



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**ISOLAMENTO DE METABÓLITOS HALOGENADOS DE  
*Laurencia catarinensis* e *Laurencia dendroidea* DE SANTA  
CATARINA, BRASIL**

Tauana Wanke

Florianópolis  
2014



Tauana Wanke

**ISOLAMENTO DE METABÓLITOS HALOGENADOS DE  
*Laurencia catarinensis e Laurencia dendroidea* DE SANTA  
CATARINA, BRASIL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia, área de concentração em Fármacos-Medicamentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Miriam de Barcellos Falkenberg.

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Cintia Lhullier.

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Wanke, Tauana

Isolamento de metabólitos halogenados de *Laurencia catarinensis* e *Laurencia dendroidea* de Santa Catarina, Brasil / Tauana Wanke ; orientadora, Miriam de Barcellos Falkenberg ; coorientadora, Cintia Lhullier. - Florianópolis, SC, 2014.  
155 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. *Laurencia catarinensis*. 3. *Laurencia dendroidea*. 4. Metabólitos halogenados. I. Falkenberg, Miriam de Barcellos. II. Lhullier, Cintia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.





Aos meus pais: Werner e Doroti;  
À minha oma Frida.





## AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus, por me dar saúde e força durante essa jornada.

A minha orientadora, Professora Dr<sup>a</sup>. Miriam de Barcellos Falkenberg, por ter aceitado me orientar. Agradeço a confiança que depositou em mim durante todo este período.

A minha co-orientadora, Dra. Cintia Lhullier, por ter aceitado me co-orientar neste trabalho e pelo apoio em tudo que precisei.

Aos Prof. Dr. Vassilios Roussis e Dr<sup>a</sup>. Efstathia Ioannou, da Universidade de Atenas, por todo o conhecimento na área de produtos naturais marinhos, disposição e atenção em receber em seu laboratório. Ao grupo de trabalho da Universidade de Atenas, pela atenção, amizade e carinho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina. Especialmente àqueles em que fui aluna nas disciplinas cursadas.

Aos meus colegas e amigos do grupo GEPRONAS, pela amizade e dedicação durante o período do mestrado.

Aos amigos que fiz na Grécia (Edna, Cristina, Catarina, Samar, Alina, Alban, Nicolai, Anneck), pela companhia durante este período.

A minha amiga Carla, por estar presente em minha vida há vários anos, pela amizade e apoio em todas as minhas escolhas.

À minha família, por tudo que representam em minha vida, por me apoiarem e estarem sempre desprendendo esforços para estarem presentes em todos os momentos. Amo vocês!

MUITO OBRIGADA!!!!!!



“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Essa é a fonte de toda a arte e ciência”.

(Albert Einstein)



## RESUMO

Algas vermelhas do complexo *Laurencia* são encontradas em todo o mundo e produzem uma enorme diversidade de metabólitos secundários, incluindo sesquiterpenos (halogenados ou não), diterpenos, triterpenos, e acetogeninas. Muitos desses metabólitos são biologicamente ativos, apresentando atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, citotóxica, entre outras. A espécie *Laurencia catarinensis* (*Lc*) foi encontrada originalmente na costa de Santa Catarina e as primeiras investigações fitoquímicas levaram ao isolamento de sesquiterpenos halogenados. *Laurencia dendroidea* (*Ld*) é encontrada na costa brasileira e estudos fitoquímicos demonstraram como componente majoritário o sesquiterpeno elatol. Considerando os resultados obtidos nas investigações químicas destas espécies de *Laurencia* envolvendo pesquisadores do grupo de pesquisas da UFSC, o presente trabalho teve como objetivo dar continuidade à investigação química dos extratos destas duas espécies. As amostras foram coletadas Ilha do Xavier (*Lc*) e na praia da Sepultura (*Ld*); foram secas sob ar frio e submetidas à maceração com diclorometano/metanol na proporção 2:1. Os extratos obtidos foram fracionados por sucessivos procedimentos cromatográficos sobre gel de sílica e a purificação final de vários metabólitos foi obtida por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de sílica. Dos compostos isolados foram obtidos espectros de RMN de hidrogênio, carbono e, em alguns casos, também espectros bidimensionais (Brucker AC200 e Brucker DRX400). De *Laurencia catarinensis* foram isolados nove compostos: sete compostos pertencem à classe dos sesquiterpenos halogenados e dois são acetogeninas. Quatro compostos isolados (pacifenol, johnstonol, prepacifenol epóxido e isomaneoneno B) estão sendo reportados pela primeira vez para a espécie; os espectros obtidos para dois outros compostos (um sesquiterpeno e uma acetogenina) sugerem tratar-se de compostos inéditos, mas sua elucidação estrutural ainda está sendo finalizada. Os metabólitos majoritários isolados neste trabalho são diferentes dos majoritários reportados anteriormente de *Lc* coletada na Ilha do Arvoredo, inclusive apresentam esqueletos diferenciados. Os compostos isolados serão avaliados quanto à atividade biológica por colaboradores da UFSC e de outros centros. De *Laurencia dendroidea* foram reisolados dois sesquiterpenos: elatol e isoobtusol, que serão submetidos a reações de derivatização, através de colaboração com outros grupos,

visando a melhoria da citotoxicidade e das propriedades físico-químicas. Observações nos locais de coleta sugerem que fatores ambientais estariam contribuindo para a diferenciação morfológica de ambas as espécies, e que esta adaptação, pelo menos no caso de *Lc* é acompanhada pela diferença de composição química. Os resultados obtidos confirmam a capacidade da espécie *Laurencia catarinensis* de produzir uma grande variedade de metabólitos halogenados com potencial atividade biológica. Dado o elevado grau de endemismo e o grande interesse científico por seus metabólitos secundários, considera-se altamente promissora a continuidade do estudo com esta espécie, incrementando experimentos de cultivo e monitoramento sazonal, bem como outros estudos que contribuam para sua preservação nos seus habitats naturais.

**Palavras chaves:** *Laurencia catarinensis*, *Laurencia dendroidea*, sesquiterpenos halogenados, acetogeninas.

## ABSTRACT

Isolation of halogenated metabolites from *Laurencia catarinensis* and *Laurencia dendroidea* from Santa Catarina, Brazil

Red algae belonging to the *Laurencia* complex are known to produce an amazing diversity of secondary metabolites, including sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes, and acetogenins. Many of these molecules are biologically active, exhibiting antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, and cytotoxic activity. *Laurencia catarinensis* (*Lc*) was first described for the coast of Santa Catarina state and has afforded several halogenated sesquiterpenes. *Laurencia dendroidea* (*Ld*) is found on the Brazilian coast and phytochemical studies showed that its major compound is the sesquiterpene elatol. Considering the results from the chemical investigations of these *Laurencia* species, the aim of this study was to continue the chemical investigation of extracts from *L. catarinensis* and *L. dendroidea*. The samples were collected at Xavier Island (*Lc*) and Sepultura Beach (*Ld*); algae were dried under cold air and the crude extract was obtained by soaking with dichloromethane/methanol 2:1. The extract was fractionated by successive chromatographic separations with silica gel and the final purification of most compounds was performed by HPLC using a normal phase column. The structure elucidation of the compounds was possible through  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and in some cases also bidimensional spectra (Bruker AC200 and Bruker DRX400). The chemical investigation of *L. catarinensis* led to the isolation of nine compounds: seven halogenated sesquiterpenes and two acetogenins. One compound from each group seems to be new, but their structures are still to be established. Four compounds (pacifenol, johnstonol, prepacifenol epoxide and isomaneonene B) are reported for the first time for this species. The major compounds from *L. catarinensis* of Xavier Island are different from the major compounds obtained from the same species collected in Arvoredo Island. The isolated compounds will be evaluated for biological activity by partners groups of UFSC and other universities. The chemical investigation of *L. dendroidea* led to re-isolation of elatol and isoobtusol; these sesquiterpenes will be submitted to derivatization aiming to improve cytotoxicity and physicochemical properties. Observations in the collection places suggest that environmental factors are contributing to the morphological

differentiation of both species; for *Lc* this adaptation process seems to include differentiation in chemical composition. The results confirm that *L. catarinensis* produces a wide variety of halogenated metabolites with potential biological activity. Due to the high degree of endemism and scientific interest for the secondary metabolites, it is considered highly promising to go deeper in the studies with this species, increasing cultivation experiments, seasonal monitoring as well other studies that might contribute to preserve the species in its natural habitat

**Key words:** *Laurencia catarinensis*, *Laurencia dendroidea*, sesquiterpenes, acetogenins.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos das diferentes classes de metabólitos secundários produzidos pelas espécies do gênero <i>Laurencia</i> .....	36
Figura 2: Classificação taxonômica de <i>Laurencia catarinensis</i> e <i>Laurencia dendroidea</i> .....	37
Figura 3: A) <i>Laurencia catarinensis</i> coletada na Ilha do Xavier em Florianópolis. B) <i>Laurencia dendroidea</i> , mostrando o ápice róseo.....	37
Figura 4: Estrutura de sesquiterpenos halogenados relacionados ao caespitol, <i>Laurencia catarinensis</i> .....	38
Figura 5: <i>Laurencia dendroidea</i> coletada na praia da Sepultura, Bombinhas, Santa Catarina .....	40
Figura 6: Organograma da obtenção e do fracionamento do extrato de <i>Laurencia catarinensis</i> .....	59
Figura 7: Organograma da obtenção e do fracionamento do extrato de <i>Laurencia dendroidea</i> . .....	60
Figura 8: A) CCD do extrato bruto de <i>L. catarinensis</i> ; B) CCD das frações contendo os compostos que foram isolados de <i>Laurencia catarinensis</i> .....	63
Figura 9: Correlação $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY, representando dois sistemas ABX.....	66
Figura 10: Correlação $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY dos sinais de hidrogênios em 6,04 e 5,36 ppm. ....	66
Figura 11: Estruturas parciais propostas para LCT1 com base nos dados de RMN ( $^1\text{H}$ -RMN, COSY e HSQC). ....	67
Figura 12: Estrutura da substância LCT1 (pacifenol).....	68
Figura 13: Espectro de $^1\text{H}$ RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT1.....	71
Figura 14: Espectro de HSQC-DEPT ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT1.....	72
Figura 15: Espectro de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT1.....	73
Figura 16: Representação dos dois sistemas ABX da substância LCT2. ....	76
Figura 17: Estruturas parciais propostas para LCT2 . ....	76
Figura 18: Correlações visualizadas no espectro de HMBC para a substância LCT2.....	77
Figura 19: Estrutura da substância LCT2 (johnstonol).....	78

Figura 20: Espectro de $^1\text{H}$ RMN (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância LCT2.....	82
Figura 21: Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância LCT2.....	83
Figura 22: Espectro de HSQC-DEPT da substância LCT2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	84
Figura 23: Espectro de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT2.....	85
Figura 24: Espectro de HMBC da substância LCT2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	86
Figura 25: Estrutura do prepacifenol epóxido.....	90
Figura 26: Espectro de $^1\text{H}$ RMN (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância LCT3.....	92
Figura 27: Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância LCT3.....	93
Figura 28: Representação do sistema ABX da substância LCT4.....	95
Figura 29: Estrutura parcial proposta para LCT4 com base na análise dos dados de RMN.....	96
Figura 30: Estrutura da substância LCT4 - dehidroxiprepacifenol epóxido.....	97
Figura 31: Espectro de $^1\text{H}$ RMN (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância LCT4.....	99
Figura 32 : Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância LCT4.....	100
Figura 33: Espectro de HSQC-DEPT ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT4.....	101
Figura 34: Espectro de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT4.....	102
Figura 35: Estruturas parciais propostas para LCT5 com base na análise dos dados de RMN.....	104
Figura 36: Estrutura da substância LCT5 (deoxiprepacifenol).....	105
Figura 37: Espectro de $^1\text{H}$ RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT5.....	108
Figura 38: Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) da substância LTC5.....	109
Figura 39: Espectro de HSQC-DEPT ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT5.....	110
Figura 40: Espectro de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT5.....	111

Figura 41: Estrutura parcial sugerida pelos dados de RMN de hidrogênio da substância LCT6.....	112
Figura 42: Estrutura da substância LCT7 (elatol).....	114
Figura 43: Espectro de $^1\text{H}$ RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT7 .....	116
Figura 44: Estrutura parcial do sistema eno-ino, proposto para a substância LCT8.....	118
Figura 45: Estruturas parciais da substância LCT8. ....	119
Figura 46: Estrutura da substância LCT8 (isomaneoneno B).....	121
Figura 47: Estrutura do isomaneoneno A.....	122
Figura 48: Espectro de $^1\text{H}$ RMN ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 400 MHz) da substância LCT8. ....	123
Figura 49: Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) da substância LCT8. ....	124
Figura 50: CCD do extrato bruto de <i>L. dendroidea</i> e de frações contendo as substâncias LDT1 e LDT2.....	125
Figura 51: Estrutura da substância LDT2 (isoobtusol).....	127
Figura 52: Espectro de $^1\text{H}$ RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LDT2. ....	129



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema de eluição utilizado na cromatografia líquida a vácuo (Coluna A) para o extrato de <i>Laurencia catarinensis</i> .....	51
Tabela 2: Esquema de eluição utilizado na cromatografia líquida a vácuo (coluna LDA) para o extrato de <i>Laurencia dendroidea</i> .....	55
Tabela 3: Dados da substância LCT1, a partir dos espectros de $^1\text{H}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN, HSQC-DEPT e COSY.....	65
Tabela 4: Dados de $^1\text{H}$ RMN da substância LCT1, em comparação com a literatura para o pacifenol.....	69
Tabela 5: Dados de $^{13}\text{C}$ RMN da substância LCT1, em comparação com a literatura para o pacifenol.....	70
Tabela 6: Dados da substância LCT2, a partir dos espectros de $^1\text{H}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN, HSQC-DEPT, COSY e HMBC.....	75
Tabela 7: Dados de $^1\text{H}$ RMN da substância LCT2, em comparação com a literatura com johnstonol.....	79
Tabela 8: Dados de $^{13}\text{C}$ RMN da substância LCT2, em comparação com dados de literatura para o johnstonol.....	80
Tabela 9: Comparação dos deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ RMN da substância LCT3 com os dados descritos para prepacifenol epóxido....	88
Tabela 10: Comparação dos deslocamentos químicos de $^{13}\text{C}$ RMN da substância LCT3 com os dados descritos para prepacifenol epóxido....	89
Tabela 11: Dados da substância LCT4, a partir dos espectros de $^1\text{H}$ RMN, $^{13}\text{C}$ RMN, HSQC-DEPT e COSY.....	94
Tabela 12: Dados de $^1\text{H}$ RMN da substância LCT4, em comparação com a literatura para dehidroxiprepacifenol epóxido.....	97
Tabela 13: Dados de $^{13}\text{C}$ RMN da substância LCT4, em comparação com a literatura para dehidroxiprepacifenol epóxido.....	98
Tabela 14: Dados de $^1\text{H}$ RMN da substância LCT5, em comparação com a literatura para deoxiprepacifenol.....	106
Tabela 15: Dados de $^{13}\text{C}$ RMN da substância LCT5.....	107
Tabela 16: Dados de $^1\text{H}$ RMN da substância LCT7, em comparação com a literatura para o elatol.....	114
Tabela 17: Dados de $^1\text{H}$ RMN da substância LCT8, em comparação com a literatura para o isomaneoneno B.....	120
Tabela 18: Dados de $^{13}\text{C}$ RMN da substância LCT8, em comparação com a literatura para o isomaneoneno B.....	120
Tabela 19: Dados de $^1\text{H}$ RMN da substância LDT2, em comparação com a literatura para o isoobtusol.....	127

Tabela 20: Atividades biológicas avaliadas para as substâncias isoladas de *Laurencia catarinensis* e *Laurencia dendroidea* .....135

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS

- $^{13}\text{C}$  RMN – Ressonância magnética nuclear de carbono  $^{13}$   
 $^1\text{H}$  RMN – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio  
A431 – Linhagem celular de carcinoma epidermoide  
A549 – Linhagem celular de carcinoma de pulmão  
AcOEt – Acetato de etila  
B16F10 – Linhagem celular de melanoma cutâneo  
CCD – Cromatografia em camada delgada  
cHx – Ciclohexano  
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência  
CLMP – Cromatografia líquida de média pressão  
CLV – Cromatografia líquida a vácuo  
COSY – Espectroscopia de correlação (do inglês “*Correlation spectroscopy*”)  
d – Duplete  
dd – Duplo duplete  
ddd – Duplo duplete de duplete  
dl – Duplete largo  
dq – Duplo quarteto  
dt – Duplo triplete  
 $\delta\text{C}$  – Valor de deslocamento químico em ppm no espectro  $^{13}\text{C}$  RMN  
 $\delta\text{H}$  – Valor de deslocamento químico em ppm no espectro  $^1\text{H}$  RMN  
EB – Extrato bruto  
Hep-2 – Linhagem celular tumoral derivada do carcinoma laríngeo humano  
HMBC – Correlação heteronuclear através de múltiplas ligações (do inglês “*Heteronuclear multiple bond correlation*”)  
HPLC – High pressure liquid chromatography  
HSQC – Correlação heteronuclear de quantum-simples (do inglês “*Heteronuclear single quantum correlation*”)  
HSV – Herpes simplex virus  
HT29 – Linhagem celular de carcinoma colorretal  
Hx – Hexano  
 $\text{IC}_{50}$  – Concentração inibitória de 50%  
IV – Infravermelho  
m – Multiplete  
MCF7 – Linhagem celular de câncer de mama  
MeOH – Metanol

nHx – Hexano

NO – Sinal não observado

RD – Linhagem celular de rhabdomyosarcoma humano

RMN – Ressonância magnética nuclear

s – Simpleto

sl – Simpleto largo

t – Tripleto



## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO E BREVE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>29</b>
1.1	INTRODUÇÃO.....	29
1.2	BREVE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
<b>1.2.1</b>	<b>Produtos naturais de origem marinha.....</b>	<b>31</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Complexo <i>Laurencia</i>.....</b>	<b>33</b>
1.2.2.1	Gênero <i>Laurencia</i> Lamouroux.....	34
1.2.2.1.1	<i>Laurencia catarinensis</i> Cordeiro-Marinho & Fujii.....	36
1.2.2.1.1.1	Substâncias isoladas da alga vermelha <i>Laurencia catarinensis</i> Cordeiro-Marinho & Fujii.....	38
1.2.2.1.2	<i>Laurencia dendroidea</i> J. Agardh.....	39
1.2.1.1.2.1	Substâncias isoladas da espécie <i>Laurencia dendroidea</i> J. Agardh.....	40
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	45
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
<b>2.2.1</b>	<b><i>Laurencia catarinensis</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>2.2.2</b>	<b><i>Laurencia dendroidea</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
3.1	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	49
<b>3.1.1</b>	<b>Material vegetal .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Solventes, adsorventes e reagentes.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Equipamentos.....</b>	<b>50</b>
3.2	MÉTODOS UTILIZADOS.....	50
<b>3.2.1</b>	<b><i>Laurencia catarinensis</i>.....</b>	<b>50</b>
3.2.1.1	Obtenção do extrato.....	50
3.2.1.2	Fracionamento do extrato .....	50
3.2.1.2.1	<i>Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV) – COLUNA A</i> .....	50
3.2.1.2.2	<i>CLMP da Fração A3-4 – COLUNA B</i> .....	51
3.2.1.2.3	<i>CLMP da Fração A5 – COLUNA C</i> .....	52
3.2.1.2.4	<i>CLMP da Fração A6 – COLUNA D</i> .....	52
3.2.1.2.5	<i>CLMP da Fração B20-22 e B23-26 – COLUNA E</i> .....	52
3.2.1.3	Purificação das frações .....	52
3.2.1.3.1	<i>CLAE da fração B17-19</i> .....	52
3.2.1.3.2	<i>CLAE da fração C15-17</i> .....	53
3.2.1.3.3	<i>CLAE das frações C18 e C19-20</i> .....	53
<b>3.2.2</b>	<b><i>Laurencia dendroidea</i>.....</b>	<b>54</b>

3.2.2.1	Obtenção do extrato.....	54
3.2.2.2	Fracionamento do extrato bruto e frações ... ..	54
3.2.2.2.1	<i>Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV) – COLUNA LDA.....</i>	54
3.2.2.2.2	<i>CLMP da Fração LDA6 – COLUNA LDC.....</i>	55
3.2.2.2.3	<i>CLMP da Fração LDA5 – COLUNA LDD.....</i>	55
3.2.2.2.4	<i>CLMP da Fração LDC 80-85 – Coluna LDE.....</i>	56
3.2.2.3	Purificação das frações.....	56
3.2.2.3.1	<i>CLAE da fração LDC86-89.....</i>	56
3.2.2.3.2	<i>CLAE da fração LDE35.....</i>	56
3.2.2.3.3	<i>CLAE da fração LDE 36.....</i>	56
3.3	ANÁLISE DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	57
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSAO.....</b>	<b>63</b>
4.1	<i>Laurencia catarinensis.....</i>	63
4.1.1	<b>SUBSTÂNCIALCT1.....</b>	<b>64</b>
4.1.2	<b>SUBSTÂNCIA LCT2.....</b>	<b>74</b>
4.1.3	<b>SUBSTÂNCIA LCT3.....</b>	<b>87</b>
4.1.4	<b>SUBSTÂNCIA LCT4.....</b>	<b>94</b>
4.1.5	<b>SUBSTÂNCIA LCT5.....</b>	<b>103</b>
4.1.6	<b>SUBSTÂNCIA LCT6.....</b>	<b>112</b>
4.1.7	<b>SUBSTÂNCIA LCT7.....</b>	<b>113</b>
4.1.8	<b>SUBSTÂNCIA LCT8.....</b>	<b>117</b>
4.1.9	<b>SUBSTÂNCIA LCT9.....</b>	<b>122</b>
4.2	<i>Laurencia dendroidea.....</i>	125
4.2.1	<b>SUBSTÂNCIA LDT1.....</b>	<b>125</b>
4.2.2	<b>SUBSTÂNCIA LDT2.....</b>	<b>126</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS....</b>	<b>133</b>
5.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	133
5.2	PERSPECTIVAS.....	135
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>141</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>143</b>

## **INTRODUÇÃO E BREVE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



# 1. INTRODUÇÃO E BREVE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 INTRODUÇÃO

Os oceanos cobrem 70% da superfície da Terra, e possuem uma enorme biodiversidade entre plantas, animais, algas e microrganismos (PINTO et al., 2002). A ampla diversidade do ambiente marinho vem despertando crescente interesse nacional e mundial, pois seus organismos são ricos em metabólitos secundários potencialmente ativos (BLUNT et al., 2008).

Até a metade do século XX, as potencialidades dos produtos marinhos eram pouco conhecidas, restringindo-se o uso das algas marinhas às medicinas tradicionais e à culinária de alguns países asiáticos (SMIT, 2004; FERRARO et al., 2010), mas nas últimas décadas, a indústria farmacêutica tem feito grandes investimentos na busca de novos fármacos a partir de produtos naturais marinhos. Este interesse deve-se pela expressiva variedade de compostos já isolados, o que confere um grande potencial para substâncias promissoras ou como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos (HU et al., 2011).

Entre os grupos de organismos marinhos presentes nos oceanos e na costa litorânea, as algas apresentam grande diversidade morfológica e química. As algas foram os primeiros organismos vivos a habitar a Terra, desempenhando um papel importante na base da cadeia alimentar. As macroalgas são talófitas (organismos carentes de raiz, caule e folhas), que possuem clorofila, com hábito predominantemente aquático (LEE, 1999). As algas podem ser classificadas em vermelhas (Rhodophyta), verdes (Chlorophyta), e marrons ou pardas (Heterokontophyta), em função do tipo de material de reserva e de pigmentos presentes nas células (ALGAEBASE, 2014). A produção de metabólitos secundários está amplamente distribuída nos organismos marinhos, principalmente nas algas bentônicas. As algas vermelhas se destacam por serem capazes de sintetizar substâncias biologicamente ativas de várias classes, muitas das quais têm mostrado atividades biológicas relevantes (BLUNT et al., 2009; 2010; 2011; 2012; 2013; HU et al., 2011).

As algas vermelhas predominam no litoral de Santa Catarina (HORTA, 2000), e dentro deste grupo destaca-se o gênero *Laurencia*. As algas desse gênero são encontradas em mares temperados e tropicais do mundo (CABRITA;VALE; RAUTER, 2010). O ambiente marinho é

um sistema altamente competitivo pela sobrevivência, assim, geralmente a defesa das algas contra microrganismos e predadores diversos é oriunda de seus metabólitos secundários (FAULKNER, 2001). Entre os metabólitos secundários que predominam no gênero *Laurencia* encontram-se os sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e as C 15-acetogeninas; usualmente estes metabólitos possuem um ou mais átomos de halogênio na sua estrutura (CABRITA; VALE; RAUTER, 2010) e apresentam frequentemente atividade antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária, inseticida e citotóxica (BLUNT et al., 2012; BLUNT et al., 2013).

As espécies *Laurencia catarinensis* Cordeiro-Marinho & Fujii e *Laurencia dendroidea* J. Agardh são encontradas especialmente no litoral de Santa Catarina, conforme descrito no site [algarisbrasilis](http://algarisbrasilis.com.br) (2013).

A espécie *Laurencia catarinensis* Cordeiro-Marino & Fujii foi identificada originalmente em Florianópolis (CORDEIRO-MARINO; FUJII, 1985) que predomina no estado de Santa Catarina (ALGAEBASE, 2014). O estudo fitoquímico desta espécie vem sendo desenvolvido em nosso grupo desde 2007. Do material coletado na Ilha do Arvoredo (SC) foram isolados sobretudo metabólitos halogenados relacionados estruturalmente ao caespitol, que apresentaram efeitos citotóxicos sobre as linhagens de células MCF7, HT29 e A431 (LHULLIER, 2009; LHULLIER et al., 2010).

A espécie *Laurencia dendroidea* J. Agardh (antigamente classificada como *Laurencia obtusa*) foi assim denominada a partir do estudo morfológico publicado por Valéria Cassano (2009). Esta espécie possui organelas denominadas “corpos em cereja” que são onde estão armazenados os metabólitos halogenados da espécie (SALGADO et al., 2008) *Laurencia dendroidea* possui como metabólito majoritário o elatol, que apresenta várias atividades biológicas já descritas, entre elas atividade antileishmania (SANTOS et al., 2010) e tripanocida (DESOTI et al., 2012). Lang e colaboradores (2012) obtiveram derivados semissintéticos do elatol, e avaliaram a sua atividade citotóxica.

Este trabalho teve como objetivo a continuidade da investigação química da alga *Laurencia catarinensis* e o reisolamento dos compostos majoritários da espécie *Laurencia dendroidea* (finalidade de obtenção de novos derivados semissintéticos a partir dos compostos majoritários desta espécie).

A seguir, será apresentada uma breve revisão a respeito de produtos naturais marinhos, do complexo *Laurencia* e das espécies abordadas nesta dissertação.

## 1.2 BREVE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1 Produtos naturais de origem marinha

O ambiente marinho vem se destacando como uma importante fonte de substâncias bioativas, os quais se caracterizam por maior diversidade em comparação com os compostos obtidos de plantas terrestres (MONTASER, LUESCH, 2011). Em 2011, ocorreu um aumento de 15% de compostos isolados de organismos marinhos (algas, esponjas, cnidários, briozoários, moluscos, tunicados e equinodermos) em comparação a 2010 (BLUNT et al., 2013).

O ambiente marinho é um sistema altamente competitivo, colonizado por uma enorme variedade de organismos vivos, que competem entre si pelo substrato (espaço), luz, nutrientes e que, na ausência e outras formas de defesa, precisam utilizar defesas químicas contra organismos patogênicos e predadores. Assim, muitos organismos marinhos produzem substâncias químicas essenciais para garantir a sua sobrevivência, que podem constituir em uma oportunidade para a descoberta de novos compostos bioativos (FAULKNER, 2001; HAEFNER, 2003).

O trabalho pioneiro de Bergmann e Freeney em 1951, com o isolamento de um nucleosídeo da esponja *Cryptotethya crypta*, despertou o interesse na descoberta de substâncias provenientes de organismos marinhos. O trabalho subsequente reportou o isolamento de dois outros nucleosídeos desta mesma esponja: espongouridina e espongotimidina (BERGMANN, BURKE, 1955).

O estudo dos análogos sintéticos destes nucleosídeos levou ao desenvolvimento do Ara-A e do Ara-C, que foram os primeiros produtos naturais de origem marinha a atingir o uso terapêutico (KIJJOA, SAWANGWONG, 2004). Até o momento, existem somente cinco fármacos no mercado provenientes de organismos marinhos: vidarabina, citarabina, ziconotídeo, trabectedina e halicondrina B (PEREIRA; COSTA-LOTUFO, 2012). Citarabina (Ara-C) é utilizada no tratamento da leucemia aguda não-linfoblástica, enquanto vidarabina (Ara-A) é um agente antiviral utilizado para o tratamento de infecções oftálmicas por

Herpes simplex (PALERMO, 2003; POMPONI, 2001). Ziconotídeo (Prialt<sup>®</sup>) é um peptídeo analgésico de 25 aminoácidos, isolado do molusco *Conus magnus*. Trabectedina (Yondelis<sup>®</sup>) é um alcaloide tetra-hidroquinolínico isolado da ascídia *Ecteinascidia turbinata*, cujo mecanismo de alquilação de DNA difere da grande maioria dos outros agentes alquilantes é utilizado no tratamento de sarcoma avançado ou metastático de tecidos moles e câncer de ovário. Halicondrina B (Halaven<sup>®</sup>) foi isolada da esponja marinha *Halichondria okadai*, seu mecanismo de ação consiste na inibição da polimerização dos microtúbulos através da ligação com tubulina no sítio dos alcaloides da Vinca e é utilizada no tratamento do câncer de mama (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

Estima-se que dos mais de 150 mil produtos de origem natural conhecidos, aproximadamente 22.000 são derivados de organismos marinhos, incluindo terpenos, acetogeninas, peptídeos, entre outros; muitos estão associados a atividades biológicas promissoras (BLUNT et al., 2011).

O Brasil possui um grande potencial na pesquisa dos organismos marinhos, pois apresenta mais de 8.000 km de litoral. No país, a pesquisa de produtos naturais marinhos teve início na década de 1960, com o grupo de pesquisa de produtos naturais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (PINTO et al., 2002). Nas décadas subseqüentes, a produção científica em relação a produtos naturais marinhos tendeu a concentrar-se na região sudeste, abrangendo especialmente algas e esponjas; com destaque para os trabalhos pioneiros do Prof. Kelecom (BERLINCK et al., 2004).

Entre os grupos de organismos marinhos presente nos oceanos e costa litorânea, as algas ocorrem praticamente em todas as condições ambientais, porém são encontradas em abundância em ambientes aquáticos, onde desempenham o papel de base da cadeia alimentar, além de realizar fotossíntese (LEE,1999).

As macroalgas pertencem ao grupo polifilético que possuem clorofila *a* e um talo não diferenciado em raiz, caule ou folha, com hábitos predominantemente aquáticos. As faixas litorânea em que as algas bênticas (indivíduos fixos no substrato-superfície) podem ser encontradas são: supralitoral, mesolitoral e infralitoral (HORTA, 2000).

As algas vermelhas estão amplamente distribuídas pelo planeta. Dentro deste grupo, destaca-se o complexo *Laurencia* por sua



importância e por apresentar um número significativo de espécies (BOURGUET-KONDROCKI; KORNPROBST, 2005).

### 1.2.2. Complexo *Laurencia*

O complexo *Laurencia* pertence à família Rhodomelaceae que agrupa atualmente cinco gêneros: *Laurencia sensu stricto*, *Chondrophycus*, *Palisada*, *Osmundea* e *Yuzurua*, distribuídos amplamente pelo mundo (FUJII et al., 2011). Possui como característica taxonômica a presença da célula apical sempre imersa em uma depressão nos ápices e ramos, rodeada por tricloblastos ramificados, segmento axial reconhecível somente próximo ao ápice e corticação ao longo do talo (FALKENBERG, 1901 apud LHULLIER, 2009; KYLIN, 1923; 1956 apud LHULLIER, 2009).

Há dificuldade na identificação das espécies do complexo, devido à grande variedade fenotípica que o gênero *Laurencia* apresenta. A grande variedade morfológica encontrada, e a falta de descrições completas e uniformes resultam na dificuldade em observar caracteres que auxiliam na identificação segura dos táxons. Isso tem contribuído para a ocorrência de enganos em relação à classificação, identificação, sinonímia e nomenclatura desse complexo (SENTÍES; FUJII, 2002, CASSANO, 2009).

As espécies do complexo *Laurencia* são amplamente distribuídas no litoral brasileiro, estendendo-se do Ceará (PINHEIRO-JOVENTINO; DANTAS; MARASCHIN, 1998) ao Rio Grande do Sul (BAPTISTA, 1977). Os primeiros relatos da existência do complexo no Brasil foram feitas por pesquisadores estrangeiros: Saint-Hilaire, Martens e Möbius (LHULLIER, 2009).

