

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

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DE ALGAS
PARDAS DO ATLÂNTICO SUL BRASILEIRO**

Ana Cláudia Philippus

Florianópolis
2016

Ana Cláudia Philippus

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DE ALGAS
PARDAS DO ATLÂNTICO SUL BRASILEIRO**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Miriam de
Barcellos Falkenberg.

Florianópolis
2016

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

Philippus, Ana Cláudia
Investigação química de extratos de algas pardas do
Atlântico Sul brasileiro / Ana Cláudia Philippus ;
orientadora, Miriam de Barcellos Falkenberg -
Florianópolis, SC, 2016.
150 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Canistrocarpus cervicornis. 3. Dictyota
mertensii. 4. Diterpenos. I. Falkenberg, Miriam de
Barcellos . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

“Investigação química de extratos de algas pardas do atlântico sul brasileiro”

POR

Ana Cláudia Philippus

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Karin Silva Caumo (UFSC – Membro Titular)

Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo (UFSC – Membro Titular)

Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho (UNIVALI – Membro Titular)

Prof.^a Dr.^a Miriam de Barcellos Falkenberg (UFSC – Orientador(a))

Prof.^a Dr.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me acompanhado sempre, sem nunca deixar que eu desistisse dos meus sonhos.

Agradeço a toda minha família, especialmente à minha mãe Veneranda, por ter sempre me motivado e por ter tornado possível a realização de mais um sonho; às minhas irmãs Adriana e Liliane, por todo o apoio e amizade; e às minhas sobrinhas Luiza e Lívia, por trazerem sempre muita alegria.

À minha orientadora, Miriam de Barcellos Falkenberg, pela orientação, paciência, conhecimento e tempo dedicado à realização deste trabalho.

Aos colegas do projeto ProspecMar-Ilhas, pela coleta e identificação das algas, em especial ao Prof. Dr. Paulo Horta, à Marina e ao Renato. Ao CNPq pelo financiamento do projeto ProspecMar-Ilhas.

Ao grupo do Prof. Vassilios Roussis da Universidade de Atenas, por todo o conhecimento e acolhida.

Agradeço aos professores que contribuíram para a realização de análises: Vassilios Roussis, Alessandra Valverde (UFF), Michele Debiasi Alberton (FURB) e Márcia Regina Franzolin (Instituto Butantan).

Agradeço imensamente aos amigos Gabriele, Lucas e Tauana por todo o auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho. Aos demais colegas do grupo GEPRONAS, pelos momentos e conhecimentos compartilhados.

Aos meus amigos de Salete, Florianópolis e Atenas, em especial àqueles que contribuíram diretamente no desenvolvimento deste trabalho: Cintia, Daniela, Germana, Lara, Rafael, Tamires e Vanessa.

Um agradecimento especial ao Luiz, meu namorado, por toda a força, apoio e paciência durante o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço à coordenação, professores e servidor do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC, por todo o conhecimento e suporte e à CAPES, pelo apoio financeiro na forma de bolsa de mestrado.

*O futuro pertence àqueles que acreditam na
beleza de seus sonhos!*

Eleanor Roosevelt

RESUMO

Algas pardas da família Dictyotaceae são conhecidas por produzirem uma ampla variedade de metabólitos secundários bioativos. Muitos desses metabólitos já demonstraram potencial antifúngico, antibacteriano, antiviral, além de exercerem múltiplas funções nas algas. Estudos químicos da espécie *Canistrocarpus cervicornis* levaram ao isolamento de diterpenos dos tipos dolastano e secodolastano, enquanto de *Dictyota mertensii* foram isolados os guaianos prenilados. Organismos marinhos geralmente apresentam uma diversidade química considerável entre amostras coletadas em locais diferentes. Nesse trabalho foram investigadas as espécies *C. cervicornis* (C2) e *D. mertensii* (D5) coletadas na “Pedra do Paraíso” (CE) e Ilha da Trindade (ES), respectivamente. C2 e D5 foram selecionados por apresentarem resultados promissores a partir de uma triagem das atividades antioxidante e antimicrobiana, realizadas por grupos parceiros. As algas previamente secas foram maceradas em diclorometano/metanol 2:1 e fracionadas através de sucessivas separações cromatográficas, geralmente utilizando sílica gel e solventes de polaridade crescente. O monitoramento de extratos e frações foi realizado por cromatografia em camada delgada. As substâncias isoladas foram analisadas por métodos espectroscópicos. De *C. cervicornis* foram isolados os diterpenos do tipo dolastano Cc2 (4 α -acetóxi-9 β ,14 α -dihidroxi-dolasta-1(15),7-dieno) e Cc4 (4 α -acetóxi-14 α -hidroxidolasta-1(15),7,9-trieno), além de um hidrocarboneto, um ácido graxo e outros 12 compostos ainda não identificados. De *D. mertensii* foram isolados os diterpenos Dm2 (acetato de dictyol B, do tipo guaiano prenilado) e Dm3 (10-acetóxi-18-hidroxi-dolabela-2,7-dieno, do tipo dolabelano), os plasticidas Dm1 (ftalato de dipentila) e Dm5 (adipato de bis(2-(2-butoxi)etoxi) etila), além de outras seis substâncias ainda não identificadas. Dm3 é inédito para *D. mertensii* e é o primeiro diterpeno do tipo dolabelano isolado da espécie. Considerando os resultados obtidos para ambas as espécies e as variações químicas e biológicas observadas em função do local de coleta, a continuidade dos seus estudos contribui para o esclarecimento da distribuição de metabólitos secundários entre as espécies, bem como do potencial farmacológico e ecológico dos mesmos.

