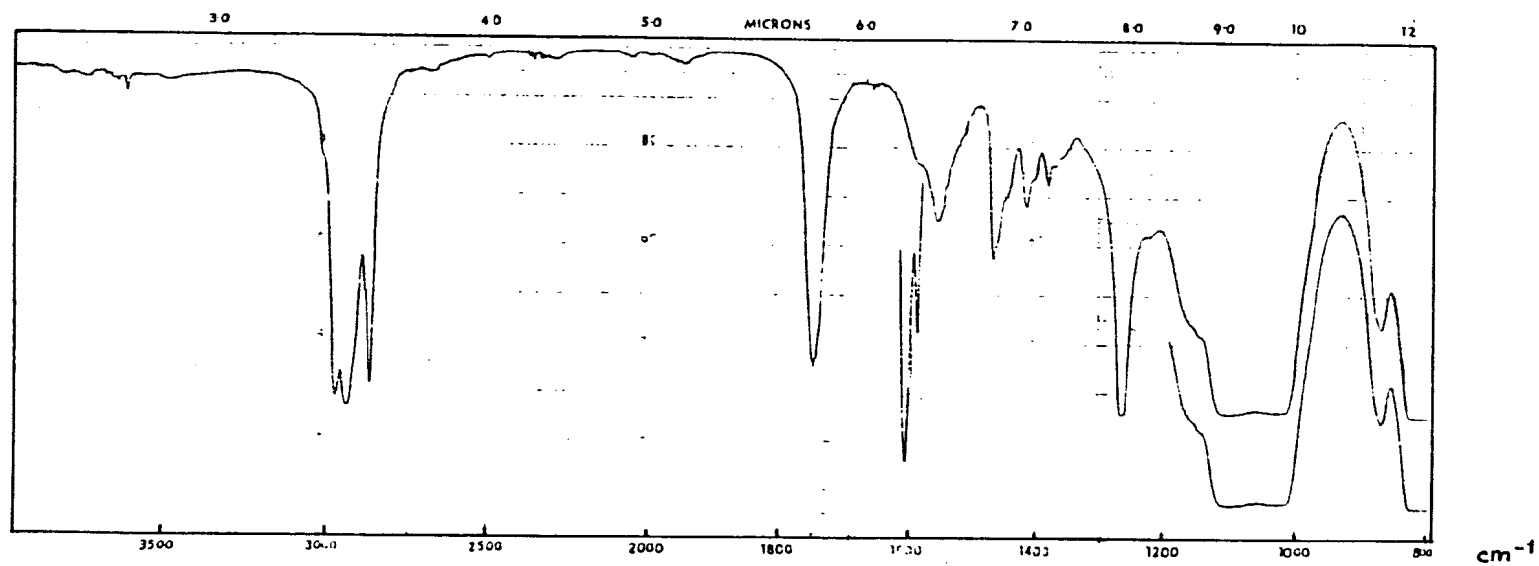
TABELA IX: Absorções observadas nos espectros de I.V. das Substâncias II, III, IV, V, VII e VIII.

$\nu_{\text{max}}\text{ (cm}^{-1}\text{)}$							Interpretação (ác. graxos)
II	III	IV	V	VII	VIII		
-	3500	3450	-	3450	-	$\nu_{\text{O-H}}$	
3010	3020	3010	3020	-	3040	$\nu_{\text{=C-H}}$	
2850-2950	2850-3000	2850-3000	2850-3000	2850-2910	2860-2940	$\nu_{\text{C-H}}$	
1750	1750	1750	1730	1740	1700	$\nu_{\text{C=C}}$	
1550	1550	1550	1550	-	-	$\nu_{\text{C=C}}$	
1460	1460	1450	1470	1460	1460	$\delta_{\text{C-H}}$ ou	
1400	1400	1400	1420	1420	-	$\delta_{\text{C-H}}$	
1280(F)	1280(f)	1190(f)	1275(F)	1190(f)	-	$\nu_{\text{C-O}}$	
800(F)	800(F)	800(F)	800(F)	-	700 e 790(F)	$\delta_{\text{=C-H}}$	

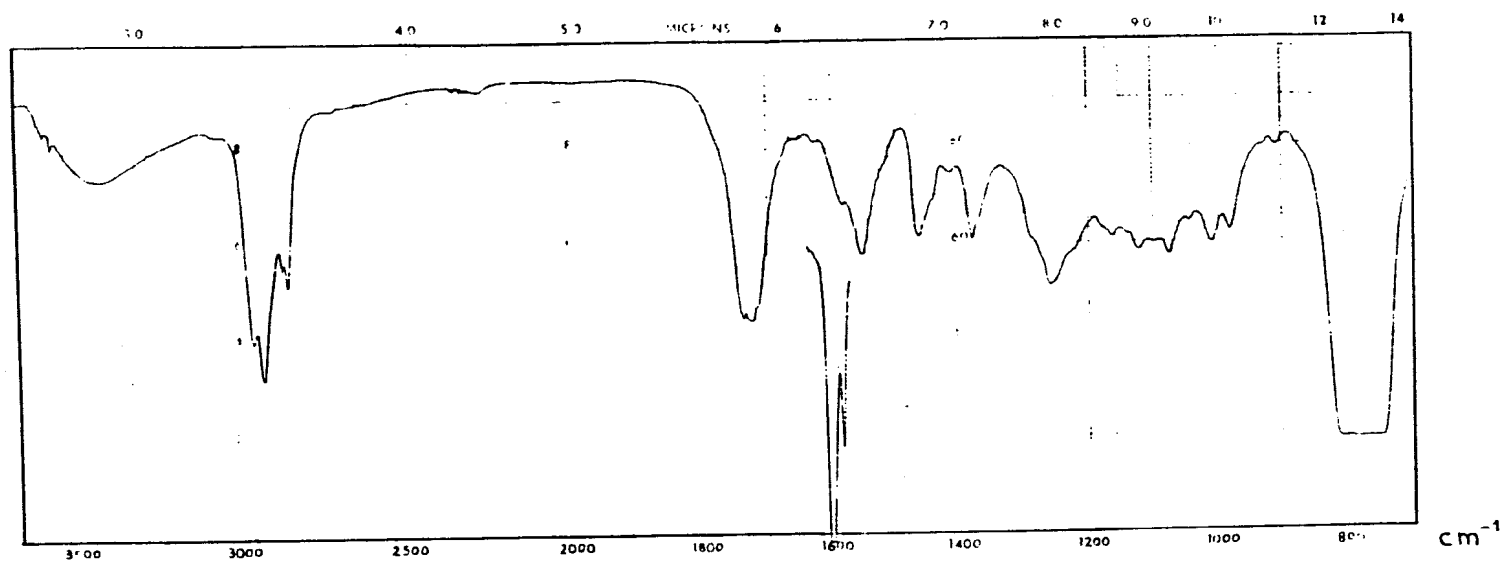
ESPECTRO 1: Espectro em RMN ^1H (60 MHz) da Substância I, em CCl_4 e TMS como referência interna (* bandas laterais).



ESPECTRO 2: Espectro no I.V. (filme) da Substância II .

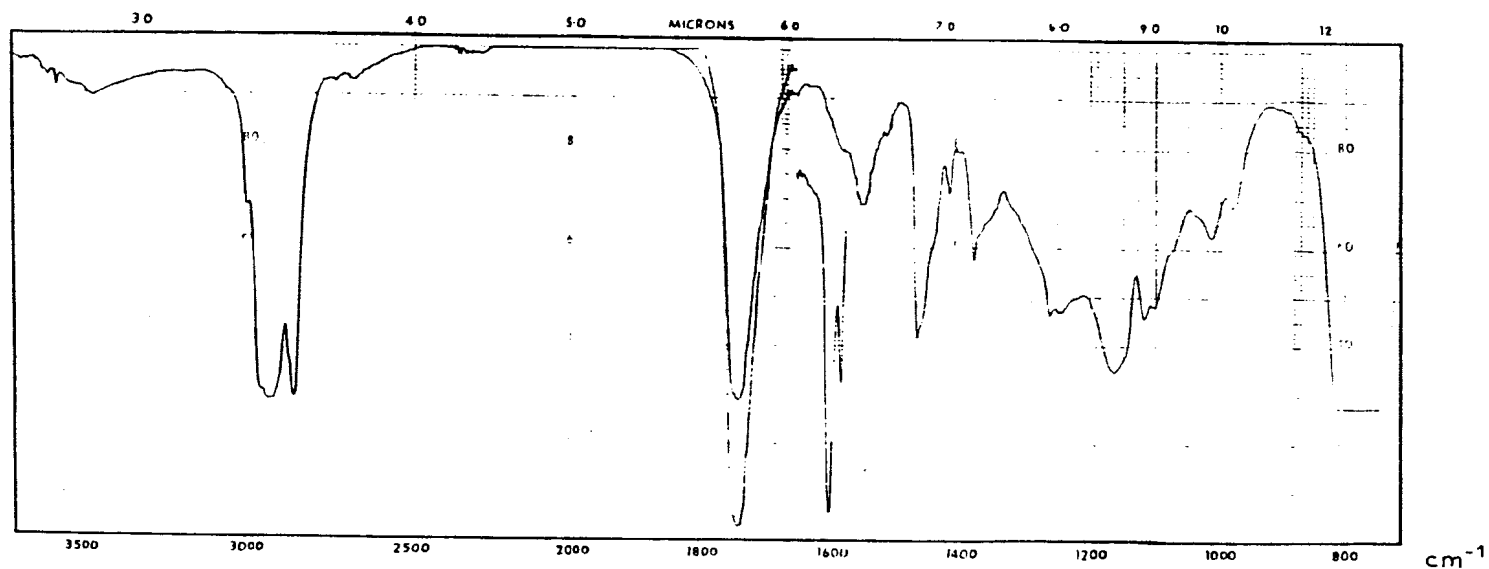


ESPECTRO 3: Espectro no I.V. (filme) da Substância III.

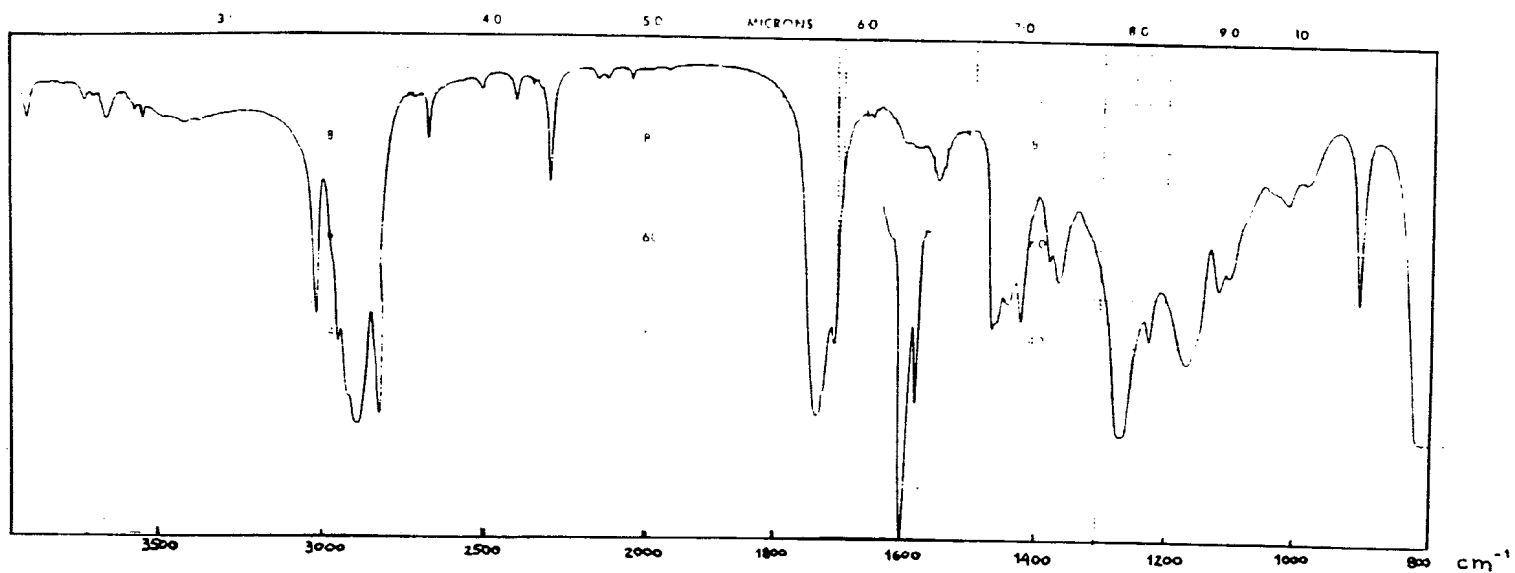


165

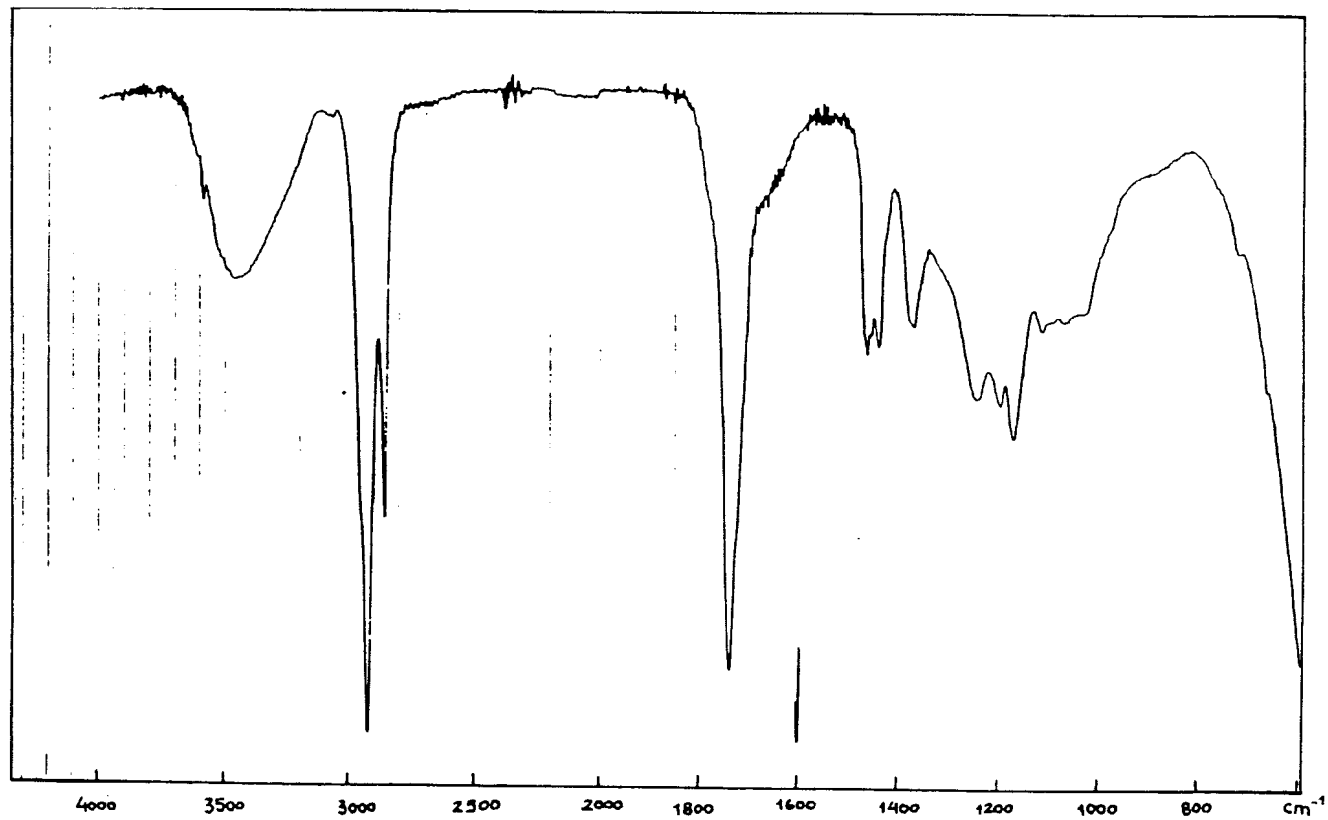
ESPECTRO 4: Espectro no I.V. (filme) da Substância IV.



ESPECTRO 5: Espectro no I.V. (filme) da Substância V.



ESPECTRO 6: Espectro no I.V. (filme) da Substância VII.



ESPECTRO 7: Espectro no I. V. (pastilha de KBr) da Substância VIII.