A partir da década de 1980 iniciou-se o estudo de forma sistemática do complexo *Laurencia* no Brasil, com o trabalho de Cordeiro-Marino e colaboradores (1983), e outros trabalhos surgiram a partir deste.

Segundo Fujii e colaboradores (2011), no Brasil o complexo é representado por vinte espécies, distribuídas por quatro gêneros (*Laurencia*, *Palisada*, *Osmundea* e *Yuzurua*), sendo registrados 12 espécies do gênero *Laurencia*.

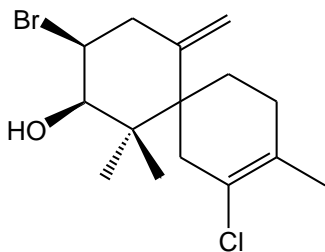
### 1.2.2.1. Gênero *Laurencia* Lamouroux

O gênero *Laurencia* destaca-se como uma fonte fascinante de produtos naturais, as espécies desse gênero estão amplamente distribuídas em mares temperados e tropicais, abrangendo cerca de 130 espécies (CABRITA; VALE; RAUTER, 2010, GUIRY; GUIRY, 2014).

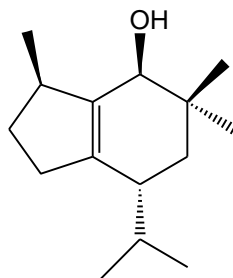
Os estudos sobre os componentes químicos deste gênero começaram na década de 50, quando foi analisado o óleo essencial de *Laurencia glandulífera*, em que foi descrita a presença de sesquiterpenos (OBATA E FUKUZI, 1953). A este estudo seguiram-se inúmeros outros e, mais recentemente, o gênero *Laurencia* tornou-se um dos mais estudados entre os organismos marinhos (PEREIRA; TEIXEIRA, 1999; MASCHKE; BAKER, 2008, FUJII et al., 2011).

Várias espécies de *Laurencia* apresentam como metabólitos secundários (Fig. 1) sesquiterpenos halogenados (a) ou não (b), diterpenos (c), triterpenos (d) e acetogeninas (e) (CABRITA; VALE; RAUTER, 2010). Muitas das substâncias sintetizadas por esse gênero representam estruturas exclusivas, nunca vistas em outros organismos (PEREIRA; TEIXEIRA, 1999).

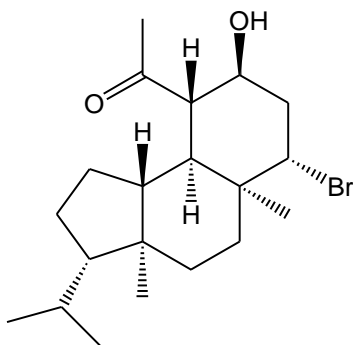
As acetogeninas são frequentemente isoladas nesse gênero e em moluscos herbívoros (FAULKNER, 1984). A maioria desses metabólitos pode ser oriunda de isômero de laurediois (f) (FUKUSAWA et al., 1993) ou de um éter cíclico de oito carbonos (g) (FAULKNER, 1984). Devido à grande variedade estrutural, as acetogeninas são importantes marcadores taxonômicos deste gênero, juntamente com os sesquiterpenos. Os diterpenos possuem poucos tipos estruturais e um reduzido número de esqueletos, para os triterpenos (tipo de terpeno raro para o gênero) existem poucos exemplos conhecidos. Os sesquiterpenos são a classe de compostos mais abundante e característica para as espécies do gênero *Laurencia* (LHULLIER, 2009).



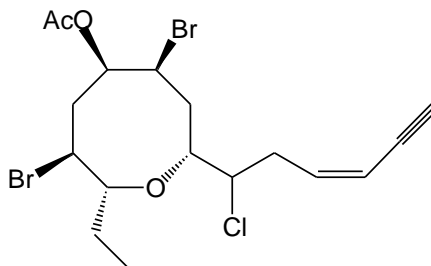
a) Elatol (sesquiterpeno halogenado)



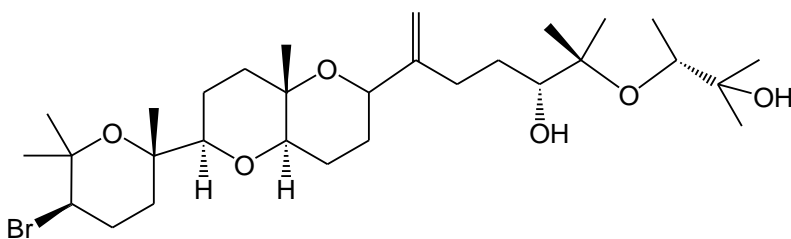
b) Brasilenol (sesquiterpeno não halogenado)



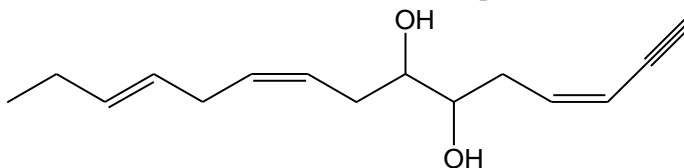
c) Coronona (diterpeno)



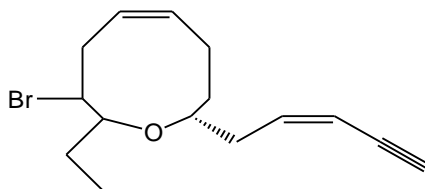
e) 10-acetoxy-6-cloro-9,12-dibromo-lautisan-3-eno-1-ino (acetogenina)



d) Dehydrovenustatriol (triterpeno)



f) 6,7-diidroxi-pentadeca-3,9,12-trienino-1 (laurendiois)



**g) éter cíclico de oito carbonos**

**Figura 1:** Exemplos das diferentes classes de metabólitos secundários produzidos pelas espécies do gênero *Laurencia*. **Modificado de:** Blunt e colaboradores (2011; 2012).

No Brasil, apenas seis espécies do gênero *Laurencia* foram submetidas à análise química, que resultou no isolamento de 48 terpenos; a maioria deste pertence à classe dos sesquiterpenos (FUJII et al., 2011).

Estudos de atividade biológica comprovaram que metabólitos do gênero *Laurencia* apresentam atividade antibacteriana, antifúngica, inseticida, citotóxica, anti-inflamatória, entre outras (BLUNT et al., 2011; BLUNT et al., 2012; BLUNT et al., 2013; WIJESINGHE et al., 2014).

Há diversas revisões na literatura que abrangem compostos isolados do gênero *Laurencia* (FAULKNER, 1998, 1999, 2000, 2001; BLUNT et al., 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013), de modo que serão apresentados com mais detalhes apenas os compostos reportados até o momento para as duas espécies em estudo.

#### 1.2.2.1.1 *Laurencia catarinensis* Cordeiro-Marinho & Fujii

Após inúmeros trabalhos publicados com o gênero *Laurencia*, a dupla de pesquisadores Cordeiro-Marino e Fujii descreveram, em 1985, uma nova espécie. A espécie é encontrada nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e Santa Catarina (LHULLIER, 2009, FUJII et al., 2011). A classificação taxonômica da alga *Laurencia catarinensis* está representada na Figura 2.

Filo: Rhodophyta
Sub-filo: Eurhodophytina
Classe: Florideophyceae
Sub-classe: Rhodymeniophycidae
Ordem: Ceramiales
Família: Rhodomelaceae
Gênero: <i>Laurencia</i> J.V. Lamouroux
Sub-gênero: <i>Laurencia</i>

**Figura 2:** Classificação taxonômica de *Laurencia catarinensis* e *Laurencia dendroidea*.

A espécie é caracterizada por possuir coloração marrom-esverdeada, frequentemente esverdeada com ápices róseos, hábito fortemente entrelaçado formando densas almofadas com coralináceas articuladas, células corticais ligeiramente projetados próximos ao ápice dos ramos e ausência de espessamentos lenticulares nas paredes das células medulares, são fixas ao substrato por apressórios discóides (CASSANO, 2009) (Fig.3).



A)

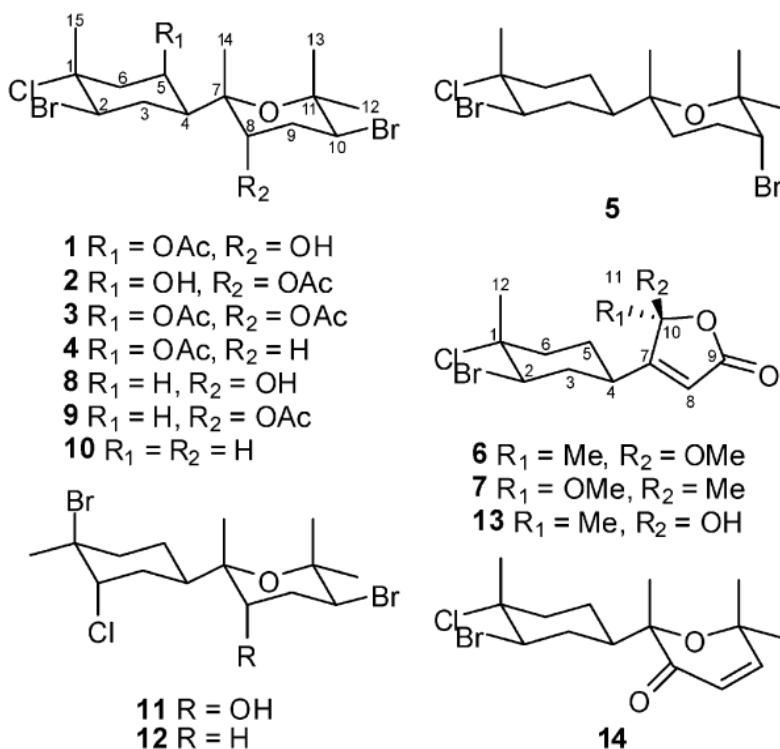


B)

**Figura 3:** A) *Laurencia catarinensis* coletada na Ilha do Xavier em Florianópolis. Foto da autora. B) *Laurencia catarinensis*, mostrando o ápice róseo. Fonte: CASSANO, 2009.

### 1.2.2.1.1.1 Substâncias isoladas da alga vermelha *Laurencia catarinensis* Cordeiro-marino & Fujii

*Laurencia catarinensis* coletada na Ilha do Arvoredo foi objeto de estudo deste programa no âmbito de uma tese de doutorado e um projeto de pós-doutorado que resultaram no isolamento de vários sesquiterpenos halogenados citotóxicos relacionados ao caespitol (substância 8, na figura 4) (LHULLIER et al., 2010; FALKENBERG et al., 2011). Alguns destes metabólitos estão representados na figura 4.



**Figura 4:** Estrutura de sesquiterpenos halogenados relacionados ao caespitol, *Laurencia catarinensis*. Fonte: LHULLIER et al., 2010.

Observa-se que os compostos apresentam variação estrutural particularmente no anel oxigenado, mas também foram isolados outros

metabólitos contendo o anel ciclo-hexano halogenado conectado a uma cadeia lateral (FALKENBERG et al., 2011).

Estudo com os metabólitos isolados da Ilha do Arvoredo demonstrou efeito citotóxico contra três linhagens de câncer: carcinoma de colo retal (HT29), câncer de mama (MCF7) e carcinoma epidermóide (A431), destacando os compostos (5S)-5-acetoxicaespitol (substância 1, na figura 4), caespitol, deoxicaespitol (substância 10, na figura 4) e caespitenona (substância 14, na figura 4) por exibir atividade com valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 20 µM (LHULLIER et al., 2010).

No âmbito das investigações fitoquímicas foram também isolados alguns compostos minoritários cuja elucidação não chegou a ser completada, despertando o interesse no seu reisolamento em maior quantidade.

#### 1.2.2.1.2 *Laurencia dendroidea* J. Agardh

A revisão morfológica feita por Cassano (2009) concluiu que a *Laurencia dendroidea* é morfológicamente plástica e incluiria os táxons *Laurencia arbuscula*, *L. filiformis*, *L. majuscula* e *L. obtusa* do Atlântico Sul. Esses dados foram confirmados por biologia molecular, deixando claro que esses táxons constituem a mesma entidade taxonômica, identificada como *Laurencia dendroidea*. *Laurencia obtusa* do Atlântico Norte é uma espécie distinta, o que foi confirmado pelos dados moleculares.

A espécie *Laurencia dendroidea* é encontrada em vários estados do Brasil, facilmente encontrada em Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia, Espírito Santo, entre outros (CASSANO, 2009). A classificação taxonômica da alga *Laurencia dendroidea* está representada na Figura 3.

A espécie é caracterizada por possuir coloração marrom-vinácea, violácea a esverdeada, comumente esverdeada nos eixos principais e ramos laterais violáceos, e ser ereta com 4 a 20 cm de altura. Os talos tem consistência cartilaginosa flácida. Eixos principais são fixos ao substrato por um único apressório ou pela agregação de apressórios discóides. Os ramos estoloníferos e ramos laterais basais descendentes são fixos secundariamente por apressórios terminais. Os eixos principais tem 925-2750 µm de diâmetro na porção mediana do talo. Eixos cilíndricos com ramificação variando de uniformemente densa desde a base da planta a esparsa (CASSANO, 2009) (Fig. 5).



**Figura 5:** *Laurencia dendroidea* coletada na praia da Sepultura, Bombinhas, Santa Catarina (Foto da autora).

Salgado e colaboradores (2008) identificaram corpos em cereja nas células corticais, e nesta organela estão armazenados os metabólitos halogenados da espécie. Neste mesmo estudo, através da técnica vídeo-microscopia, foi determinado que a transferência de vesículas oriundas dos corpos em cereja para a periferia celular ocorre através de conexões membranosas tubulares. Além disso, foi determinada a localização intracelular dos metabólitos halogenados ou precursores (incluindo o sesquiterpeno elatol) através da observação de um padrão de autofluorescência destas moléculas no interior do citoplasma, no interior dos corpos de cereja e em vesículas dispersas no citoplasma.

#### 1.2.1.1.2.1 Substâncias isoladas da espécie *Laurencia dendroidea* J. Agardh

No âmbito de uma tese de doutorado deste programa de pós-graduação (LHULLIER, 2009), foi isolado em grande quantidade o sesquiterpeno elatol (substância **a**, na Figura 1). O elatol é citado como apresentando atividade anti-herbivoria frente a predadores de *Laurencia GRANADO*; CABALLERO, 1995, PEREIRA et al., 2003), entretanto parece ser tolerado por *Echinometra lucunter* (LHULLIER et al., 2009).

Em outro estudo químico com *Laurencia dendroidea* coletada no estado do Rio de Janeiro, foram isolados mais três sesquiterpenos além do elatol; obtusol, cartilagineol, obtusano (MACHADO et al., 2011).

Em função do interesse pela atividade citotóxica, observada durante experimentos de avaliação da atividade antiviral, aguns



derivados do elatol foram obtidos visando à melhoria da atividade e das propriedades físico-químicas (LANG et al., 2012).

Entre os diversos sesquiterpenos produzidos pelas espécies de *Laurencia*, o elatol destaca-se por apresentar uma ampla distribuição em diversas espécies (KÖNIG; WRIGHT, 1997; VAIRAPPAN, 2003; VAIRAPPAN et al., 2010). O elatol demonstrou atividade anti-incrustante (DA GAMA et al., 2002), antileishmania (SANTOS et al., 2010), tripanocida (DESOTI et al., 2012), antibacteriana (VAIRAPPAN et al., 2001; 2003), citotóxica (DIAS et al., 2005) e antifúngica (KÖNIG; WRIGHT, 1997).



**OBJETIVOS**



## **2.OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Considerando os resultados obtidos nas investigações químicas destas espécies de *Laurencia*, o presente trabalho teve como objetivo geral dar continuidade à investigação dos extratos das algas vermelhas *Laurencia catarinensis* e *Laurencia dendroidea*.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os objetivos específicos propostos para o presente trabalho foram:

#### **2.2.1. *Laurencia catarinensis***

- Isolar metabólitos secundários potencialmente ativos a partir de *L. catarinensis* coletada em outro ambiente (Ilha do Xavier) e elucidar as suas estruturas;
- Encaminhar os novos compostos para testes de atividade biológica (avaliação a ser realizada em parceria);
- Eventualmente reisolar alguns dos compostos cuja elucidação estrutural não pôde ser completada e encaminhá-los para a realização de testes de atividade biológica (antiviral, antiprotozoária, citotoxicidade, etc.).

#### **2.2.2 *Laurencia dendroidea***

- Reisolar elatol e iso-obtusol para serem encaminhados para obtenção de novos derivados e testes de atividade biológica;
- Isolar compostos minoritários do extrato desta alga.



## **MATERIAIS E MÉTODOS**





### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

##### 3.1.1. Material vegetal

A amostra de *Laurencia catarinensis* foi coletada em maio de 2012, na Ilha do Xavier, na zona de mesolitoral, sendo identificada pelo Prof. Dr. Paulo Horta (UFSC/SC). Um exemplar da espécie é mantido no Herbário do Departamento de Botânica da UFSC (FLOR 54481).

A amostra de *Laurencia dendroidea* foi coletada nos mês de agosto de 2012, na praia da Sepultura, município de Bombinhas, SC, na zona de mesolitoral e foi identificada pelo Prof. Dr. Paulo Horta. Um exemplar da espécie é mantido no Herbário do Departamento de Botânica da UFSC (FLOR 14516).

##### 3.1.2. Solventes, adsorventes e reagentes

Os solventes e reagentes utilizados para a extração, análise por cromatografia em camada delgada (CCD) e para fracionamento cromatográfico foram de grau analítico, de procedência Synth<sup>®</sup> e Vetec<sup>®</sup>.

Para cromatografia líquida a vácuo (CLV) e fracionamento em SEPACORE/Syncore<sup>®</sup> foi utilizado gel de sílica 60 de procedência Vetec<sup>®</sup>, com tamanho de partículas na faixa de 0,04–0,063 mm. Nas cromatografias em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplaças de alumínio de gel de sílica 60 F 254, da marca Macherey-Nagel<sup>®</sup>.

Para fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizados solventes de grau HPLC e coluna de fase normal Supelcosil, 25 cm x 10 mm, 5 µm.

Os reagentes utilizados para revelação cromatográfica em CCD foram solução de ácido sulfúrico a 10% e solução de anisaldeído-sulfúrico, preparados a partir de reagentes de grau analítico. Os solventes utilizados para a obtenção dos espectros de RMN foram clorofórmio e benzeno deuterados.

### 3.1.3. Equipamentos

O extrato e as frações obtidas nos procedimentos cromatográficos foram concentrados em rotaevaporador da marca Büchi.

Para fracionamento, utilizou-se sistema de cromatografia líquida de média pressão (CLMP) tipo SEPACORE/Syncore®. Quando necessário, a purificação final foi realizada através de CLAE. Foram utilizados cromatógrafos Pharmacia LKB 2252 (detector de índice de refração RI-Shodex-102) e Perkin Elmer serie 200 (com detector de índice de refração).

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em equipamentos Bruker modelos: AC 200 e DRX 400 (Divisão de Farmacognosia e Química de Produtos Naturais, Universidade de Atenas). Os espectros foram calibrados através do pico do solvente utilizado para a análise. Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrômetro modelo Prestige-21 Shimadzu (Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC).

## 3.2. MÉTODOS UTILIZADOS

### 3.2.1. *Laurencia catarinensis*

#### 3.2.1.1. Obtenção do extrato

Primeiramente, a alga foi seca sob ar frio e depois rasurada. O material vegetal (35,09 g) foi submetido à maceração com diclorometano/metanol (2:1) por sete dias. Após, o extrato obtido foi filtrado e concentrado em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a temperatura inferior a 40 °C. O resíduo da primeira maceração foi re-extraído com a mesma mistura de solventes até o seu esgotamento.

#### 3.2.1.2 Fracionamento do extrato

##### 3.2.1.2.1 *Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV) – COLUNA A*

O extrato bruto resultante das várias macerações (1,91 g) foi submetido à cromatografia líquida a vácuo (CLV) com gel de sílica 60. Utilizou-se como fase móvel um gradiente de solventes que iniciou com n-hexano 100% (Tabela 1) e finalizou com metanol. Cada fração foi

coletada em frasco separado, obtendo-se um total de 20 frações. As frações coletadas foram analisadas por CCD e reunidas em função da semelhança de composição (Fig. 6), sendo denominadas Ax-y (x e y = números correspondentes aos limites do intervalo de frações reunidas). A análise das placas foi realizada sob luz ultravioleta, em 254 e 366 nm, e anisaldeído-sulfúrico foi utilizado como revelador.

**Tabela 1** – Esquema de eluição utilizado na cromatografia líquida a vácuo (Coluna A) para o extrato de *Laurencia catarinensis*.

FRAÇÃO	FASE MÓVEL
1	nHx
2	Hx/AcOEt (98:2)
3	Hx/AcOEt (95:5)
4	Hx/AcOEt (90:10)
5	Hx/AcOEt (85:15)
6	Hx/AcOEt (80:20)
7	Hx/AcOEt (75:25)
8	Hx/AcOEt (70:30)
9	Hx/AcOEt (60:40)
10	Hx/AcOEt (50:50)
11	Hx/AcOEt (40:60)
12	Hx/AcOEt (30:70)
13	Hx/AcOEt (20:80)
14	Hx/AcOEt (10:90)
15	AcOEt
16	AcOEt/MeOH (75:25)
17	AcOEt/ MeOH (50:50)
18	MeOH
19	MeOH
20	MeOH

### 3.2.1.2.2. CLMP da Fração A3-4 – COLUNA B

A fração A3-A4 (345,7 mg) foi submetida a separação cromatográfica em sistema de média pressão (Sepacore/Syncore®). Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, misturas de n-hexano com proporções crescentes de acetato de etila. Obtiveram-se 48 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em sete frações, chamadas de B1-16 a B40-48 (Fig.6).

### 3.2.1.2.3. CLMP da Fração A5 – COLUNA C

A fração A5 (311,5 mg) foi submetida ao fracionamento utilizando sistema cromatográfico de média pressão (Sepacore/Syncore®). A fase estacionária utilizada foi gel de sílica 60 e como fase móvel, usou-se n-hexano com proporção crescente de acetato de etila. Obtiveram-se 75 frações que foram analisadas por CCD e agrupadas conforme sua semelhança cromatográfica em 16 frações, denominadas de C1-13 a C61-75 (Fig. 6).

### 3.2.1.2.4. CLMP da Fração A6 – COLUNA D

A fração A6 (113,9 mg) também foi fracionada utilizando sistema cromatográfico de média pressão (Sepacore/Syncore®). Foi utilizado gel de sílica 60 e um gradiente de n-hexano com acetato de etila. Foram coletadas 62 frações, as quais foram agrupadas em 14 frações, de D1-12 a D 47-62 (Fig. 6).

### 3.2.1.2.4. CLMP da Fração B20-22 e B23-26 – COLUNA E

As frações B20-22 e B23-26 foram analisadas por CCD e observaram-se características semelhantes, por isso elas foram reunidas na fração B20-26.

A fração B20-26 (134 mg) foi submetida ao fracionamento utilizando o sistema cromatográfico de média pressão (Sepacore/Syncore®) em coluna de gel de sílica 60. Como fase móvel, usou-se n-hexano com proporções crescentes de acetato de etila e depois metanol. Obtiveram-se 62 frações que foram agrupadas conforme sua semelhança cromatográfica em 16 frações, de E1-21 a MeOH (Fig. 6).

### 3.2.1.3. Purificação das frações

#### 3.2.1.3.1. CLAE da fração B17-19

A fração B17-19 (154 mg) foi purificada por CLAE, utilizando como fase móvel ciclohexano: acetato de etila (99,5:05). Foram coletadas oito frações (Fig. 6).

### 3.2.1.3.2. CLAE da fração C15-17

A fração C15-17 (102,4 mg) foi aplicada sobre uma coluna Sepack com gel de sílica. Foram coletadas três frações (C15-17A, C15-17B e C15-17C): a primeira com ciclohexano/acetato de etila (95:5), a segunda com a proporção 1:1 e a terceira, com acetato de etila.

A fração C15-17A foi purificada por CLAE, utilizando ciclohexano/acetato de etila (95:5) como fase móvel. Obtiveram-se seis frações, de C15-17A1 a C15-17A6 (Fig. 6).

A fração C15-17A3 também foi purificada por CLAE, com ciclohexano/acetato de etila (95:5) como fase móvel. Foram coletadas duas frações (Fig. 6).

### 3.2.1.3.2. CLAE das frações C18 e C19-20

As frações C18 e C19-20 foram analisadas por CCD, observando-se composições semelhantes, por isso elas foram reunidas na fração C18-20.

A fração C18-20 (76 mg) foi submetida a uma coluna Sepack de gel de sílica. Foram coletadas três frações (C18-20A, C18-20B e C18-20C); a primeira e a segunda com ciclohexano/ acetato de etila (95:5) e a terceira com acetato de etila.

A fração C18-20A (8,4 mg) foi purificada por CLAE, utilizando ciclohexano/ acetato de etila (95:5) como fase móvel. Foram obtidas cinco frações, de C18-20A1 a C18-20A5 (Fig. 6).

A fração C18-20B (45,3 mg) também foi purificada por CLAE; utilizou-se como fase móvel ciclohexano/acetato de etila (95:5) e coletaram-se seis frações, de C18-20B1 a C18-20B6 (Fig. 6).

A purificação da fração C18-20B4 (22 mg) foi realizada por CLAE, utilizando como fase móvel n-hexano/acetato de etila (93:7). Foram obtidas cinco frações, de C18-20B4A a C18-20B4E (Fig. 6).

A fração C18-20B4E (10,9 mg) foi purificada por CLAE, utilizando ciclohexano/acetona (95:5). Obtiveram-se três frações C18-20B4E1 a C18-20B4E3 (Fig. 6).

### **3.2.2. *Laurencia dendroidea***

#### 3.2.2.1. Obtenção do extrato

Primeiramente, a alga foi seca sob ar frio e depois, rasurada. O material vegetal (88,5 g) foi submetido à maceração com diclorometano/metanol (2:1) por 7 dias. Após, o extrato obtido foi filtrado e concentrado em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a temperatura inferior a 40 °C. O resíduo da primeira maceração foi re-extraído com a mesma mistura de solventes até o seu esgotamento.

#### 3.2.2.2. Fracionamento do extrato bruto e frações

##### 3.2.2.2.1. *Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV) – COLUNA LDA*

Os extratos brutos resultantes das várias macerações (5,54 g) foram submetidos à cromatografia líquida a vácuo (CLV) com gel de sílica 60. Utilizou-se como fase móvel um gradiente de solventes que iniciou com n-hexano 100% (Tabela 2) e finalizou com metanol. Cada fração foi coletada em frasco separado, obtendo-se um total de 16 frações. As frações coletadas foram analisadas por CCD e reunidas em função da semelhança de composição (Fig. 7), sendo denominadas LDax-y (x e y = números correspondentes ao limites do intervalo de frações reunidas). A análise das placas foi realizada sob luz ultravioleta (254 e 366 nm) e anisaldeído-sulfúrico foi utilizado como revelador.

**Tabela 2** – Esquema de eluição utilizado na cromatografia líquida a vácuo (coluna LDA) para o extrato de *Laurencia dendroidea*.

FRAÇÃO	FASE MÓVEL
LDA1	nHx
LDA2	Hx/AcOEt (99:1)
LDA3	Hx/AcOEt (98:2)
LDA4	Hx/AcOEt (95:5)
LDA5	Hx/AcOEt (90:10)
LDA6	Hx/AcOEt (85:15)
LDA7	Hx/AcOEt (80:20)
LDA8	Hx/AcOEt (70:30)
LDA9	Hx/AcOEt (60:40)
LDA10	Hx/AcOEt (50:50)
LDA11	Hx/AcOEt (40:60)
LDA12	Hx/AcOEt (1:2)
LDA13	AcOEt
LDA14	AcOEt : MeOH (50:50)
LDA15	MeOH
LDA16	MeOH

Uma alíquota da fração LDA5 foi submetida a um fracionamento por CLMP, com o fim exclusivo de testar sistemas cromatográficos para as frações LDA. Este fracionamento (coluna LDB) não está representado no organograma da Fig. 7.

#### 3.2.2.2.2. CLMP da Fração LDA6 – COLUNA LDC

A fração LDA6 (1459 mg) foi submetida ao fracionamento utilizando o sistema cromatográfico de média pressão (Sepacore/Syncore®). A fase estacionária utilizada foi gel de sílica 60 e como fase móvel, usou-se n-hexano com proporção crescente de acetato de etila. Foram obtidas 100 frações, as quais foram analisadas por CCD e agrupadas conforme sua semelhança cromatográfica em 28 frações, denominadas LDC1-9 a LDC100 (Fig. 7).

#### 3.2.2.2.3 CLMP da Fração LDA5 – COLUNA LDD

A fração LDA5 (325 mg) também foi submetida ao fracionamento utilizando o sistema cromatográfico de média pressão (Sepacore/Syncore®). Foi utilizado gel de sílica 60 e um gradiente de n-

hexano com acetato de etila. Foram obtidas 63 frações, as quais foram agrupadas em 25 frações, denominadas LDD1-7 a LDD 63 (Fig. 7).

#### 3.2.2.2.4. *CLMP da Fração LDC 80-85 – Coluna LDE*

A fração LDC 80-85 (145 mg) foi submetida a separação cromatográfica em sistema de média pressão (Sepacore/Syncore®). Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 e, como fase móvel, uma mistura de n-hexano com proporções crescentes de metanol. Foram obtidas 52 frações, as quais foram agrupadas conforme sua semelhança cromatográfica em 21 frações, de LDE1-3 a LDE 46-52 (Fig.7).

#### 3.2.2.3. Purificação das frações

##### 3.2.2.3.1. *CLAE da fração LDC86-89*

A fração LDC86-89 (20 mg) foi aplicada sobre uma coluna Sepack com gel de sílica. Foram coletadas duas frações (LDC86-89A e LDC86-89B): a primeira com ciclohexano/acetato de etila (96:4) e a segunda com acetato de etila.

A fração LDC86-89A foi purificada por CLAE, utilizando ciclohexano/acetato de etila (95:5) como fase móvel. Obtiveram-se três frações, de LDC86-89A1 a LDC86-89A3 (Fig.7).

##### 3.2.2.3.2. *CLAE da fração LDE35*

A fração LDE35 (25,2 mg) foi submetida a uma coluna Sepack de gel de sílica e usou-se ciclohexano/acetato de etila (96:4) e acetato de etila como fase móvel. Obtiveram-se duas frações (LDE35A e LDE35B).

A fração LDE35A (19,1 mg) foi purificada por CLAE, utilizando ciclohexano/ acetato de etila (95:5) como fase móvel. Foram obtidas três frações, de LDE35A1 a LDE35A3 (Fig. 7).

##### 3.2.2.3.3. *CLAE da fração LDE 36*

A fração LDE36 (10,7 mg) também foi submetida a uma coluna Sepack com gel de sílica. Utilizou-se ciclohexano/acetato de etila (96:4)



e acetato de etila como fase móvel. Foram coletadas duas frações (LDE36A e LDE36B).

A purificação da fração LDE36A (10,7 mg) foi realizada por CLAE, utilizou-se como fase móvel ciclohexano/acetato de etila (95:5). Obtiveram-se três frações LDE36A1 a LDE36A3 (Fig. 7).

### 3.3 ANÁLISE DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

As substâncias LCT1, LCT4, LCT5 foram analisadas por meio de espectros de  $^1\text{H-RMN}$ ,  $^{13}\text{C-RMN}$ , COSY e HSQC. A substância LCT2 foi analisada por meio de espectros de IV,  $^1\text{H-RMN}$ ,  $^{13}\text{C-RMN}$ , COSY, HSQC e HMBC.

As substâncias LCT3 e LCT8 foram analisadas por meio de espectros de IV,  $^1\text{H-RMN}$  e  $^{13}\text{C-RMN}$ .

As substâncias LCT7, LDT1 e LDT2 foram analisadas através de espectros de IV,  $^1\text{H RMN}$  e ponto de fusão. Já as substâncias LCT6 e LCT9 ainda não foram completamente identificadas.