Palavras-chave: *Canistrocarpus cervicornis*. *Dictyota mertensii*. Diterpenos. Antioxidante. Antimicrobiana.

ABSTRACT

PHILIPPUS, A. C. **Chemical investigation of brown algae extracts from Brazilian South Atlantic.** 2016. 150p. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

Brown algae of Dictyotaceae family are known to produce a wide variety of bioactive secondary metabolites. Many of these metabolites have shown antifungal, antibacterial and antiviral activities, and play multiples functions in algae. Previous investigations on *Canistrocarpus cervicornis* led to the isolation of dolastane and secodolastane diterpenes, while *Dictyota mertensii* samples afforded prenylated guaianes. Identical marine organisms present usually a considerable chemicals change among samples collected from different locations. This study investigated species *C. cervicornis* and *D. mertensii* collected in “Pedra do Paraíso” (CE) and Trindade Island (ES), respectively. These extracts were selected after a screening of antioxidant and antimicrobial activities performed by partner groups, since they showed the most promising results. The dried algae were soaked in dichloromethane/methanol 2:1 (v/v) and fractionated by successive chromatographic separations with silica gel and solvents of increasing polarity. Extracts and fractions were monitored by thin layer chromatography. Isolated compounds were identified by spectroscopic methods. Two diterpenes of dolastane types, Cc2 (4 α -acetoxy-9 β , 14 α -dihydroxydolasta-1 (15), 7-diene) and Cc4 (4 α -acetoxy-14 α -hidroxydolasta-1 (15) 7 9-triene), along with a hydrocarbon, a fatty acid and 12 yet unidentified compounds were isolated from *C. cervicornis*. From *D. mertensii* were isolated two diterpenes Dm2 (dictyol B acetate, a prenylated guaiane) and Dm3 (10-acetoxy-18-hidroxydolabela-2,7-diene, a dolabellane), besides the plasticizers Dm1 (dipentyl phthalate) and Dm5 (adipate bis (2- (2-butoxyethoxy) ethyl), and six other substances not yet identified. Dm3 is new reported from *D. mertensii* and it is the first dolabellane isolated in this species. Considering the results obtained for both species, besides chemical and biological changes observed due to the collection site, the continuity of their studies would help to clarify the distribution of secondary metabolites among species, as well as their pharmacological and ecological potential.

Keywords: *Canistrocarpus cervicornis*. *Dictyota mertensii*. Diterpenes. Antioxidant. Antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de formação dos compostos terpênicos pela via do mevalonato-acetato (A) e via independente de mevalonato (B).....	35
Figura 2. Exemplos de estruturas de grupos químicos de diterpenos isolados de espécies da família Dictyotaceae.....	36
Figura 3. Aspecto macro e microscópico de <i>Canistrocarpus cervicornis</i>	37
Figura 4. Estruturas de diterpenos relatados para a espécie <i>C. cervicornis</i>	39
Figura 5. Aspecto macro e microscópico de <i>Dictyota mertensii</i>	41
Figura 6. Estruturas de diterpenos relatados para <i>D. mertensii</i>	42
Figura 7. Locais das coletas dos materiais de <i>C. cervicornis</i> (1) e <i>D. mertensii</i> (2) utilizados para a investigação química.	48
Figura 8. Esquema geral do fracionamento de <i>C. cervicornis</i> que resultou no isolamento de compostos.	57
Figura 9. Esquema geral do fracionamento de <i>D. mertensii</i> que resultou no isolamento de compostos.	63
Figura 10. Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) de Cc1.....	73
Figura 11. Estruturas parciais sugeridas a partir do espectro de ¹ H RMN de Cc2.....	75
Figura 12. Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) de Cc2.....	76
Figura 13. Detalhe ampliado do espectro de ¹ H RMN (5,6-2,5 ppm) de Cc2 (400 MHz, CDCl ₃).	77
Figura 14. Detalhe ampliado do espectro de ¹ H RMN (2,3-0,5 ppm) de Cc2 (400MHz, CDCl ₃).	78
Figura 15. Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) de Cc2.	79
Figura 16. Estrutura proposta para a substância Cc2 (4 α -acetóxi-9 β ,14 α -dihydroxido-1(15),7-dieno);	80
Figura 17. Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) de Cc3.....	83
Figura 18. Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, benzeno- <i>d</i> ₆) de Cc4.....	85
Figura 19. Detalhe ampliado do espectro de ¹ H RMN (3,2-5,7 ppm) de Cc4 (400 MHz, benzeno- <i>d</i> ₆).....	86
Figura 20. Estrutura proposta para a substância Cc4 (4 α -acetóxi-14 α -hidroxido-1(15),7,9-trieno)	87
Figura 21. Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) de Cc4.	89
Figura 22. Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) de Dm1	92
Figura 23. Estrutura da substância Dm1 (ftalato de dipentila)	93
Figura 24. Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) de Dm2.	95
Figura 25. Detalhe ampliado do espectro de ¹ H RMN (3,9-5,5 ppm) de Dm2 (400 MHz, CDCl ₃).	96