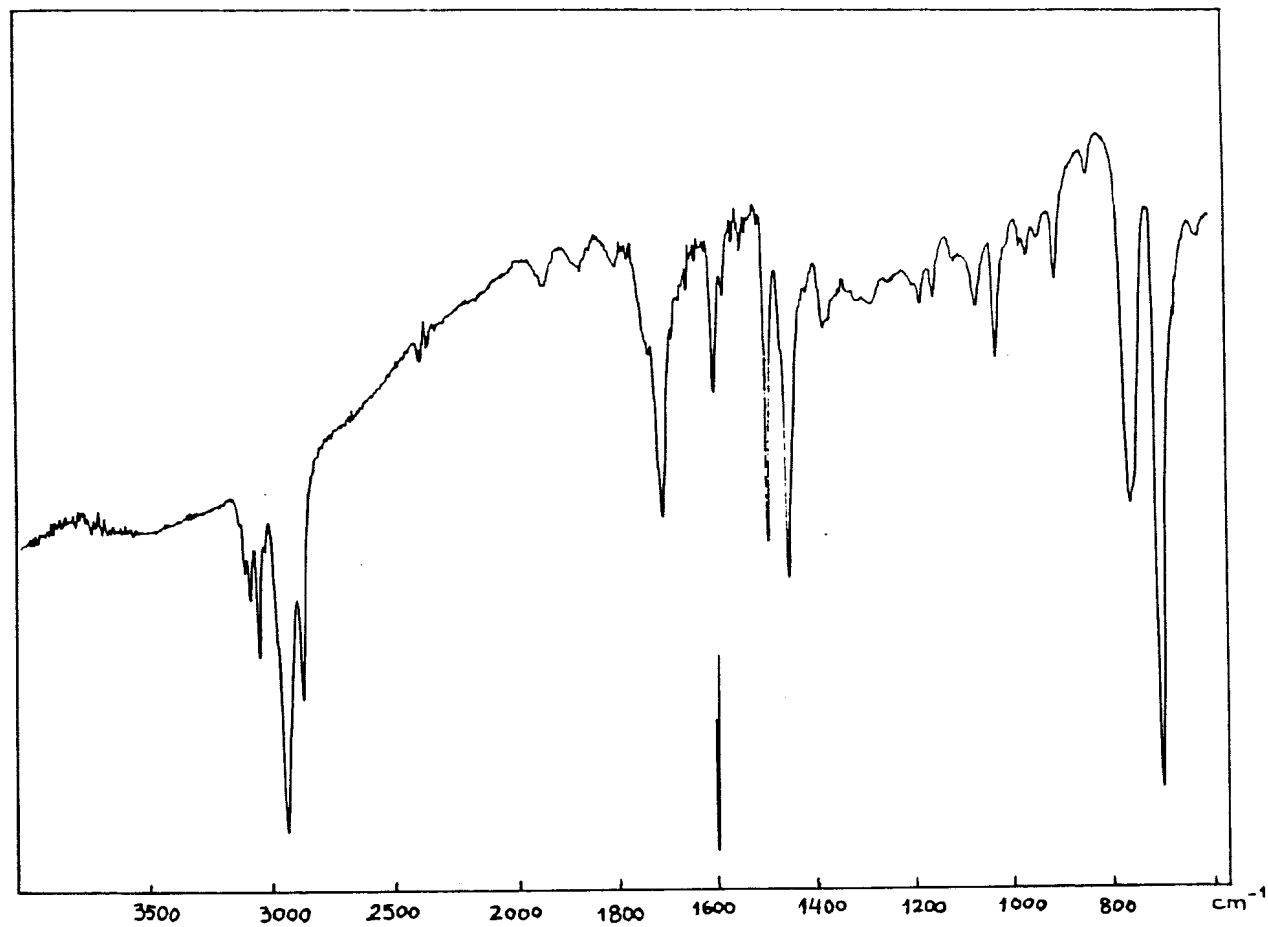


TABELA X: Interpretação dos dados espectrais no I.V. da substância VI.

$\nu_{\max}^{\text{filme}} (\text{cm}^{-1})$	Interpretação
3490	$\nu_{\text{O-H}}$ (álcool)
3010	$\nu_{\text{=C-H}}$
2940-2860	$\nu_{\text{C-H}}$
1740	$\nu_{\text{C=O}}$ (de acetato) éster
1650	$\nu_{\text{C=C}}$
1450 e 1380	$\delta_{\text{C-H}}$
1280 e 1060	$\nu_{\text{C-O}}$ (éster de acetato e éter alifático respectivamente)
890	$\nu_{\text{C=C}}$ ($\text{R}_2\text{C} = \text{CH}_2$)
800	$\nu_{\text{C=C}}$ ($\text{R}_2\text{C} = \text{CHR}$)

O espectro de RMN ^{13}C (totalmente desacoplado e DEPT, ESPECTRO 10), juntamente com as informações anteriores, permitiram deduzir o número de CH_3 , CH_2 , CH e C desta molécula (TABELA XI).

TABELA XI: Número de CH₃, CH₂, CH e C obtidas a partir das interpretações do espectro de RMN ¹³C de VI (δ).

CH ₃	CH ₂	CH	C
15.8	22.6	46.1	82.1
22.2*	26.0	50.2	86.9
22.6*	34.0	59.5	142.1
22.6	35.2	73.4	152.3
24.6	40.4	83.5	170.4
	107.3	127.7	
(CH ₃) ₅	(CH ₂) ₆	(CH) ₆	C ₄ . CO
(CH ₃) ₄ (CH ₃)	(CH ₂) ₅ (=CH ₂)	(CH) ₉ (CH-O) ₂ (CH=)	(C-O) ₂ (C=) ₂ (CO)

A presença da unidade de acetato é confirmada pelos sinais em δ 22.2 (CH₃) e δ 170.4 (CO) no espectro de RMN ¹³C (ESPECTRO 10 - TABELA XI). Os dados da TABELA XI permitem propôr a estrutura ampliada [(CH₃)₅ (CH₂)₅ (CH)₉; -C=CH₂; -C=CH; (CH-O)₂; (C-O)₂; CO]. * ou 22.6.

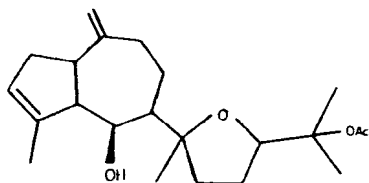
O valor m/z 362 do íon molecular ^{não} revelado no E.M. de VI (ESPECTRO 11) estaria de acordo com a fórmula molecular C₂₂H₃₄O₄. Subtraindo-se a unidade ác. acético (H₃C-C(=O)OH) resta C₂₀H₃₀O₂, que corresponde à estrutura de um diterpeno com cinco insaturações e tendo um oxigênio participando de duas ligações carbinólicas (TABELA XI).

Após a determinação da presença de duas ligações duplas (C=C) na molécula, restavam ainda três insaturações, duas delas se encaixam no sistema bicíclico do esqueleto guaiano, e a outra ao anel heterocíclico de cinco membros da cadeia lateral (prenila).

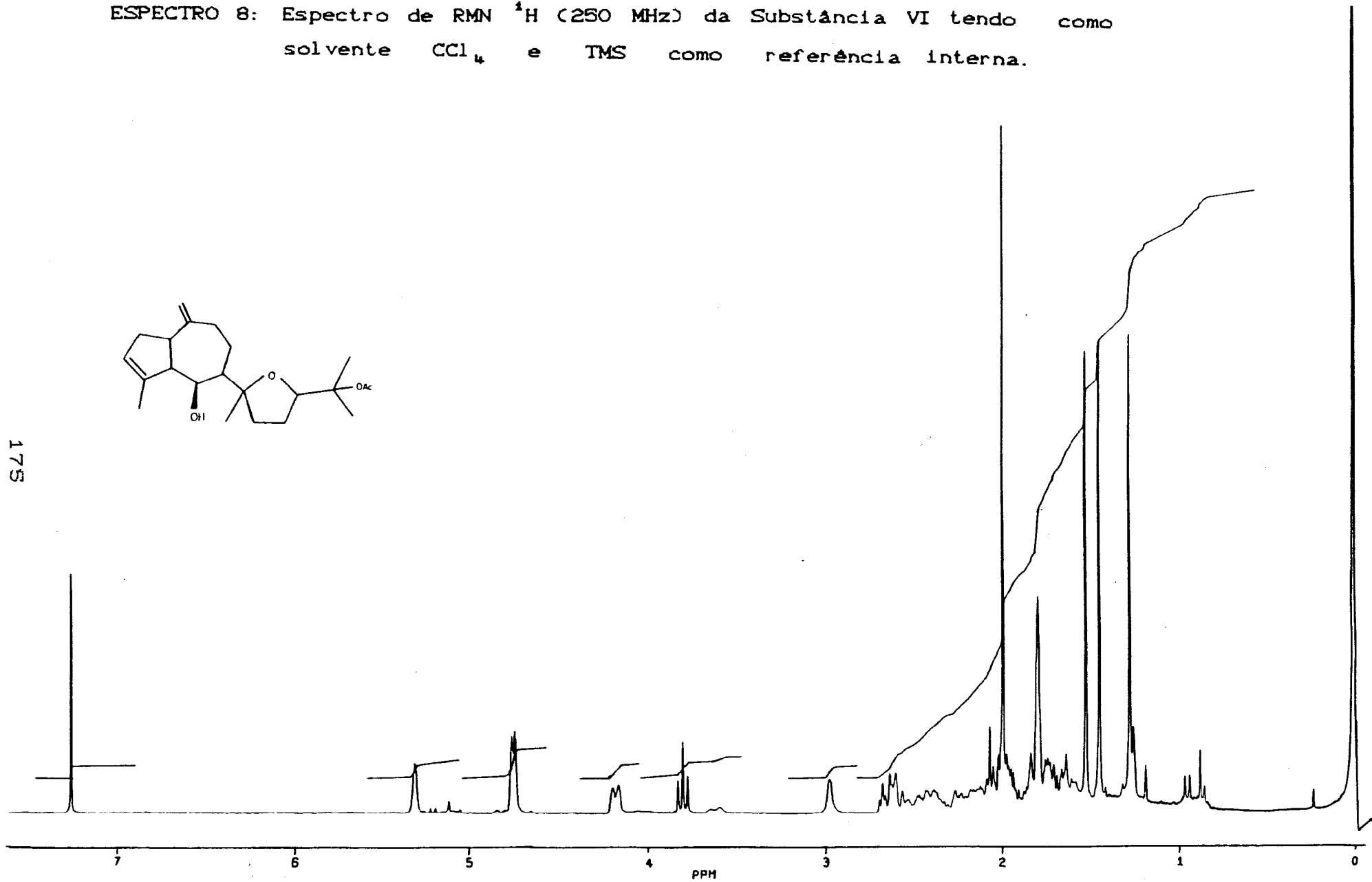
Na E.M., uma retroanálise na disposição dos íons e fragmentos indica a saída de água logo após a de ácido acético, este fato sugere a existência de uma hidroxila (OH) vizinha a C-H (ESQUEMA X). A quebra da cadeia lateral, indicada pela saída do fragmento 125 (ou C₈H₁₃O), reforça a presença de um oxigênio na cadeia lateral; a presença do íon *m/z* 221 forneceu a indicação de uma das posições deste oxigênio na cadeia lateral. Através dos íons *m/z* 185, 143 e 125 foi possível localizar a unidade de acetato na cadeia lateral da molécula; os íons *m/z* 159, 157 e 145 são bem conhecidos para o esqueleto guaiano e guaiano prenilado, e por isso reforçaram a estrutura da molécula proposta.

Estes dados deram subsídios para proposição da molécula como em se tratando de uma substância já conhecida na literatura e isolada de outros integrantes da família Dictyotaceae (CAPÍTULO III, pag.104). A comparação dos dados experimentais de RMN ¹H (ESPECTRO 8 e TABELA XII), bem como de RMN ¹³C (ESPECTRO 10 e TABELA XIII) com informações da literatura permitiu identificar a substância VI como sendo Dictyol H, isolado anteriormente a partir de *Dictyota dentata*.

ESPECTRO 8: Espectro de RMN ^1H (250 MHz) da Substância VI tendo como solvente CCl_4 e TMS como referência interna.



175



ESPECTRO 9: Espectro no I.V. (filme) da Substância VI.

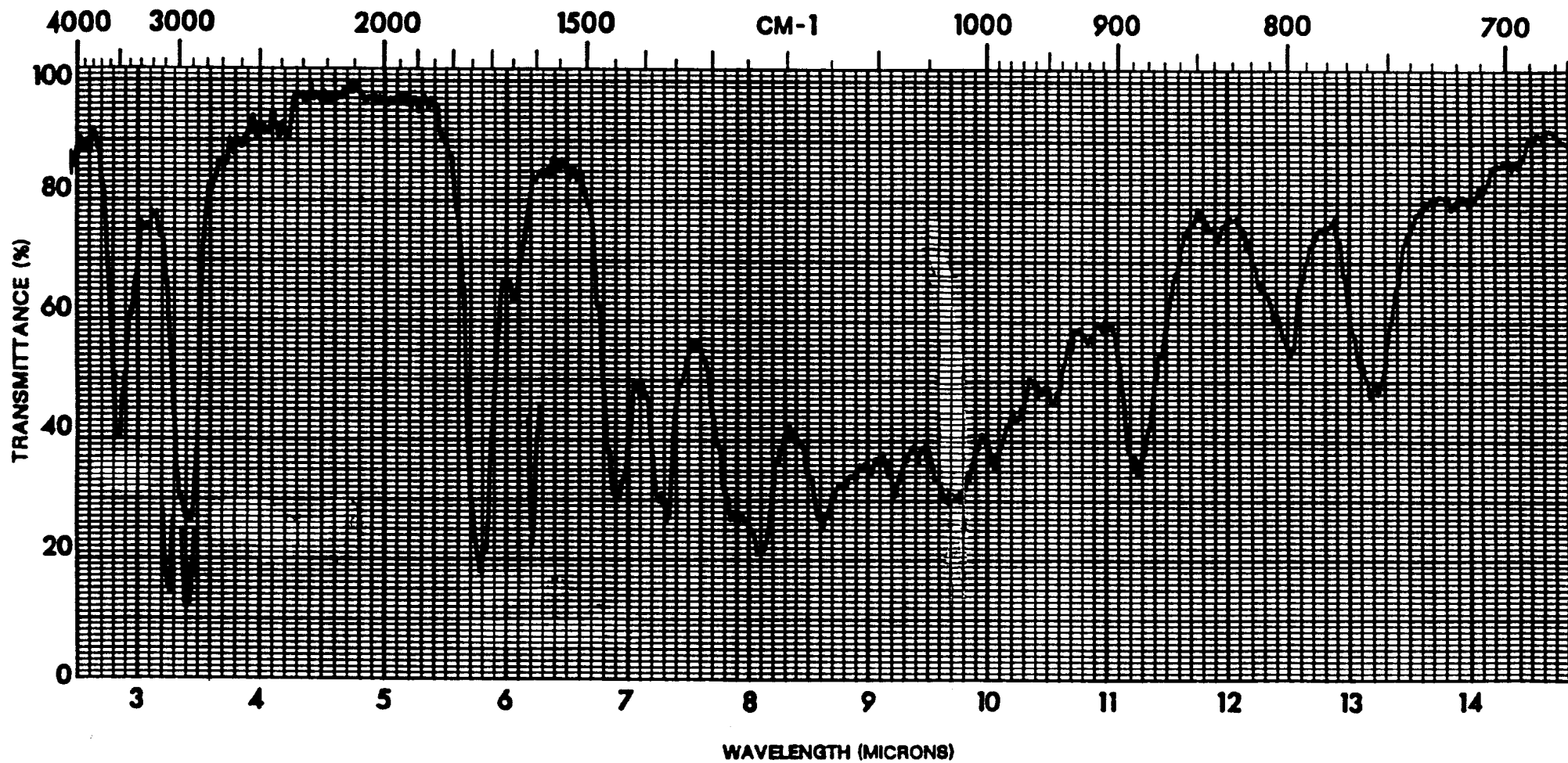


TABELA XIII: Sinais do espectro de RMN ^{13}C (ESPECTRO 10) comparados com dados da literatura (7). • * Dados intercambiáveis.