- LCT1 (pacifenol) sólido branco inodoro, IV (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3500, 3030, 2960, 1438, 1379, 1072, 777, 657; ponto de fusão: 148,7 a 150 °C, dados de  $^1\text{H-RMN}$  ver tabela 4 e dados de  $^{13}\text{C-RMN}$  ver tabela 5.
- LCT2 (johnstonol) sólido amarelo inodoro, IV (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3485, 2987, 1381, 1080, 770, 640; ponto de fusão: 178,1 a 178,9 °C, dados de  $^1\text{H-RMN}$  ver tabela 7 e dados de  $^{13}\text{C-RMN}$  ver tabela 8.
- LCT3 (prepacifenol epóxido) sólido branco inodoro, IV (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3510, 2985, 1362, 1070, 792, 653; ponto de fusão: 95,1 a 96,7 °C, dados de  $^1\text{H-RMN}$  ver tabela 9 e dados de  $^{13}\text{C-RMN}$  ver tabela 10.
- LCT4 (dehidroxiprepacifenol epóxido) óleo incolor inodoro, dados de  $^1\text{H-RMN}$  ver tabela 12 e dados de  $^{13}\text{C-RMN}$  ver tabela 13.
- LCT5 (deoxiprepacifenol) sólido branco inodoro, ponto de fusão: 121,2 a 123,2 °C, dados de  $^1\text{H-RMN}$  ver tabela 14 e dados de  $^{13}\text{C-RMN}$  ver tabela 15.
- LCT6 óleo incolor inodoro.
- LCT7 (elatol) óleo com odor característico, IV (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3100, 2972, 1641, 1040, 759, 615; dados de  $^1\text{H-RMN}$  ver tabela 16.
- LCT8 (isomaneoneno B) sólido branco inodoro, IV (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3278, 2966, 2100, 1010, 667; dados de  $^1\text{H-RMN}$  ver tabela 17 e dados de  $^{13}\text{C-RMN}$  ver tabela 18.
- LCT9 óleo incolor inodoro.

- LDT1 (elatol) ver dados da substancia LCT7.
- LDT2 (isoobtusol) sólido branco inodoro, IV (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3259, 2968, 1640, 1080, 721, 610; dados de  $^1\text{H-RMN}$  ver tabela 19.

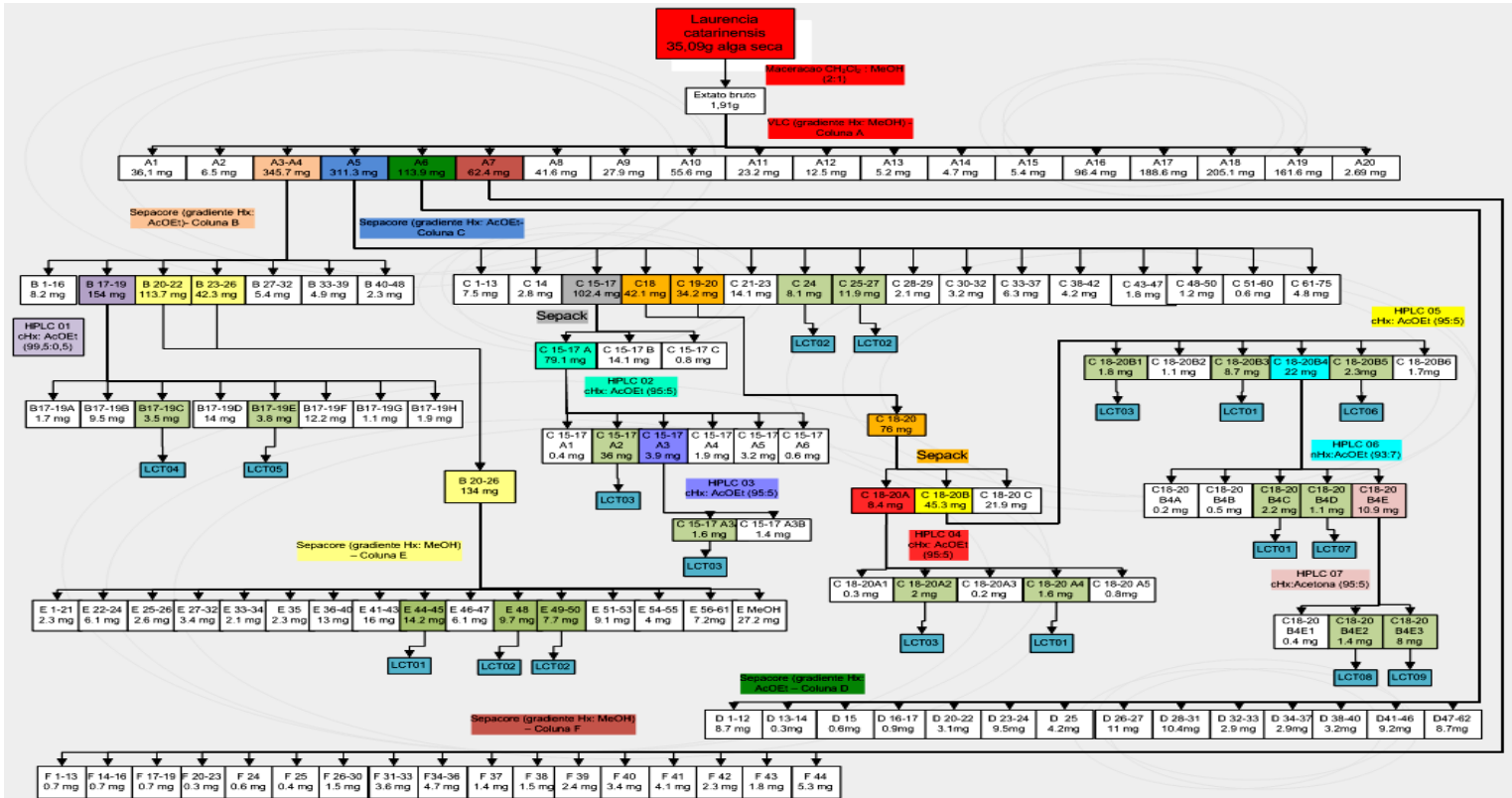


Figura 6: Organograma da obtenção e do fracionamento do extrato de *Laurencia catarinensis*.

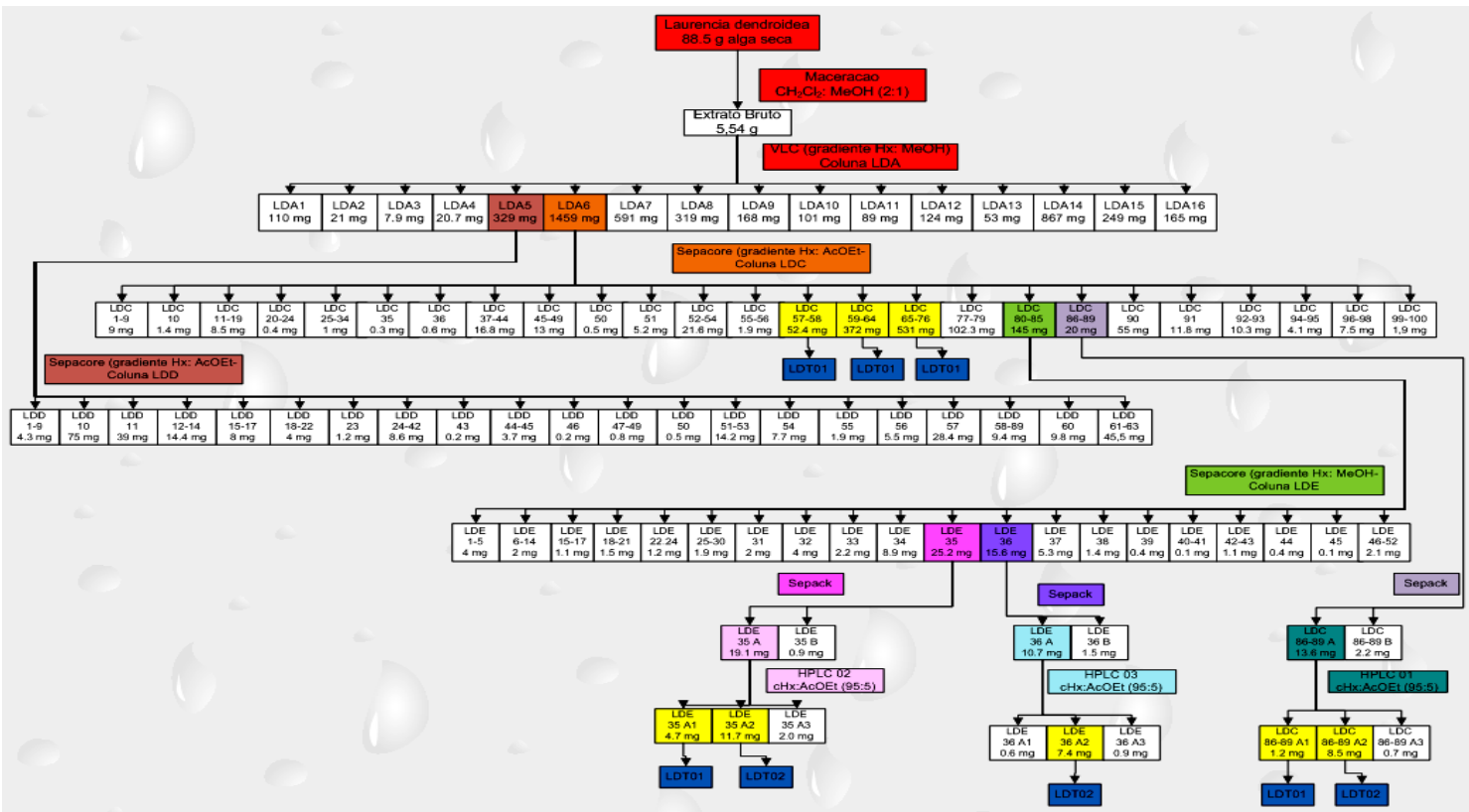


Figura 7: Organograma da obtenção e do fracionamento do extrato de *Laurencia dendroidea*.

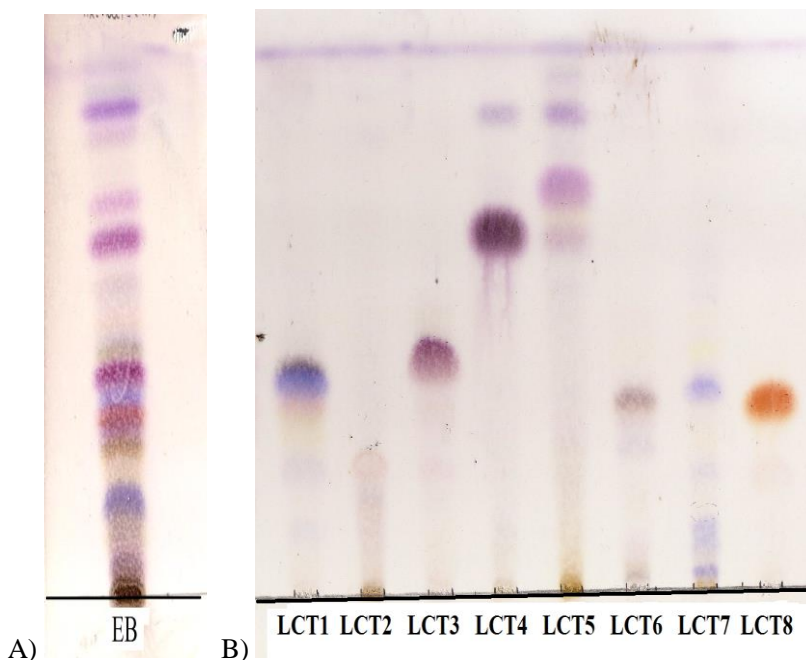
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. *Laurencia catarinensis*

Após a realização de sucessivos procedimentos cromatográficos, seguidos da purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram isoladas nove substâncias. A elucidação estrutural dos compostos isolados deu-se através da análise dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) mono- e bidimensionais, bem como dos espectros na região do infravermelho (IV) e comparação com dados da literatura e base de dados Marinlit®.



**Figura 8:** A) CCD do extrato bruto de *L. catarinensis*; B) CCD das frações contendo os compostos que foram isolados de *Laurencia catarinensis*. Em ambas, a fase móvel foi hexano/acetato de etila (9:1) e o revelador, anisaldeído-sulfúrico.

#### 4.1.1. Substância LCT1

A substância LCT1 (24,5 mg) foi isolada de diferentes frações, sendo obtida após a purificação por CLMP e CLAE (Fig. 6) como um sólido branco e inodoro, apresentando-se na CCD em Hx/AcOEt (9:1) como uma mancha em Rf 0,4. Esta substância não extingue a fluorescência em 254 nm, nem apresenta fluorescência em 366 nm; após a revelação com anisaldeído-sulfúrico, o composto adquire cor azul.

O espectro de IV sugeriu a presença de grupamento hidroxila (estiramento O-H atribuído à banda em  $3500\text{ cm}^{-1}$ ); a banda intensa próxima a região de  $1100\text{ cm}^{-1}$  corresponderia à ligação C-O de éter e/ou álcool.

O espectro  $^1\text{H-RMN}$  em  $\text{CDCl}_3$  apresentou sinais em 5,36 ppm (1 H, d,  $J = 9,9\text{ Hz}$ ) e 6,04 (1 H, d,  $J = 9,9\text{ Hz}$ ) com deslocamento químico característico de hidrogênios olefínicos, o que foi confirmado pelo HSQC-DEPT. O sinal em 4,66 (1 H, dd,  $J = 12,6; 5,1\text{ Hz}$ ) se refere ao hidrogênio ligado ao carbono em 74,2 ppm e, devido ao deslocamento químico deve ser geminal a um grupo eletronegativo, como oxigênio ou halogênio. O sinal em 5,42 ppm (1 H, dd,  $J = 13,3; 3,8\text{ Hz}$ ) corresponde a um hidrogênio desprotegido (cujo carbono ressona em 59,3 ppm), provavelmente geminal em relação a um átomo eletronegativo, como bromo ou cloro. Entre 2,15 e 2,68 ppm quatro sinais sugerem a presença de dois grupos metílenos. Os singletos em 1,77 (3 H), 1,49 (3 H), 1,28 (3 H) e 1,09 (3 H) ppm correspondem a metilas.

No espectro de HSQC-DEPT foram visualizados sinais para quatro metinos, dois metílenos e quatro metilas, sendo dois carbonos de metinos próximos a 132 e 134 ppm atribuídos aos carbonos olefínicos.

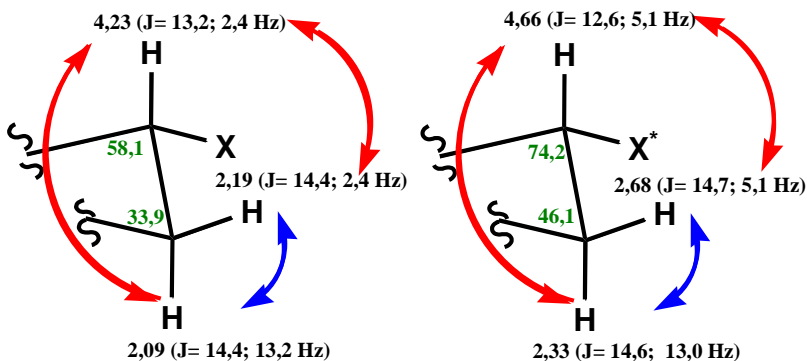


**Tabela 3:** Dados da substância LCT1, a partir dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, HSQC-DEPT e COSY.

$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ ( $^1\text{H}$ RMN)
134,2 (CH)	5,36 d (9,9 Hz)
132,5 (CH)	6,04 d (9,9 Hz)
74,2 (CH)	4,66 dd (12,6; 5,1 Hz)
59,3 (CH)	5,42 dd (13,3; 3,8 Hz)
46,1 ( $\text{CH}_2$ )	2,68 dd (14,7; 5,1 Hz)
	2,33 dd (14,7; 13,0 Hz)
34,3 ( $\text{CH}_2$ )	2,32 dd (14,7; 3,4 Hz)
	2,15 dd (14,7; 13,3 Hz)
33,6 ( $\text{CH}_3$ )	1,77 s
25,1 ( $\text{CH}_3$ )	1,49 s
24,7 ( $\text{CH}_3$ )	1,28 s
23,5 ( $\text{CH}_3$ )	1,09 s

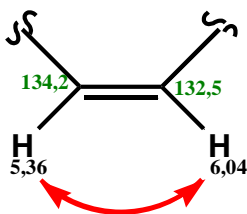
A análise detalhada do espectro de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY mostra dois sistemas ABX (Fig. 9). O primeiro sistema ABX demonstrado é dos sinais em  $\delta\text{H}$  5,42,  $\delta\text{H}$  2,32 e  $\delta\text{H}$  2,15. O sinal em  $\delta\text{H}$  5,42 (dd,  $J= 13,3; 3,8$  Hz) correlaciona com os sinais de hidrogênio em 2,32 e 2,15 ppm e estes correlacionam entre si. Tendo em vista as constantes de acoplamento dos sinais em 2,32 (1 H, dd,  $J= 14,7; 3,4$  Hz) e 2,15 ppm (1 H, dd,  $J= 14,7; 13,3$  Hz), podemos inferir que este sistema está inserido em um anel, que o último hidrogênio mencionado é axial e que o primeiro é equatorial. O hidrogênio que ressona em 5,42 ppm deve ser também axial, por apresentar uma constante de acoplamento vicinal acima de 7 Hz.

O segundo sistema ABX é dos sinais  $\delta\text{H}$  4,66,  $\delta\text{H}$  2,33 e  $\delta\text{H}$  2,68. O H que ressona em 4,66 ppm (dd,  $J= 12,6; 5,1$  Hz) correlaciona com os sinais de hidrogênio em 2,33 e 2,68 ppm e estes correlacionam entre si. Analisando as constantes de acoplamento dos sinais em 2,33 (1 H, dd,  $J= 14,7; 13,0$  Hz) e 2,68 ppm (1 H, dd,  $J= 14,7; 5,1$  Hz), pode-se afirmar que este segundo sistema também deve fazer parte de um ciclo, que o hidrogênio em 2,33 ppm está em posição axial e que o hidrogênio em 2,68 ppm está em posição equatorial. Em relação ao hidrogênio em 4,66 ppm, também se pode afirmar que o mesmo é axial, pela magnitude das constantes de acoplamento.



**Figura 9:** Correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, representando dois sistemas spins ABX. Acoplamentos entre hidrogênios geminais estão representados em azul; entre hidrogênios vicinais, em vermelho.

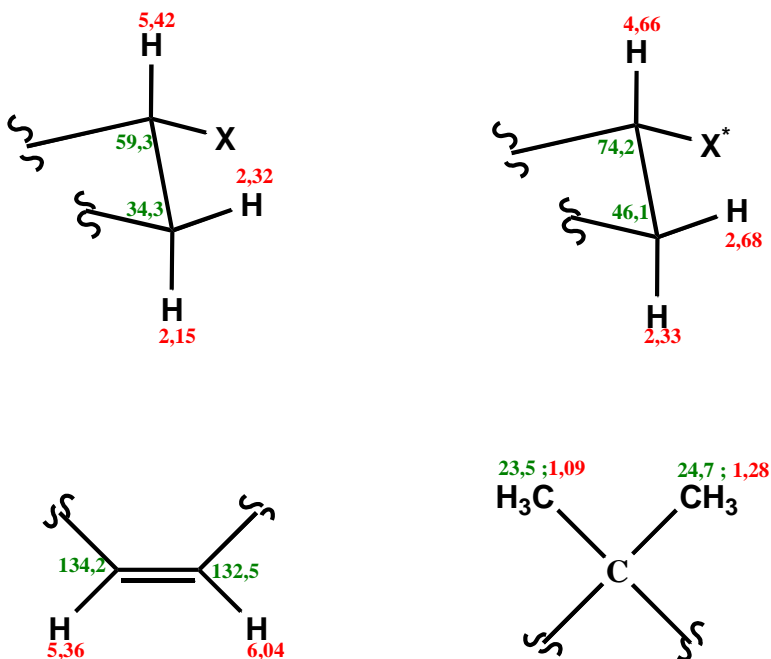
Em relação aos hidrogênios olefínicos em 6,04 e 5,36 ppm, as constantes de acoplamento ( $J=9,9$  Hz) sugerem que os mesmos tem configuração cis. A correlação entre ambos foi claramente observada no espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Fig. 10).



**Figura 10:** Correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY dos sinais de hidrogênios em 6,04 e 5,36 ppm.

Dos quatro grupamentos metila, dois foram identificados como sendo geminais (1,09 e 1,28 ppm) através do espectro de COSY.

O conjunto de dados permitiu propor as estruturas parciais abaixo (Figura 11).

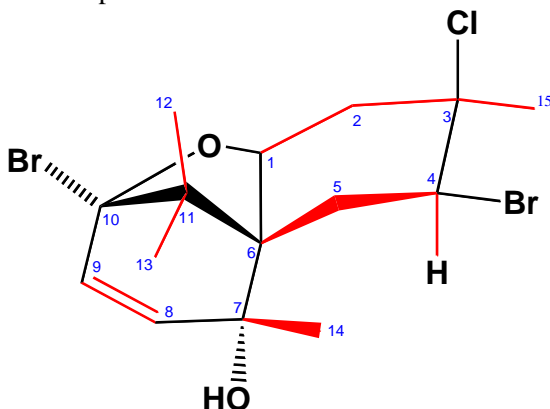


**Figura 11:** Estruturas parciais propostas para LCT1 com base nos dados de RMN (<sup>1</sup>H-RMN, COSY e HSQC).

Considerando o espectro de IV de LCT1, que já havia sugerido a presença do grupo OH, a presença de halogênios ligados a carbonos alifáticos pode ser inferida a partir das bandas em 777 e 657 cm<sup>-1</sup> (RÜCKER; NEUGEBAUER; WILLEMS, 2001). Apesar dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternários de LCT1 não serem conhecidos, a sua presença na estrutura podia ser inferida pela necessidade de conexões entre os sistemas ABX.

A partir do conjunto de dados espectrais, considerando a presença de quatro singletos de metila, quatro metinos, um grupo OH, um grupo CH=CH, além das ausências de metilas como dubleto ou tripleto, anéis aromáticos, etc., foi realizada pesquisa na base de dados Marinlit® utilizando a interface de busca por aspectos estruturais. Entre as hipóteses apresentadas, apenas o pacifenol apresentou valores de

deslocamento químico compatíveis com LCT1 (Fig.12). Este composto não havia sido relatado para *Laurencia catarinensis*.



**Figura 12:** Estrutura da substância LCT1 (pacifenol). O destaque em vermelho se refere às estruturas parciais propostas através da análise dos dados espectrais.

A posição do cloro para o pacifenol nos artigos consultados apresenta algumas diferenças. A posição equatorial do bromo é inequívoca em todos os artigos. Caccanese, Compagnini e Toscano (1986) representam de forma a deixar dúvida quanto à posição do carbono ligado ao átomo de cloro; já Kimura, Kamada e Tsujimoto (1999) não apresentam os dados espectroscópicos, mas representam o sistema como diequatorial. Entretanto, a posição do cloro e bromo deve ser axial-equatorial, com base na análise cristalográfica do composto originalmente isolado (SIMS et al., 1971) e na investigação estereoquímica realizada por Kaiser, Pitombo e Pinto (2001). Segundo a literatura (SIMS et al., 1971), o pacifenol funde entre 149 e 150,5 °C, o que está de acordo com o verificado para LCT1 (148,7-150,0 °C).

O pacifenol foi originalmente isolado de *Laurencia pacifica* e sua estrutura foi estabelecida através da cristalografia de raio X. Este foi o primeiro composto natural contendo cloro e bromo em sua estrutura (SIMS et al., 1971). A comparação com os dados da literatura permitiu confirmar que LCT1 corresponde ao pacifenol (Tabela 4). O pacifenol foi isolado, ainda, da *Laurencia nidifica* (KIMURA; KAMADA; TSUJIMOTO, 1999), *Laurencia claviformis* (ARGANDOÑA; MARTÍN; ROVIROSA, 1993), *Laurencia majuscula* (CACCAMESE;

COMPAGNINI; TOSCANO, 1986), *Laurencia elata* (DIAS; URBAN, 2011) e *Laurencia caduciramulosa* (CASSANO et al., 2008). No Brasil, foi isolado do molusco *Aplysia dactilomela* (KAISER, PITOMBO, PINTO, 2001).

**Tabela 4:** Dados de <sup>1</sup>H-RMN da substância LCT1, em comparação com a literatura para o pacifenol.

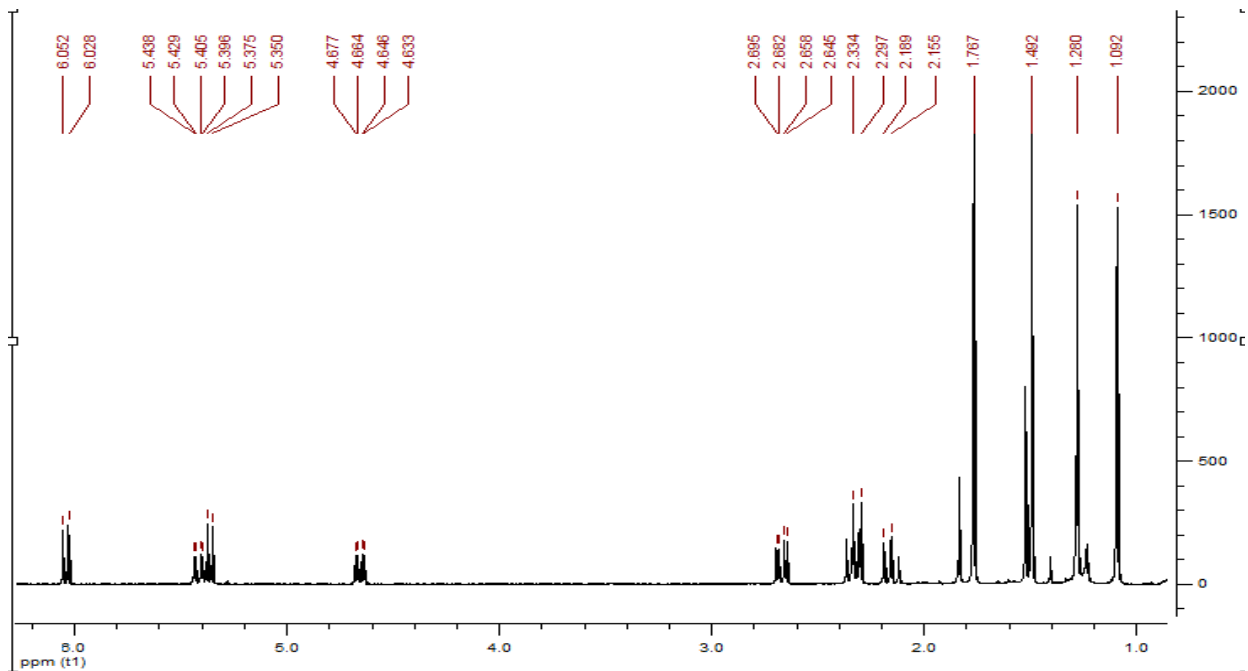
C	$\delta H$ (J Hz) – LCT1 CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz	$\delta H$ (J Hz) (CACCAMESE; COMPAGNINI; TOSCANO, 1986) CDCl <sub>3</sub> , 200 MHz	$\delta H$ (J Hz) (KAISER; PITOMBO; PINTO, 2001) CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz	$\delta H$ (J Hz) (NYS; COLL; BOWDEN,1993) CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz
1	4,66 dd (12,6; 5,1)	4,68 dd (12,5; 5,2)	4,61 dd (12,6; 5,2)	4,67 dd (12,6; 5,1)
2	2,68 dd (14,7; 5,1) 2,33 dd (14,7; 13,0)	2,69 dd (15,0; 5,2) 2,35 dd (15,0; 12,5)	2,63 dd (14,0; 5,2) 2,28 dd (14,0; 12,6)	2,68 dd (14,8; 5,1) 2,33 dd (14,8; 12,6)
3	-----	-----	-----	-----
4	5,42 dd (13,3; 3,8)	5,44 dd (13,1; 3,6)	5,25 dd (13,1; 3,6)	5,43 dd (13,1; 4,0)
5	2,32 dd (14,7;3,4) 2,15 dd (14,7; 13,3)	2,34 dd (14,4; 3,6) 2,18 dd (14,4; 13,1)	2,26 dd (14,3; 3,6) 2,10 dd (14,3; 13,1)	2,30 dd (10,8; 4,0) 2,16 dd (13,1; 10,8)
6	-----	-----	-----	-----
7	-----	-----	-----	-----
8	5,36 d (9,9)	5,38 d (9,8)	5,32 d (9,7)	5,38 d (9,8)
9	6,04 d (9,9)	6,06 d (9,8)	5,90 d (9,7)	6,04 d (9,8)
10	-----	-----	-----	-----
11	-----	-----	-----	-----
12	1,28 s	1,29 s	1,23 s	1,28 s
13	1,09 s	1,11 s	1,04 s	1,10 s
14	1,49 s	1,51 s	1,44 s	1,50 s
15	1,77 s	1,78 s	1,72s	1,77 s
OH	1,8 s	1,9 s	-----	-----

**Tabela 5:** Dados de  $^{13}\text{C}$ -RMN da substância LCT1, em comparação com a literatura para o pacifenol. **NO** = sinal não observado

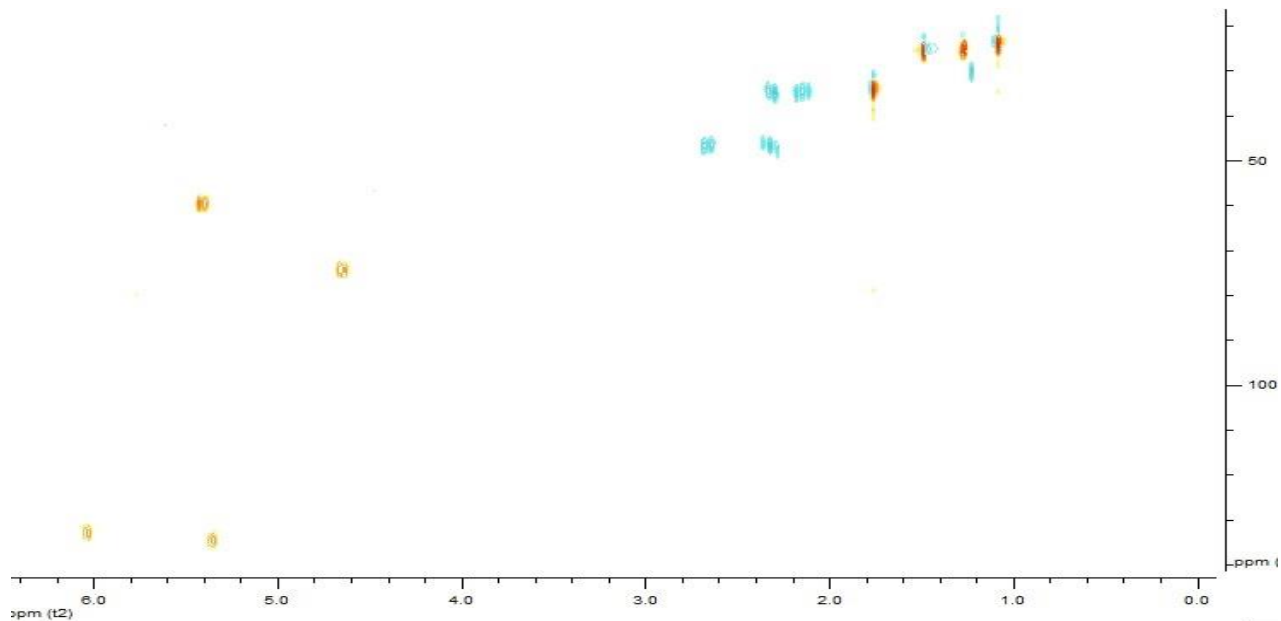
C	$\delta\text{C} - \text{LCT1}$ $\text{CDCl}_3, 50 \text{ MHz}$	$\delta\text{C}$ (KAISER; PITOMBO; PINTO, 2001) $\text{CDCl}_3, 75 \text{ MHz}$	$\delta\text{C}$ (NYS; COLL; BOWDEN,1993) $\text{CDCl}_3, 75 \text{ MHz}$
1	74,2	74,4	74,1
2	46,1	46,3	46,1
3	69,0	69,3	69,0
4	59,3	59,6	59,4
5	34,3	34,5	34,2
6	<b>NO</b>	53,6	53,3
7	77,1	77,6	77,0
8	134,2	134,5	134,3
9	132,5	132,7	132,4
10	<b>NO</b>	99,8	99,8
11	<b>NO</b>	49,3	52,0
12	24,7	24,7	24,6
13	23,5	23,6	23,5
14	25,1	25,3	25,1
15	33,6	33,9	33,6

Kimura, Kamada e Tsujimoto (1999) relataram a atividade do pacifenol frente ao vírus herpético do tipo 1 (HSV-1), com  $\text{IC}_{50}$  de  $7,6 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . O composto inibiu a citoquinase do ouriço do mar *Tetrapyrgus niger* (ROVIROSA et al., 1999) e também foi testado para atividade inseticida frente à larva do mosquito *Culex pipiens pallens*, porém, não apresentou atividade (WATANABE; UMEDA; MIYAKADO, 1989). Segundo Cassano e colaboradores (2008), o pacifenol possui atividade antiincrustante frente ao mexilhão perna-perna.

Pacifenol apresentou atividade anti-inflamatória diminuindo a produção de leucotrieno B4 e de tromboxano B2, gerando uma resposta inibitória da inflamação (D'ORAZIO et al., 2012).