Carbonos	Literatura (δ)	Experimental (δ)
C-1	46.07	46.1
C-2	33.99	34.0
C-3	123.64	123.7
C-4	142.01	142.1
C-5	59.45	59.5
C-6	73.37	73.4
C-7	50.13	50.2
C-8	* 22.90	* 22.6
C-9	40.43	40.4
C-10	152.19	152.3
C-11	86.91	86.9
C-12	35.07	35.2
C-13	25.97	26.0
C-14	83.50	83.5
C-15	82.15	82.1
C-16	24.51	• 24.6
C-17	15.84	15.8
C-18	107.28	107.3
C-19	* 22.55	• * 22.2
C-20	* 22.55	* 22.2
$\text{CH}_g(\text{Ac})$	* 22.55	* 22.6
$\text{COO}(\text{Ac})$	170.50	170.4

Os ions fragmentários obtidos experimentalmente foram comparados com a literatura (7); as percentagens para cada uma das fragmentações encontram-se indicadas abaixo:

m/z (exp.)	% (exp.)	m/z (lit.)	% (lit.)	fragmento
18	18%			
28	28%			
29 (M+1)	18%			
41	59%			
42 (M+1)	8%			
43	100%			
44	7%			
55	62%			
56 (M+1)	9%			
71	75%			
72 (M+1)	13%			
81	67%			
82 (M+1)	22%			
91	43%			
92 (M+1)	14%			
93	49%			
94 (M+1)	13%	101	10.4%	
105	46%	105	30.3%	C ₈ H ₉
107	66%	107	43.3%	C ₈ H ₁₁
108	24%	-		
109	45%	109	30.2%	C ₈ H ₁₃
121	51%	121	36.4%	C ₈ H ₁₃

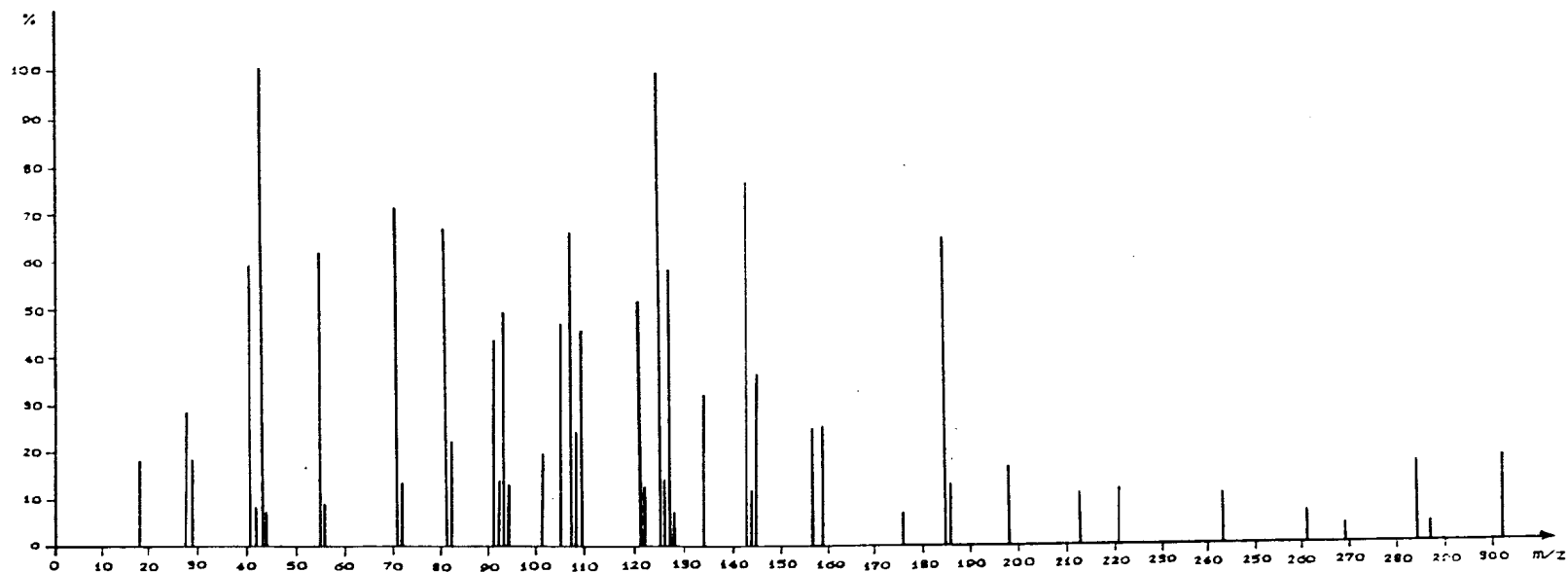
continuação

122 (M+1)	12%	-		
125	99%	125	100%	$C_8H_{13}O$
126 (M+1)	14%	-		
127	58%	127	67.2%	$C_8H_{15}O$
128 (M+1)	7%	-		
134	32%	134	34.5%	$C_{10}H_{14}$
143	77%	143	50.9%	$C_8H_{15}O_2$
144 (M+1)	12%	-		
145	35.6%	145	24.7%	$C_{11}H_{13}$
157	28%	157	23.8%	$C_{12}H_{13}$
159	28%	159	14%	$C_{12}H_{15}$
185	65%	185	58.2%	$C_{10}H_{17}O_3$
186 (M+1)	13%	-		
198	17%	198	24.6%	$C_{15}H_{18}$
213	11%	-		
221	12%	221	11.7%	$C_{14}H_{21}O_2$
243	11%	243	7.7%	$C_{17}H_{23}O$
261	7%	261	6.6%	$C_{17}H_{25}O_2$
269	4%	-		
284	17%	284	35%	$C_{20}H_{28}O$
287	4%	-		
302	18%	302	41.1%	$C_{20}H_{30}O_2$
-		362	3.4%	$C_{22}H_{34}O_4$

(exp.) - experimental

(lit.) - literatura

ESPECTRO 11: Ions fragmentários do espectro de massas da Substância VI.
(não apresenta o íon molecular).

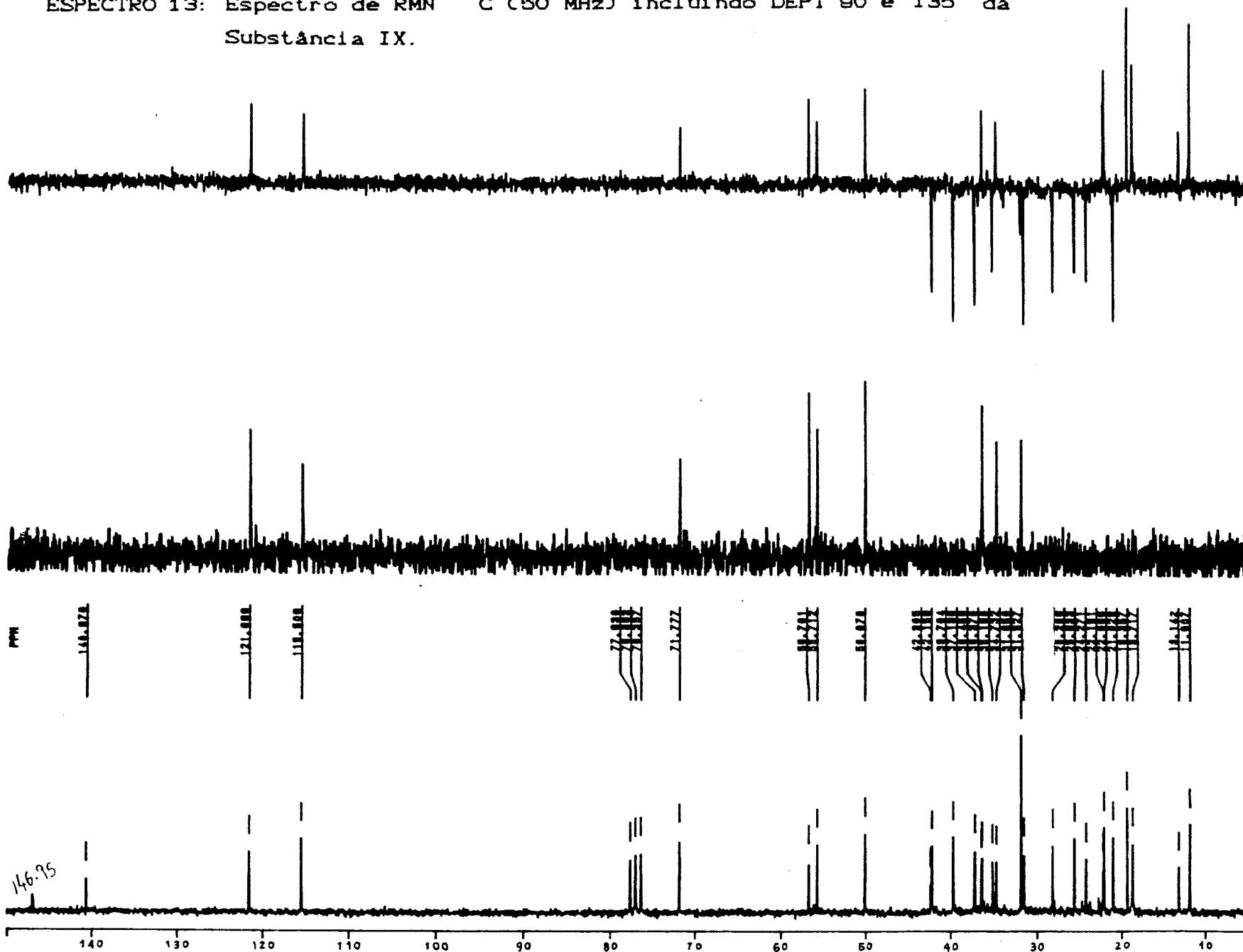


IV.D.4.DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA IX (do extrato Metanólico).

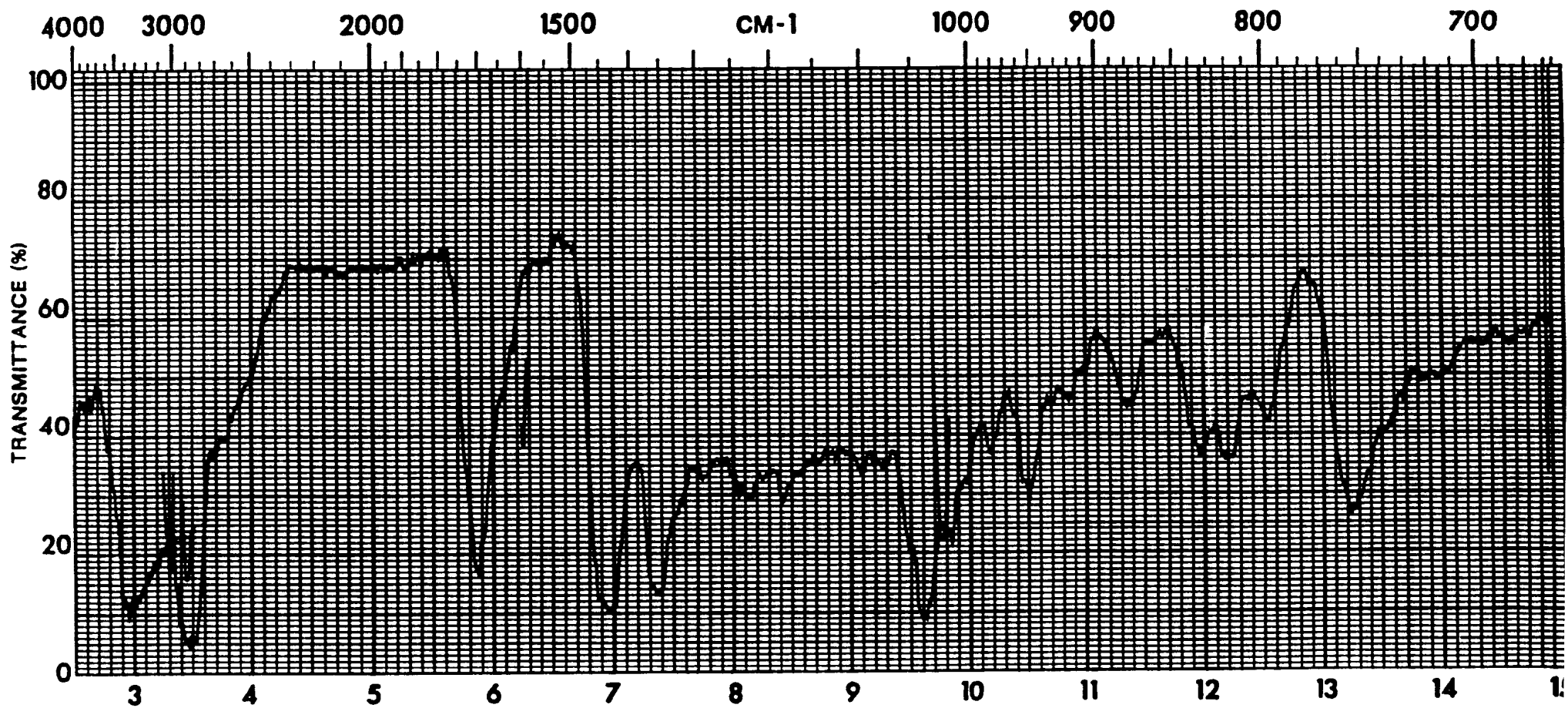
O espectro de RMN ^1H (ESPECTRO 12) mostra dois singletos destacados a 0.68 e 1.25 ppm, correspondentes a duas metilas, o sinal complexo (aparentemente vários singletos) em torno de 1.0 ppm parece indicar a presença de três metilas ligadas a carbonos quaternários, e o dubleto em 1.56 ppm, está de acordo com a metila ligada a carbono sp^2 . Estes sinais, juntamente com os multipletos em 3.53 ppm (1H, HC-O), 5.16 (1H olefínico, $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}=\text{}$) e 5.34 ppm (1H olefínico) estão de acordo com as atribuições dos sinais do espectro de RMN ^{13}C .

A interpretação do espectro de RMN ^{13}C (totalmente desacoplado e DEPT 135° e 90° - ESPECTRO 13) permitiu a dedução do número de CH_3 , CH_2 , CH e C (TABELA XIV), enquanto no espectro de I.V. (ESPECTRO 14) destacam-se as absorções em 3.450 cm^{-1} (OH), uma banda entre 2.940 e 2.860 cm^{-1} (CH alifático). Juntamente com os dados citados acima e as interpretações do espectros de IV (ESPECTRO 14 e TABELA XV) foi possível propor a fórmula molecular em módulos, como sendo: $(\text{CH}_3)_6 (\text{CH}_2)_{10} (\text{CH})_6 (\text{CH}-\text{OH}) (\text{CH}=\text{})_2 (\text{C}=\text{})_2 \text{C}_2$. Esta fórmula molecular está de acordo com o íon M^+ revelado no E.M. (ESPECTRO 15). O espectro de U.V. (ESPECTRO 16) não apresentou nenhuma absorção.

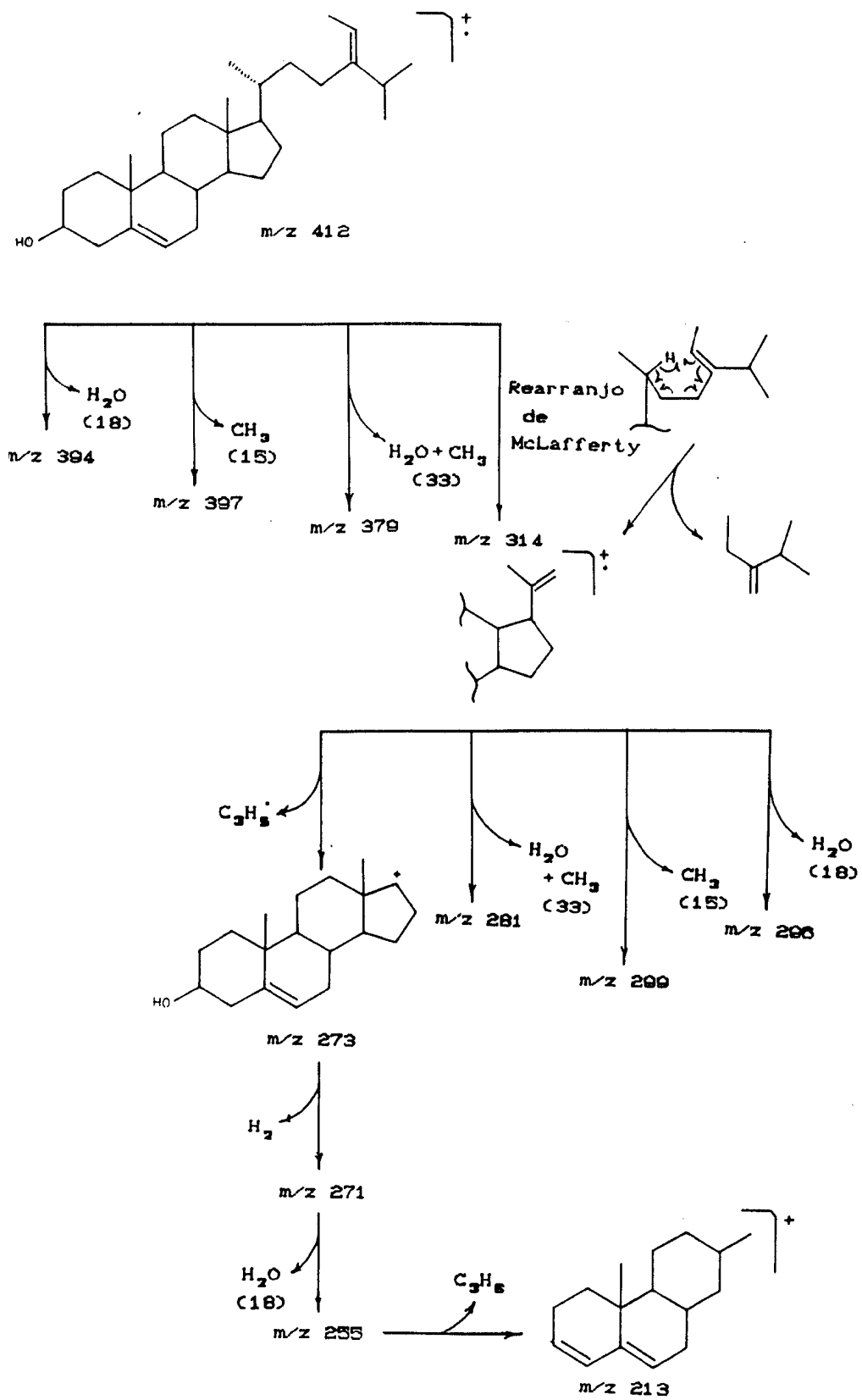
ESPECTRO 13: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz) incluindo DEPT 90° e 135° da Substância IX.