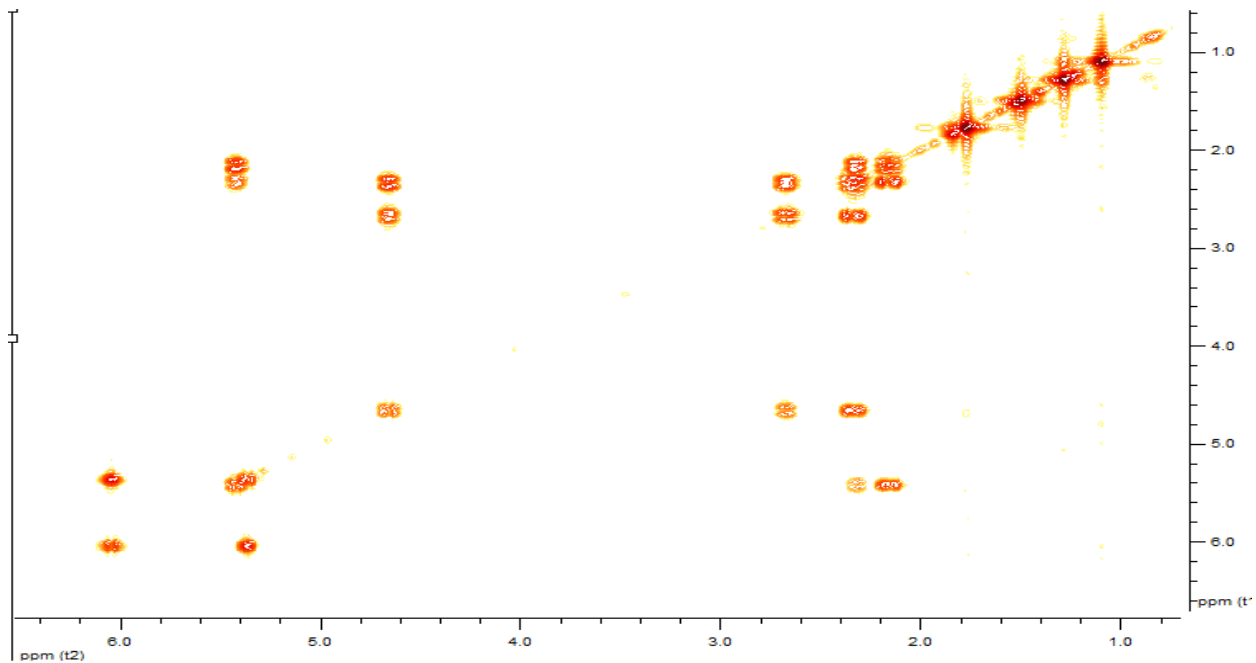


**Figura 13:** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT1.



**Figura 14:** Espectro de HSQC-DEPT (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância LCT1.





**Figura 15:** Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT1.

#### 4.1.2 Substância LCT2

A substância LCT2 (37,4 mg) foi isolada de diferentes frações, após a purificação por CLMP (Fig. 6) como sólido amarelo, inodoro. Apresenta-se na CCD em Hx/AcOEt (9:1) como uma mancha em Rf 0,25. A substância não extingue a fluorescência em 254 nm, nem apresenta fluorescência em 366 nm; após a revelação com anisaldeído sulfúrico, a substância adquire coloração rosa-clara.

O espectro de infravermelho evidenciou a presença de grupamento hidroxila (pelo característico estiramento da ligação O-H entre 3400 a 3100  $\text{cm}^{-1}$ ) e de C-O de éter ou álcool, pela banda intensa em 1080  $\text{cm}^{-1}$ .

No espectro  $^1\text{H}$  RMN os sinais em 4,63 (1 H, dd,  $J=14,0$ ; 4,6 Hz) e 4,23 (1 H, dd,  $J=13,2$ ; 2,5 Hz) e 4,01 ppm (singleto largo) se referem a hidrogênios geminais a um grupo eletronegativo, como halogênio ou oxigênio. Entre 2,09 e 2,53 ppm há quatro sinais que sugerem a presença de dois grupos metilenos. Os singletos em 1,71 (3 H), 1,43 (3 H), 1,26 (3 H) e 1,14 ppm (3 H) correspondem a quatro metilas. Dessa forma, a substância LCT2 apresentou algumas semelhanças ao pacifenol (LCT1), diferindo deste pela ausência de hidrogênios olefínicos e pela presença de um singleto em 3,18 (1 H), o qual pode tratar-se de um hidrogênio ligado a C que faça parte de um grupo epóxido.

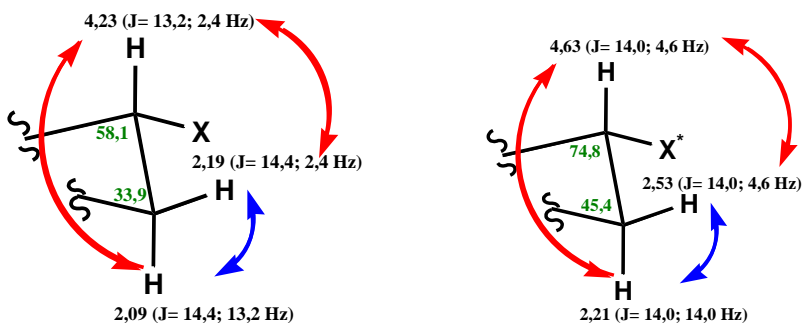
Nos espectros de HSQC-DEPT,  $^{13}\text{C}$ -RMN e HMBC foram visualizados sinais para quatro metinos, dois metilenos, quatro metilas e cinco carbonos quaternários ( $\delta\text{C}$  49,6;  $\delta\text{C}$  50,7;  $\delta\text{C}$  61,4;  $\delta\text{C}$  68,1;  $\delta\text{C}$  113,5).

**Tabela 6-** Dados da substância LCT2, a partir dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN, HSQC-DEPT, COSY e HMBC.

$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ ( $^1\text{H}$ RMN)
113,5 (C)	-----
74,8 (CH)	4,01 sl
74,8 (CH)	4,63 dd (14,0; 4,6 Hz)
68,10 (C)	-----
61,4 (C)	-----
60,0 (CH)	3,18 s
58,1 (CH)	4,23 dd (13,2; 2,4 Hz)
50,7 (C)	-----
49,6 (C)	-----
45,4 (CH <sub>2</sub> )	2,21 dd (2x 14,0 Hz) 2,53 dd (14,0; 4,6 Hz)
33,9 (CH <sub>2</sub> )	2,09 dd (14,4; 13,2 Hz) 2,19 (14,4; 2,4 Hz)
31,3 (CH <sub>3</sub> )	1,71 s
24,8 (CH <sub>3</sub> )	1,26 s
21,7 (CH <sub>3</sub> )	1,43 s
18,4 (CH <sub>3</sub> )	1,14 s

A análise do espectro de correlação 1H-1H COSY mostra dois sistemas de spins ABX (Fig. 16). O primeiro sistema ABX demonstrado é formado pelos sinais em  $\delta\text{H}$  4,63,  $\delta\text{H}$  2,53 e  $\delta\text{H}$  2,21. O sinal em  $\delta\text{H}$  4,63 (dd,  $J= 14,0; 4,6$  Hz) correlaciona com os sinais de hidrogênio em 2,53 e 2,21 ppm e estes correlacionam entre si. Tendo em vista as constantes de acoplamento dos sinais em 2,53 (1 H, dd,  $J= 14,0; 4,6$  Hz) e 2,21 ppm (1 H, dd,  $J= 2x 14,0$  Hz), podemos afirmar que novamente o sistema ABX faz parte de um ciclo em que o primeiro hidrogênio é equatorial, sendo o segundo axial. O hidrogênio que ressona em 4,63 ppm deve ser também axial, por apresentar uma constante de acoplamento vicinal acima de 7 Hz.

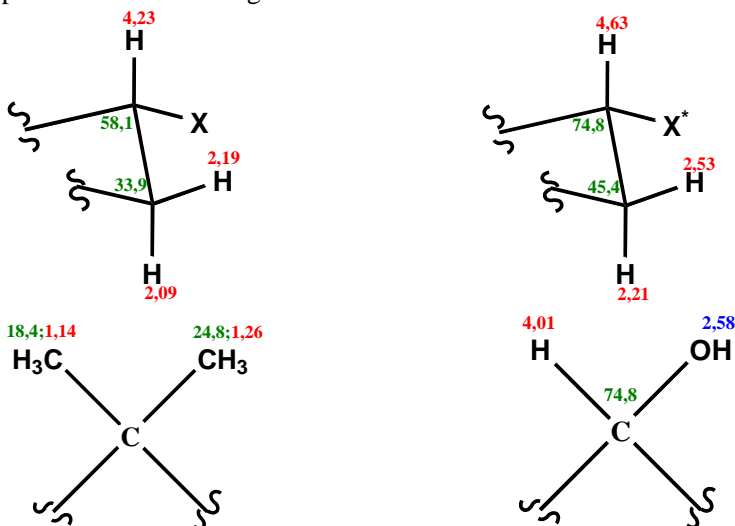
O segundo sistema ABX é constituído pelos sinais em  $\delta\text{H}$  4,23,  $\delta\text{H}$  2,19 e  $\delta\text{H}$  2,09. O hidrogênio em 4,23 ppm (dd,  $J= 13,2; 2,5$  Hz) correlaciona com os sinais de hidrogênio em 2,19 e 2,09 ppm e estes correlacionam entre si. Analisando as constantes de acoplamento dos sinais em 2,09 (1 H, dd,  $J= 14,4; 13,2$  Hz) e 2,19 (1 H, dd,  $J= 14,4; 2,4$  Hz) ppm, pode-se afirmar que o primeiro hidrogênio é axial e que o segundo é equatorial. Em relação ao hidrogênio em 4,23 ppm também se pode afirmar que o mesmo é axial.



**Figura 16:** Representação dos dois sistemas ABX da substância LCT2. Acoplamentos entre os hidrogênios geminais estão representados em azul; entre hidrogênios vicinais em vermelho.

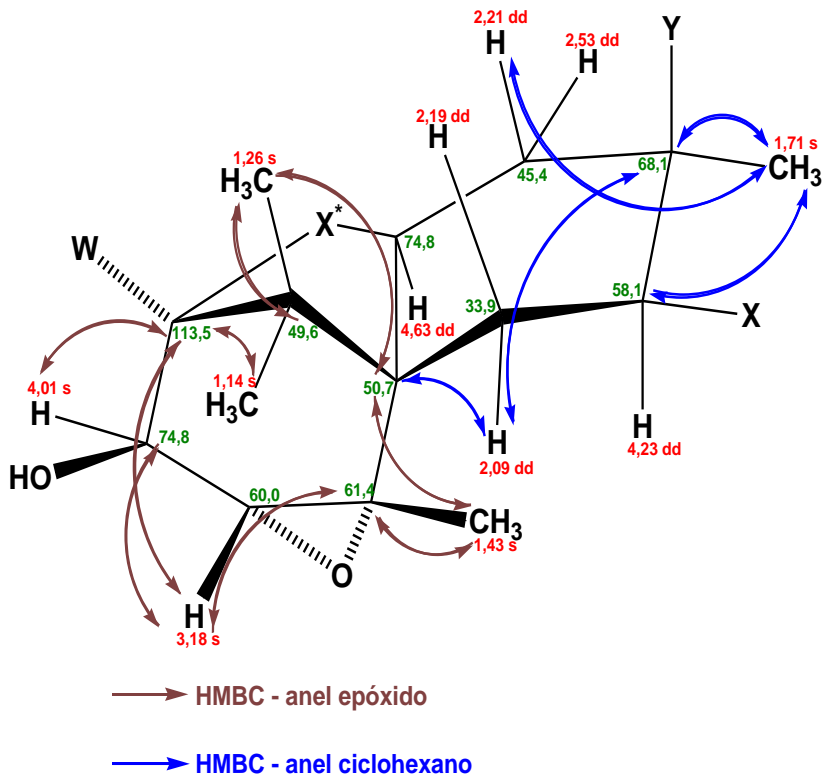
Dos grupamentos metila, dois foram identificados como sendo geminais (1,14 e 1,26 ppm), através do espectro de COSY. No espectro de COSY é observada a correlação do hidrogênio em 4,01 (singlete largo) com o hidrogênio que ressona em 2,58 ppm (singlete largo), atribuído a um grupo OH.

O conjunto de dados espectrais permitiu propor as estruturas parciais conforme a figura 17.



**Figura 17:** Estruturas parciais propostas para LCT2.

A análise detalhada do espectro de HMBC permitiu propor a conectividade entre as estruturas parciais, representada na Figura 18.



X, X\*, Y e W - átomos eletronegativos (halogênios ou oxigênio)

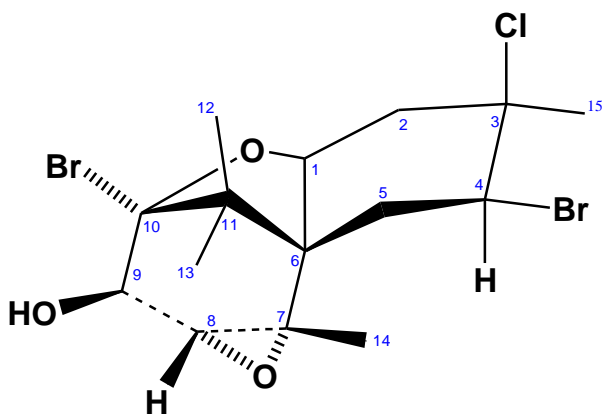
**Figura 18:** Correlações visualizadas no espectro de HMBC para a substância LCT2.

O anel ciclohexano contendo os substituintes X e Y apresenta grande semelhança com os deslocamentos químicos de LCT1, sugerindo que X e Y podem ser halogênios. O átomo eletronegativo que deve estar ligado ao carbono quaternário em 68,09 é o cloro, pois apresenta deslocamento químico compatível (RÜCKER; NEUGEBAUER; WILLEMS, 2001). Os deslocamentos químicos do metino em  $\delta$ C 58,1,

do carbono quaternário em  $\delta C$  68,10 e dos hidrogênios da metila ressoando em  $\delta H$  1,71 estão de acordo com os descritos na literatura para sistemas dihalogenados em ciclohexano (GONZÁLEZ et al., 1979). Da mesma forma, considerando X\* como uma ponte éter e o substituinte em W como um átomo de bromo, pode-se explicar que C-10 apresente deslocamento químico tão alto para um carbono alifático.

A partir do conjunto de dados espectrais, indicando a presença de quatro simpletos de metila, dois metilenos, dois metinos e um grupo OH, além da ausência de hidrogênios olefínicos, e de anéis aromáticos foi realizada a pesquisa na base de dados MARINLIT, utilizando a interface de busca por aspectos estruturais. Entre as hipóteses apresentadas o johnstonol foi a mais plausível.

Johnstonol foi originalmente isolado de *Laurencia johnstonii* coletada no norte do Golfo da Califórnia (SIMS et al., 1972). O johnstonol também foi isolado da *Laurencia nidifica* (KIMURA; KAMADA; TSUJIMOTO, 1999), *Laurencia tristicha* (SUN et al., 2005) e, no Brasil, foi isolado do molusco *Aplysia dactilomela* (KAISER; PITMBO; PINTO, 2001).



**Figura 19:** Estrutura da substância LCT2 (johnstonol).

**Tabela 7:** Dados de  $^1\text{H}$  RMN da substância LCT2, em comparação com a literatura com johnstonol.

C	$\delta\text{H}$ (J Hz) – LCT2 CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz	$\delta\text{H}$ (J Hz) (KAISER, 2000) CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz
1	4,63 dd (14,0; 4,6)	4,60 dd (13,62; 4,59)
2	2,53 dd (14,0; 4,6) 2,21 dd (2x 14,0)	2,50 dd (14,47; 4,59) 2,18 dd (14,47; 13,62)
3	-----	-----
4	4,23 dd (13,2; 2,4)	4,24 dd (12,97; 2,82)
5	2,19 dd (14,4; 2,4) 2,09 dd(14,4; 13,2)	2,16 dd (14,52; 2,82) 2,07 dd (14,52; 12,97)
6	-----	-----
7	-----	-----
8	3,18 s	3,15 s
9	4,01 br s	3,98 d (2,31)
10	-----	-----
11	-----	-----
12	1,26 s	1,23 s
13	1,14 s	1,12 s
14	1,43 s	1,40 s
15	1,71s	1,68 s
OH	2,58 sl	2,61 d (2,31)

**Tabela 8:** Dados de  $^{13}\text{C}$  RMN da substância LCT2, em comparação com dados de literatura para johnstonol.

C	$\delta\text{C} - \text{LCT2}$ ( $^{13}\text{C}$ RMN/ HMBC) $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz/	$\delta\text{C}$ (KAISER, 2000) $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz	HMBC - LCT2 $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz
1	74,8	74,59	-----
2	45,4	45,16	C74,8; C68,1; C58,1; C31,3
3	68,10	67,88	-----
4	58,1	57,91	C68,1
5	33,9	33,65	C68,1; C61,4; C58,1; C50,7
6	50,7	50,43	-----
7	61,4	61,23	-----
8	60,0	59,75	C113,5; C74,8; C61,4
9	74,8	74,61	C113,5; C61,4; C60,0
10	113,5	113,40	-----
11	49,6	49,36	-----
12	24,8	24,60	C113,5; C50,7; C49,6; C18,4
13	18,4	18,19	C113,5; C50,7; C49,6; C24,8
14	21,7	21,51	C61,4; C60,0; C50,7
15	31,3	31,09	C68,1; C58,1; C45,4

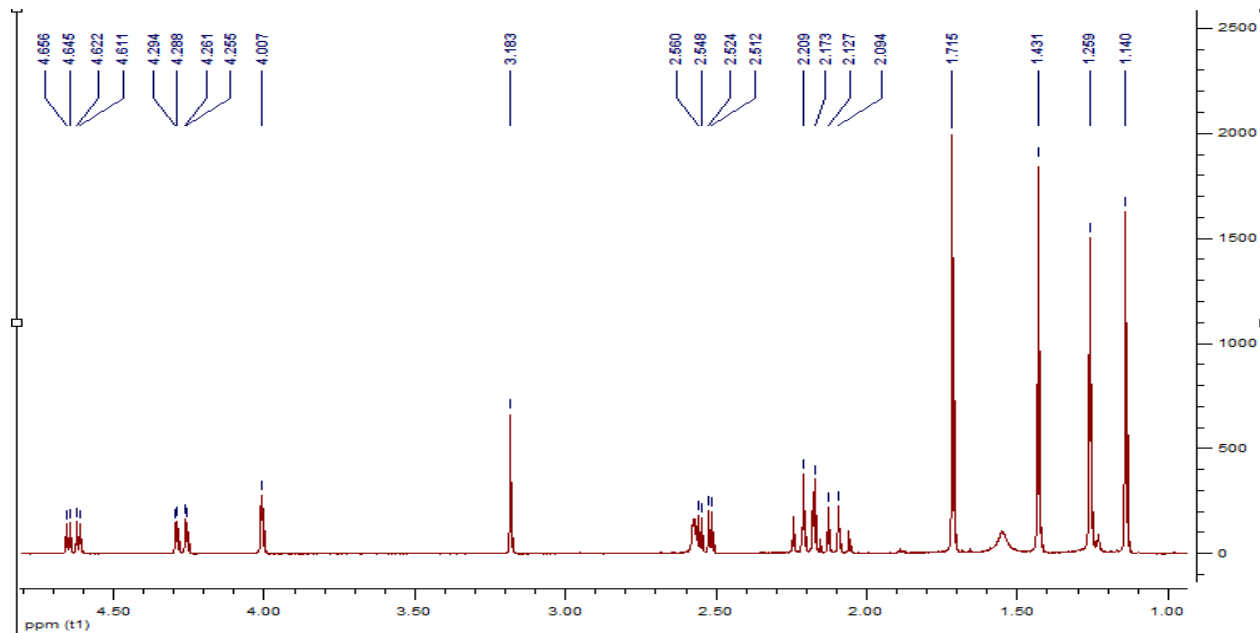
Os dados espectrais de LCT2 (deslocamentos químicos, multiplicidade e constantes de acoplamento) estão de acordo com os descritos na literatura (conforme as Tabelas 7 e 8). Como evidência adicional, foi verificado o ponto de fusão; a substância LCT2 funde em 178,1 a 178,9 °C, que está de acordo com o descrito para o johnstonol, que funde a 178°C (SIMS et al., 1972). O conjunto dos dados permitiu confirmar que LCT2 é o johnstonol. Esta substância não foi isolada no estudo anteriormente desenvolvido com *Laurencia catarinensis* da Ilha do Arvoredo.

A investigação da estereoquímica feita por Kaiser (2000) para o johnstonol confirmou que a metila em 1,14 ppm se localiza do mesmo lado do ciclo em que se localiza a hidroxila; a metila em 1,26 ppm se localiza do lado oposto (pois apresenta correlação com os hidrogênios na posição 2 e 5), conforme o experimento NOESY. Foi observado também que não ocorre o acoplamento entre os hidrogênios nas posições 8 e 9, pois o hidrogênio em 3,18 ppm está em posição pseudo-axial e o hidrogênio em 4,01 ppm em pseudo-equatorial, justificando assim o singlete em 3,18 ppm, pois o ângulo formado entre eles não é favorável

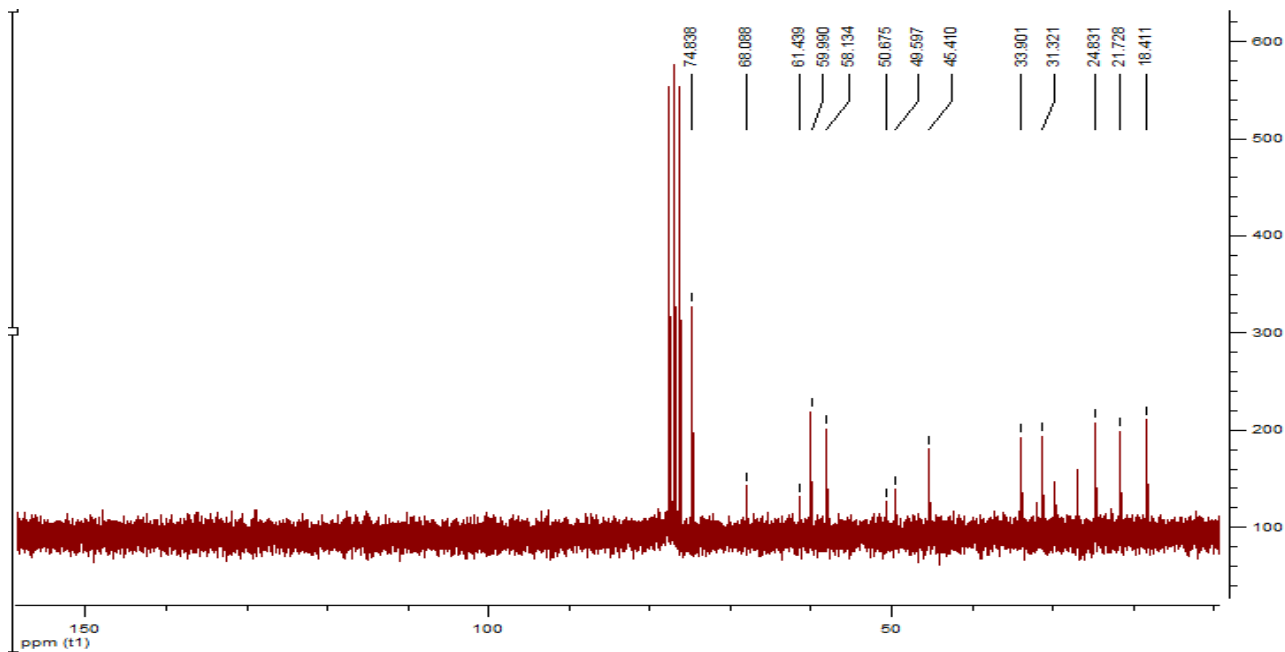


para o acoplamento. O ciclohexano contendo o cloro e o bromo deve estar em conformação de barco invertido com os halogênios em posição axial-equatorial (KAISER; PITOMBO; PINTO, 2001).

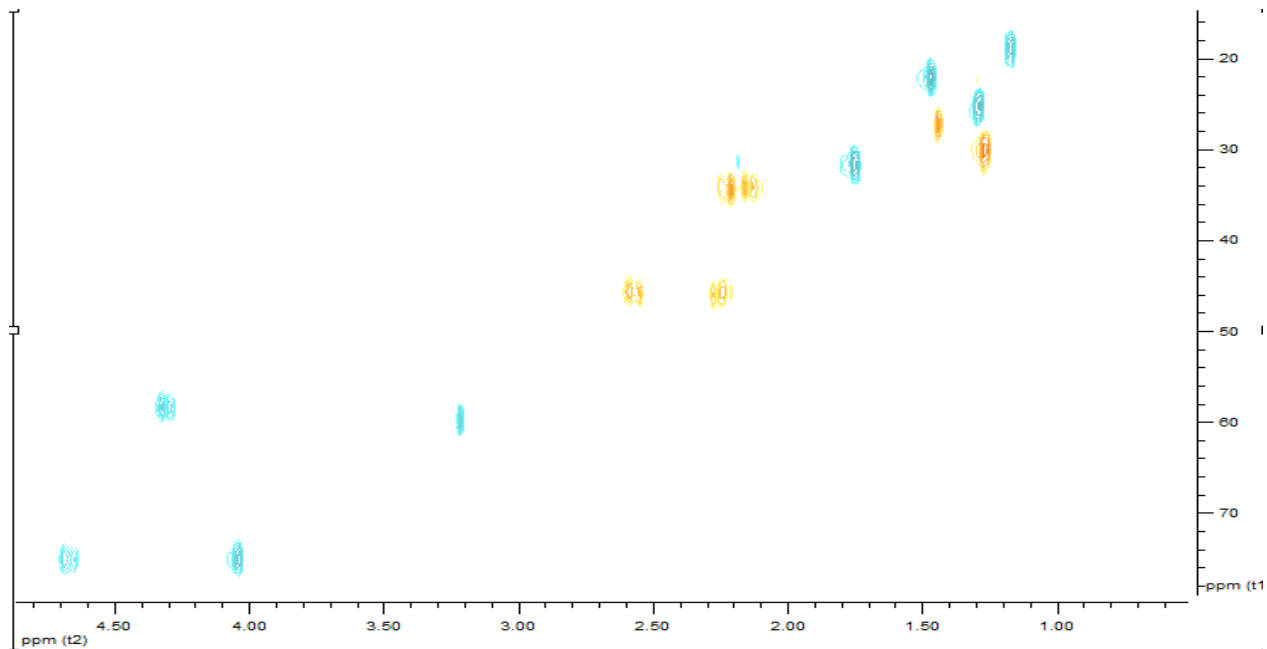
Segundo Kimura, Kamada e Tsujimoto (1999), o johnstonol não apresentou atividade contra o vírus herpético do tipo 1. Em 2005, Sun e colaboradores relataram que esta substância não apresenta atividade citotóxica frente às linhagens celulares do tipo A549 (adenocarcinoma de pulmão), BGC823 (câncer de estômago), BEL7402 (carcinoma hepatocelular), HCT8 (câncer de colón) e células HeLa.



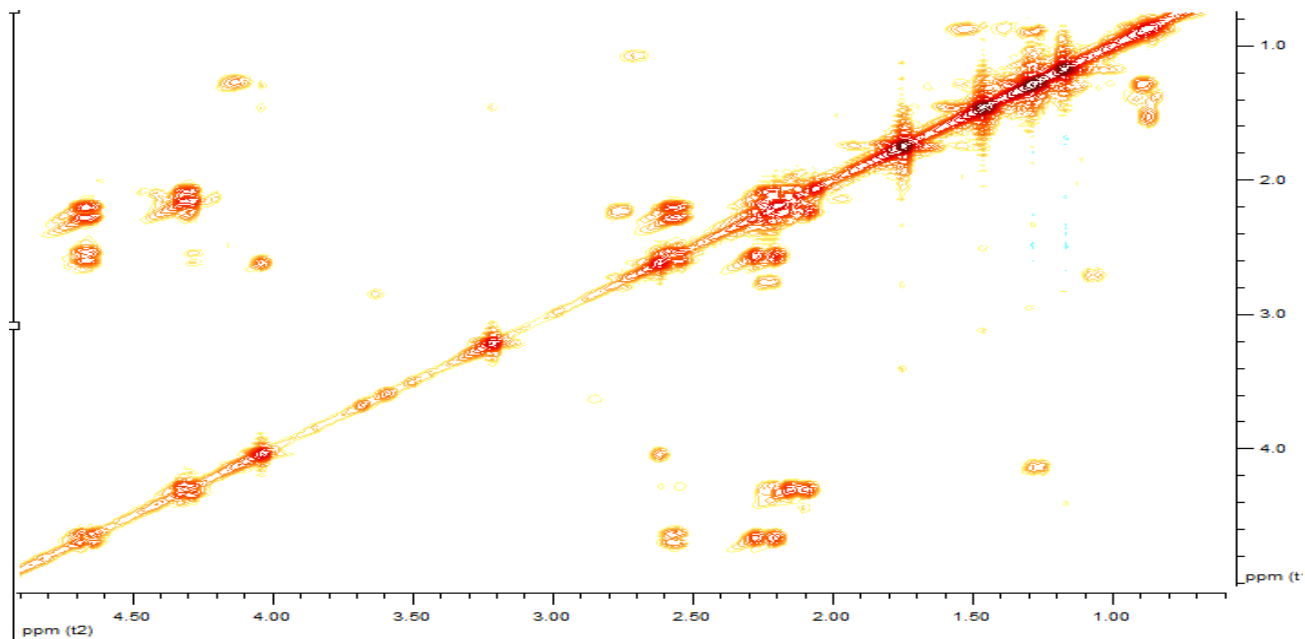
**Figura 20:** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT2.



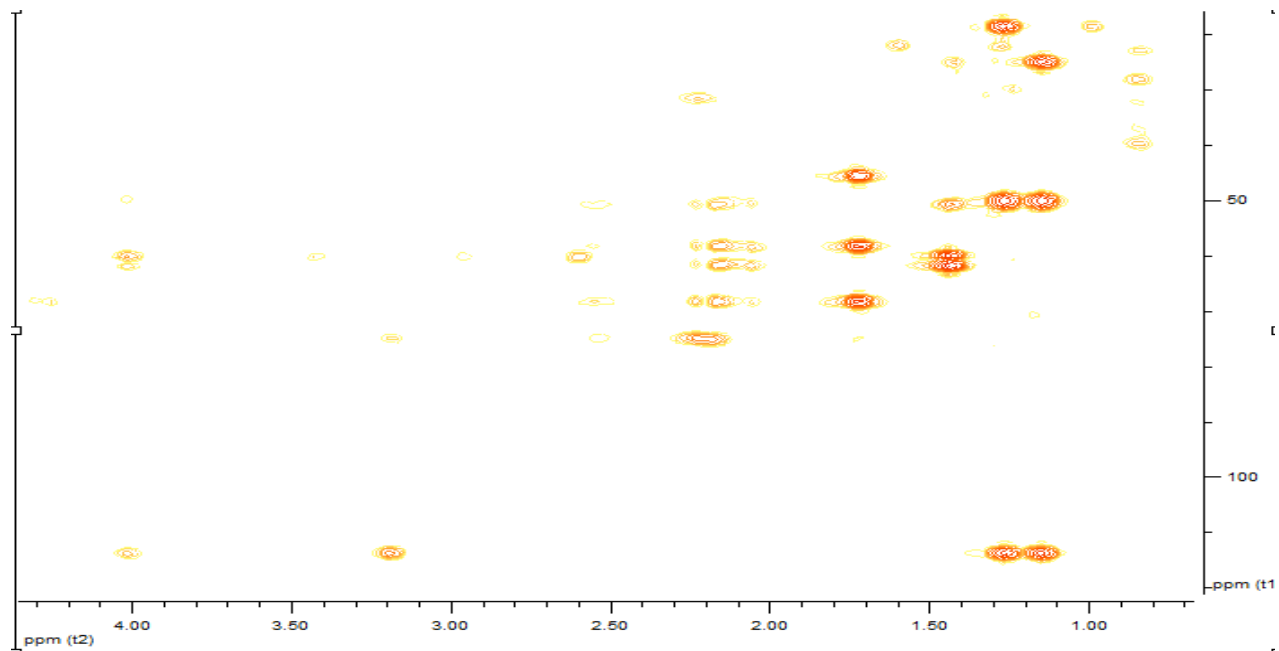
**Figura 21:** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) da substância LCT2.



**Figura 22:** Espectro de HSQC-DEPT da substância LCT2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).



**Figura 23:** Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT2.



**Figura 24:** Espectro de HMBC da substância LCT2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

### 4.1.3. Substância LCT3

A substância LCT3 (41,4 mg) foi isolada de diferentes frações, após a purificação por CLAE (Fig. 6), como um sólido branco e inodoro. Apresenta-se na CCD em Hx/AcOEt (9:1) como uma mancha em Rf 0,47. O substância não apresenta fluorescência em 366 nm, nem extingue a fluorescência em 254 nm, mas adquire cor roxa após revelação com anisaldeído sulfúrico.