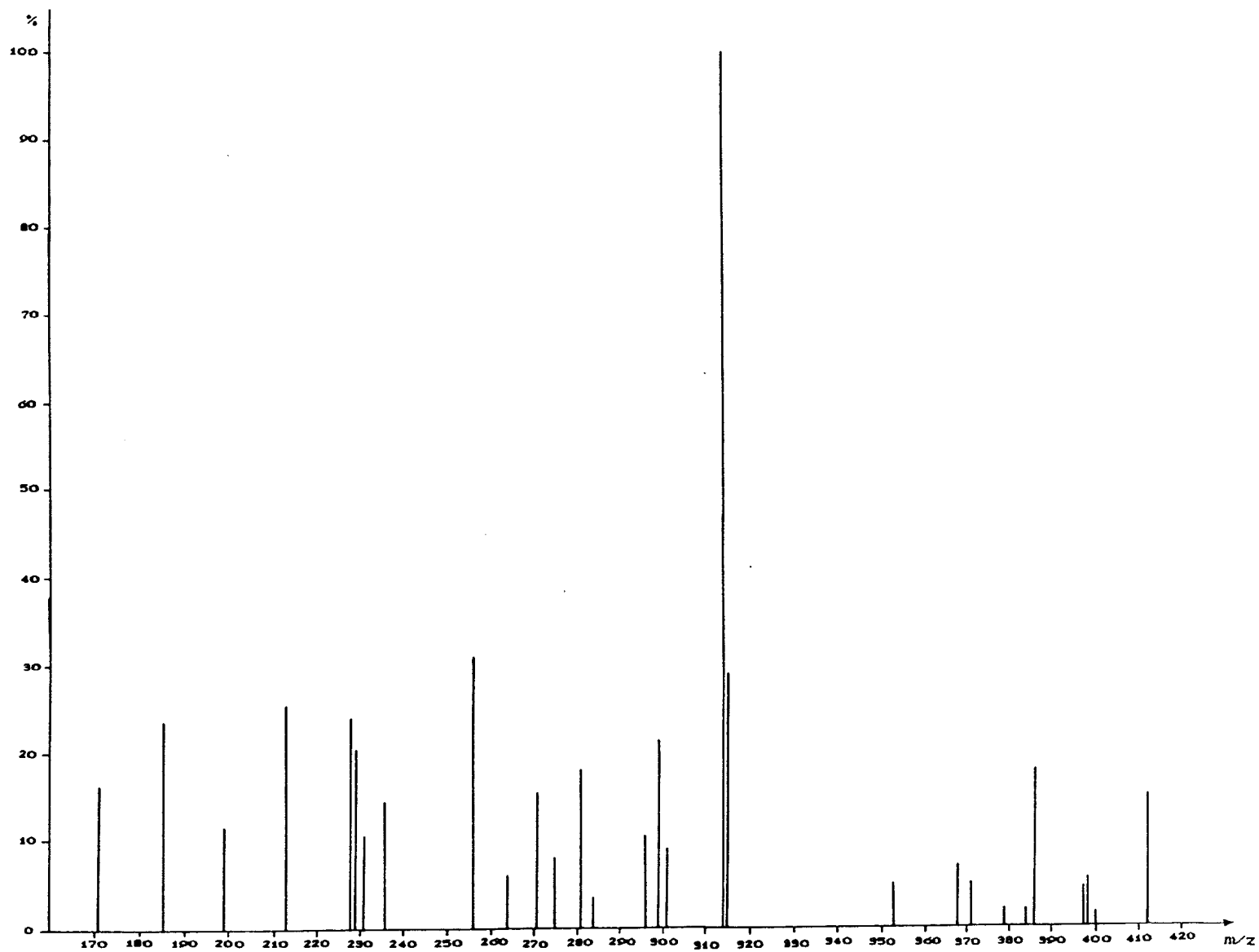
ESPECTRO 14: Espectro no I.V. (filme) da Substância IX.



Desenho esquemático das principais fragmentações do
Fucosterol.



ESPECTRO 15: Espectro de Massas da Substância IX; principais ions fragmentários e percentagens.



ESPECTRO 16: Espectro no U.V. (em metanol) da Substância IX.

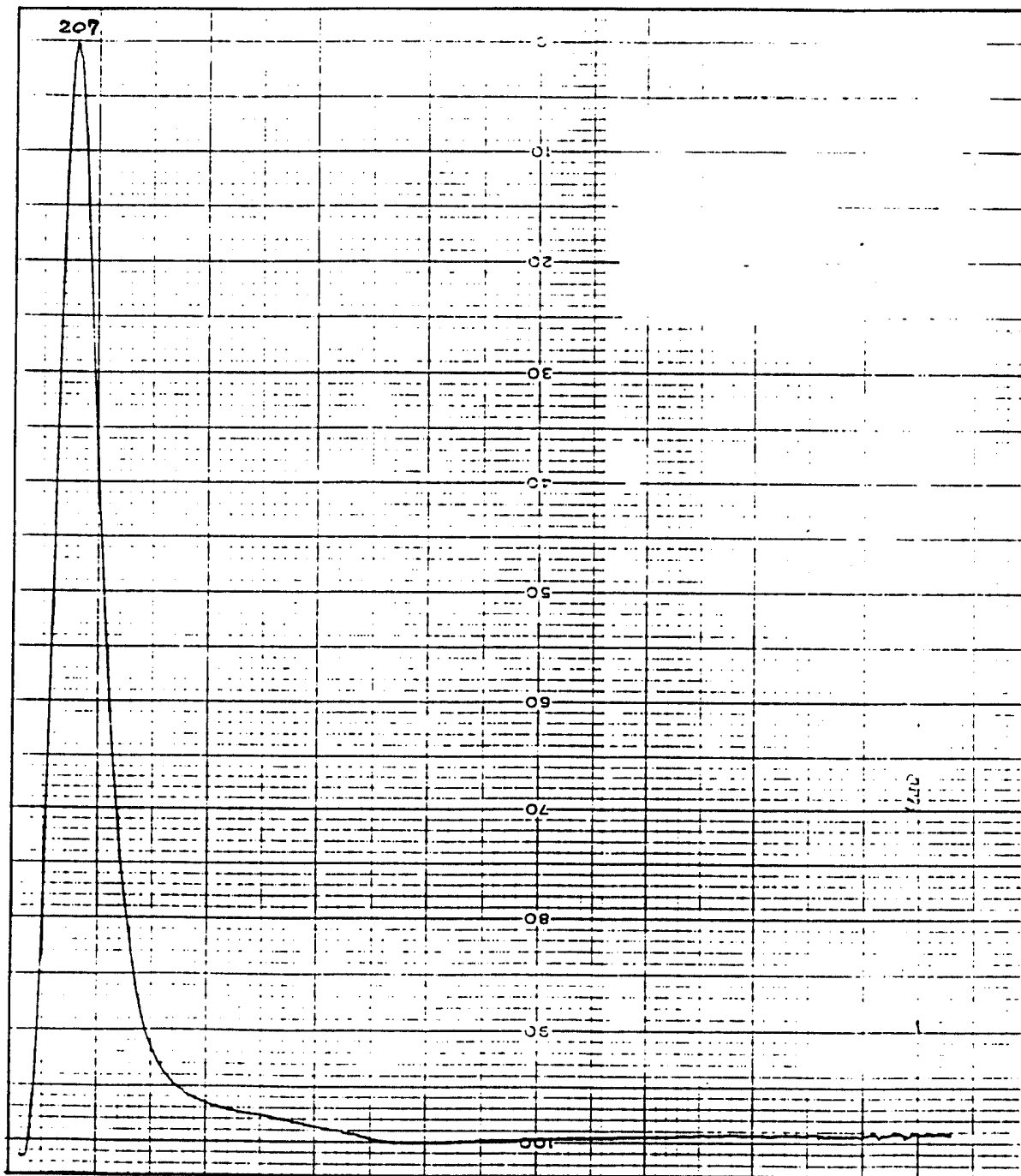


TABELA XIV: Definição do número de CH₃, CH₂, CH e C da substância IX a partir dos dados fornecidos pelo espectro de RMN ¹³C (CDCl₃, 50.3 MHz, δ - ESPECTRO 13).

CH ₃	CH ₂	CH	C
11.8	21.0	31.5	36.4
13.1	24.3	34.7	42.4
18.7	25.6	36.4	140.7
19.3	26.2	50.1	146.9
22.0	31.8	55.7	C _u
22.1	31.8	56.7	
(CH ₃) ₈	35.2	71.7	C ₂ (-C=) ₂
	37.2	115.5	
	42.1	121.9	
	39.7	(CH) ₈	
	(CH ₂) ₁₀	(CH) ₈ (CH-OH)(-CH=) ₂	

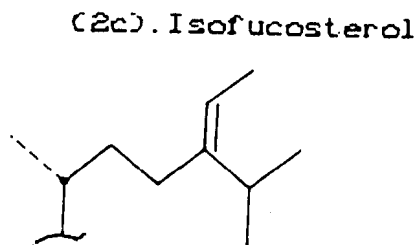
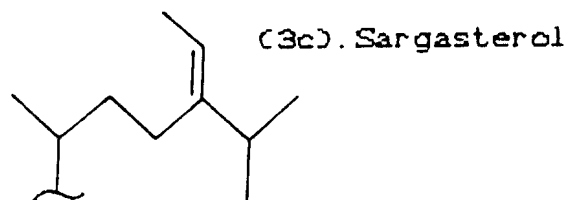
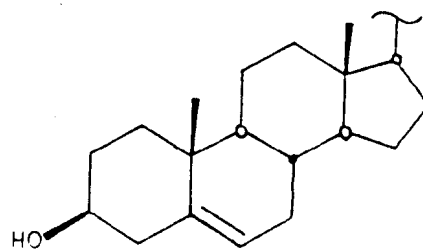
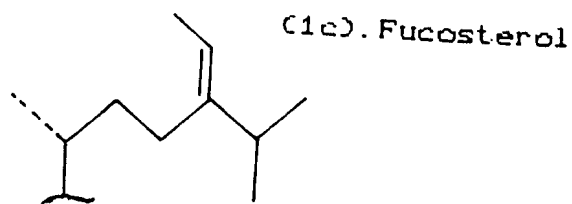
TABELA XV: Interpretação dos dados fornecidos pelo espectro de I.V. da substância IX (ESPECTRO 14).

$\nu_{\max}^{\text{filme}}$ (cm ⁻¹)	Interpretação
3500	$\nu_{\text{O-H}}$
3020	$\nu_{\text{=C-H}}$
2900	$\nu_{\text{C-H}}$
1680	$\nu_{\text{-C=CH}}$ (trissubst.)*
1450	ν_{CH} (CH ₃ , CH ₂)
1360	$\delta_{\text{C-H}}$ (vinil)
1040	$\nu_{\text{C-O}}$
840	$\delta_{\text{C-H}}$ (trissubst.)*

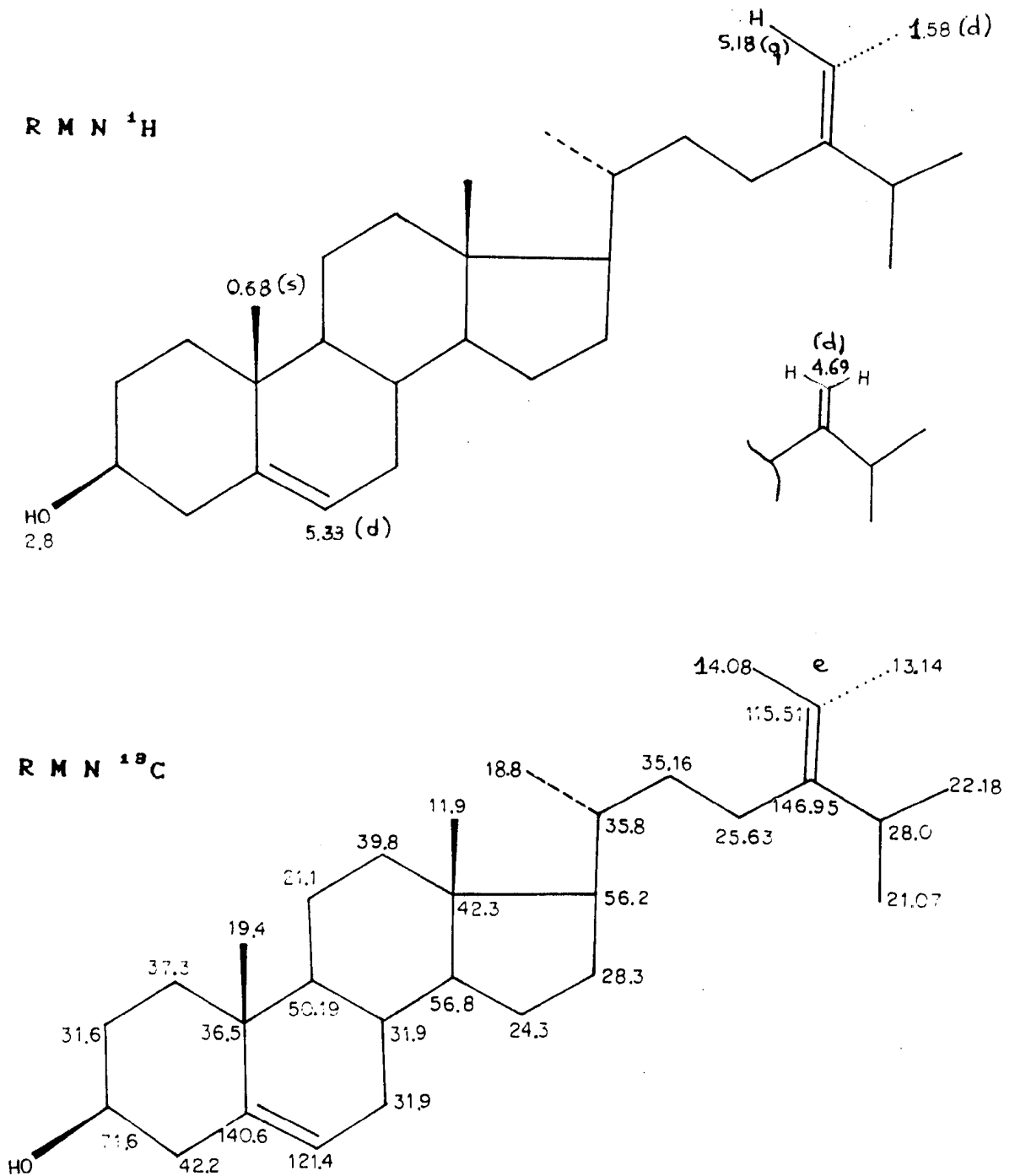
O dados do EM (ESPECTRO 16) forneceram as seguintes fragmentações, também observados na literatura (15,122):

Fragmentação	1c,2c,3c (m/z)	Percentagens
M^+	412	15%
$M^+ - H_2O + CH_3$	379	2%
$M^+ - C_7H_{14}$	314	100%
$M^+ - C_7H_{14} + CH_3$	299	21.5%
$M^+ - C_7H_{14} + H_2O$	298	10.5%
$M^+ - C_7H_{14} + CH_3 + H_2O$	281	18%
$M^+ - \text{cadeia lateral} + 2H^+$	271	15.5%

A comparação dos dados obtidos com informações da literatura (15) permitiu propor para IX a estrutura do esteroide (c), contituido de tres isômeros: fucosterol (1c), isofucosterol (2c) e sargasterol (3c), isolados de outros gêneros de algas pardas (83,124,240).



Os dados experimentais obtidos a partir dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C (ESPECTROS 12 e 13) encontram-se destacados de forma esquemática como se segue:



A comparação dos dados de RMN ^{13}C de IX (ESPECTRO 13) com os do fucosterol (1c), registrado na literatura (TABELA XIV), confirma a proposta da estrutura (1c) para IX.

TABELA XVI: Comparação dos dados de RMN ^{13}C de IX (ESPECTRO 13) com padrão da literatura (15).