À semelhança das substâncias anteriores, o espectro de infravermelho sugeriu a presença do grupamento hidroxila (pelo característico estiramento da ligação O-H entre 3400 a 3100  $\text{cm}^{-1}$ ) e possivelmente de éter (pela banda intensa em 1070  $\text{cm}^{-1}$ ).

No espectro  $^1\text{H}$  RMN, a região entre 5,0 e 3,0 ppm apresentou dois singletos (1 H cada) em 3,64 e 3,06 ppm (sugestivo de prótons que façam parte de grupo epóxido) e dois outros sinais em 4,72 (1 H, dd,  $J=1308$ ; 3,8 Hz) e 4,01 ppm (1 H, ddd,  $J=5,7$ ; 3,2; 2,7 Hz) correspondem a hidrogênios geminais a grupos eletronegativos (como halogênio ou oxigênio). Em torno de 2,5 ppm, ressonam três hidrogênios (aparente multipletto), enquanto outros dois hidrogênios ressonam em 2,12 e 2,01 ppm (d,  $J=6$  Hz). Os singletos em 1,90 (3 H), 1,51 (3 H), 1,46 (3 H) e 0,96 ppm (3 H) correspondem a metilas.

O espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN indicou a presença de 15 carbonos, sendo cinco quaternários ( $\delta\text{C}$  75,5;  $\delta\text{C}$  71,5;  $\delta\text{C}$  61,0;  $\delta\text{C}$  50,2 e  $\delta\text{C}$  46,8), quatro metinos (69,8; 62,1; 56,6 e 55,6), dois metilenos (47,2 e 33,9) e quatro metilas. Assim, a substância LCT3 apresentou grande semelhança com o johnstonol (LCT2), diferindo pelo deslocamento químico das metilas em 1,90 e 0,96 ppm e de um dos metinos.

A partir do conjunto dos dados espectrais, considerando a presença de quatro singletos de metila, quatro metinos, dois metilenos, um grupo OH, além da ausência de metilas como dubleto ou tripleto, a busca por aspectos estruturais realizada na pesquisa da base de dados Marinlit® apontou alguns sesquiterpenos como estruturas hipotéticas, sendo o prepacifenol epóxido o único que apresentou dados espectroscópicos compatíveis com LCT3 (Tabelas 9 e 10). Esta substância também não havia sido isolado previamente de *Laurencia catarinensis* da Ilha do Arvoredo.

**Tabela 9:** Comparação dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  RMN da substância LCT3 com os dados descritos para prepacifenol epóxido.

<b>C</b>	<b><math>\delta\text{H}</math> (J Hz) LCT3 <math>\text{CDCl}_3</math>, 400 MHz</b>	<b><math>\delta\text{H}</math> (J Hz) Prepacifenol epóxido (KAISER; PITOMBO; PINTO, 1998) <math>\text{CDCl}_3</math>, 300 MHz</b>	<b><math>\delta\text{H}</math> (J Hz) Prepacifenol epóxido (Mc PHAIL et al., 1999), <math>\text{CDCl}_3</math>, 400 MHz</b>
<b>1</b>	2,12 ddd (14,4; 3,8; 2,4) 2,52 dd (14,4; 13,4)	2,10 ddd (14,0; 3,9; 2,3) 2,48 t (14,0; 13,8)	2,14 m (4,0; 2,0) 2,54 t (14,0)
<b>2</b>	4,72 dd (13,4; 3,8)	4,69 dd (13,8; 3,9)	4,73 dd (13,0; 4,0)
<b>3</b>	-----	-----	-----
<b>4</b>	2,50 d (3,2) 2,50 d (3,2)	2,47d (3,4) 2,47d (3,3)	2,52 m (5,0; 3,0) 2,52 m (5,0; 3,0)
<b>5</b>	4,01 ddd (6,0; 3,2; 2,4)	3,98 dq (5,9; 3,4; 3,3; 2,3)	4,03 sept (3,0)
<b>6</b>	-----	-----	-----
<b>7</b>	-----	-----	-----
<b>8</b>	-----	-----	-----
<b>9</b>	3,64 s	3,62 s	3,65 s
<b>10</b>	3,06 s	3,06 s	3,06 s
<b>11</b>	-----	-----	-----
<b>12</b>	1,90 s	1,88 s	1,91 s
<b>13</b>	0,96 s	0,95 s	0,95 s
<b>14</b>	1,46 s	1,45 s	1,53 s
<b>15</b>	1,51 s	1,48 s	1,48 s
<b>OH</b>	2,01 d (6,0)	1,99 d (5,9)	-----

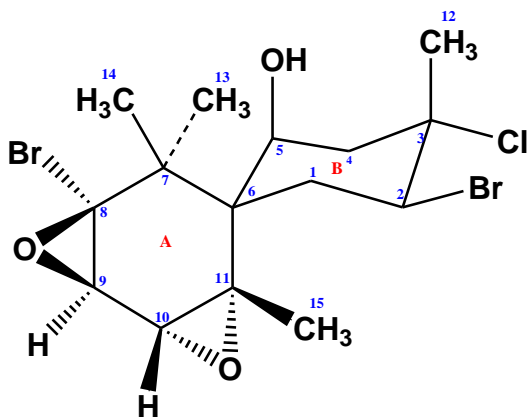


**Tabela 10:** Comparação dos deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  RMN da substância LCT3 com os dados descritos para prepacifenol epóxido.

C	$\delta\text{C}$ LCT3 $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz	$\delta\text{C}$ Prepacifenol epóxido (KAISER; PITOMBO; PINTO, 1998 $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz	$\delta\text{C}$ Prepacifenol epóxido (Mc PHAIL et al., 1999) $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz
1	33,9	33,80	33,9
2	62,1	62,06	62,1
3	71,5	71,47	71,5
4	47,2	47,08	47,2
5	69,8	69,69	69,8
6	50,2	50,04	50,2
7	46,8	46,88	46,8
8	75,5	75,40	75,5
9	55,6	55,49	55,6
10	56,6	56,53	56,7
11	61,0	60,91	61,0
12	28,0	27,95	28,0
13	24,3	24,26	24,3
14	27,1	27,08	27,2
15	22,1	22,07	22,1

Prepacifenol epóxido (Fig. 25) foi primeiramente isolado de *Aplysia californica* (FAULKNER; STALLARD; IRELAND, 1974). Este substância também já foi relatado para *Aplysia dactilomela* coletada no Brasil (KAISER; PITOMBO; PINTO, 1998) e na África do Sul (McPHAIL et al., 1999). Estas espécies costumam se alimentar de algas do gênero *Laurencia*, sendo que muitos metabólitos relatados para o molusco são considerados originários da sua dieta. Prepacifenol epóxido já foi isolado de *Laurencia okamurai* (OJIKI; SHIZURI; YAMADA, 1982) e *Laurencia nidifica* (KIMURA; KAMADA; TSUJIMOTO, 1999).

Os dados espectrais de LCT3 estão de acordo com os descritos na literatura para o prepacifenol epóxido (conforme as Tabelas 9 e 10). Assim, o conjunto dos dados permitiu confirmar que LCT3 é o prepacifenol epóxido.



**Figura 25:** Estrutura do prepaicifenol epóxido. As letras A e B correspondem aos anéis, cuja estereoquímica é discutida.

A estereoquímica do anel B pode ser proposta com base nas constantes de acoplamento para H-2 (que deve ser axial, logo o átomo de bromo é equatorial) e H-5 (que deve ser equatorial; ddd, com 2 constantes pequenas e uma de 6 Hz, devida ao acoplamento com a hidroxila geminal, cujo hidrogênio ressona como dubleto, também com constante de 6 Hz). Outra evidência de que a hidroxila da posição 5 está em posição axial é o seu efeito sobre o deslocamento químico dos hidrogênios da metila em C-3: eles ressonam em 1,90 ppm, o que poderia sugerir uma configuração diaxial para os halogênios em C-2 e C-3 (GONZÁLEZ et al., 1979). Entretanto, o átomo de bromo em C-2 é equatorial, conforme evidenciado pela constante de acoplamento de H-2; além disso, os valores de deslocamentos químicos para os carbonos portadores destes halogênios estão de acordo com os previstos na literatura para um sistema de halogênios em configuração diequatorial (GONZÁLEZ et al., 1979). Assim, o deslocamento químico dos hidrogênios da metila em C-12 (como axial) pode ser explicado pela presença do grupo hidroxila axial em C-5 (GONZÁLEZ et al., 1979). Tal efeito já foi observado em outros metabólitos de *Laurencia* isolados anteriormente em nosso grupo (LHULLIER et al., 2010).

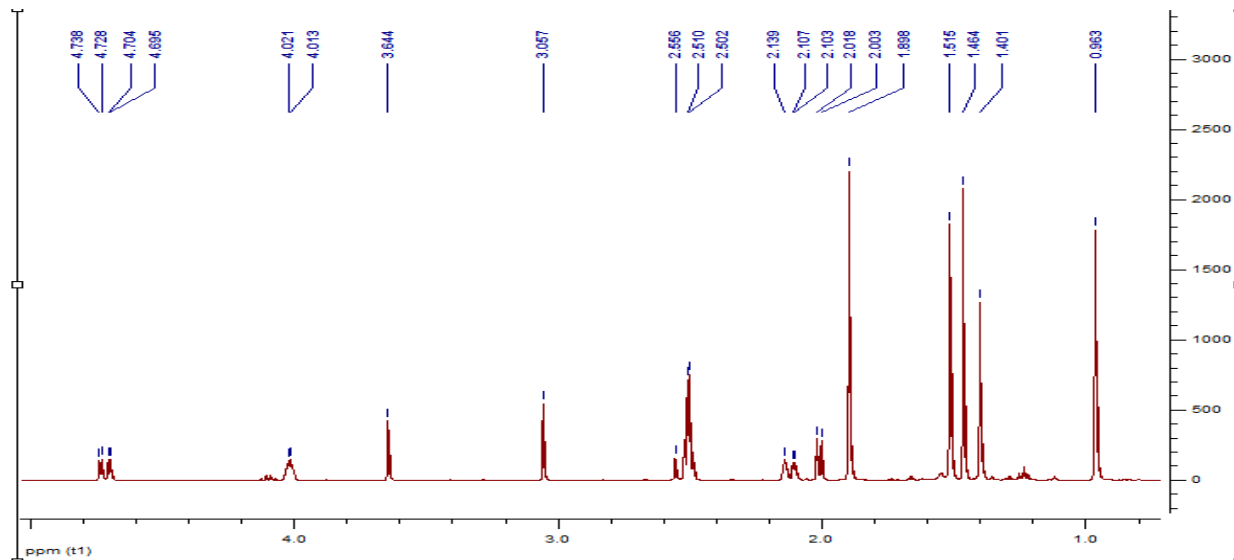
O espectro de  $^1\text{H}$  RMN indicou uma correlação em W (correlação de longa distância entre os hidrogênios, com uma constante de acoplamento de 0 a 10 Hz, segundo Rücker, Neugebauer e Willems,

(2001) entre H-1 e H-5, observada através da constante de acoplamento ( $J= 2,4$  Hz) destes hidrogênios.

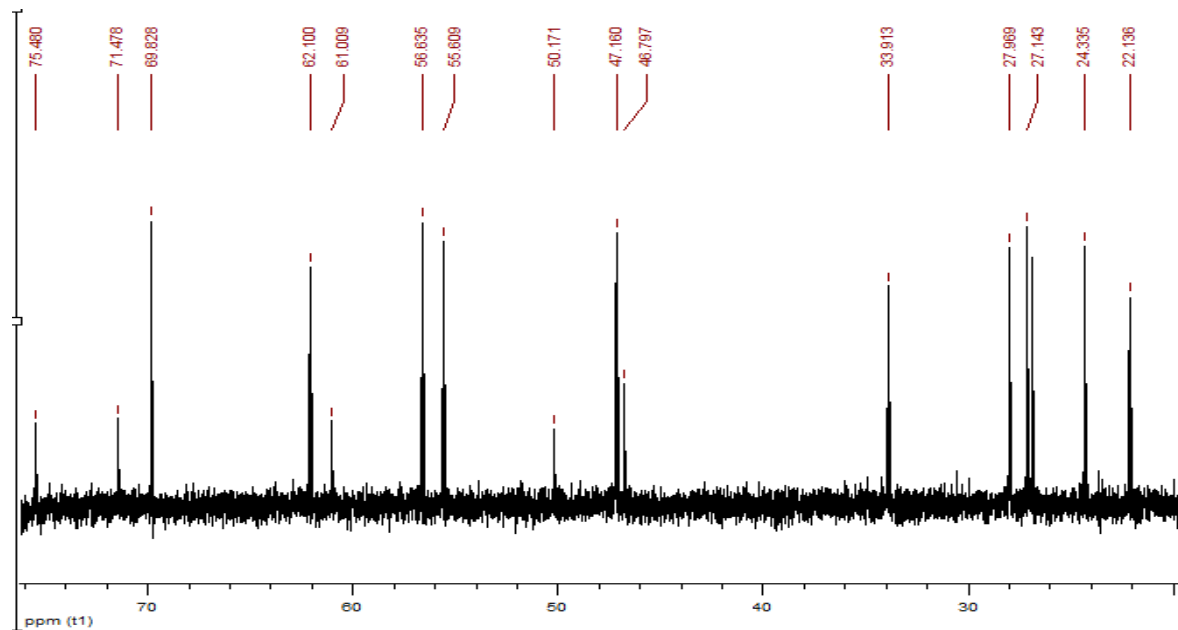
A ausência do acoplamento vicinal entre os hidrogênios do grupo epóxido ( $\delta H$  3,64 e  $\delta H$  3,06) indica que os mesmos estão em diferentes anéis. A evidência conclusiva se dá pelo deslocamento químico; o hidrogênio que está ligado ao exo-epóxido ( $\delta H$  3,06) não sofre o efeito de blindagem como o hidrogênio em 3,64 ppm que está ligado ao endo-epóxido (POHLIT; FERRAZ., 1995).

A estereoquímica do prepacifenol epóxido foi originalmente deduzida pelos detalhes dos dados fornecidos pelo  $^1H$  RMN e confirmada pela reação de conversão do prepacifenol epóxido em johnstonol (IRELAND et al., 1976). LCT3 apresentou faixa de fusão entre 95,1 e 96,7 °C, o que está de acordo com o referido na literatura (95-97 °C, segundo MCPHAIL et al., 1999).

Segundo Kimura, Kamada e Tsujimoto (1999), o prepacifenol epóxido não apresentou atividade contra o vírus herpético do tipo 1.



**Figura 26:** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). da substância LCT3. O sinal em  $\delta\text{H}$  1,40 se refere a resíduo de ciclohexano.



**Figura 27:** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) da substância LCT3.

#### 4.1.4. Substância LCT4

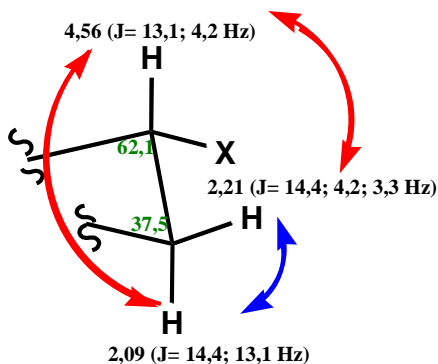
LCT4 (3,5 mg), foi isolado como óleo incolor e inodoro, após a purificação por CLAE (Fig. 6) da fração B17-19. Apresenta-se na CCD em Hx/AcOEt (9:1) como uma mancha em Rf 0,68; após revelação com anisaldeído sulfúrico, adquire cor roxa. A substância não apresenta fluorescência em 366 nm, nem extingue a fluorescência em 254 nm.

O espectro  $^1\text{H}$  RMN apresentou dois singletos em 3,62 e 3,06 ppm (sugestivos de grupo epóxido) e um sinal em 4,56 (1 H, dd,  $J = 13,1; 4,2$  Hz), que sugerem tratar-se de hidrogênios geminais a um grupo eletronegativo, como halogênio ou oxigênio. Entre 2,30 e 1,50 ppm há seis sinais que sugerem a presença de três grupos metilenos. Os quatro singletos em  $\delta 1,69$ ,  $\delta 1,45$ ,  $\delta 1,34$  e  $\delta 0,95$  correspondem a metilas. Nos espectros de HSQC-DEPT e de  $^{13}\text{C}$  RMN foram visualizados 15 carbonos, cinco carbonos quaternários ( $\delta 75,8; \delta 70,8; \delta 59,6; \delta 47,5$  e  $\delta 45,2$ ), três metinos, três metilenos e quatro metilas (Tabela 11). Dessa forma, a substância LCT4 apresentou semelhança ao LCT3, diferindo deste pela ausência de um sinal de metino na região acima de 4 ppm e a presença de um grupo metileno adicional.

**Tabela 11-** Dados da substância LCT4, a partir dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN, HSQC-DEPT e COSY.

$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ ( $^1\text{H}$ RMN)
75,8 (C)	-----
70,8 (C)	-----
62,1 (CH)	4,56 dd (13,1; 4,2 Hz)
59,6 (C)	-----
56,1 (CH)	3,62 s
55,0 (CH)	3,06 s
47,5 (C)	-----
45,2 (C)	-----
39,9 (CH <sub>2</sub> )	2,28 m (2H)
37,5 (CH <sub>2</sub> )	2,21 ddd (14,4; 3,4; 3,3 Hz) 2,09 dd (14,4; 13,1 Hz)
26,2 (CH <sub>3</sub> )	1,34 s
25,4 (CH <sub>2</sub> )	1,64 dddd (14,2; 3,3; 2x3,5 Hz) 1,50 ddd (14,2; 8,7; 5,6 Hz)
23,5 (CH <sub>3</sub> )	1,69 s
22,6 (CH <sub>3</sub> )	1,45 s
21,7 (CH <sub>3</sub> )	0,95 s

A análise detalhada do espectro de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY permitiu observar um sistema de spins ABX (Fig. 28), entre os sinais em  $\delta\text{H}$  4,56,  $\delta\text{H}$  2,21 e  $\delta\text{H}$  2,09, sistema este semelhante aos já relatados para as substâncias LCT1, LCT2. O sinal em  $\delta\text{H}$  4,56 (dd,  $J= 13,2; 4,2$  Hz) correlaciona com os sinais de hidrogênio em 2,21 e 2,09 ppm e estes correlacionam entre si. Tendo em vista as constantes de acoplamento dos sinais em 2,21 e 2,09 ppm podemos deduzir que o primeiro é equatorial e o segundo é axial. O hidrogênio em 4,63 ppm deve estar em posição axial.



**Figura 28:** Representação do sistema ABX da substância LCT4. Acoplamento entre hidrogênios geminais está representado em azul; entre hidrogênios vizinhos em vermelho.

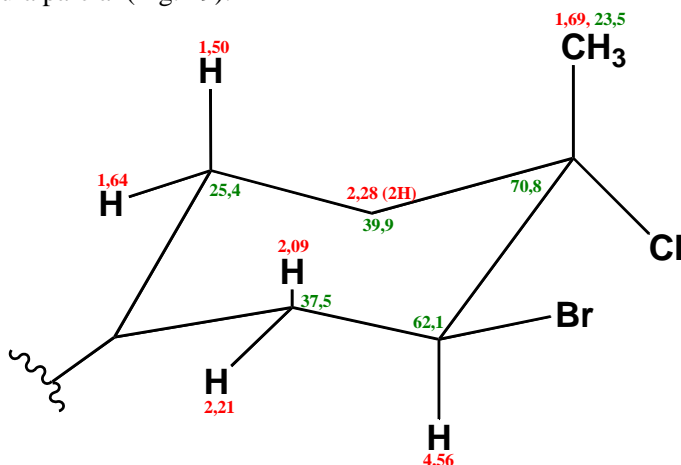
No COSY, a correlação entre os hidrogênios em 1,64 e 2,21 ppm sugere um acoplamento em W - uma constante de acoplamento entre 0 a 10 Hz é esperada, segundo Rücker, Neugebauer e Willems (2001), justificando a multiplicidade dos sinais dos átomos de hidrogênio em  $\delta\text{H}$  2,21 (ddd) e 1,64 (dddd). Os grupamentos metila cujos hidrogênios ressonam em 1,34 e 0,95 ppm foram identificados como sendo geminais, através do espectro de COSY.

Ainda no espectro de COSY, foi possível a observação da correlação entre os hidrogênios em 2,28 (2 H), 1,64 e 1,50 ppm. Os hidrogênios em 2,28 (2 H, m) correlacionam com os hidrogênios em 1,64 e 1,50 ppm e estes correlacionam entre si. Analisando as constantes de acoplamento dos sinais em 1,50 (1 H, ddd,  $J= 14,2; 8,7; 5,6$  Hz) e

1,64 ppm (1 H, dddd,  $J= 14,2; 3,5; 3,5; 3,3$  Hz), pode-se concluir que o hidrogênio em 1,50 ppm é axial e o hidrogênio em  $\delta_H$  1,64 ppm é equatorial

Os deslocamentos químicos do carbono de metino em 62,1 ppm, do carbono quaternário em 70,8 ppm e dos hidrogênios da metila em 1,69 ppm, permitem sugerir que este sistema de spins está inserido em um anel do tipo ciclohexano, em que os halogênios estão em posição diequatorial (GONZÁLEZ et al., 1979), tal como LCT3. Diferente deste, porém, não há grupo OH, o que faz com que os hidrogênios em C-5 estejam mais blindados.

O conjunto de dados espectrais permitiu propor a seguinte estrutura parcial (Fig. 29).



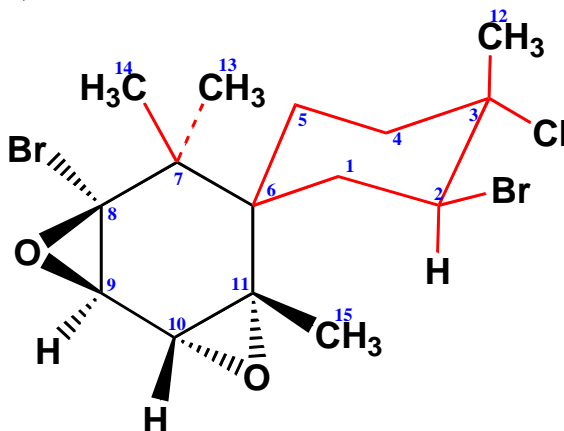
**Figura 29:** Estrutura parcial proposta para LCT4 com base na análise dos dados de RMN.

Considerando que esta estrutura parcial justifique as diferenças observadas entre LCT3 e LCT4, pode-se sugerir que as duas substâncias seriam idênticas quanto ao anel A. A partir da comparação dos dados espectrais apresentados com os dados da literatura (Tabelas 12 e 13) pode-se confirmar a identidade da substância LCT4 como sendo dehidroxipreparicifenol epóxido (Fig. 30). Tal substância já havia sido isolado de *Laurencia catarinensis* (dados não publicados).

O dehidroxipreparicifenol epóxido foi isolado pela primeira vez a partir *Aplysia dactylomela* (KAISER; PITOMBO; PINTO, 1998). Na literatura há ainda o relato de seu isolamento de *Laurencia nidifica*



(KIMURA; KAMADA; TSUJIMOTO, 1999). A configuração relativa da substância foi estabelecida através de NOE (KAISER; PITOMBO; PINTO, 1998).



**Figura 30:** Estrutura da substância LCT4 - dehidroxipreapacifenol epóxido. O destaque em vermelho se refere à estrutura parcial proposta.

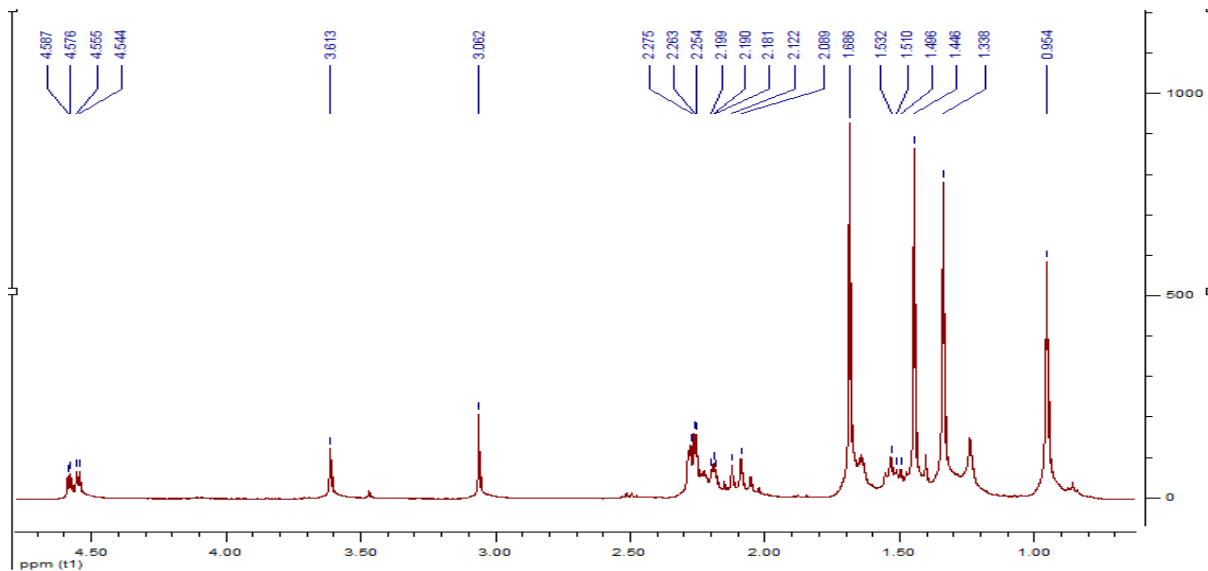
**Tabela 12:** Dados de  $^1\text{H}$  RMN da substância LCT4, em comparação com a literatura para dehidroxipreapacifenol epóxido.

C	$\delta\text{H}$ (J Hz)- LCT4 $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz	$\delta\text{H}$ (J Hz)- Dehidroxipreapacifenol epóxido (KAISER; PITOMBO; PINTO, 1998) $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz
1	2,21 ddd (14,4; 4,2; 3,3) 2,09 dd (14,4; 13,1)	2,23 dt (14,0; 4,2; 3,6) 2,12 dd (14,0; 13,1)
2	4,56 dd (13,1; 4,2)	4,59 dd (13,1; 4,2)
3	-----	-----
4	2,28 m (2H)	2,29 m 2,30m
5	1,64 dddd (14,2; 3,5; 3,5; 3,3) 1,50 ddd (14,2; 8,7; 5,6)	1,68 dq (14,2; 3,9; 3,7; 3,5) 1,55 dt (14,2; 12,4; 5,8)
6	-----	-----
7	-----	-----
8	-----	-----
9	3,62 s	3,64 s
10	3,06 s	3,09 s
11	-----	-----
12	1,69 s	1,72 s
13	0,95s	0,98 s
14	1,34s	1,37 s
15	1,45 s	1,48 s

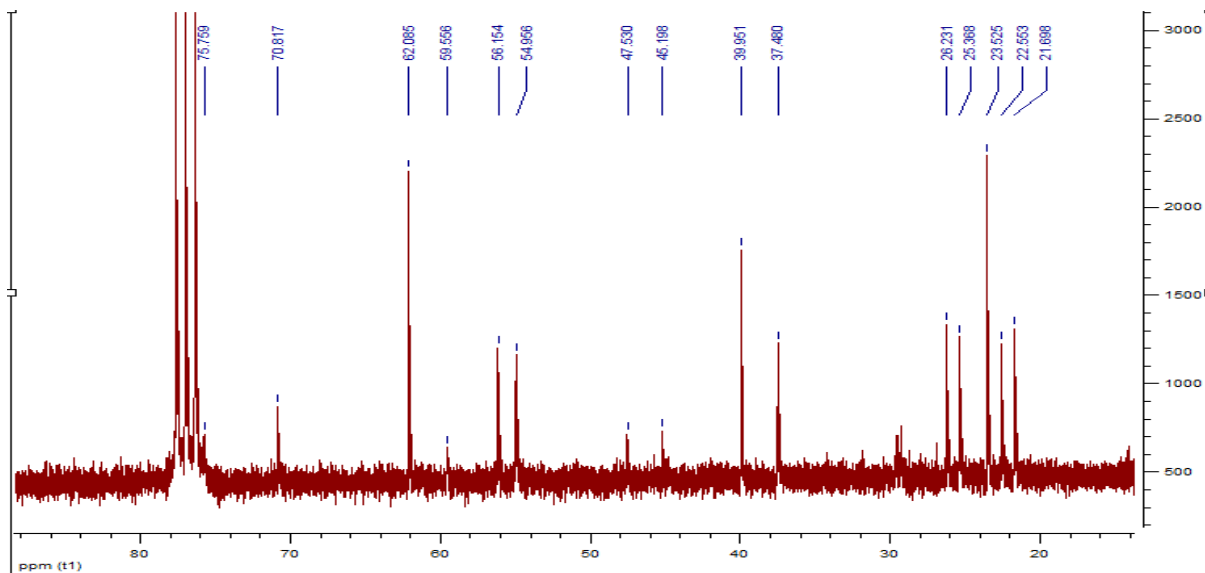
**Tabela 13:** Dados de  $^{13}\text{C}$  RMN da substância LCT4, em comparação com a literatura para dehidroxiprepacifenol epóxido.

C	$\delta\text{C- LCT4}$ CDCl <sub>3</sub> , 50 MHz	$\delta\text{C- Dehidroxiprepacifenol epóxido}$ (KAISER; PITOMBO; PINTO, 1998) CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz
1	37,5	37,86
2	62,1	62,52
3	70,8	71,28
4	39,9	40,33
5	25,4	25,75
6	47,5	47,92
7	45,2	45,59
8	75,8	76,17
9	56,1	56,54
10	55,0	55,33
11	59,6	59,99
12	23,5	23,94
13	21,7	22,11
14	26,2	26,66
15	22,6	22,97

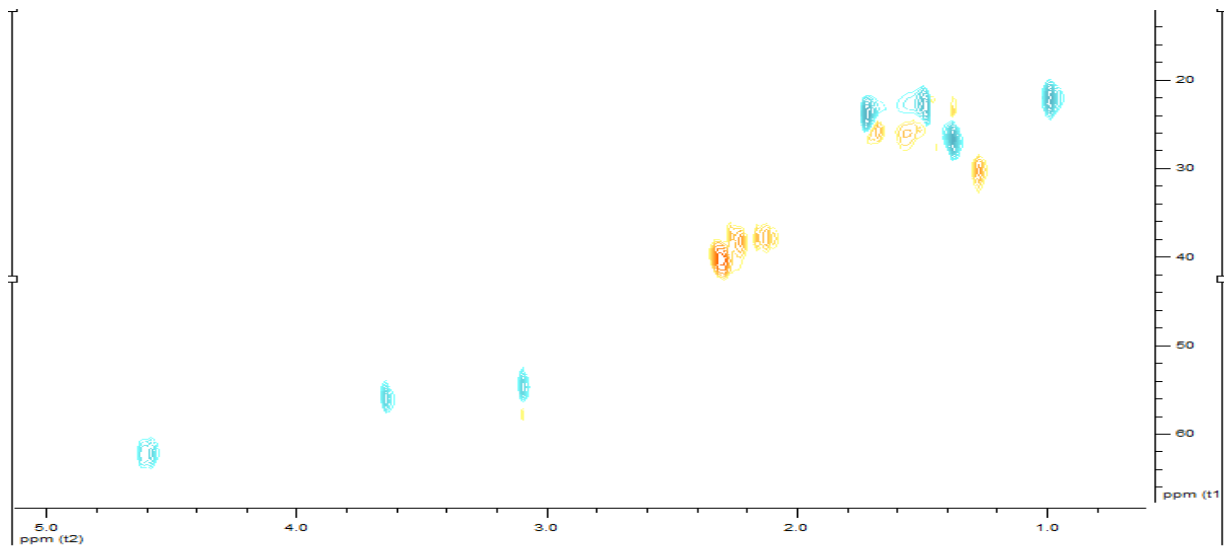
Dehidroxiprepacifenol epóxido isolado de *Laurencia catarinensis* foi testado frente às linhagens celulares HT29 (câncer colorretal), MCF7 (câncer de mama) e A431 (câncer epidermoide) (dados não publicados). Segundo Kimura, Kamada e Tsujimoto (1999), o dehidroxiprepacifenol epóxido possui atividade contra o vírus herpético do tipo 1 (IC<sub>50</sub> 13 µg/ml).



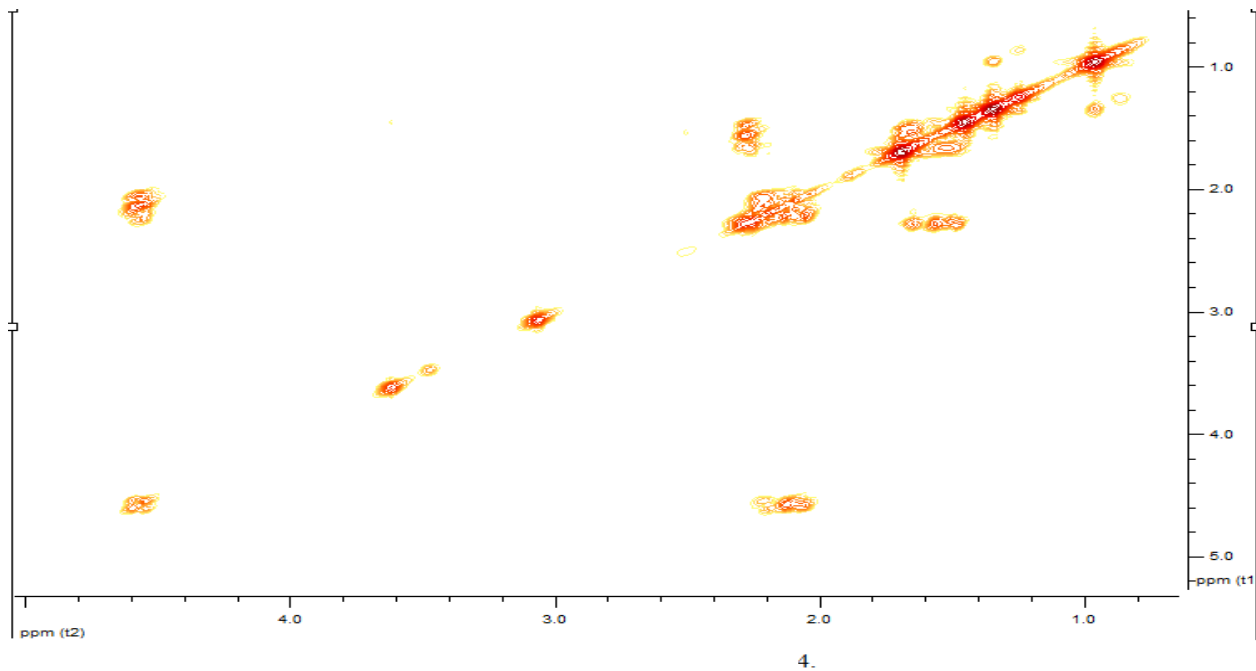
**Figura 31:** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT4. O sinal em  $\delta\text{H}$  1,23 se refere a resíduo de n-hexano.



**Figura 32:** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) da substância LCT4.



**Figura 33:** Espectro de HSQC-DEPT (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância LCT4.



**Figura 34:** Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT4.

#### 4.1.5. Substância LCT5

A substância LCT5 (3,8 mg) foi isolada como um sólido branco inodoro, após a purificação por CLAE (Fig. 6) da fração B17-19. Apresenta-se na CCD em Hx/AcOEt (9:1) como uma mancha em Rf 0,80; após revelação com anisaldeído sulfúrico adquire cor roxa. A substância não apresenta fluorescência em 366 nm, mas extingue a fluorescência em 254 nm.

No espectro  $^1\text{H}$  RMN, LCT5 apresenta dois sinais de hidrogênio desprotegido em 6,22 (d,  $J= 2,8$  Hz) e 4,67 ppm (1H, dd,  $J=13,0$ ; 4,5 Hz); o primeiro se refere a H olefínico, enquanto o segundo parece tratar-se de hidrogênio geminal a um grupo eletronegativo (como halogênio ou oxigênio). O dubleto em  $\delta\text{H}$  2,93 (1H,  $J= 2,8$  Hz) sugere estar relacionado a hidrogênio de anel epóxido. Entre 2,41 e 1,33 ppm há seis sinais que sugerem a presença de três grupos metilenos. Os singletos em  $\delta\text{H}$  1,68,  $\delta\text{H}$  1,61,  $\delta\text{H}$  1,19 e  $\delta\text{H}$  1,16 correspondem a quatro metilas. Dessa forma, a substância LCT5 apresentou semelhança ao LCT4, diferindo deste pela presença do hidrogênio olefínico ( $\delta\text{H}$  6,22) e por apenas um sinal na região próxima a 3 ppm ( $\delta\text{H}$  2,93), enquanto LCT4 apresenta dois hidrogênios nesta região.

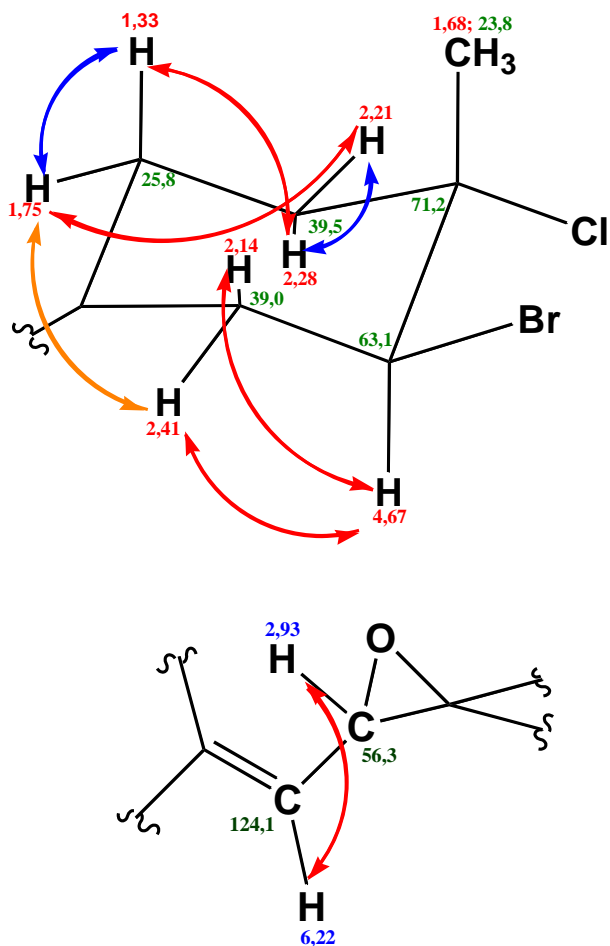
Nos espectros de HSQC-DEPT e de  $^{13}\text{C}$ -RMN foram visualizados 15 carbonos, três metinos ( $\delta\text{C}$  124,1;  $\delta\text{C}$  63,1 e  $\delta\text{C}$  56,3), três metilenos ( $\delta\text{C}$  39,5;  $\delta\text{C}$  39,0 e  $\delta\text{C}$  25,8), quatro metilas ( $\delta\text{C}$  24,7;  $\delta\text{C}$  24,3;  $\delta\text{C}$  23,8 e  $\delta\text{C}$  23,5) e cinco carbonos quaternários ( $\delta\text{C}$  143,7;  $\delta\text{C}$  71,2;  $\delta\text{C}$  58,2;  $\delta\text{C}$  49,1 e  $\delta\text{C}$  45,8).

Analisando o espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, observa-se uma correlação entre os hidrogênios em 6,22 e 2,93 ppm, já identificada no  $^1\text{H}$  RMN através da constante de acoplamento ( $J= 2,8$  Hz). No espectro de COSY há ainda um sistema de spins do tipo ABX entre  $\delta\text{H}$  4,67,  $\delta\text{H}$  2,41 e  $\delta\text{H}$  2,14. Este dado, juntamente com a alta constante de acoplamento entre os hidrogênios em 4,67 e 2,14 ppm ( $J= 13,0$  Hz), e os deslocamentos químicos do carbono de metino em 63,1 ppm, do carbono quaternário em 71,2 ppm e dos hidrogênios da metila em 1,68 ppm, sugere que o sistema de spins em questão esteja inserido em um anel do tipo ciclohexano com os halogênios (cloro e bromo) em posição diequatorial (GONZÁLEZ et al., 1979), tal como em LCT3 e LCT4.

Os átomos dos hidrogênios ressoando em 2,41 e 1,75 ppm apresentam uma correlação entre si, observada pelo espectro de COSY. Esta correlação sugere um acoplamento em W, o qual justifica a

constante de acoplamento de 3,3 HZ e os sinais visualizados no  $^1\text{H}$  RMN para estes hidrogênios ( $\delta\text{H}$  2,41 ddd e  $\delta\text{H}$  1,75 como dddd).

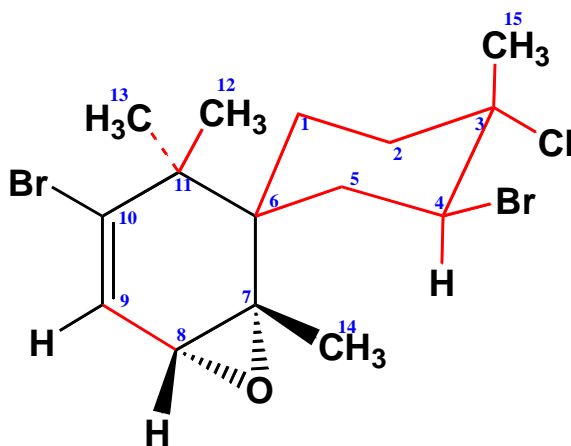
O conjunto de dados espectrais permitiu propor as estruturas parciais abaixo (Figura 35).



**Figura 35:** Estruturas parciais propostas para LCT5 com base na análise dos dados de RMN. Acoplamento entre hidrogênios vicinais está em vermelho; entre hidrogênios geminais, em azul; acoplamento em “W” representado em laranja.



Com base nos dados apresentados e na semelhança com LCT4, sugere-se que a substância LCT5 corresponde à estrutura representada na figura 36. Os dados espectrais de LCT5 (deslocamentos químicos, multiplicidade e constantes de acoplamento) estão de acordo com os descritos na literatura (conforme as Tabelas 14 e 15). Como evidência adicional, foi verificado o ponto de fusão; a substância LCT5 funde em 121,2 a 123,2 °C, o que está de acordo com o descrito para o deoxipreparacifenol, que sofre fusão em 122 a 124°C (WATANABE; UMEDA; MIYAKADO, 1989). O conjunto dos dados permitiu confirmar que LCT5 é o deoxipreparacifenol. Tal substância foi isolada originalmente do organismo marinho *Aplysia californica* (IRELAND et al., 1976). A configuração absoluta foi estabelecida através da cristalografia de raio X (FRONCZEK; CACCAMESE, 1989). Tal substância já havia sido isolada de *Laurencia catarinensis* da Ilha do Arvoredo (dados não publicados).



**Figura 36:** Estrutura da substância LCT5 (deoxipreparacifenol). O destaque em vermelho se refere às estruturas parciais propostas.

**Tabela 14:** Dados de  $^1\text{H}$  RMN da substância LCT5, em comparação com a literatura para deoxiprepacifenol.

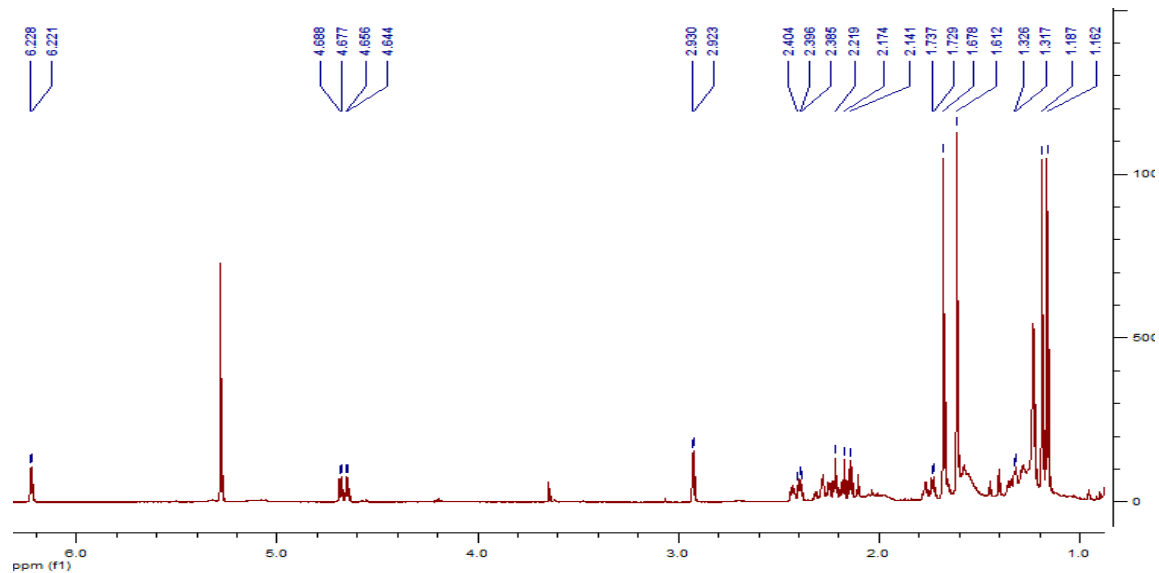
C	$\delta\text{H}$ (J Hz)- LCT5 $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz	$\delta\text{H}$ (J Hz)- deoxiprepacifenol (NYS; COLL; BOWDEN, 1993) $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz
1	1,75 dddd (13,8; 3,8; 3,3; 3,3) 1,33 ddd (13,8; 13,7; 3,8)	1,77 dddd (13,9; 3,6; 3,3; 3,3) 1,33 ddd (13,9; 13,8; 4,0)
2	2,21 ddd (13,8; 3,8; 3,8) 2,28 ddd (13,8; 13,7; 3,1)	2,21 ddd (13,8; 4,0; 3,6; 4,0) 2,30 ddd (13,8; 13,8; 3,3;)
3	-----	-----
4	4,67 dd (13,0; 4,5)	4,69 dd (13,0; 4,4)
5	2,41 ddd (14,5; 4,5; 3,3) 2,14 dd (14,5; 13,0)	2,43 ddd (14,5; 4,4; 3,3) 2,16 dd (14,5; 13,0)
6	-----	-----
7	-----	-----
8	2,93 d (2,8)	2,94 d (2,8)
9	6,22 d (2,8)	6,24 d (2,8)
10	-----	-----
11	-----	-----
12	1,16 s	1,17 s
13	1,19 s	1,20 s
14	1,61 s	1,63 s
15	1,68 s	1,69 s

**Tabela 15:** Dados de  $^{13}\text{C}$  RMN da substância LCT5. Em amarelo: destaque para a atribuição em que nossos dados para LCT5 divergem da literatura, sendo inversos em relação ao sugerido pelos autores para o deoxiprepacifenol.

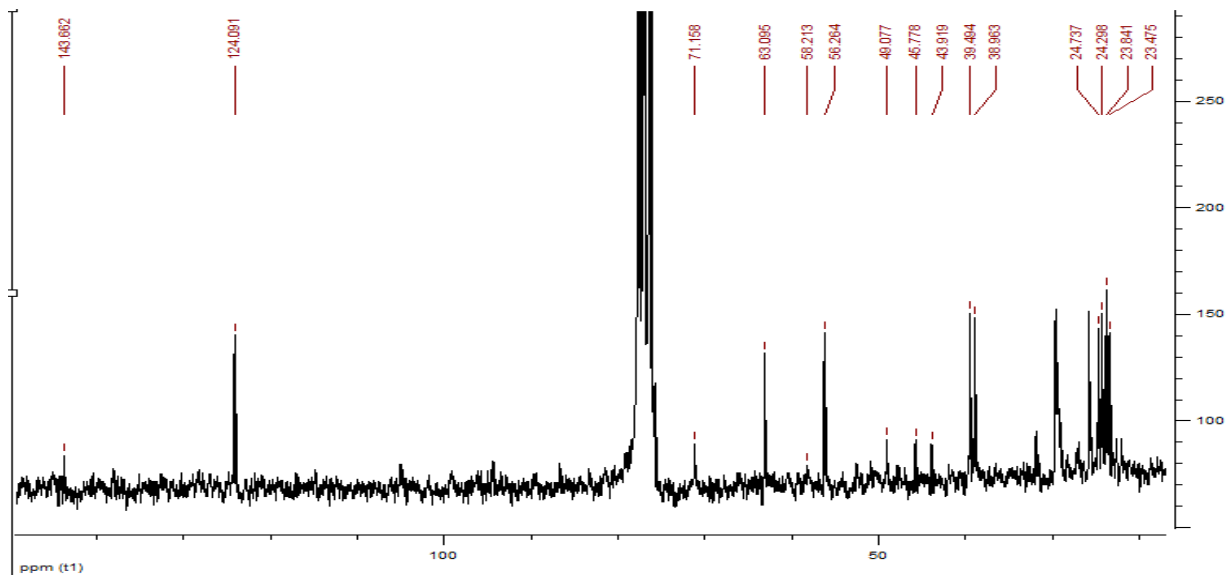
C	$\delta\text{C}$ - LCT5 $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz	$\delta\text{C}$ (NYS; COLL; BOWDEN, 1993) $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz
1	25,8	25,8
2	39,5	38,9
3	71,2	71,2
4	63,1	63,1
5	39,0	39,5
6	49,1	49,1
7	58,2	58,2
8	56,3	56,2
9	124,1	124,1
10	143,7	143,7
11	45,8	45,8
12	24,7	24,7
13	24,3	24,3
14	23,5	23,5
15	23,8	23,6

O deoxiprepacifenol não apresentou atividade frente ao vírus herpético do tipo 1 (KIMURA; KAMADA; TSUJIMOTO, 1999) e não possui atividade antifúngica contra os fungos *Cladosporium cucumerinum* (MAO; GUO, 2010) e *Colletotrichum lagenarium* (LI et al., 2012). Segundo Rovirosa e colaboradores (1999), o deoxiprepacifenol não inibe a citoquinase do ouriço-do-mar *Tetrapygyus niger*. O deoxyrepacifenol apresentou atividade inseticida frente a larvas do mosquito *Culex pipiens pallens* (WATANABE; UMEDA; MIYAKADO, 1989).

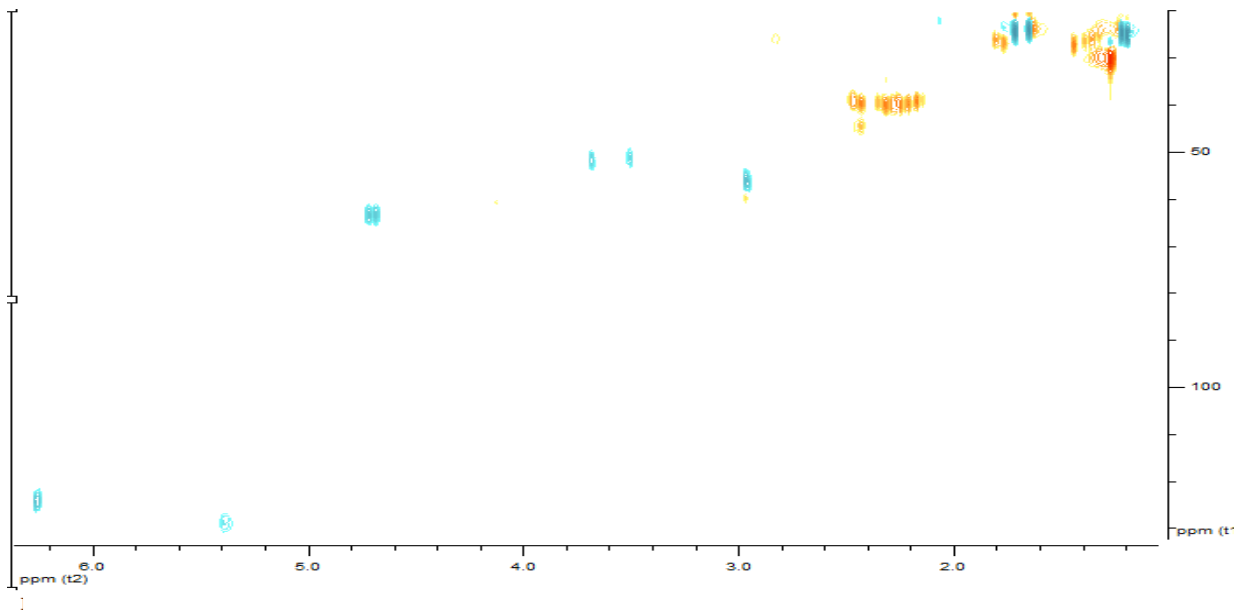
LCT5 foi testado para atividade citotóxica frente às linhagens celulares HT29, MCF7 e A431, mas não apresentou atividade significativa (IC 50 > 100  $\mu\text{M}$ , dados não publicados).



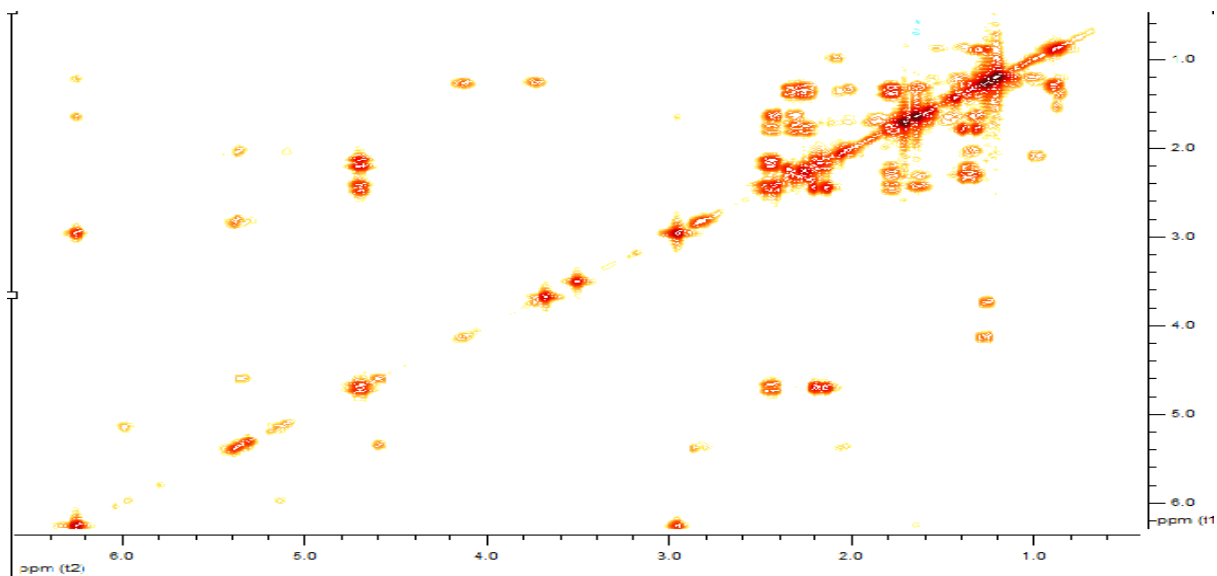
**Figura 37:** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT5. O sinal em  $\delta\text{H}$  5,28 se refere ao diclorometano.



**Figura 38:** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) da substância LCT5.



**Figura 39:** Espectro de HSQC-DEPT ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT5.



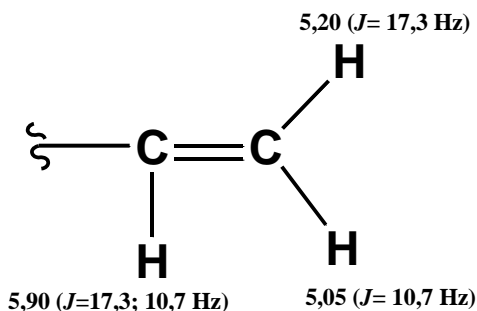
**Figura 40:** Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT5.

#### 4.1.6. Substância LCT6

LCT6 (2,3 mg) foi isolado da fração C18-20B5, após a purificação por CLAE (Fig. 6), como óleo incolor inodoro. Apresenta-se na CCD em Hx:AcOEt (9:1) como uma mancha em Rf 0,36. A substância não extingue a fluorescência em 254 nm, nem apresenta fluorescência em 366 nm; após a revelação com anisaldeído sulfúrico, a substância adquire cor roxa.

O espectro  $^1\text{H}$  RMN permitiu identificar cinco hidrogênios desprotegidos que ressonam em 5,90 (dd,  $J= 17,3; 10,7$  Hz), 5,22 (dd,  $J= 7,0; 6,5$  Hz), 5,20 (d,  $J= 17,3$  Hz), 5,05 (d,  $J= 10,7$  Hz) e 3,96 ppm (dd,  $J= 17,3; 1,1$  Hz). Foram identificados quatro grupos metilas (singletos, 3H cada em 1,75; 1,65; 1,59 e 1,27 ppm).

O hidrogênio que ressona em 5,90 ppm (1 H, dd,  $J= 17,3; 10,7$  Hz) parece ser olefínico (RÜCKER; NEUGEBAUER; WILLEMS, 2001) e deve estar acoplado com os hidrogênios em 5,05 (1 H, d,  $J= 10,7$  Hz) e 5,20 ppm (1 H, d,  $J= 17,3$  Hz). O espectro de RMN de hidrogênio sugere tratar-se de um sesquiterpeno com cadeia lateral semelhante ao sniderol (TOPCU et al., 2003), contendo a estrutura parcial representada na figura 41.



**Figura 41:** Estrutura parcial sugerida pelos dados de RMN de hidrogênio da substância LCT6.

Foi realizada a busca na base de dados Marinlit® com os dados de  $^1\text{H}$  RMN, mas nenhuma hipótese compatível foi identificada, sugerindo tratar-se de substância com estrutura inédita. Espectros adicionais ( $^{13}\text{C}$  RMN, COSY, HSQC-DEPT e HMBC) estão sendo obtidos. A substância LCT6 é idêntica a um metabólito minoritário



anteriormente isolado de *Laurencia catarinensis* da Ilha do Arvoredo (dados não publicados).

#### 4.1.7. Substância LCT7

A substância LCT7 (1,1 mg), foi isolada da fração C18-20B4 , após a purificação por CLAE (Fig. 6) como um óleo com odor característico. Apresenta-se na CCD em Hx/AcOEt (9:1) como uma mancha em Rf 0,39. Esta substância não extingue a fluorescência em 254 nm, nem apresenta fluorescência em 366 nm; após a revelação com anisaldeído sulfúrico, a substância adquire cor azul intensa. O comportamento cromatográfico sugeriu tratar-se do elatol.

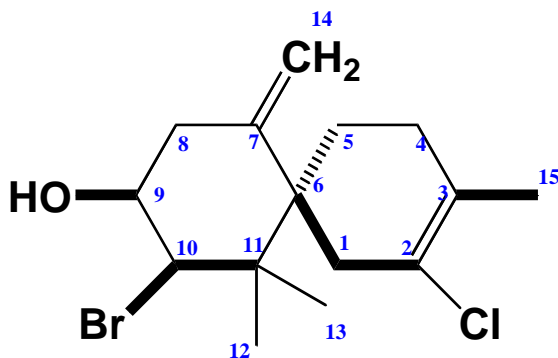
O espectro de IV confirmou a presença de grupamento hidroxila (estiramento O-H atribuído à banda em 3400); a banda intensa próxima à região de 1100 corresponderia à ligação C-O de álcool ou éter. (RÜCKER; NEUGEBAUER; WILLEMS, 2001).

Na região entre 5,5 e 4,0 ppm, o espectro  $^1\text{H}$  RMN apresentou dois singletos (1 H cada) em 5,11 e 4,78 ppm e dois outros sinais em 4,60 (1 H, d,  $J= 2,9$  Hz) e 4,13 ppm (1 H, dl,  $J= 3,2$  Hz), que correspondem a hidrogênios geminais a grupos eletronegativos (como halogênio ou oxigênio). Os singletos com intensidade para três hidrogênios em 1,69, 1,06 e 1,05 ppm correspondem a metilas.

Estes dados conferem com os descritos para o elatol, isolado anteriormente em nosso grupo (LHULLIER et al., 2009). Assim pode-se confirmar que a substância LCT7 é o elatol (Tabela 16 e Fig.42).

**Tabela 16:** Dados de  $^1\text{H}$  RMN da substância LCT7, em comparação com a literatura para o elatol.

C	$\delta\text{H}$ (J Hz) – LCT7 $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz	$\delta\text{H}$ (J Hz)- elatol (LHULLIER et al., 2009) $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz
1	2,57 d (17,4) 2,35 d (17,4)	2,59 d (17,0) 2,38 d (17,0)
2	-----	-----
3	-----	-----
4	1,94 m 1,78 m	1,95 m 1,81 m
5	1,81 m 1,62 m	1,82 m 1,63 m
6	-----	-----
7	-----	-----
8	2,61 d (14,60) 2,48 dd (14,60; 2,6)	2,63 d (14,6) 2,50 dd (14,6; 2,5)
9	4,13 dl (3,2)	4,15 dl (3,4)
10	4,60 d (2,9)	4,61 d (2,6)
11	-----	-----
12	1,05 s	1,07 s
13	1,06 s	1,08 s
14	5,11 s 4,78 s	5,12 s 4,79 s
15	1,69 s	1,70 s



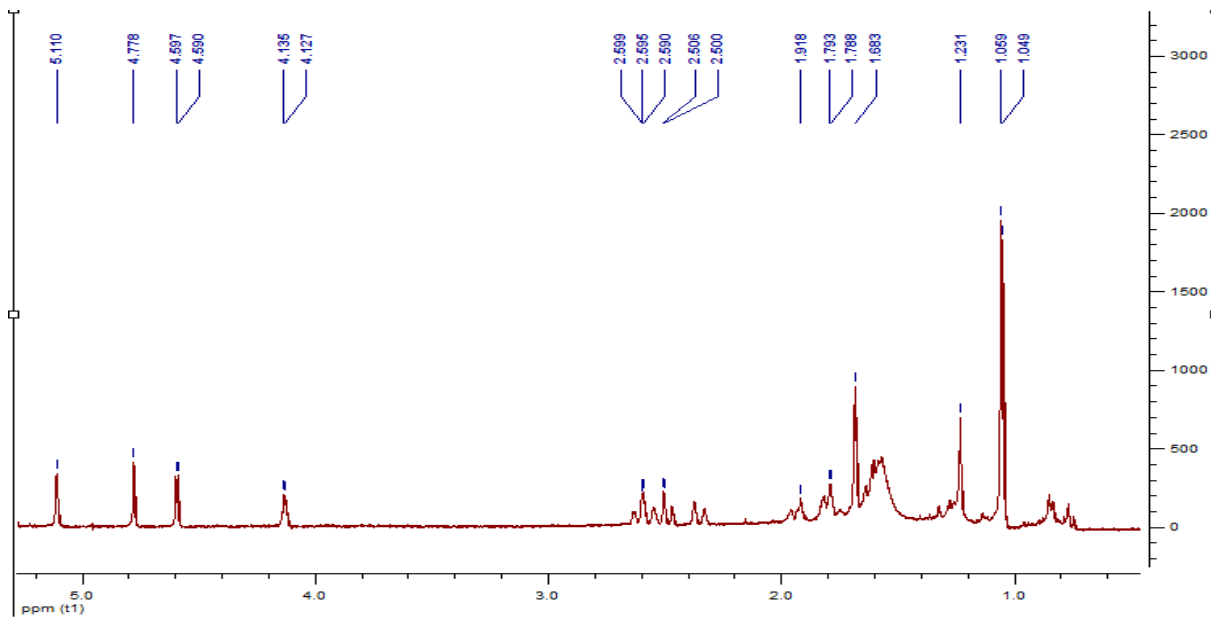
**Figura 42:** Estrutura da substância LCT7 (elatol).

O elatol foi isolado originalmente de *Laurencia elata* (SIMS; LIN; WING, 1974). Elatol inibe o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Eurotium repens*, *Ustilago violacea* e *Mycotypha*

*microspora* (KÖNIG; WRIGHT, 1997). Segundo Lhullier e colaboradores (2009), o elatol não apresentou atividade anti-herbivoria frente ao ouriço-do-mar *Echinometra lucunter*. A substância possui atividade antileishmania (SANTOS et al., 2010) e atividade tripanocida frente a formas tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* (DESOTI et al., 2012). Elatol inibiu o estabelecimento do mexilhão perna-perna, caracterizando a atividade antiincrustante (DA GAMA et al., 2002).

Elatol mostrou-se bacteriostático para diversas espécies de *Clostridium* e *Vibrio*, além de *Chromobacterium violaceum*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Flavobacterium helmiphilum*, *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis* (VAIRAPPAN et al., 2011; VAIRAPPAN, 2003). O elatol foi testado para a atividade citotóxica frente linhagens celulares HeLa, Hep-2 e Vero, com maior citotoxicidade para as últimas (DIAS et al., 2005).

A atividade antitumoral do elatol foi descrita por Campos e colaboradores (2012), com inibição no ciclo celular provavelmente na transcrição da fase G1/S, iniciando a indução da apoptose e sendo capaz de reduzir o crescimento do tumor em ratos inoculados com células B16F10 (melanoma cutâneo). Lang e colaboradores (2012) fizeram modificações estruturais na hidroxila do elatol com finalidade de melhorar a atividade biológica. Os derivados obtidos foram o hemi-succinato, sulfamato e o carbamato, testados quanto à atividade citotóxica para as células A549 e RD.