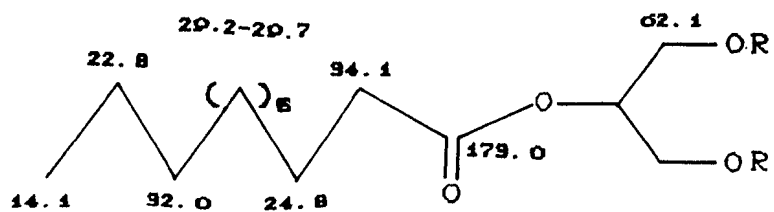
Carbonos	Literatura	Experimental
1	37.6	37.2
2	31.8	31.6
3	71.9	71.7
4	42.4	42.1
5	140.9	140.7
6	121.7	121.9
7	32.0	31.6
8	32.0	31.6
9	50.2	50.1
10	36.5	36.4
11	21.2	21.0
12	39.8	39.7
13	42.4	42.4
14	56.8	56.7
15	24.4	24.3
16	28.3	26.2
17	55.9	55.7
18	11.9	11.6
19	19.5	19.3
20	35.3	34.7
21	18.8	18.7
22	36.5	35.2
23	25.8	25.6
24	147.1	146.9
25	34.8	34.7
26	22.2	22.0
27	22.2	22.1
28	115.8	115.5
29	13.2	13.1

IV. D. 5. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTANCIA X (do extr. MeOH).

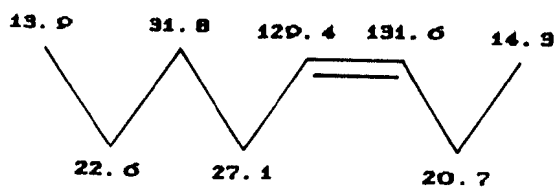
O espectro de RMN ^1H (ESPECTRO 17) apresentou um sinal a 0.89 ppm (t, 3H, $J=6\text{Hz}$) referente a uma metila terminal de uma cadeia alcânica, que é comprovada pelo sinal em 1.24 ppm $[(\text{CH}_2)_n]$. Os sinais em 2.33 ppm (t, $J=6,20\text{ Hz}$), correspondente a prótons α à carbonila e em 4.14 ppm, correspondente a prótons carbinólicos, estão de acordo com a função éster da molécula. Esta função é revelada pela banda em 1.740 cm^{-1} no espectro de I.V. (ESPECTRO 18). O triplete em 5.33 ppm permite sugerir a presença de 1 ou mais ligações duplas no éster. O sinal múltiplo em 1.98 ppm corresponde aos prótons alílicos da substância.

A banda em 3.500 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-H}}$ de álcool) presente no espectro de I.V. sugere um álcool como um segundo componente da mistura. Sendo assim, o sinal do próton carbinólico deve absorver em 3.73 ppm (sinal fraco) no espectro de RMN ^1H .

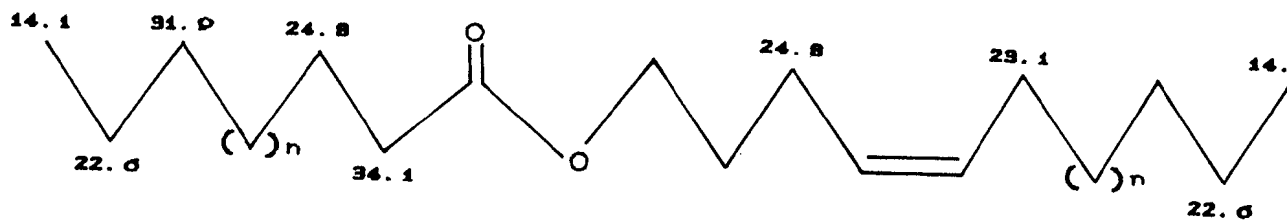
A análise do espectro de RMN ^{13}C (ESPECTRO 19 - TABELA XVII), levando-se em consideração os dados discutidos anteriormente e padrões da literatura (1 e 2d) (326,327), permitiu fazer as atribuições dos carbonos e propor a estrutura (3d) para o componente principal de X.



(1d)



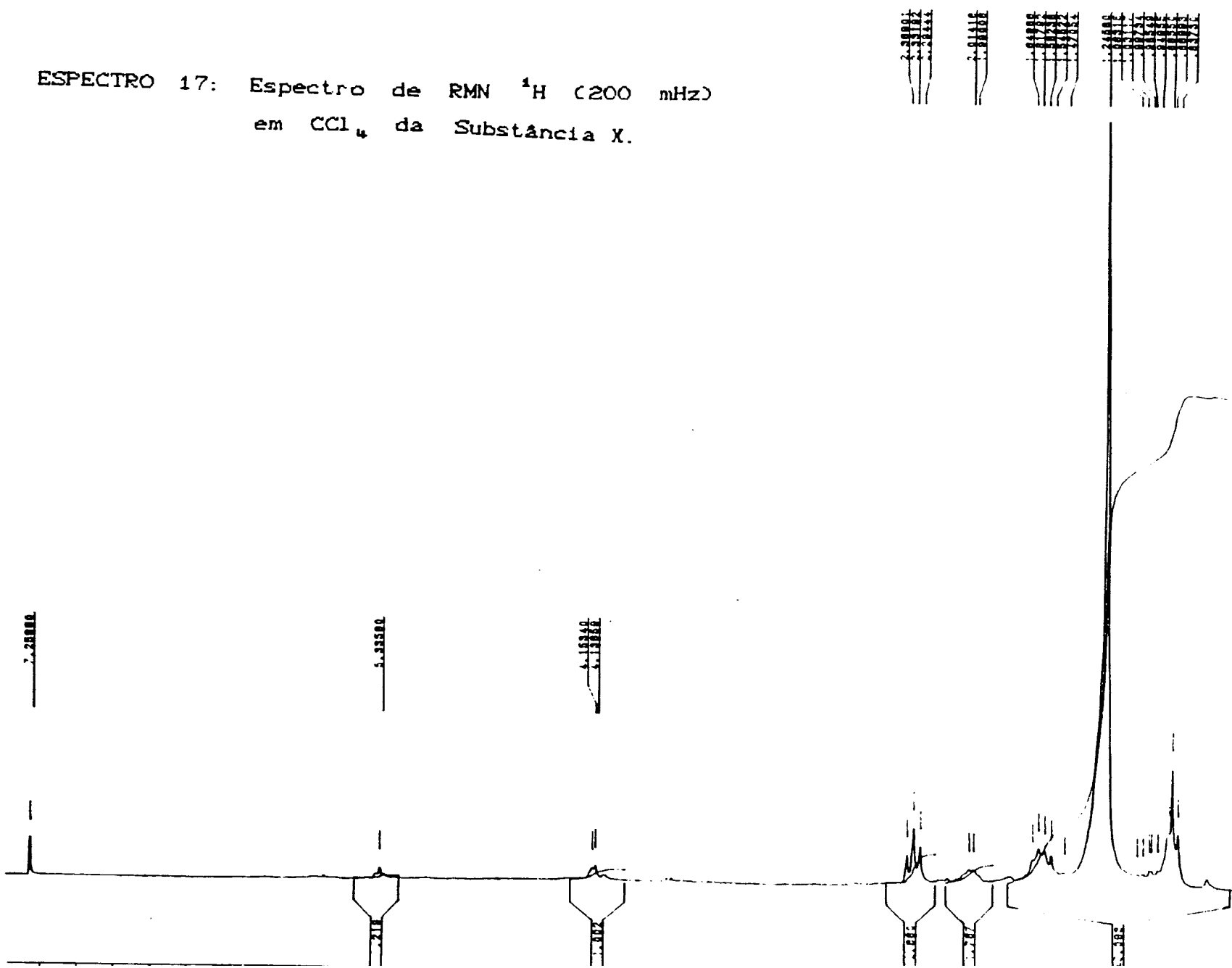
(2d)



(3d)



ESPECTRO 17: Espectro de RMN ^1H (200 MHz)
em CCl_4 da Substância X.



ESPECTRO 18: Espectro no I.V. (filme) da Substância X.

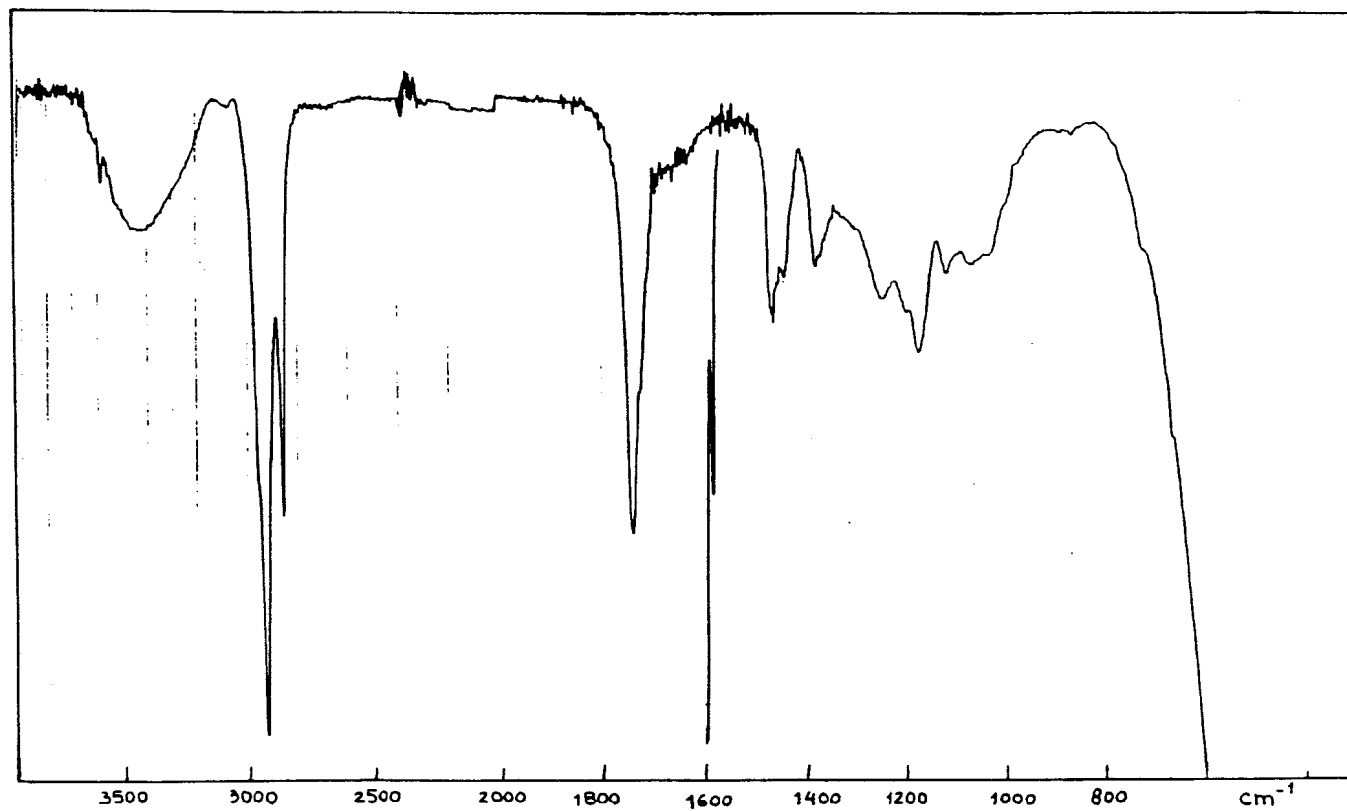


TABELA XVII: Deslocamentos químicos dos carbonos da Substância X.

Carbono	(δ)	Carbono	(δ)
$\begin{array}{c} -\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OR} \\ =\text{CH} \end{array}$	179.0	$\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$	29.2-29.7
$=\text{CH}$	129.9	$\text{H}_2\text{C}-\text{C}=\text{}$	27.1
$=\text{CH}$	129.7	$\text{H}_2\text{C}-\text{C}=\text{}$	24.8
CH_2O	65.0	$\text{(CH}_2\text{)}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$	24.8
$\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$	34.1	$\text{(CH}_2\text{)}-\text{CH}_3$	22.6
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	31.9	CH_3	14.1

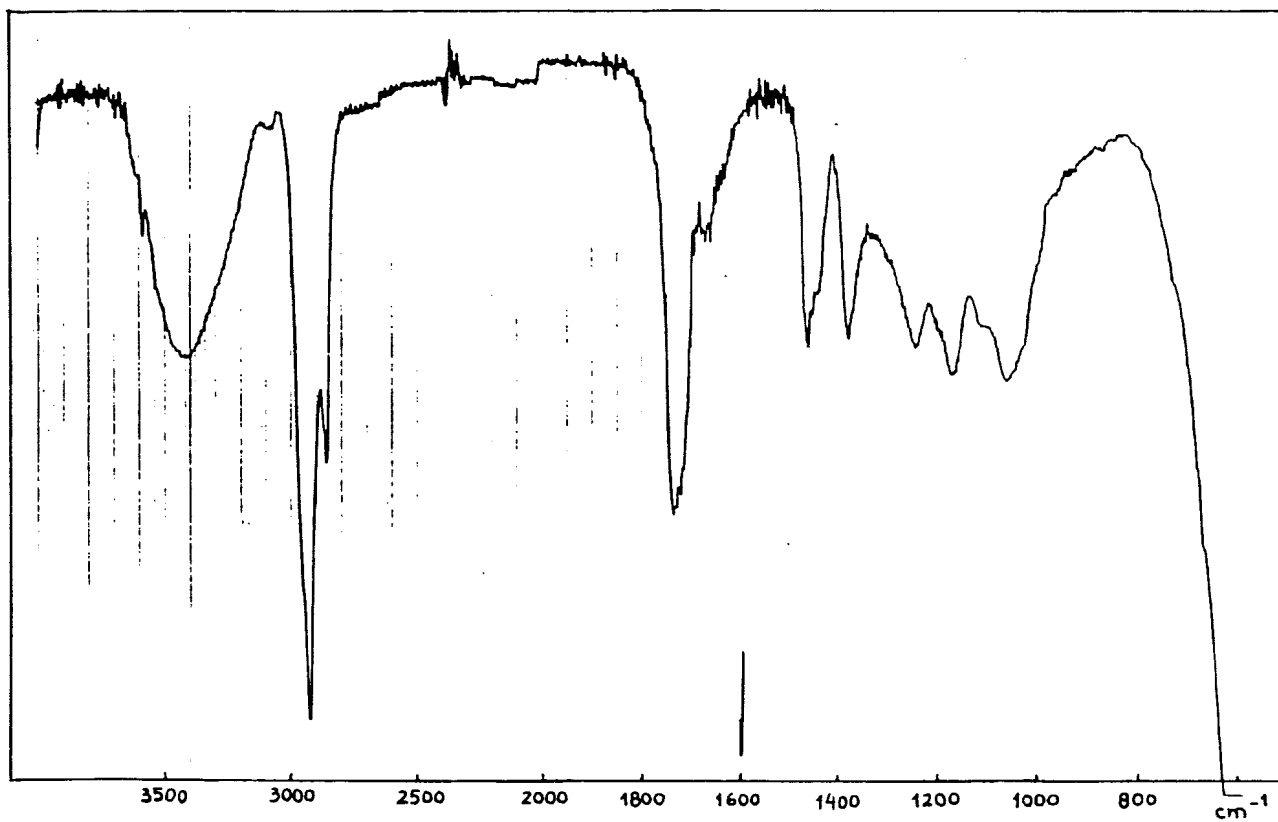
IV. D. 6. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTANCIA XI (do extr. MeOH)

O espectro no I.V. (ESPECTRO 20) apresentou absorções em 3430 cm^{-1} ($\nu_{\text{O-H}}$ álcool), em 1740 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$ éster) e em 700 cm^{-1} ($\delta_{\text{C-H}}$ cis). O espectro de RMN ^1H (ESPECTRO 21) apresentou um sinal a 0.69 ppm (s, 1H) e outro sinal a 0.86 ppm (t, 3H, $J=6\text{ Hz}$) correspondentes a metilas, sendo que o primeiro a uma metila ligada a C quaternário e a segunda, a uma metila terminal de uma cadeia alcânica, que é comprovada pelo singlete a 1.24 ppm [$(\text{CH}_2)_n$]. Os sinais a 2.33 ppm (dt, 2H, $J=0,014\text{ Hz}$) referentes a Hs α à carbonila e a 4.13 ppm correspondente a prótons carbinólicos estão de acordo com a função éster da molécula, como observado no espectro no I.V.. Os sinais em 5.34 ppm e 5.68 ppm permitem sugerir a presença de ligações duplas na molécula. Os vários sinais próximos a 2.0 ppm correspondem aos prótons alílicos da substância.

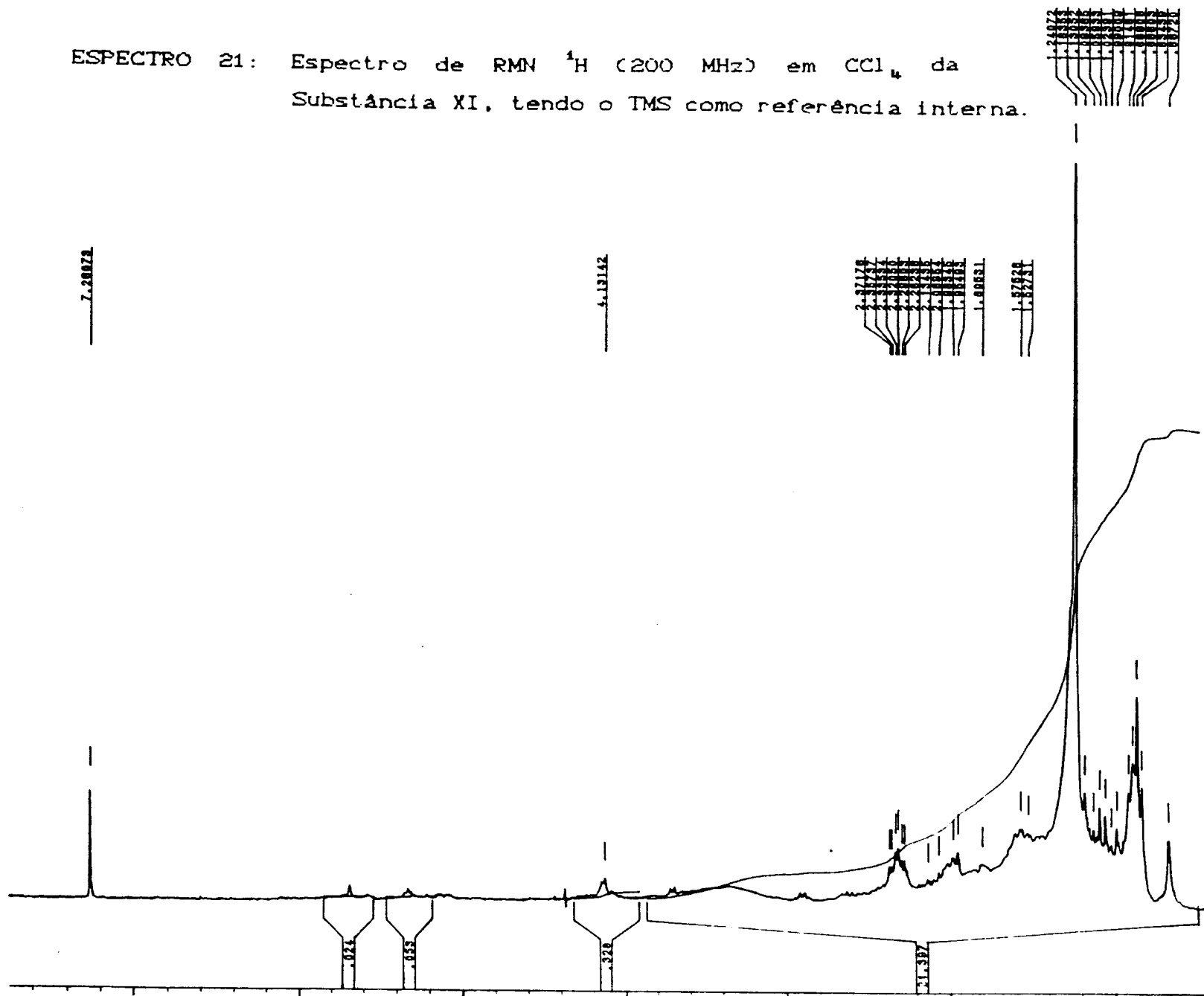
A banda em 3.430 cm^{-1} , descrita acima para o espectro no I.V., sugere a existência de uma função álcool na molécula ou na mistura.

ESPECTRO 20: Espectro no I.V. (filme) da Substância XI.

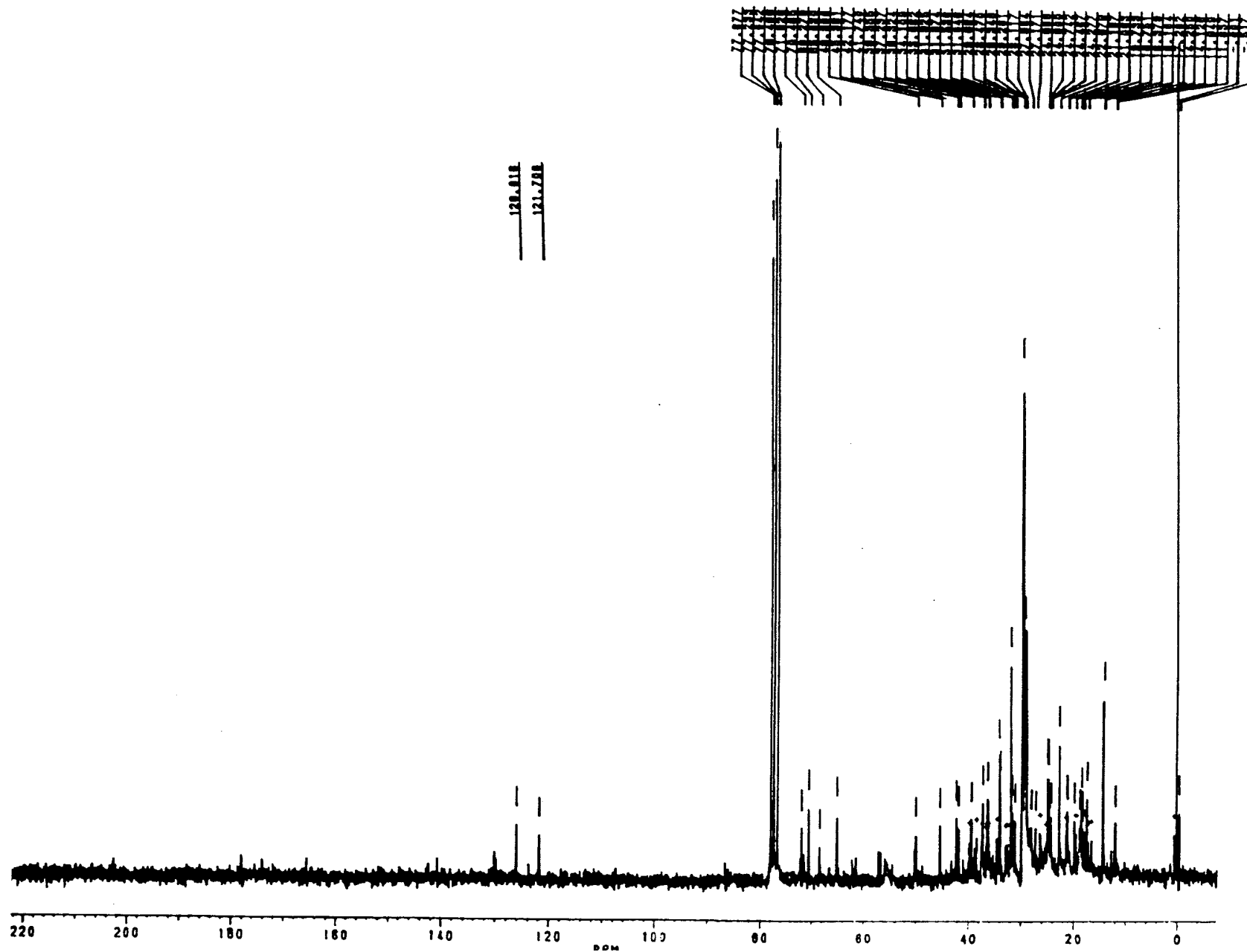
201



ESPECTRO 21: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) em CCl_4 da
Substância XI, tendo o TMS como referência interna.



ESPECTRO 22: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz) em CDCl_3 da Substância XI.



Devido ao grande número de sinais observados na análise do espectro de RMN ^{13}C (ESPECTRO 22), é provável que a Substância XI não se trate de uma substância pura, mas de uma mistura de ésteres e substâncias esteroídicas. Apesar das substâncias envolvidas serem de natureza diferente, os métodos utilizados não permitiram sugerir as estruturas prováveis.

IV. D. 7. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTANCIA XII (do extr. MeOH).

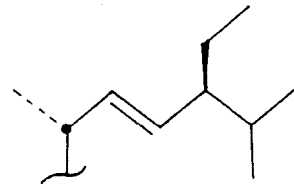
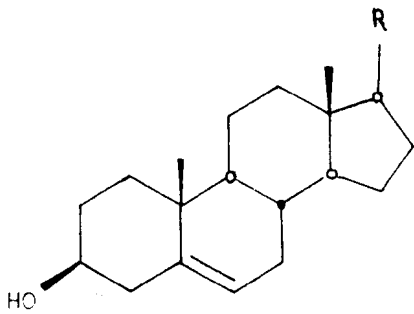
Após minuciosa avaliação dos espectros foi observado que o Composto XII não se trata de uma única substância, mas sim de uma mistura. Neste caso específico o espectro de RMN ^1H (ESPECTRO 23) não é muito informativo pois apresenta muitos picos semelhantes ao esteroi descrito anteriormente; já a E.M. (ESPECTRO 24) fornece dados relevantes ao compararmos com valores encontrados na literatura, As tabelas que se seguem indicam as principais fragmentações observadas:

Fragmentação	24-metileno colesterol	Desmosterol	β -sitosterol	Colesterol
M^+	398 (14%)	384 (20%)	414 (11%)	398 (19.5%)
$\text{M}^+ - \text{CH}_9$	383 (mp)	369 (mp)	397 (10.5%)	371 (7.5%)
$\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$	380 (mp)	366 (mp)	396 (mp)	368 (10.8%)
$\text{M}^+ - \text{C}_9\text{H}_7 + \text{H}_2\text{O}$	314 (100%)	-	351 (mp)	-
$\text{M}^+ - \text{c. lateral}$	273 (22.9%)	273 (idem)	273 (idem)	273 (idem)
$\text{M}^+ - \text{c. lat.} + 2\text{H}^+$	271 (87.5%)	271 (idem)	271 (idem)	271 (idem)

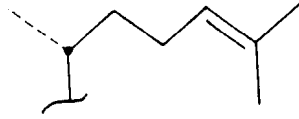
Fragmentação	Stigmasterol	Saringosterol	24-cetocolesterol	Campesterol
M ⁺	412 (27%)	428 (8%)	400 (28%)	400 (28%)
M ⁺ - CH ₃	397 (10.4%)	-	-	383 (7%)
M ⁺ - H ₂ O	394 (mp)	410 (14%)	362 (8.7%)	382 (8.7%)
M ⁺ - CH ₃ + H ₂ O	379 (mp)	-	-	367 (9.1%)
M ⁺ - C ₉ H ₇	-	365 (13.3%)	-	-
M ⁺ - C ₆ H ₁₀ O	-	-	314 (100%)	-
M ⁺ - C ₆ H ₁₀ O + H ₂ O	-	312 (15%)	-	-
M ⁺ - c.lat. + 2H ⁺	271 (87.5%)	271 (idem)	271 (idem)	271 (idem)
M ⁺ - " + H ₂ O	-	255 (33.5%)	255 (33.5%)	-

Fragmentação	Brassicasterol	22-deidrocolesterol	Cystosterol
M ⁺	398 (14%)	384 (20%)	384 (20%)
M ⁺ - CH ₃	383 (7.1%)	369 (8.7%)	369 (8.7%)
M ⁺ - H ₂ O	380 (mp)	366 (mp)	366 (mp)
M ⁺ - CH ₃ + H ₂ O	365 (mp)	351 (mp)	351 (mp)