**Figura 43:** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LCT7.

#### 4.1.8. Substância LCT8

A substância LCT8 (1,4 mg), foi isolada da fração C18-20B4E, após a purificação por CLAE (Fig. 6) como sólido branco inodoro. Apresenta-se na CCD em Hx/AcOEt (9:1) como uma mancha em Rf 0,36. A substância não extingue a fluorescência em 254 nm e nem apresenta fluorescência em 366 nm; após a revelação com anisaldeído sulfúrico, adquire cor laranja.

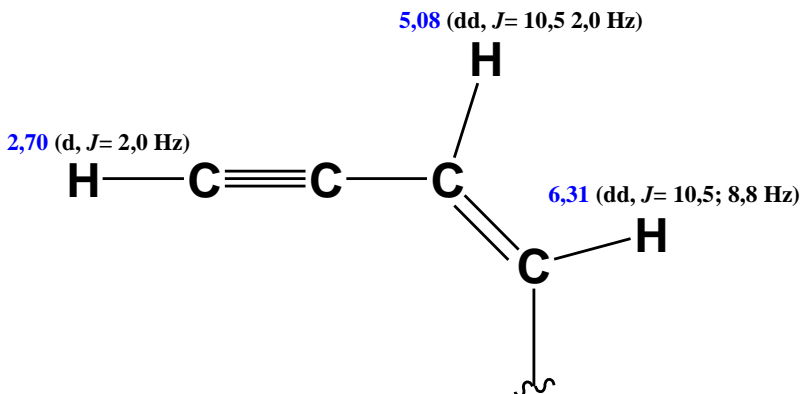
O espectro de IV sugeriu a presença de estiramento C-H de alcino, atribuído à banda em  $3.300\text{ cm}^{-1}$ ; a banda discreta próxima a  $2.100\text{ cm}^{-1}$  corresponderia a  $\text{C}\equiv\text{C}$  e a banda intensa em torno de  $1010\text{ cm}^{-1}$ , à ligação C-O de éter (RÜCKER; NEUGEBAUER; WILLEMS, 2001).

O espectro  $^1\text{H}$  RMN em  $\text{CDCl}_3$  apresentou sobreposição de sinais na região em que se observam os sinais de resíduos de água, dificultando a interpretação dos sinais naquela região. Por isto, novo espectro  $^1\text{H}$  RMN foi obtido em benzeno deuterado.

O espectro em  $\text{C}_6\text{D}_6$  apresentou sinais de hidrogênios desprotegidos em 6,32 (1 H, dd,  $J= 10,5; 8,8$  Hz), 5,08 (1 H, dd,  $J= 10,5; 2,0$  Hz), 5,04 (1 H, dd,  $J= 2 \times 4,8$  Hz), 4,25 (1 H, dd,  $J= 2 \times 5,0$  Hz) e 4,08 ppm (1 H, dd,  $J= 5,5; 4,4$  Hz). No espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN foram observados sinais de carbonos desprotegidos ressonando em  $\delta\text{C}$  146,9 (CH);  $\delta\text{C}$  109,6 (C);  $\delta\text{C}$  108,7 (CH); ainda em  $\delta\text{C}$  85,2 (C),  $\delta\text{C}$  84,7 (CH),  $\delta\text{C}$  83,6 (CH),  $\delta\text{C}$  81,5 (CH),  $\delta\text{C}$  79,9 (C) e um último em  $\delta\text{C}$  77,6 ppm (CH sobreposto ao sinal do clorofórmio), configurando um total de nove átomos de carbono desprotegidos. Destes, pelo menos dois devem ser olefínicos e os demais podem estar ligados a átomos eletronegativos, como oxigênio e halogênio ou fazer parte de estrutura parcial acetilênica (RÜCKER; NEUGEBAUER; WILLEMS, 2001). Possivelmente um dos carbonos está ligado a dois átomos eletronegativos, à semelhança do que ocorre no grupamento acetal (RÜCKER; NEUGEBAUER; WILLEMS, 2001).

O deslocamento químico esperado para o hidrogênio de uma estrutura parcial acetilênica com alquino terminal seria entre 2,0 e 3,2 ppm (RÜCKER; NEUGEBAUER; WILLEMS, 2001). O hidrogênio que ressona em 2,70 ppm (1 H, d,  $J= 2,0$ ) deve estar acoplado àquele hidrogênio cujo sinal em 5,08 ppm (dd,  $J= 10,5; 2,0$ ) indica estar acoplado também ao hidrogênio em 6,31 ppm (dd,  $J= 10,5; 8,8$ ). Estes dados indicam tratar-se de uma estrutura eno-ino em que há configuração *cis* entre os hidrogênios da liga dupla, em função da

constante de acoplamento (já que para a configuração *trans*, uma constante de acoplamento superior a 11 Hz seria esperada, segundo Rücker; Neugebauer e Willems, 2001).



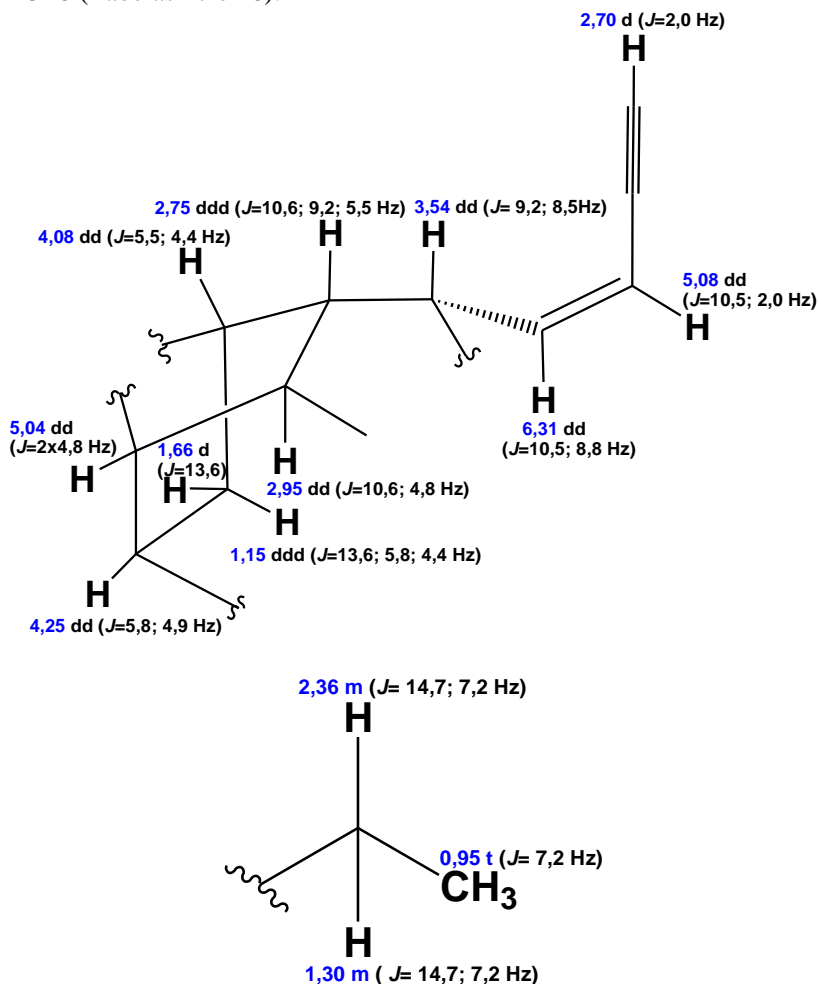
**Figura 44:** Estrutura parcial do sistema eno-ino proposto para a substância LCT8.

O hidrogênio em 3,54 (1 H, dd,  $J = 9,2, 8,5$  Hz) ppm indica que este deve estar acoplado com os hidrogênios em 6,31 e 2,75 ppm (1H, ddd;  $J = 10,6; 9,2; 5,5$  Hz) e este com os hidrogênios em 4,08 (1 H, dd,  $J = 5,5; 4,4$  Hz) e o 2,95 ppm (1 H, dd,  $J = 10,6; 4,8$  Hz).

As constantes do duplo dubleto em 4,08 ppm sugerem que este hidrogênio esteja acoplado com o hidrogênio em 1,15 ppm (1 H, ddd,  $J = 13,6; 5,8; 4,4$  Hz) e este com os hidrogênios em 1,66 (1 H, d,  $J = 13,6$  Hz) e o 4,25 ppm (1 H, dd,  $J = 5,8; 4,9$  Hz). A constante de acoplamento entre os hidrogênios em 1,66 e 1,15 ppm ( $J = 13,6$  Hz) indica um acoplamento entre hidrogênios geminais - constante acima de 6 Hz, conforme Rücker; Neugebauer e Willems, (2001). Já o hidrogênio em 4,25 ppm está acoplado com o hidrogênio em 5,04 (1 H, dd,  $J = 2 \times 4,8$  Hz) e este com o 2,95 ppm (1 H, dd,  $J = 10,6; 4,8$  Hz). A análise dos dados permitiu propor a estrutura parcial representada na Figura 45.

O tripleto em  $\delta H$  0,95 (3H,  $J = 7,2; \delta C_{10,6}$ ) se refere ao sinal característico de metila ligada a um grupamento  $CH_2$ . Os hidrogênios deste grupo metileno ressonam em 2,35 ( $J = 7,2; 14,7$  Hz) e 1,30 ppm ( $J = 7,2; 14,7$  Hz), ambos ressonando como multipletos, o que sugere que o grupo metileno esteja ligado a um carbono quaternário.

A partir do conjunto dos dados, considerando a presença de um tripleto de metila, um sistema eno-ino, além da ausência de anéis aromáticos e hidroxila, fez-se a pesquisa na base de dados Marinlit® buscando identificar substâncias já isoladas com aspectos estruturais compatíveis com LCT8. Os resultados desta pesquisa apontaram algumas acetogeninas como estruturas hipotéticas, sendo que apenas o isomaneoneno B apresentou dados espectroscópicos compatíveis com LCT8 (Tabelas 17 e 18).



**Figura 45:** Estruturas parciais da substância LCT8.

**Tabela 17:** Dados de  $^1\text{H}$  RMN da substância LCT8, em comparação com a literatura para o isomaneoneno B.

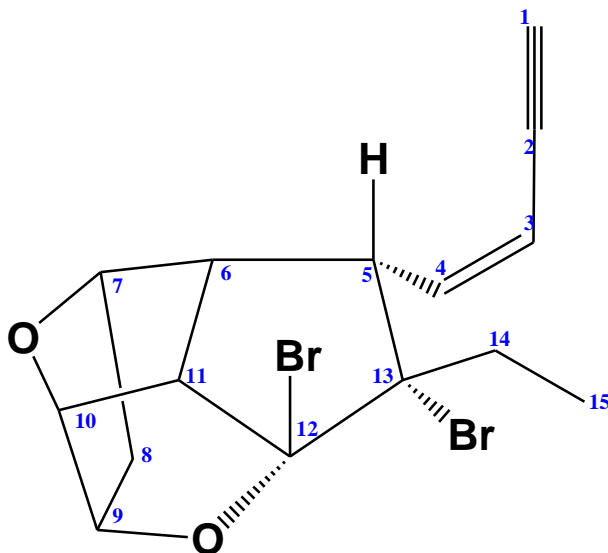
C	$\delta\text{H}$ (J Hz) LCT8 $\text{C}_6\text{D}_6$ , 400 MHz	$\delta\text{H}$ (J Hz) isomaneoneno B – (WARASKIEWICZ et al., 1978) $\text{C}_6\text{D}_6$ , 60 MHz
1	2,70 d (2,0)	2,72 d (2,0)
2	-----	-----
3	5,08 dd (10,5; 2,0)	5,08 dd (10,5; 2,0)
4	6,31 dd (10,5; 8,8)	6,34 dd (10,5; 9,0)
5	3,54 dd (9,2; 8,5)	3,53 t (2x9,0)
6	2,75 ddd (10,6; 9,2; 5,5)	2,75 sext (10,0; 9,0; 5,0)
7	4,08 dd (5,5; 4,4)	4,08 t (2x5,0)
8	1,66 d (13,6) 1,15 ddd (13,6; 5,8; 4,4)	1,67 d (13,0) 1,15 dt (13,0; 2x5,0)
9	4,25 dd (5,8; 4,9)	4,25 t (2x5,0)
10	5,04 dd (2x 4,8)	5,03 t (2x5,0)
11	2,95 dd (10,6; 4,8)	2,96 dd (10,0; 5,0)
12	-----	-----
13	-----	-----
14	2,35 m (14,7; 7,2) 1,30 m (14,7; 7,2)	2,36 sext (14,0; 7,0) 1,30 sext (14,0; 7,0)
15	0,95 t (7,2)	0,95 t (7,0)

**Tabela 18:** Dados de  $^{13}\text{C}$  RMN da substância LCT8, em comparação com a literatura para o isomaneoneno B.

C	$\delta\text{C}$ LCT8 $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz	$\delta\text{C}$ isomaneoneno B – (WARASKIEWICZ et al., 1978) $\text{CDCl}_3$ , 25 MHz
1	83,5	83,5
2	79,9	79,9
3	108,7	108,7
4	146,9	146,9
5	43,2	43,2
6	50,0	50,0
7	77,6	77,6
8	41,1	41,1
9	81,4	81,4
10	84,7	84,6
11	58,7	58,7
12	109,5	109,5
13	85,2	85,2
14	38,0	38,0
15	10,6	10,6



Com base na comparação dos dados, foi possível confirmar que a substância LCT8 é o isomaneoneno B (Fig. 46). Esta substância foi primeiramente isolada da *Laurencia nidifica* (WARASZKIEWICZ et al., 1978) e está sendo relatada pela primeira vez para *Laurencia catarinensis*.



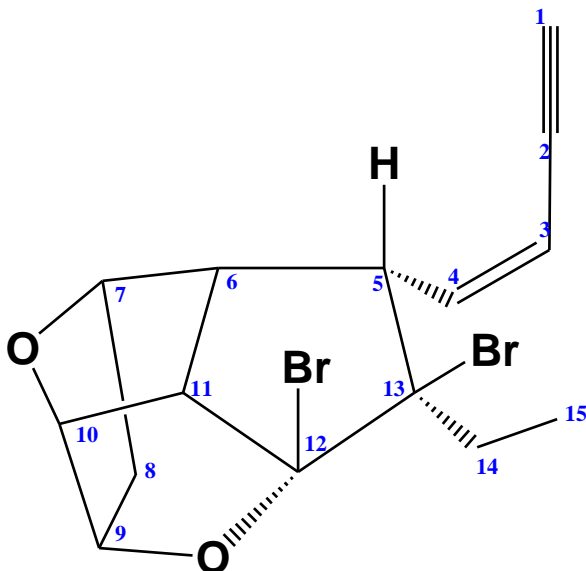
**Figura 46:** Estrutura da substância LCT8 (isomaneoneno B).

A estereoquímica do isomaneoneno B foi definida através de cristalografia de raio X (WARASZKIEWICZ et al., 1978).

Isomaneoneno e maneoneno diferem de outras acetogeninas pela presença do anel carbocíclico (WANG et al., 2013). A classe maneoneno possui apenas um anel carbocíclico e átomos de cloro e bromo fazem parte da sua estrutura, já os isomaneonenos possuem dois anéis carbocíclicos e, como halogênios, contem apenas átomos de bromo (WARASZKIEWICZ et al., 1978).

Atualmente, o grupo dos isomaneonenos possui apenas três representantes: isomaneoneno-A, isomaneoneno-B e lembino-B. A diferença do isomaneoneno-A para o -B está na configuração do C-13. No isomaneoneno-B (figura 46), o hidrogênio na posição quatro está mais desprotegido do que o hidrogênio na mesma posição no

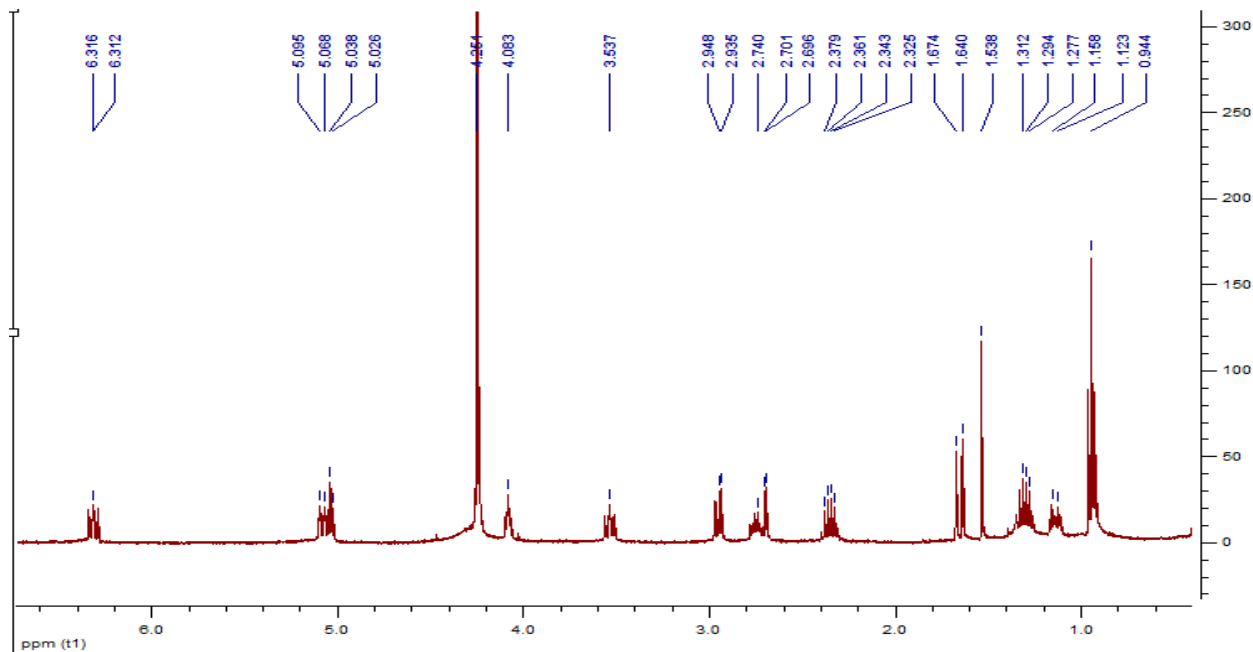
isomaneoneno A (figura 47). O efeito contrário é observado no hidrogênio da posição cinco (WARASZKIEWICZ et al., 1978).



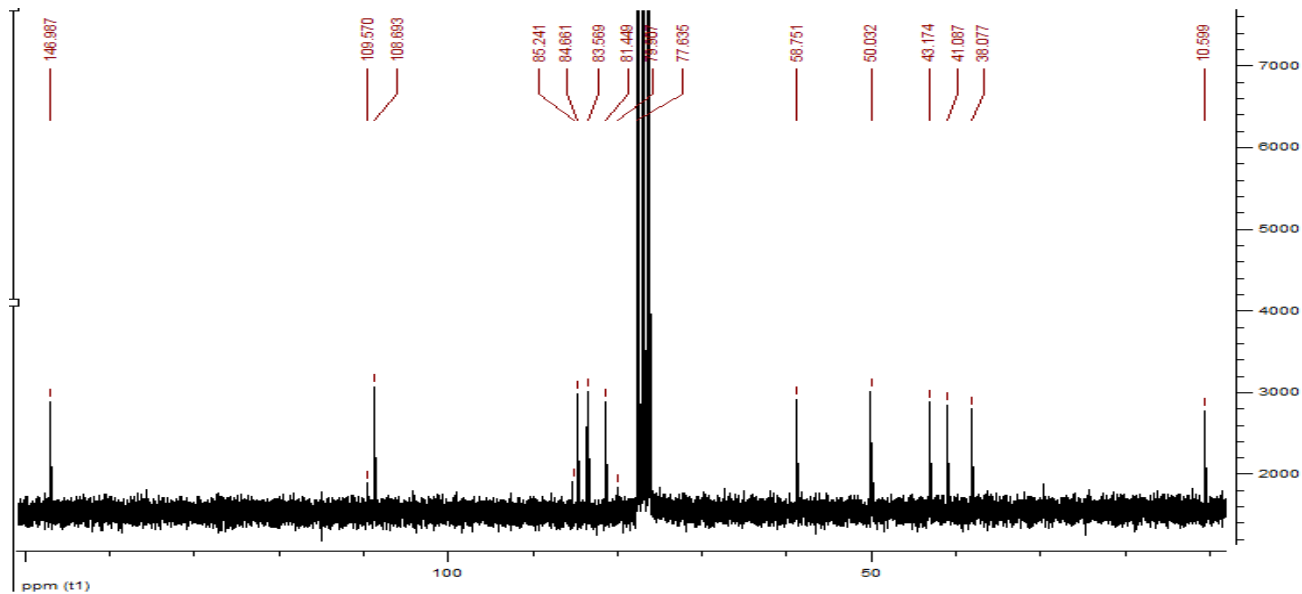
**Figura 47:** Estrutura do isomaneoneno A.

#### 4.1.9. Substância LCT9

A substância LCT9 (8,0 mg) foi isolada da fração C18-20B4E, após a purificação por CLAE (Fig. 6) como óleo incolor e inodoro. Apresenta-se na CCD em Hx/AcOEt (9:1) como uma mancha em Rf 0,36. A substância não extingue a fluorescência em 254 nm e nem apresenta fluorescência em 366 nm; após a revelação com anisaldeído sulfúrico, adquire a cor roxa. O espectro de  $^1\text{H}$  RMN sugeriu tratar-se de outra acetogenina, com base nos sinais nas regiões de 5,3; 5,13; 2,96 ppm (sugerindo sistema eno-ino), mas a partir dos dados espectrais disponíveis nenhum “match” foi identificado na busca no Marinlit®, sugerindo tratar-se de um substância inédita na literatura. Espectros complementares ainda estão sendo adquiridos.



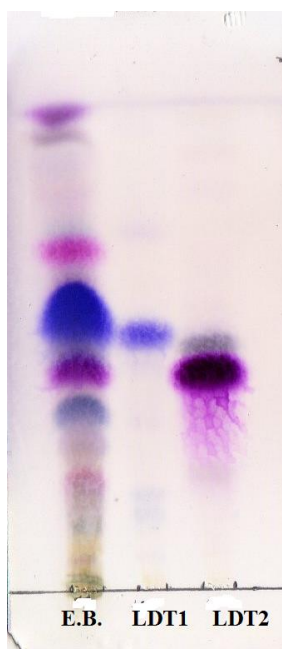
**Figura 48:** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 400 MHz) da substância LCT8.



**Figura 49:** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz) da substância LCT8.

#### 4.2. *Laurencia dendroidea*

Após a realização de sucessivos procedimentos cromatográficos, seguidos da purificação por CLAE, foram isoladas duas substâncias, cuja a elucidação estrutural deu-se através da análise dos espectros de RMN monodimensionais, bem como dos espectros IV e comparação com dados da literatura e base de dados Marinlit®.



**Figura 50:** CCD do extrato bruto de *L. dendroidea* e de frações contendo as substâncias LDT1 e LDT2. A fase móvel foi hexano/acetato de etila 9:1 e o revelador, anisaldeído-sulfúrico.

##### 4.2.1. Substância LDT1

A substância LDT1 (961,3 mg) foi isolada de diferentes frações, sendo obtida após a purificação por CLMP e CLAE (Fig. 7) como um óleo com odor característico. Apresenta-se na CCD em Hx/AcOEt (9:1) como uma mancha em Rf 0,45. Esta substância não extingue a

fluorescência em 254 nm, nem apresenta fluorescência em 366 nm; após a revelação com anisaldeído sulfúrico, adquire cor azul intensa. O comportamento cromatográfico e a comparação com o padrão de elatol confirmou trata-se desta substância, que foi isolada também de *Laurencia catarinensis* (LCT7). O espectro de  $^1\text{H}$  RMN obtido mostrou-se idêntico ao do elatol ( Fig. 43).

#### 4.2.2. Substância LDT2

A substância LDT2 (27,6 mg), foi isolada de diferentes frações, sendo obtida após a purificação por CLAE (Fig. 7) como um sólido branco inodoro. Apresenta-se na CCD em Hx:AcOEt (9:1) como uma mancha em Rf 0,38. Esta substância não extingue a fluorescência em 254 nm, nem apresenta fluorescência em 366 nm; após a revelação com anisaldeído sulfúrico, adquire cor “pink”.

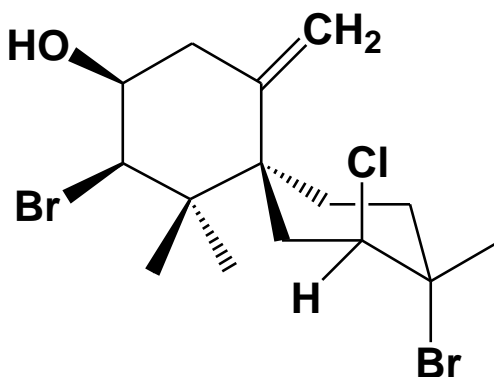
O espectro de IV sugeriu a presença de grupamento hidroxila (estiramento O-H atribuído à banda em 3.300); a banda próxima a 3.100 indica estiramento C-H de olefínico, já a banda em 1640 é indicativa de estiramento C=C e a banda intensa próxima à região de 1.100 corresponde à ligação C-O de álcool ou éter (RÜCKER, NEUGEBAUER; WILLEMS, 2001).

O espectro de  $^1\text{H}$  RMN apresentou cinco sinais de hidrogênios desprotegidos ( $\delta\text{H}$  5,14;  $\delta\text{H}$  4,90,  $\delta\text{H}$  4,42,  $\delta\text{H}$  4,40 e  $\delta\text{H}$  3,64). Os sinais em 5,14 (1 H, s) e 4,90 ppm (1 H, s) apresentam os deslocamentos esperados para hidrogênios olefínicos (4,6 a 5,3 ppm, conforme Rucker; Neugebauer e Willems, 2001). Já os sinais em 4,42, 4,40 e 3,64 ppm devem estar ligados a um átomo eletronegativo (halogênio ou oxigênio). Os singletos com intensidade para 3 H em 1,92, 1,34 e 1,06 correspondem a metilas.

Os deslocamentos químicos apresentados pela substância LDT2 já foram observados em outro metabólito do gênero *Laurencia* isolado pelo nosso grupo (dados espectrais não publicados), identificado como isoobtusol, que foi submetido à derivatização juntamente com o elatol (LANG et al., 2012). Com base nesses dados e comparando com a literatura (GONZÁLEZ et al., 1976), pode-se confirmar que o substância LDT2 é o isoobtusol (Fig.51).

**Tabela 19:** Dados de  $^1\text{H}$  RMN da substância LDT2, em comparação com a literatura para o isoobtusol.

$\delta$ H (J Hz) LDT2 (400 MHz)	$\delta$ H Isoobtusol (GONZÁLEZ et al., 1976)
5,14 s	5.19 s
4,90 s	4.92 s
4,42 sl	4,42 m
4,40 dd (12,3; 3,8)	4,42 m
3,66 sl	3,65 m
1,92 s	1,92 s
1,34 s	1,35 s
1,06 s	1,06 s



**Figura 51:** Estrutura da substância LDT2 (isoobtusol).

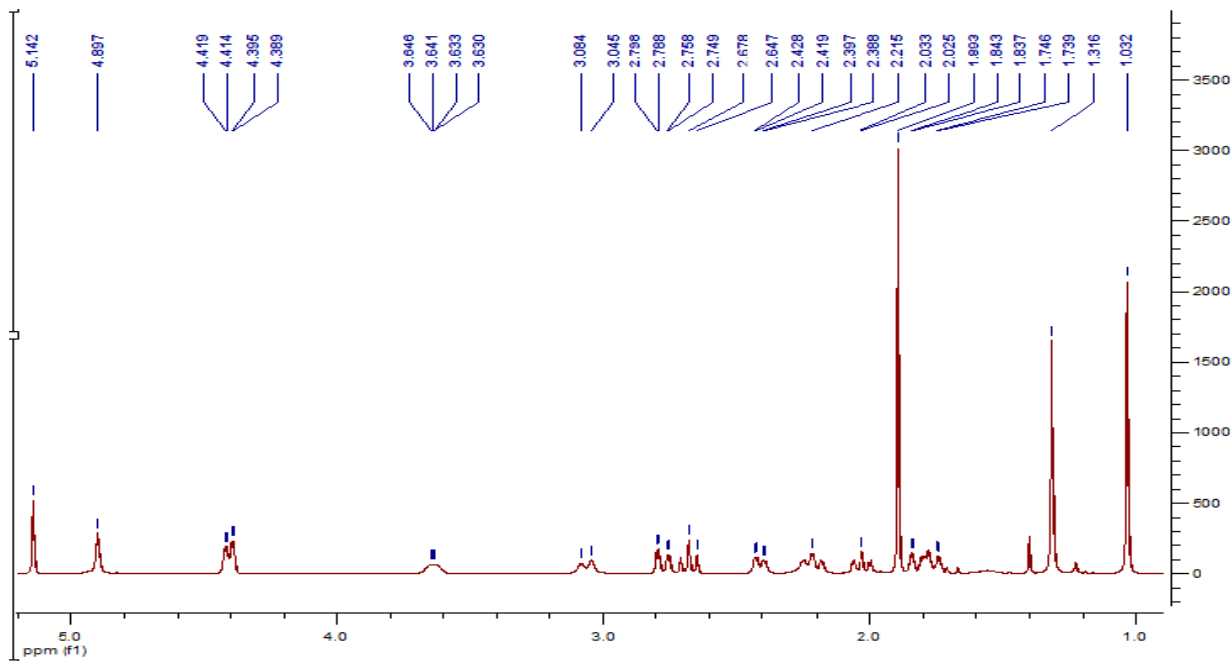
O isoobtusol foi primeiramente isolado da *Laurencia obtusa* por González e colaboradores (1976); *Proteus sp* apresentou-se resistente ao substância, enquanto uma sensibilidade parcial a ele foi apresentada por *Bacillus sphaericus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* (GONZÁLEZ; DARIAS; ESTÉVEZ, 1982).

Vairappan e colaboradores (2001) observaram que o isoobtusol inibe o crescimento da *Chromobacterium violaceum*, *Clostridium cellobioparum*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium helmiphilum*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio parahaemolyticus*. Vairappan (2003) também observou

inibição do crescimento de *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella sp* e *Citrobacter freundii* nas placas de cultivo em contato com isoobtusol.

Lang e colaboradores (2012) fizeram modificações estruturais na estrutura do isoobtusol e do elatol, com finalidade de melhorar a atividade biológica. Dos derivados obtidos, o hemisuccinato foi o que apresentou melhor perfil de atividade citotóxica para as células A549 e RD.





**Figura 52:** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) da substância LDT2.



## **CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS**



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVA

### 5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Contrariando a expectativa de que a investigação de *Laurencia catarinensis* da Ilha do Xavier poderia levar ao isolamento de metabólitos relacionados ao caespitol (isolados primeiramente de *Laurencia catarinensis* da Ilha do Arvoredo), o presente trabalho resultou no isolamento de vários metabólitos inéditos para a espécie. O interesse despertado por estas “novas substâncias” de *Laurencia catarinensis*, acabou diminuindo o tempo dedicado a outra espécie de *Laurencia* abordada nesta dissertação, de modo que desta não foram isoladas outras substâncias que não os já obtidas por Lhullier (2009).

As algas vermelhas do gênero *Laurencia* são amplamente conhecidas por apresentar uma enorme variedade de metabólitos secundários halogenados. Há indícios de que a produção dessas substâncias esteja relacionada com a adaptação à vida marinha (MACHADO et al., 2010). A concentração e a diversidade dos metabólitos podem estar diretamente relacionadas com alguns fatores ambientais, como as condições do local (salinidade, disponibilidade de nutrientes), intensidade luminosa, dessecação, herbivoria e temperatura (OLIVEIRA, 2006). O material para este trabalho de dissertação foi coletado da Ilha do Xavier (região de mesolitoral), enquanto o material do estudo fitoquímico realizado entre 2008 e 2009 (LHULLIER, 2009) foi coletado na Ilha do Arvoredo (região de infralitoral, profundidade de 2 a 5 metros). A diferença marcante entre as regiões mesolitoral e infralitoral é que a primeira apresenta algas que são adaptadas às variações da maré, enquanto a outra região é composta por espécies que ficam sempre imersas (ALMEIDA, 2008).

A literatura apresenta vários relatos de casos semelhantes de diferentes composições químicas para mesma espécie em função do local de coleta (HOWARD; NONOMURA; FENICAL, 1980; LYAKHOVA et al., 2004; CASSANO et al., 2008). Um exemplo é a espécie *Laurencia obtusa*: do material coletado no Mar Jônico na Grécia, foram isolados dois novos diterpenos (MIHOPOULOS et al., 2001), que não ocorrem na amostra da mesma espécie coletada no mesmo país, mas no Mar Egeu (ILIPOULOU et al., 2002).