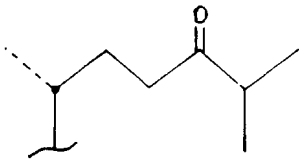
c.lat. - cadeia lateral



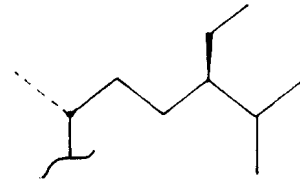
Stigmasterol



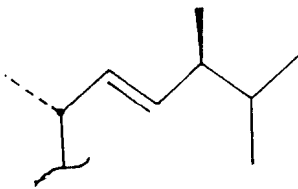
Desmosterol



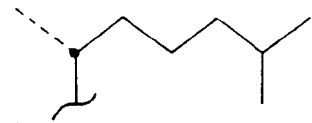
24-cetocolesterol



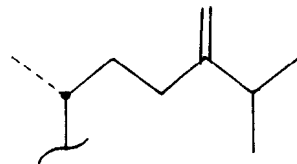
β -sitosterol



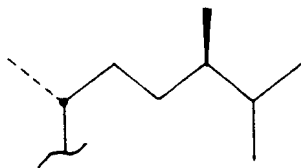
Brassicasterol



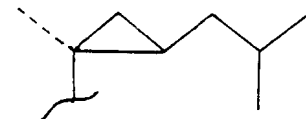
Cholesterol



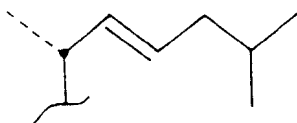
24-metileno
colesterol



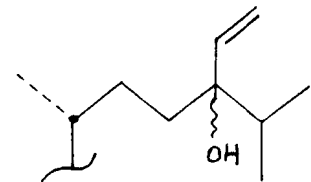
Campesterol



Cystosterol



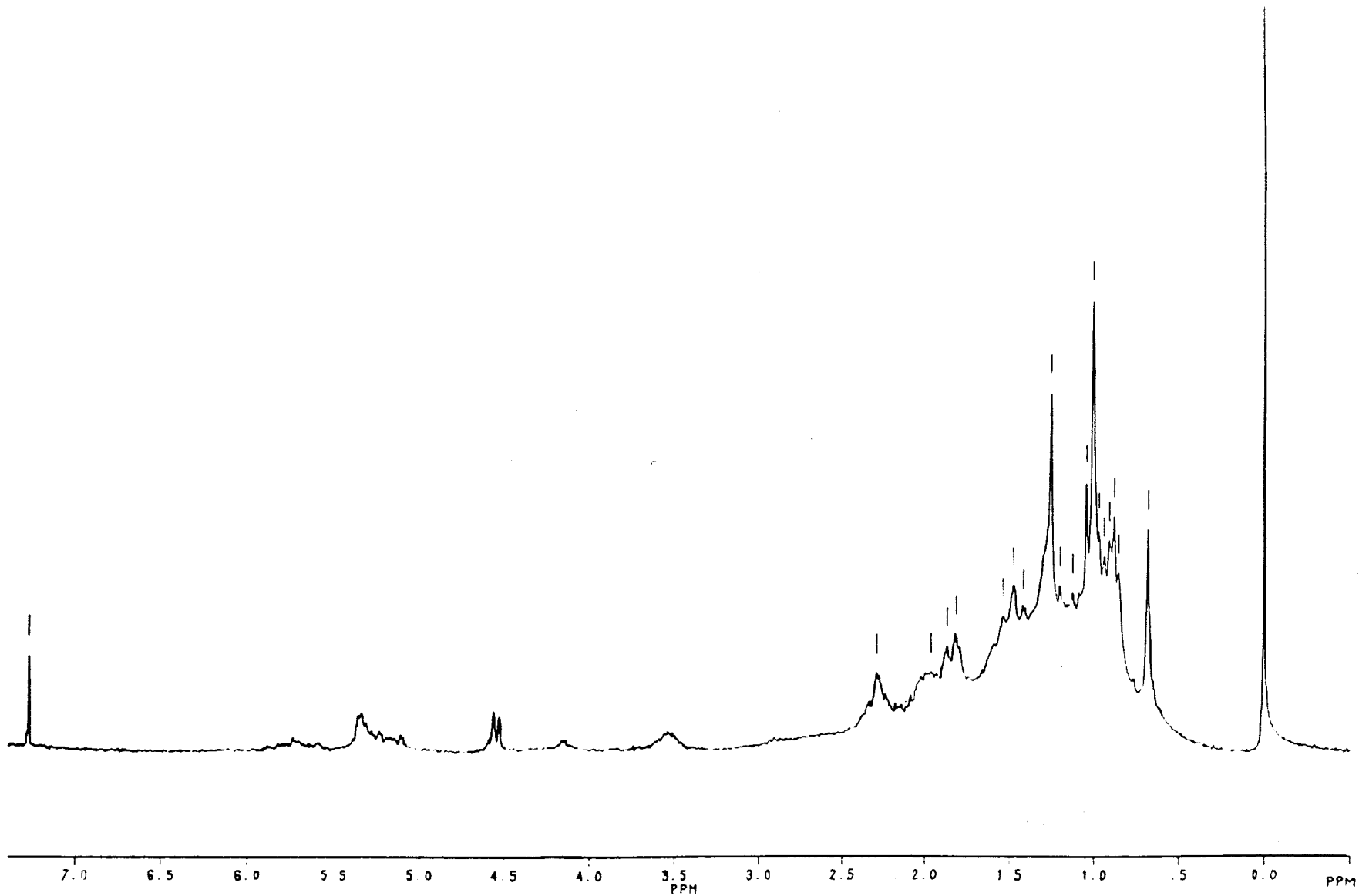
22-deidrocolesterol



Saringosterol

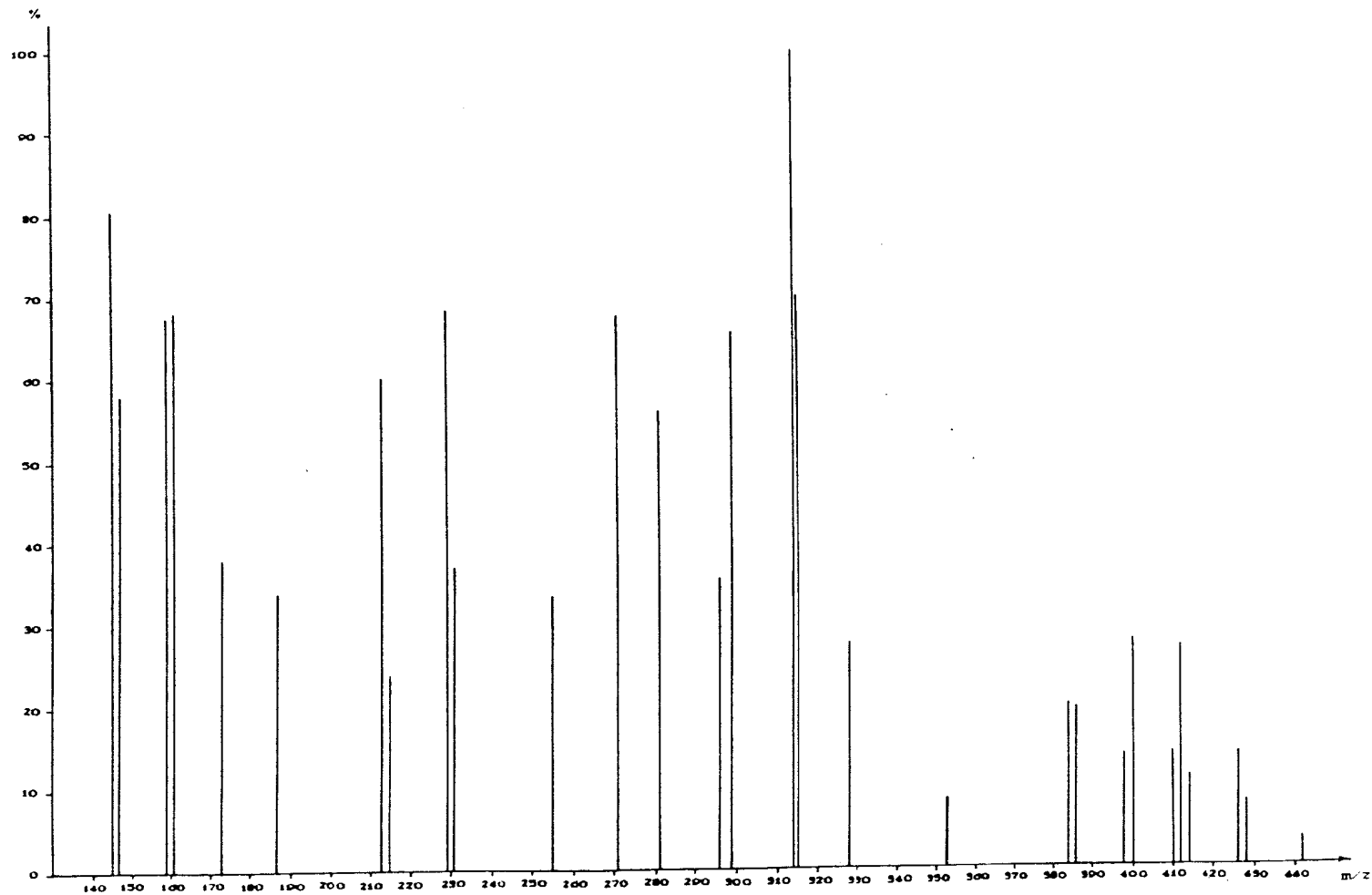
ESPECTRO 23: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) da Substância XII,
tendo o TMS como referência interna.

208



ESPECTRO 24: Espectro de Massas contendo os principais íons observados para a Substância XIII.

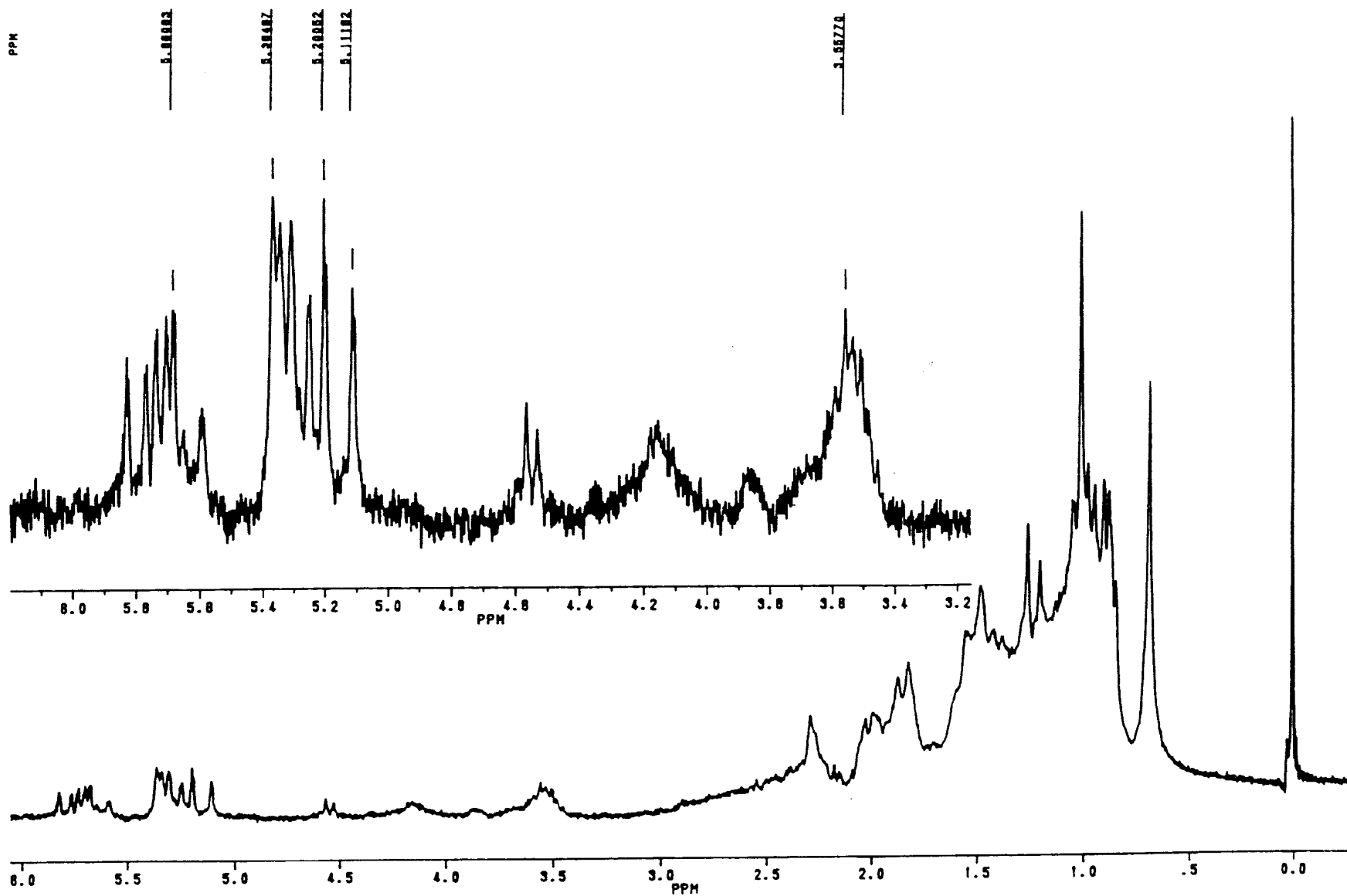
209



IV. D. 8. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTANCIA XIII (do extrato Metanólico).

Como observado no caso anterior, este composto trata-se também de outra mistura, sendo que neste caso específico não há dados referentes a espectros de massa. Os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C , ESPECTROS 25 e 26 respectivamente, indicam que trata-se de uma mistura muito complexa de esteróis muito insaturados.

ESPECTRO 25: Espectro de RMN ^1H (200 MHz) da Substância XIII tendo o TMS como referência interna.



ESPECTRO 26: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz) da Substância XIII,
contendo DEPT $\theta 90^\circ$ e 135° .

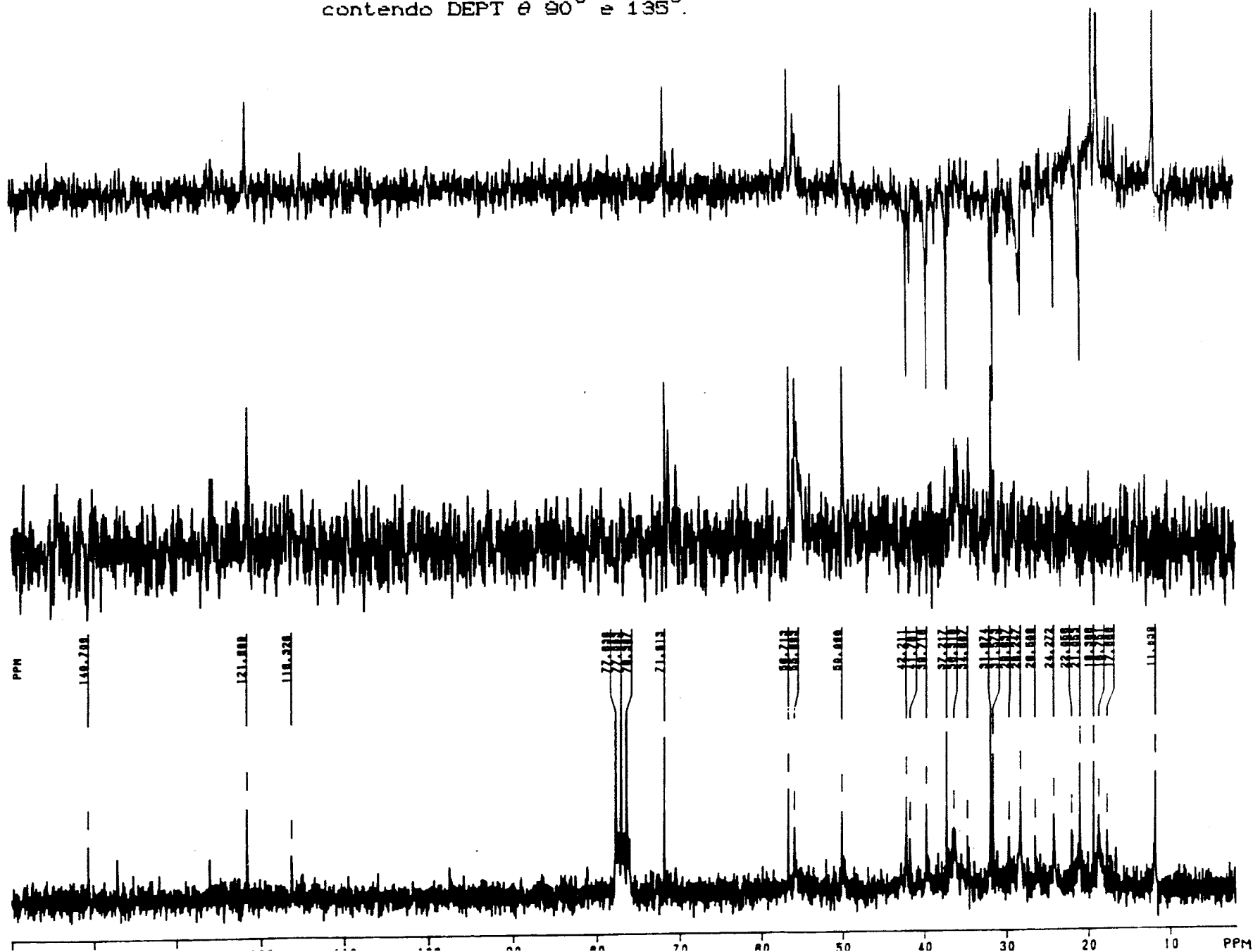
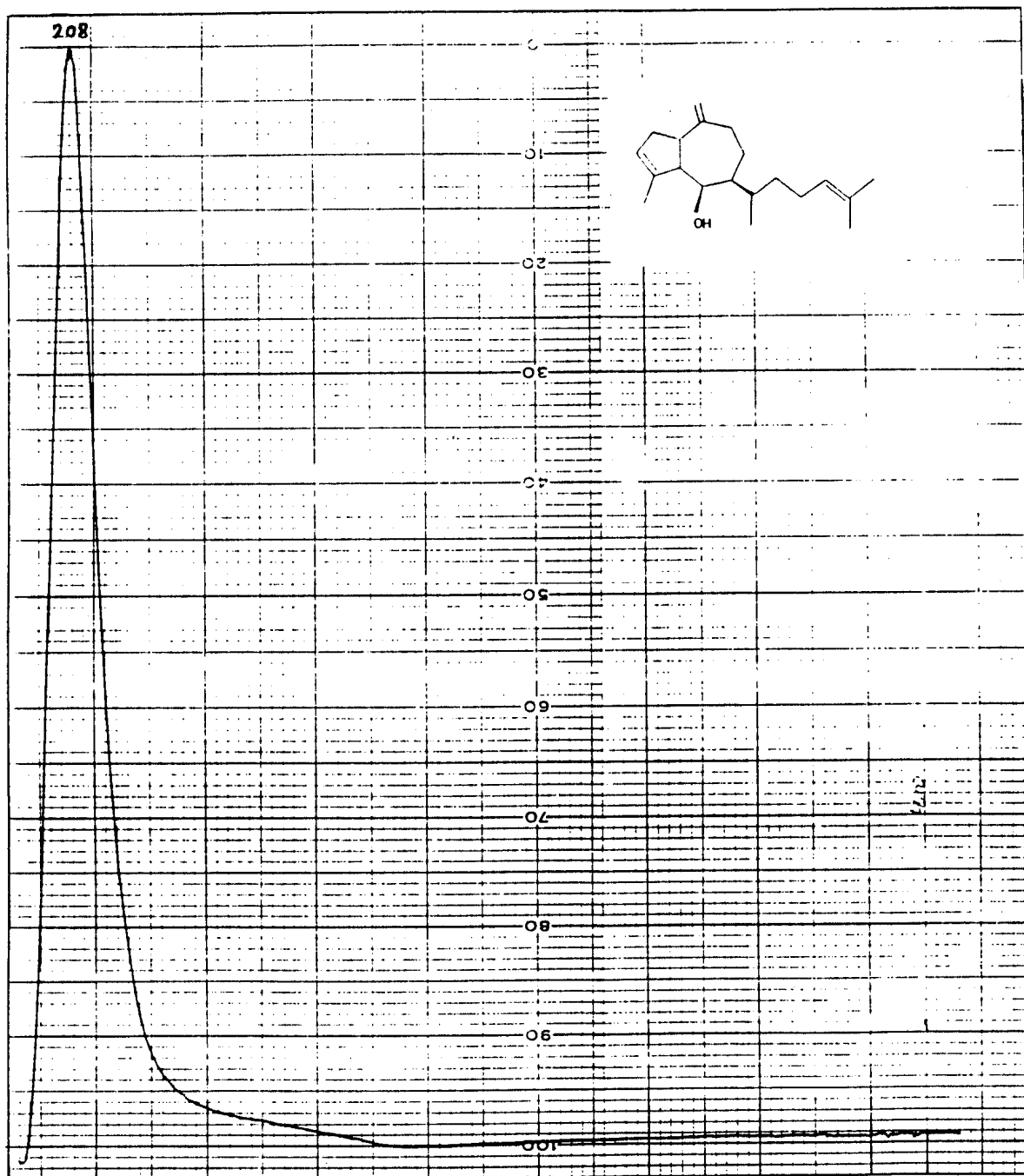


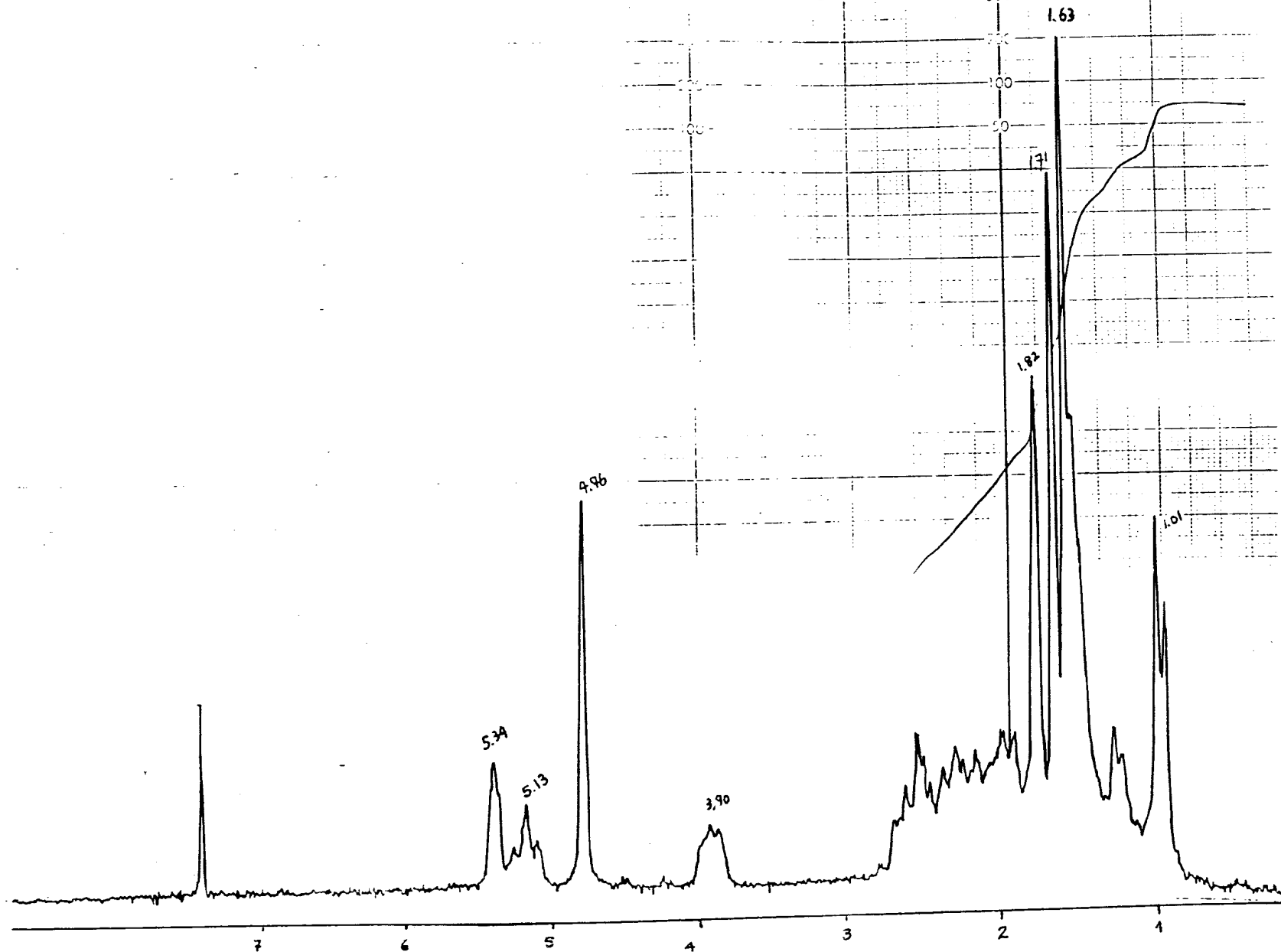
TABELA XIX: Comparação dos dados do espectro de RMN ^{13}C (ESPECTRO 29) com informações da literatura (65,72).

C	Literatura (δ)	Experimental (δ)
1	46.1	46.2
2	33.9	34.0
3	123.9	124.1
4	141.5	141.5
5	60.4	60.6
6	75.1	75.3
7	47.7	47.8
8	23.5	23.6
9	40.6	40.6
10	152.5	152.6
11	35.0	34.9
12	34.8	35.2
13	25.7	25.7
14	124.7	124.8
15	131.4	131.6
16	25.7	25.7
17	15.9	15.9
18	107.1	107.2
19	17.5	17.6
20	17.7	17.7

ESPECTRO 27: Espectro no U.V. (em metanol) da Substância XIV.

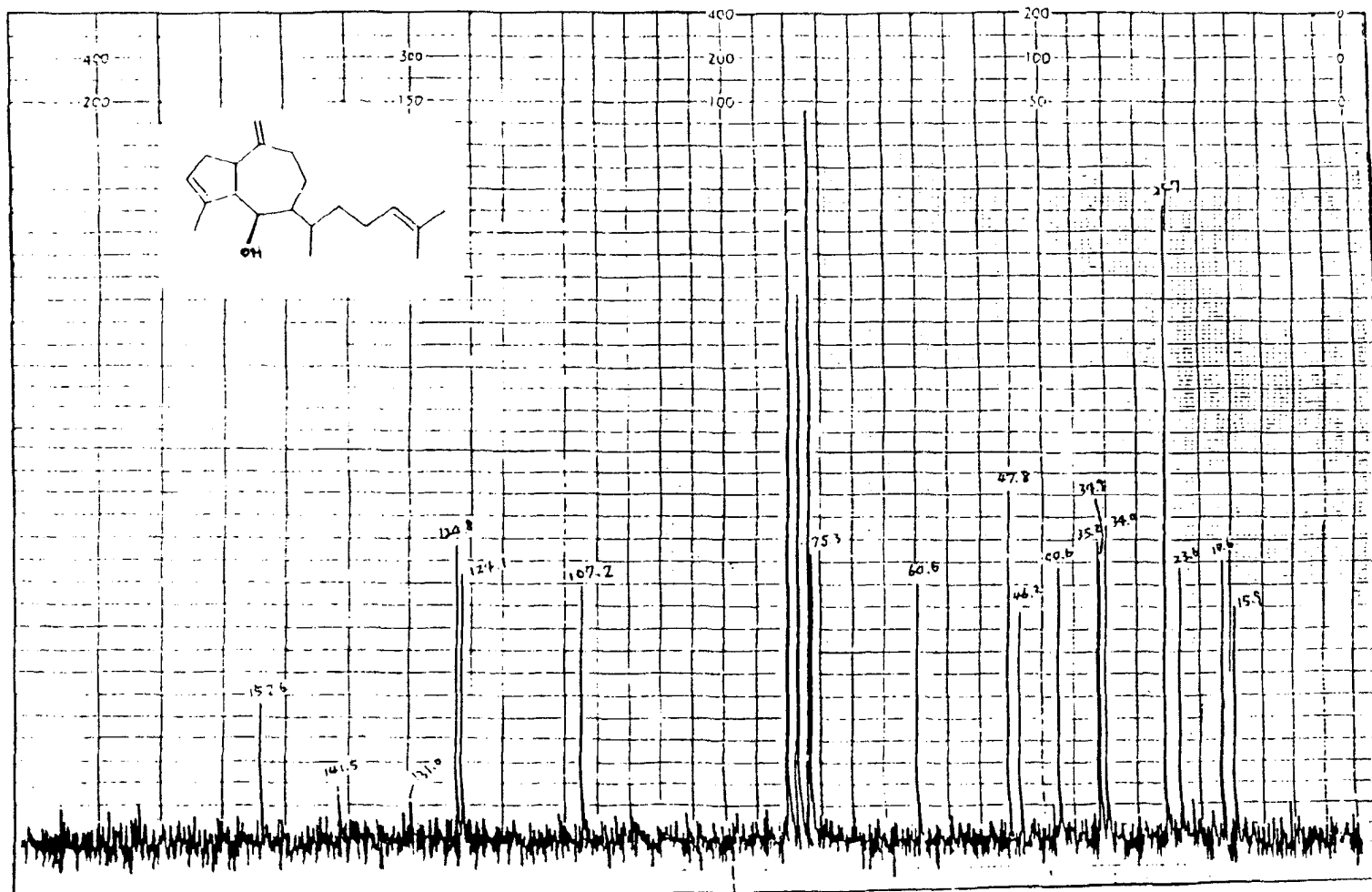


ESPECTRO 28: Espectro de RMN ^1H (100 MHz) da Substância XIV, em CDCl_3
tendo o TMS como referência interna.

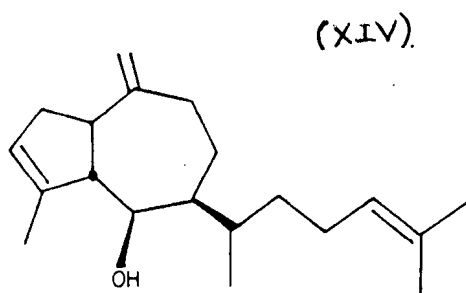


ESPECTRO 29: Espectro de RMN ^{13}C (25 MHz) em CDCl_3 da Substância XIV.

-Obs: o espectro foi fornecido sem escala.



Todas as informações obtidas, bem como o estudo comparativo com dados da literatura permitem propor para a Substância XIV a estrutura de um diterpeno do tipo guaiano prenilado, observado na família Dictyotaceae (7,79,162,190,313)
- Pachydictyol A.



IV.E. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como foi visto anteriormente, os fracionamentos dos extratos de *D.mertensii* forneceram, principalmente, dois diterpenos,* purificados por sucessivas cromatografias em colunas e placas preparativas em sílica gel. No levantamento da literatura foram observadas aproximadamente 181 ocorrências de diterpenos no gênero *Dictyota*. Pachydictyol A (95) foi registrado 13 vezes, enquanto Dictyol H (120) uma única vez. Com base nestes valores avaliamos, primeiramente as percentagens de ocorrência de 95 e 120 no gênero em questão, como se segue:

$$\text{percentagem} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de ocorrências da estrutura no gênero}}{\text{n}^{\circ} \text{ de ocorrências de todas as estruturas no gênero}} \times 100$$

$$\text{ou seja, } X \text{ de } 95 = \frac{13 \times 100}{181} \quad \text{e} \quad X \text{ de } 120 = \frac{1 \times 100}{181}$$

Os cálculos acima propostos fornecem os seguintes valores:

* Dictyol H e Pachydictyol A.

95 = 7.18 % ou 0.0718

120 = 0.55 % ou 0.0055

Ao multiplicarmos ambos os valores (de 95 e 120) encontraremos o número capaz de indicar a probabilidade de co-ocorrência dessas estruturas em duas espécies diferentes do gênero *Dictyota*. O valor calculado é de, aproximadamente 0.0004.

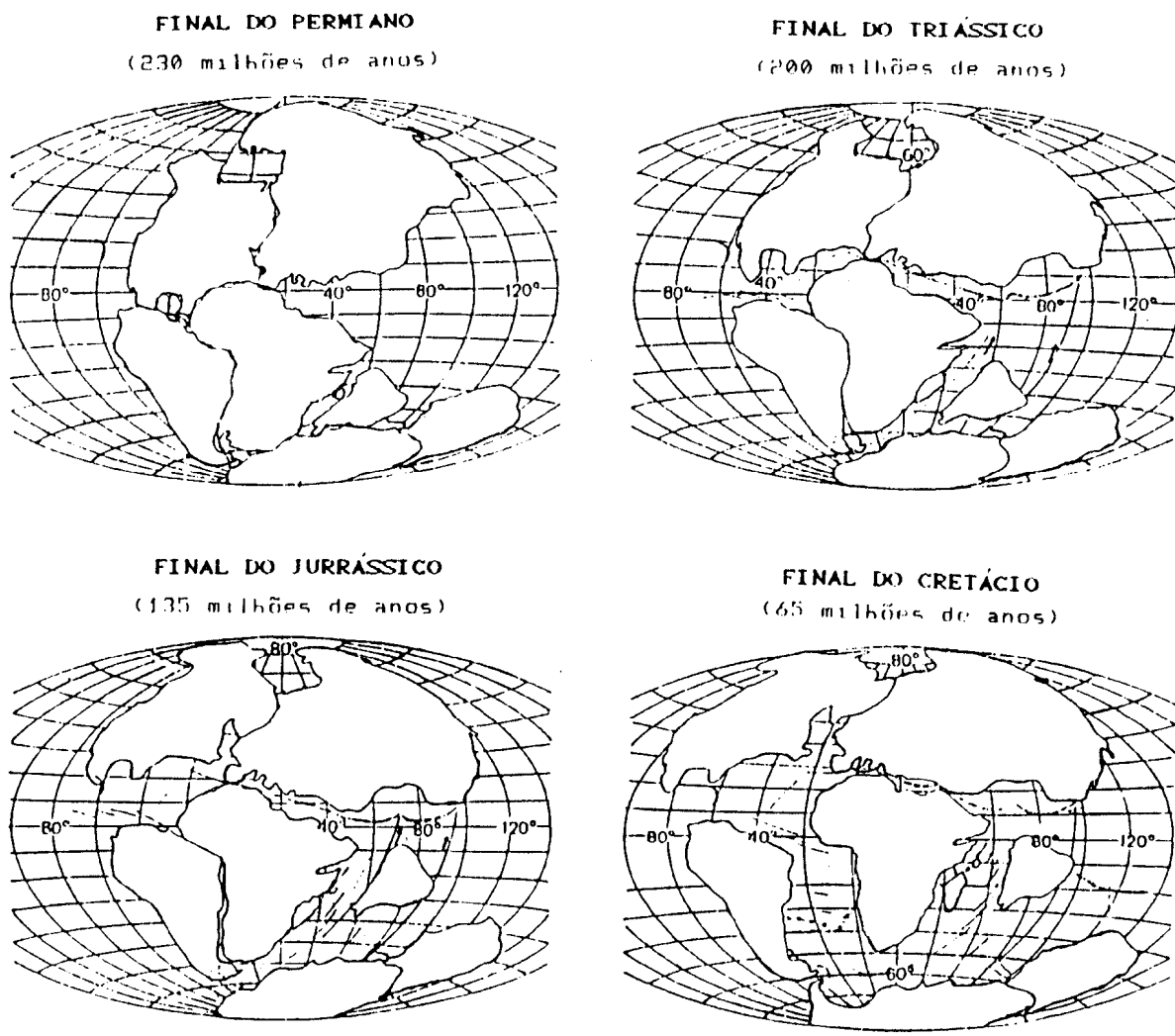
IV.F. CONCLUSÕES

Os cálculos acima descritos indicam que a probabilidade de uma co-ocorrência das estruturas 95 e 120 em espécies diferentes do gênero *Dictyota* é de 4 chances em 10000. Este resultado, associado a outras informações, reforça a existência de uma sinonímia entre as duas algas, *Dictyota mertensii* e *Dictyota dentata*, sendo que, neste caso, o nome legítimo é *Dictyota mertensii*, por constituir a combinação mais antiga (248,256). Sendo assim, nossos dados sugerem que *D. mertensii* tenha

se originado no oceano Atlântico primitivo, durante a quebra da Pangea, numa região compreendida entre o Golfo da Guiné e o litoral nordeste do Brasil, migrando posteriormente para o Caribe e Golfo do México (FIGURA 32).

Estudos fitoquímicos com espécimes de *D. mertensii* coletadas no litoral africano poderiam reforçar os resultados obtidos no presente trabalho.

FIGURA 32: Fracionamento progressivo da Pangea ou massa continental primitiva, onde são indicadas as épocas a que se referem as diferentes reconstruções hipotéticas e sua antigüidade em relação aos tempos atuais (segundo MARGALEF, 1978).



V. MATERIAL E MÉTODOS

Os espectros de absorção na região do ultravioleta (UV) foram registrados em aparelho Philips PU 8700, acoplado a um registrador, utilizando-se Metanol UVASOL como solvente.

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em aparelho Perkin Elmer, modelo 1420, feixe duplo e equipado com retícula. As técnicas utilizadas foram a incorporação da amostra em KBr anidro e compressão até obter pastilhas transparentes e sob a forma de filme com CCl_4 , em célula de NaCl anidro (1mm). Os comprimentos de onda (λ) das absorções obtidas estão expressos em centímetros recíprocos (cm^{-1}), e os espectros calibrados com filme de Poliestireno, utilizando-se como referência a banda de absorção em 1601 cm^{-1} .

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) foram registrados em aparelhos Brücker WM 200 (200MHz) e WM 250 (250MHz), com as amostras sendo dissolvidas em solventes indicados (em geral CDCl_3), e tendo como padrão interno o Tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos encontram-se expressos em unidades δ (ppm). As seguintes convenções foram adotadas: s (sinal simples ou singlete); d (sinal duplo ou dubleto); t (sinal triplo ou tripleto); q (sinal quádruplo ou quarteto); m (sinal múltiplo ou multiplete); l (sinal largo).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C) foram obtidos em aparelho Brücker WM 200 e WM 250, utilizando-se as técnicas de DEPT 90° e DEPT 135° . As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 e os deslocamentos químicos expressos em unidades δ (ppm), tendo também o TMS como referência interna.

Os espectros de massa (EM) foram determinados em aparelho VG Micromass 7070 F, sendo os fragmentos descritos como m/z, cujas intensidades são expressas em percentuais do pico base (100%).

Para as separações por cromatografia de adsorção em coluna foram usadas: gel de sílica G-60 (Merck) de 0.063-0.200 mm de diâmetro de partícula e alumina neutra

Aluminiumoxid 90 da Merck (0.063-0.200 mm). Nas cromatografias em camada delgada foram empregadas placas montadas em folha de alumínio Kieselgel 80 F₂₅₄ (Merck) e Aluminiumoxid F₂₅₄ (Merck). Em todos os processos cromatográficos, as misturas de solventes foram feitas volume a volume (V/V).

Para os cromatogramas em placa preparativa de gel de sílica foram usadas placas Kieselgel 80 (Merck) N° 5745 com 2mm de espessura e 20 x 20 centímetros de largura.

A revelação dos cromatogramas foi feita através da inspeção à luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, e mediante borrifamento com solução de sulfato cérico a 2% em ácido sulfúrico [$Ce(SO_4)_2$], seguida de aquecimento por 3 minutos à temperatura aproximada de 150 °C. Alguns cromatogramas foram revelados com vapores de Iodo.

A concentração dos extratos brutos, das frações e subfrações eluídas das colunas cromatográficas foi feita em evaporador rotatório Brüchi, em banho de água, sob pressão reduzida (5mmHg), a temperaturas inferiores a 70 °C.