Os sesquiterpenos do tipo chamigrano que foram isolados possuem como estrutura parcial um anel *spiro* fundido com um anel de 5

átomos. Esse tipo de esqueleto é distribuído amplamente no gênero, porém na literatura, quatro espécies se destacam como principal fonte desta classe (*Laurencia nidifica*, *L. nipponica*, *L. majuscula* e *L. obtusa*). Os chamigranos podem ser divididos em duas subclasses; a primeira contém um sistema de anel epóxido nos carbonos C-5 e C-10 e a segunda possui vários halogênios e oxigênios no esqueleto e não possui o sistema de anel citado para o primeiro (WANG et al., 2013). As substâncias majoritárias isoladas nesse trabalho são sesquiterpenos do tipo chamigrano, já as substâncias majoritárias isoladas no estudo com *Laurencia catarinensis* de Ilha do Arvoredo (LHULLIER et al., 2010) são derivados do bisabolano.

Outra diferença é que *Laurencia catarinensis* coletada na ilha do Xavier possui acetogeninas (LCT8 e LCT9) que ainda não haviam sido relatadas para esta espécie. A substância LCT8 pertence às acetogeninas do tipo isomaneoneno, que é bastante raro, possuindo apenas três relatos na literatura.

A substância majoritária isolada de *Laurencia dendroidea* foi identificada como o elatol, que possui uma ampla gama de atividades biológicas relatadas (tabela 20). O principal interesse em reisolar o elatol está na possibilidade de derivatização. Alguns derivados foram obtidos por Lang e colaboradores (2012). O elatol e o isoobtusol isolados de *Laurencia dendroidea* serão submetidos a derivatização em parceria com grupos da Universidade Federal de Santa Catarina e Universidade Federal de Juiz de Fora, com vistas à obtenção de glicosídeos e outros derivados, objetivando a melhora das propriedades físico-químicas e biológicas (em particular, citotóxicas). Um terceiro metabólito de interesse foi visualizado sobreposto aos majoritários nos cromatogramas, mas sua identificação não foi possível. Uma vez que o mesmo não foi visualizado em extratos obtidos anteriormente do mesmo local, é possível que se trate de um metabólito minoritário obtido em maior concentração na coleta em questão.

Na tabela 20 está o resumo das atividades biológicas já avaliadas para as substâncias isoladas neste trabalho.

**Tabela 20:** Atividades biológicas avaliadas para as substâncias isoladas de *Laurencia catarinensis* e *Laurencia dendroidea*.

SUBSTÂNCIAS	ATIVIDADES BIOLÓGICAS
Pacifenol – LCT1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apresenta atividade contra HSV-1 (KIMURA; KAMADA; TSUJIMOTO, 1999), anti-inflamatória (D'ORAZIO et al., 2012), inibição da citoquinase do ouriço do mar <i>Tetrapyqus niger</i> (ROVIROSA et al., 1999) e anti-incrustante contra mexilhão perna-perna (CASSANO et al., 2008).</li> <li>• Não apresenta atividade inseticida contra <i>Culex pipiens pallens</i> (WATANABE; UMEDA; MIYAKADO, 1989).</li> </ul>
Johnstonol – LCT2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não apresenta citotoxicidade para A549, BGC823; BEL7402, HCT8, HeLa (SUN et al., 2005) nem atividade contra HSV-1 ((KIMURA; KAMADA; TSUJIMOTO, 1999).</li> </ul>
Prepacifenol epóxido – LCT3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não apresenta atividade contra HSV-1 (KIMURA; KAMADA; TSUJIMOTO, 1999)</li> </ul>
Dehidroxiprepacifenol epóxido – LCT4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apresenta atividade contra HSV-1 (KIMURA; KAMADA; TSUJIMOTO, 1999)</li> </ul>
Deoxiprepacifenol – LCT5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apresenta atividade inseticida contra <i>Culex pipiens pallens</i> (WATANABE; UMEDA; MIYAKADO, 1989).</li> <li>• Não apresenta atividade contra HSV-1 ((KIMURA; KAMADA; TSUJIMOTO, 1999), e nem atividade antifúngica contra <i>Cladosporium cucumerinum</i> (MAO; GUO, 2010). e <i>Colletotrichum lagenarium</i> (LI et al., 2012)</li> </ul>
LCT6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Composto presumivelmente inédito</li> </ul>
Isomaneono B – LCT8	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Na literatura não foram encontrados relatos de avaliações de atividades biológicas</li> </ul>
LCT9	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Composto presumivelmente inédito</li> </ul>
Elatol – LCT7 e LDT1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apresenta atividades: anti-incrustante (DA GAMA et al., 2002), antifúngica (KÖNIG; WRIGHT, 1997), antileishmania (SANTOS et a., 2010), antitripanosoma (DESOTI et al., 2012), antibacteriana (VAIRAPPAN et al., 2001; VAIRAPPAN, 2003), antitumoral (CAMPOS et al., 2012).</li> <li>• Não apresentou atividade anti-herbivoria (LHULLIER et al., 2009).</li> <li>• OBS: derivados testados para atividade citotóxica para A549 e RD (LANG et al., 2012)</li> </ul>
Isoobtusol – LDT2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apresenta atividade antibacteriana (VAIRAPPAN et al., 2001; VAIRAPPAN, 2003).</li> <li>• OBS: derivados testados para atividade citotóxica para A549 e RD (LANG et al., 2012)</li> </ul>

## 5.2 PERSPECTIVAS

Observações realizadas em diferentes locais, na Ilha de Santa Catarina e no litoral continental, apontaram a existência de algumas

populações de *Laurencia dendroidea* com aspecto diferenciado, em particular quanto ao porte mais avantajado dos espécimes. Dificuldades climáticas nos períodos previstos para maré baixa impediram, por questões de segurança, a coleta de exemplares para avaliação cromatográfica dos extratos. A investigação deste material diferenciado poderia contribuir para um melhor conhecimento sobre esta espécie.

Em relação a *Laurencia catarinensis*, no decorrer dos últimos anos constatou-se o seu aparente desaparecimento da Ilha do Arvoredo, em especial após fortes chuvas no litoral catarinense em 2009; os bancos onde a alga foi coletada praticamente desapareceram após aquele evento e não foram reconstituídos até o momento. Este fenômeno levou à sua busca em outras ilhas, sendo então realizado o presente estudo com o material da Ilha do Xavier, onde a espécie vem apresentando uma curiosa interação com outra alga (*Hypnea sp*) crescendo sobre a mesma rocha. A alga em questão está crescendo misturada e se tornando semelhante a *Laurencia catarinensis*, numa aparente camuflagem. Este co-crescimento dificulta a triagem do material, o que reduziu o rendimento das coletas efetuadas, especialmente considerando que quando o material foi coletado, os tufos aparentavam ser constituídos apenas por *L. catarinensis*.

Considerando o endemismo da espécie e o interesse pela sua diversidade química, a continuidade das investigações seria extremamente relevante, tanto no sentido de esclarecer seus mecanismos de adaptação ao ambiente, como de monitorar sua ocorrência nas ilhas e locais em que já foi relatada e principalmente no sentido de tentar preservar esta espécie. Sua ocorrência na Ilha do Arvoredo foi registrada em uma área protegida, em que foram encontradas formações abundantes. Nos outros locais em que foi observada desde 2008 (Barra da Lagoa, Ilha do Xavier e Praia do Gravatá), os tufos apresentavam-se geralmente mais escassos. Deve-se destacar que desde aquela época até o momento atual, a presença de embarcações a motor ao redor da Ilha de Santa Catarina também tem aumentado, o que pode ter contribuído para o desaparecimento da espécie no canal da Barra.

Dado o grande interesse despertado pelos metabólitos de *L. catarinensis*, estudos de cultivo desta espécie estão em andamento no Laboratório de Ficologia do Departamento de Botânica da UFSC.

As substâncias pacifenol, prepacifenol epóxido (LCT3), isomaneoneno B (LCT8), LCT6 e LCT9 (após finalizada sua elucidação estrutural) serão encaminhados para avaliação da citotoxicidade.



Em relação à função biológica destas substâncias na alga, é provável que exerçam algum papel na defesa química frente a predadores. Assim, estudos preliminares de herbivoria estão sendo delineados com a alga fresca e o extrato de *Laurencia catarinensis* frente a ouriços-do-mar, em colaboração com colegas do Departamento de Botânica (CCB, UFSC). Caso haja evidência de efeito anti-herbivoria, serão realizados novos estudos com as substâncias isoladas.

Está sendo preparada uma publicação com as substâncias inéditas isolados de *L. catarinensis* da Ilha do Arvoredo e as substâncias isoladas da mesma espécie da Ilha do Xavier. Dependendo dos resultados dos testes de atividade biológica com estas substâncias e com os derivados de elatol e isoobtusal a ser obtidos, outras publicações serão preparadas.



**CONCLUSÕES**



## 6 CONCLUSÕES

- A investigação química de *Laurencia dendroidea* resultou no reisolamento dos sesquiterpenos halogenados elatol e isoobtusol, que serão objeto de procedimentos de derivatização com vistas à melhoria da atividade citotóxica.

- A investigação química de *Laurencia catarinensis* da Ilha do Xavier resultou no isolamento de sete sesquiterpenos halogenados e duas acetogeninas. Das nove substâncias, sete são conhecidas: pacifenol, johnstonol, prepacifenol epóxido, dehidroxiprepacifenol epóxido, deoxiprepacifenol, elatol e isomaneoneno B; as outras duas substâncias (um sesquiterpeno e uma acetogenina) parecem ter estrutura inédita.

- Quatro substâncias isoladas (pacifenol, johnstonol, prepacifenol epóxido e isomaneoneno B) estão sendo relatadas pela primeira vez para a espécie; três substâncias isoladas (dehidroxiprepacifenol, deoxiprepacifenol e LCT6) já haviam sido obtidas também do extrato da espécie coletada na Ilha do Arvoredo, mas de modo geral foi observada uma notável diferença química entre o material desta espécie coletado nas duas ilhas.

- Considerando as variações observadas para ambas espécies em função do local de coleta, a realização de estudos de monitoramento destas espécies em seus habitats poderia contribuir para uma melhor compreensão do efeito de fatores ambientais na produção dos metabólitos e de outras interações que possam estar ocorrendo.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALGAEBASE, **Algaebase**, Word-wide electronic publication, Galway, Irlanda, 2014. Disponível em : <http://www.algaebase.org/>, acessado em 20 de fevereiro de 2014.

ALGAEMARISBRASILIS. **Algas Marinhas Bênticas do Brasil**, Florianópolis, Brasil, 2013. Disponível em: <http://www.algaemarisbrasilis.ccb.ufsc.br/>, acessado em 16 de outubro de 2013

ARGANDOÑA, V.H.; MARTÍN, A.S.; ROVIROSA, J. Halogenated sesquiterpenes pacifenol and pacifenol derivatives on the aphid *Schizaphis graminum*. **Phytochemistry**, v.32, n.5, p.1159-1161, mar., 1993.

ALMEIDA, V.F. Importância dos costões rochosos nos ecossistemas costeiros. **Cadernos de Ecologia Aquática**, v.3, n.2, p.19-32, ago/dez., 2008.

BAPTISTA, L.R.M. Flora marinha de Torres (Chlorophyta, Xanthophyta, Phaeophyta, Rhodophyta). **Boletim do Instituto de Biociências**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Série Botânica, v.37, p.1-244, 1977.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 16, n.6, p. 981–987, jun., 1951

BERGMANN, W.; BURKE, D. C. Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothymidine and spongouridine. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 20, n.11, p. 1501-1507, nov., 1955.

BERLINCK, R.G.; HAJDU, E.; ROCHA, R.M.; OLIVEIRA, J.H.; HERNÁNDEZ, I.L.; SELEGHIM, M.H.R.; GRANATO, A.C.; ALMEIDA, E.V.R.; NUNEZ, C.V.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; CAVALCANTI, B.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; THIEMANN, O.; SILVA, O.; SILVA, M.; SOUZA, A.O.; SILVA, C.L.; MINARINI, P.R.R. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 67, n.3, p. 510-522, mar., 2004.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; HU, W.P.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, v.24, n.1, p.31-86, jan., 2007.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; HU, W.P.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, v.25, n.1, p.35-94, jan., 2008.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; HU, W.P.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, v.26, n.2, p.170-244, feb., 2009.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v.20, n.1, p.1-48, jan., 2003.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v.21, n.1, p.1-49, jan., 2004.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, v.22, n.1, p.15-61, jan., 2005.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, v.23, n.1, p.26-78, jan., 2006.



BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, v.27, n.2, p.165-237, feb., 2010.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, v.28, n.2, p.196-268, feb., 2011.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, v.29, n.2, p.144-222, feb., 2012.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; KEYZERS, R.A.; MUNRO, M.H.G.; PRINSEP, M.R. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, v.30, n.2, p.237-323, feb., 2013.

BOURGUET-KONDROCKI, M.L.; KORNPROBST, J.M. Marine Pharmacology: Potentialites in the treatment of infectious diases, osteoporosis and Alzheimer's diase. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 97, p. 105-131, 2005.

CABRITA, M.T.; VALE, C.; RAUTER, A.P. Halogenated compounds from marine algae. **Marine Drugs**, v.8, n.8, p.2301-2317, aug., 2010.

CACCAMESE, S.; COMPAGNINI, A.; TOSCANO, R.M. Pacifenol from the Mediterranean red alga *Laurencia majuscula*. **Journal of Natural Products**, v.49, n.1, p.176-174, jan., 1986.

CAMPOS, A.; SOUZA, C.B.; LHULLIER, C.; FALKENBERG, M.; SCHENKEL, E.P.; DO-VALLE, R.M.R.; SIQUEIRA, J.M. Anti-tumor effects of elatol, a marine derivative compound obtained from the red algae *Laurencia microcladia*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.64, n.8, p.1146-1154, aug., 2012.

CASSANO, V. **Taxonomia e filogenia do complexo *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta), com ênfase no estado do Rio de Janeiro, Brasil**. 378 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, São Paulo, 2009.

CASSANO, V.; DE-PAULA, J.C.; FUJII, M.T.; GAMA, B.A.P.; TEIXEIRA, V.L. Sesquiterpenes from the introduced red seaweed *Laurencia caduciramulosa* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.36, n.3, p.223-226, mar., 2008.

CORDEIRO-MARINO, M., FUJII, M.T.; YAMAGHISHI-TOMITA, N. Morphological and cytological studies on Brazilian *Laurencia*. 1: *L. arbuscula* Sonder (Rhodomelaceae, Rhodophyta). **Rickia**, v.10, p.29-39l, 1983.

CORDEIRO-MARINO, M.; FUJII, M.T. *Laurencia catarinensis* (Rhodomelaceae, Rhodophyta), a new species from Ilha de Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.8, p. 47-53, 1985.

COSTA-LOTUFO, L.V.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C.; EPIFANIO, R.A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico e perspectivas. **Química Nova**, v.32, n.3, p.703-716, 2009.

D'ORAZIO, N.; GAMMONE, M.A.; GEMELLO, E.; GIROLAMO, M.; CUSENZA, S.; RICCIONI, G. Marine bioactives: pharmacological properties and potencial applications against inflammatory diseases. **Marine Drugs**, v.10, n.4, p.812-833, apr., 2012.

DA GAMA, B.A.P.; PEREIRA, R.C.; CARVALHO, A.G.V.; COUTINHO, R.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. The effects of seaweed secondary metabolites on biofouling. **Biofouling**, v.18, n.1, p.13-20, 2002.

DESOTI, V.C.; BIDÓIA, D.L.; SUDATTI, D.B.; PEREIRA, R.C.; ALONSO, A.; NAKAMURA, T.U.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V.; SILVA, S.O. Trypanocidal action of elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction. **Marine Drugs**, v.10, n.8, p.1631-1646, aug., 2012

DIAS, D.A.; URBAN, S. Phytochemical studies of the southern Australian marine alga, *Laurencia elata*. **Phytochemistry**, v.72, n.16, p.2081-2089, nov., 2011.

DIAS, T.; BRITO, I.; MOUJIR, L.; PAIZ, N.; DARIAS, J.; CUETO, M. Cytotoxic sesquiterpenes from *Aplysia dactylomela*. **Journal of Natural Products**, v.68, n.11, p.1677-1679, nov., 2005.

FALKENBERG, M.; IOANNOU, E.; LHULLIER, C.; PAPAZAFIRI, P.; SCHENKEL, E. P.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. Evaluation of cytotoxicity of halogenated metabolites isolated from the Brazilian red alga *Laurencia catarinensis*. In: **Trends in Natural Products Research**, 1., 2011, Kolymvari - Crete, Greece. Book of abstracts. Athens: Phytochemical Society of Europe 2011, p.130.

FALKENBERG, P. **Die Rhodomelaceen des Golfes von Neapel und der Angrenzenden Meeres-Abschnitte**. Berlin; Fauna Flora Golfes Neapel, 1901, 754p.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v.15, n.2, p.113-157, 1998.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v.16, n.2, p.155-198, 1999.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v.17, n.1, p.7-55, 2000.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v.18, n.1, p.1-49, 2001.

FAULKNER, D. J. Marine natural products: metabolites of marine algae and hervivorous marine molluscs **Natural Products Reports**, v.1, n.3, p.251-280, 1984.

FAULKNER, D.J.; STALLARD, M.O.; IRELAND, C. Prepacifenol epoxide, a halogenated sesquiterpene diepoxide. **Tetrahedron Letters**, v.15, n.40, p.3571-3574, 1974.

FERRARO V.; CRUZ I.G.; JORGE R.F.; MALCATA F.X.; PINTADO M.E.; CASTRO P.M.L. Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: a review. **Food Research International**, v.43, n.9, p.2221-2233, nov., 2010.

FRONCZEK, B.F.; CACCAMESE, S. Redetermination of the absolute configuration of deoxyprepacifenol, from the Mediterranean red alga *Laurencia majuscula*. **Acta Crystallographica Section C**, v.45, n.7, p.1102-1104, jul., 1989.

FUJII, M.T.; CASSANO, V.; STEIN, É.M.; CARVALHO, L.R. Overview of the taxonomy and of the major secondary metabolites and their biological activities related to human health of the *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n.2, p. 268-282, mar/abr., 2011.

FUKUSAWA, A.; HONMA, T.; TAKASUGI, Y.; MURAI, A. Biogenetic intermediates, (3*e* and 3*z*,12*z*)-laurediols and (3*e* and 3*z*)-12,13- dihydrolaurediols, isolated from *Laurencia nipponica*. **Phytochemistry**, v.32, n.6, p.1435-1438, 1993.

GONZÁLEZ, A. G.; DARIAS, V.; ESTÉVEZ, E. Chemotherapeutic activity of polyhalogenated terpenes from Spanish algae. **Planta Medica**, v.44, n.1, p.44-46, jan., 1982.

GONZÁLEZ, A. G.; DARIAS, J.; DÍAZ, A.; FOURNERON, J.D.; MARTÍN, J.D.; PÉREZ, C. Evidence for the biogenesis of halogenated chamigrenes from the red alga *Laurencia obtusa*. **Tetrahedron Letters**, v.17, n.35, p.3051-3054, aug., 1976.

GONZÁLEZ, A.G.; MARTÍN, J.D.; MARTÍN, V.S.; NORTE, M. Carbon-13 NMR application to *Laurencia* polyhalogenated sesquiterpenes. **Tetrahedron Letters**, v.20, n.29, p.2719-2722, 1979.

GRANADO, I.; CABALLERO, P.; Chemical defense in the seaweed *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux. **Scientia Marina**, v.59, supl.1, p.31-39, dec., 1995.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, Irlanda, 2014. Disponível em: <http://www.algaebase.org/>, acessado em 04 de janeiro de 2014.

HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discovery Today**, v. 8, n.12, p.536-544, jun., 2003.

HORTA, P.A. **Aspectos taxonômicos e ecologia de macroalgas bêmicas**. Florianópolis: UFSC, 2000.

HOWARD, B.M.; NONOMURA, A.M.; FENICAL, W. Chemotaxonomy in marine algae: secondary metabolite synthesis by *Laurencia* in unialgal culture. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.8, n.4, p.329-336, nov., 1980.

HU, G.P.; YUAN, J.; SUN, L.; SHE, Z.G.; WU, J.H.; LAN, X.J.; ZHU, X.; LIN, Y.C.; CHEN, S.P. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. **Marine Drugs**, v.9, n.4, p.514-525, apr., 2011.

ILIOPOULOU, D.; VAGIAS, C.; HARVALA, C.; ROUSSIS, V. C<sub>15</sub> acetogenins from the red alga *Laurencia obtusa*. **Phytochemistry**, v.59, n.1, p. 111-116, jan., 2002.

IRELAND, C.; STALLARD, M.O.; FAULKNER, D.J.; FINER, J.; CLARDY, J. Some chemical constituents of the digestive gland of the sea hare *Aplysia californica*. **The Journal of Organic Chemistry**, v.41, n.14, p.2461-2465, jul., 1976.

KAISER, C.R. RMN 2D: detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v.23, n.2, p.231-236, mar/abr., 2000.

KAISER, C.R.; PITOMBO, L.F.; PINTO, A.C. C-13 and H-1 NMR assignments of the chamigrenes prepacifenol and dehydroxyprepacifenol epoxides. **Spectroscopy Letters**, v.31, n.3, p.573-585, apr., 1998.

KAISER, C.R.; PITOMBO, L. F.; PINTO, A.C. Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C RMN assignments of chamigrenes from *Aplysia dactilomela*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.39, n.3, p.147-149, mar., 2001.

KIJOA, A.; SAWANGWONG, P. Drugs and Cosmetics from the Sea. **Marine Drugs**, v. 2, n.2, p. 73-82, jun., 2004.

KIMURA, J.; KAMADA, N.; TSUJIMOTO, Y. Fourteen chamigrane derivatives from a red alga, *Laurencia nidifica*. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v.72, n.2, p.289-292, feb., 1999.

KÖNIG, G.M.; WRIGHT, A.D. *Laurencia rigida*: chemical investigations of its antifouling dichloromethane extract. **Journal of Natural Products**, v.60, n.10, p.967-970, oct., 1997.

KYLIN, H. **Die Gattungen der Rhodophyceae**. Gleerups, Lund, Gleerups, 1956, 673p.

KYLIN, H. Studien über die Entwicklungsgeschichte der Florideen. **Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar**, v.63, p.1-139, 1923.

LANG, K.L.; SILVA, I.T.; ZIMMERMANN, L.A.; LHULLIER, C.; ARANA, M.V.M.; PALERMO, J.A.; FALKENBERG, M.; SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; DURÁN, F.J. Cytotoxic activity of semi-synthetic derivatives of elatol and isoobtusol. **Marine Drugs**, v.10, n.10, p.2254-2264, oct., 2012.

LEE, R.E. **Phycology**, 3 ed. Cambridge; Cambridge University Press, 1999, 614p.

LHULLIER, C. **Investigação química de espécies do gênero *Laurencia* Lamouroux na costa sul brasileira**. 291 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2009.

LHULLIER, C.; DONNANGELO, A.; CARO, M.; PALERMO, J.A.; HORTA, P.A.; FALKENBERG, M.; SCHENKEL, E.P. Isolation of elatol from *Laurencia microcladia* and its palatability to the sea urchin *Echinometra lucunter*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.37, n.4, p. 254-259, oct., 2009.

LHULLIER, C.; FALKENBERG, M.; IOANNOU, E.; QUESADA, A.; PAPAZAFIRI, P.; HORTA, P.A.; SCHENKEL, E.P.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. Cytotoxic halogenated metabolites from the brazilian red alga *Laurencia catarinensis*. **Journal of Natural Products**, v.73, n.1, p.23-32, jan., 2010.

LI, X.D.; MIAO, F.P.; YIN, X.L.; LIU, J.L.; JI, N.Y. Sesquiterpenes from the marine red alga *Laurencia composita*. **Fitoterapia**, v.83, n.7, p.1191-1195, oct., 2012.

LYAKHOVA, E.G.; KALINOVSKY, A.I.; KOLESNIKOVA, S.A.; VASKOVSKY, V.E.; STONIK, V.A. Halogenated diterpenoids from the red alga *Laurencia nipponica*. **Phytochemistry**, v.65, n.18, p.2527-2532, sep., 2004.

MAHADO, F.L.S.; KAISER, C.R.; COSTA, S.S.; GESTINARI, L.M.; SOARES, A.R. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.3, p.441-452, jun/jul., 2010.

MACHADO, F.L.S.; PACIENZA-LIMA, W.; ROSSI-BERGMANN, B.; GESTINARI, L.M.S.; FUJII, M.T.; PAULA, J.C.; LOPES, N.P.; KAISER, C.R.; SOARES, A.R. Antileishmanial sesquiterpenes from the brazilian red alga *Laurencia dendroidea*. **Planta Medica**, v.77, n.7, p.733-735, may, 2011.

MAO, S.C.; GUO, Y.W. Sesquiterpenes from chinese red alga *Laurencia okamurai*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v.8, n.5, p.321-325, sep., 2010.

MASCHEK, J.A.; BAKER, B.J. The chemistry of algal secondary metabolism. In: AMSLER, Charles D. **Algal Chemical Ecology**. Berlin: Springer; 2008, p.1-24.

McPHAIL, K.L.; COLEMAN, M.T.D.; COPLEY, R.C.B.; EGGLESTON, D.S. New halogenated sesquiterpenes from south African specimens of the circumtropical sea hare *Aplysia dactylomela*. **Journal of Natural Products**, v.62, n.12, p. 1618-1623, dec., 1999.

MIHOPOULOS, N.; VAGIAS, C.; MIKROS, E.; SCULLOS, M.; ROUSSIS, V. Prevezols A and B: new brominated diterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*. **Tetrahedron Letters**, v.42, n.22, p.3749-3752, may, 2001.

MONTASER, R.; LUESCH, H. Marine natural products: a new wave of drugs? **Future Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 12, p. 1475–1489, sep., 2011.

NYS, R.; COLL, J.C.; BOWDEN, B. F. Tropical marine algae. A new sesquiterpenoid metabolite from the red alga *Laurencia marianensis*. **Australian Journal of Chemistry**, v.46, n.6, p.933-937, jun., 1993.

OBATA, Y.; FUKUZUMI, S. Essencial oil in *Laurencia glandulifera*. **Nippon Nogei Kagaku Kaishi**, v.27, p.331-334, 1953.

OJIKI, M.; SHIZURI, Y.; YAMADA, K. A halogenated chemigrane epoxide and six related halogen-containing sesquiterpenes from the red alga *Laurencia okamurai*. **Phytochemistry**, v.21, n.9, p. 2410-2411, 1982.

OLIVEIRA, A.S. **Varição qualitativa e quantitativa e ação defensiva de metabólitos secundários em macroalgas marinhas do gênero *Dictyota* Lamouroux (Phaeophyta, Dictyotales)**. 94 f. Dissertação (Mestrado). – Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Programa de Pós-graduação em Biologia Marinha, Niterói, 2006.

PALERMO, J. A. Productos Naturales de Origen Marina. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (ORG.). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: EDUFRGS; Florianópolis: EDUFSC, 2003. cap. 38, p. 996-1044.

PEREIRA, R.C.; DA GAMA, B.A.P.; TEIXEIRA, V.L.; YONESHIGUE-VALENTIN; Y. Ecological roles of natural products of the brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. **Brazilian Journal of Biology**, v.63, n.4, p.665-672, nov., 2003.



PEREIRA, R.C.; TEIXEIRA; V.L. Sesquiterpenos das algas marinhas *Laurencia* Lamouroux (Ceramiales, Rhodophyta). **Química Nova**, v.22, n.3, p.369-374, maio/jun., 1999.

PEREIRA, R.C.; COSTA-LOTUFO; L.V. Bioprospecting for bioactives from seaweeds: potencial, obstacles and alternatives. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, n.4, p.894-905, aug., 2012.

PINHEIRO-JOVENTINO, F., DANTAS, N.P.; MARASCHIN, C. D.H. Distribuição de algas marinhas no litoral de Fortaleza, Ceará, Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.31, p.29-40, 1998.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, supl.1, p.45-61, maio, 2002.

POHLIT, A.M.; FERRAZ, H.M.C. Estudos de RMN de epóxidos: uma visão geral. **Química Nova**, v.18, n.2, p.160-170, mar/abr., 1995.

POMPONI, S. A. The oceans and human health: the discovery and development of marine-derived drugs. **Oceanography**, v.14, n.1, p.78-87, 2001.

ROVIROSA, J.; SOTO, H.; CUETO, M.; DÁRIAS, J.; HERRERA, J.; SAN-MARTÍN, A. Sesquiterpenes from *Laurencia claviformis*. **Phytochemistry**, v.50, n.5, p.745-748, mar., 1999.

RÜCKER, G.; NEUGEBAUER, M.; WILLENS, G. G. **Instrumentelle pharmazeutische Analytik**. 2<sup>a</sup> ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2001.

SALGADO, L.T.; VIANA, N.B.; ANDRADE, L.R.; LEAL, R.N.; DA GAMA, B.A.P.; ATTÍAS, M.; PEREIRA, R.C.; FILHO, G.M.A. Intra-cellular storage, transport and axocytosis of halogenated compounds in marine red alga *Laurencia obtusa*. **Journal of Structural Biology**, v.162, n.2, p.345-355, may, 2008.

SANTOS, A.O.; SANTOS, P.V.; NAKAMURA, T.U.; FILHO, B.P.D.; SUDATTI, D.B.; BIANCO, E. M.; PEREIRA, R.C.; NAKAMURA, C.V. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. **Marine Drugs**, v.8, n.11, p.2733-2743, nov., 2010.

SENTÍES A.; FUJII, M.T. El complejo *Laurencia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) en el Caribe mexicano. In: A Sentíes & Dreckmann, K.M. (Eds). **Monografías Ficológicas**. Universidad Autônoma Metropolitana – Iztapalapa y Red Latinoamericana de Botanica, 2002, p.121-192.

SIMS, J.J.; FENICAL, W.; WING, R.M.; RADLICK, P. Marine natural products III. Johnstonol, an unusual halogenated epoxide from the red alga *Laurencia johnstonii*. **Tetrahedron Letters**, v.13, n.3, p.195-198, 1972.

SIMS, J.J.; FENICAL, W.; WING, R.M.; RADLICK, P. Marine natural products.I. Pacifenol, a rare sesquiterpene containing bromine and chlorine from the red alga, *Laurencia pacifica*. **Journal of the American Chemical Society**, v.93, n.15, p.3774-3775, jul., 1971.

SIMS, J.J.; LIN, G.H.Y.; WING, R.W. Marine natural products. Elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga *Laurencia elata*. **Tetrahedron Lettets**, v.15, n.39, p.3487-3490, 1974.

SMIT, A.J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Journal of Applied Phycology**, v.16, n.4, p. 245-262, aug., 2004.

SUN, J.; SHI, D.; MA, M.; LI, S.; WANG, S.; HAN, L.; YANG, Y.; FAN, X.; SHI, J.; HE, L. Sesquiterpenes from the red alga *Laurencia tristicha*. **Journal of Natural Products**, v.68, n.6, p.915-919, jun., 2005.

TOPCU, G.; AYDOGMUS, Z.; IMRE, S.; GOREN, A.C.; PEZZUTO, J.M.; CLEMENT, J.A.; KINGSTON, D.G.I. Brominated sesquiterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*. **Journal of Natural Products**, v.66, n.11, p. 1505-1508, nov., 2003.

VAIRAPPAN, C.S. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Biomolecular Engineering**, v.20, n.4-6, p.255-259, jul., 2003.

VAIRAPPAN, C.S.; ANANGDAN, S.P.; TAN, K.L.; MATSUNAGA, S. Role of secondary metabolites as defense chemicals against ice-ice disease bacteria in biofouler at carrageenophyte farms. **Journal of Applied Phycology**, v.22, n.3, p.305-311, jun., 2010.

VAIRAPPAN, C.S.; DALTON, M.; SUZUKI, M.; ABE, T.; MASUDA, M. Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. **Phytochemistry**, v.58, n.2, p.291-297, sep., 2001.

WANG, B.G.; GLOER, J.B.; JI, N.Y.; ZHAO, J.C. Halogenated organic molecules of Rhodomelaceae origin: chemistry and biology. **Chemical Reviews**, v.113, n.5, p.3632-3685, may, 2013.

WARASZKIEWICZ, S.M.; SUN, H.H.; ERICKSON, K.L.; FINER, J.; CLARDY, J. C<sub>15</sub> halogenated compounds from the Hawaiian marine alga *Laurencia nidifica*. Maneonenes and isomaneonenes. **The Journal of Organic Chemistry**, v.43, n.16, p.3194-3204, aug., 1978.

WATANABE, K.; UMEDA, K.; MIYAKADO, M. Isolation and identification of three insecticidal principles from the red alga *Laurencia nipponica* Yamada. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.53, n.9, p.2513-2515, sep., 1989.

WIJESINGHE, W.A.J.P.; KIM, E.; KANG, M.C.; LEE, W.W.; LEE, H.S.; VAIRAPPAN, C.S.; JEON, Y.J. Assessment of anti-inflammatory effect of 5 $\beta$ -hydroxypalisadin B isolated from red seaweed *Laurencia snackeyi* in zebrafish embryo in vivo model. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.37, n.1, p.110-117, jan., 2014.