Figura 26. Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) de Dm2.....	97
Figura 27. Estrutura proposta para a substância Dm2 (acetato de dictyol B)	98
Figura 28. Espectro de massas (70 eV) de Dm3.	101
Figura 29. Espectro de ¹ H RMN (300 MHz, CDCl ₃) de Dm3.	102
Figura 30. Detalhe ampliado do espectro de ¹ H RMN (4,5-5,5 ppm) de Dm3 (300 MHz, CDCl ₃).	103
Figura 31. Primeiras estruturas parciais propostas para Dm3.	104
Figura 32. Espectro de ¹³ C RMN de Dm3 (75 MHz, CDCl ₃).	105
Figura 33. Mapa de correlação HSQC (300 MHz, CDCl ₃) de Dm3.	106
Figura 34. Novas estruturas parciais propostas para Dm3 a partir do mapa de correlação HSQC.	107
Figura 35. Mapa de correlação HMBC (300 MHz, CDCl ₃) de Dm3.	108
Figura 36. Mapa de correlação ¹ H- ¹ H COSY (300 MHz, CDCl ₃) de Dm3.	109
Figura 37. Conectividade entre estruturas parciais proposta para Dm3 a partir de dados obtidos nos mapas de correção HMBC e ¹ H- ¹ H COSY.	110
Figura 38. Estrutura parcial proposta para Dm3 a partir de dados obtidos nos mapas de correção HMBC e ¹ H- ¹ H COSY.	110
Figura 39. Correlações entre os sinais de carbonos e hidrogênios da nova estrutura parcial proposta a partir do mapa de correlação HMBC obtido para Dm3.....	111
Figura 40. Estrutura parcial proposta para Dm3 a partir de dados obtidos nos mapas de correlação HMBC.....	111
Figura 41. Estrutura proposta para substância Dm3 (10-acetóxi-18-hidroxiolabela-2,7-dieno).....	113
Figura 42. Espectro de ¹ H RMN (CDCl ₃ , 400 MHz) obtido por Othmani e colaboradores (2014) para 10-acetóxi-18-hidroxiolabela-2,7-dieno	115
Figura 43. Primeiras estruturas parciais sugeridas a partir do espectro de ¹ H RMN de Dm4.	116
Figura 44. Estrutura do fucosterol.....	117
Figura 45. Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) de Dm4.	118
Figura 46. Estrutura proposta para a substância Dm5 (adipato de bis (2-(2-butoxi)etoxi) etila) com deslocamentos químicos obtidos (números em azul) e deslocamentos químicos calculados através da predição espectral (números em laranja).	120
Figura 47. Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) de Dm5.	121

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Atividades biológicas descritas para substâncias isoladas de <i>C. cervicornis</i>	40
Quadro 2. Atividades biológicas relatadas na literatura para os diterpenos isolados de <i>C. cervicornis</i> no presente trabalho.....	127
Quadro 3. Atividades biológicas relatadas na literatura para os diterpenos isolados de <i>D. mertensii</i> no presente trabalho.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema de solventes utilizados na CLVCC.	50
Tabela 2. Esquema de solventes utilizados na Coluna A.	51
Tabela 3. Esquema de solventes utilizados na Coluna E.	51
Tabela 4. Esquema de solventes utilizados na Coluna C.	53
Tabela 5. Esquema de solventes utilizados na Coluna F.	54
Tabela 6. Esquema de solventes utilizados na Coluna G.	55
Tabela 7. Esquema de solventes utilizados na Coluna H.	55
Tabela 8. Esquema de solventes utilizados na Coluna D.	56
Tabela 9. Esquema de solventes utilizados na CLVDM.	58
Tabela 10. Esquema de solventes utilizados na Coluna A.	59
Tabela 11. Esquema de solventes utilizados na Coluna C.	59
Tabela 12. Esquema de solventes utilizados na Coluna E.	61
Tabela 13. Esquema de solventes utilizados na Coluna G.	62
Tabela 14. Esquema de solventes utilizados na EFS 3.	62
Tabela 15. Rendimentos dos extratos brutos obtidos a partir das espécies estudadas.	67
Tabela 16. Resultados obtidos para extratos de algas pardas dos gêneros <i>Dictyota</i> e <i>Canistrocarpus</i> no teste de potencial redutor.	69
Tabela 17. Resultados em porcentagem de inibição obtidos para extratos de algas pardas dos gêneros <i>Dictyota</i> e <i>Canistrocarpus</i> no teste de atividade antimicrobiana.	70
Tabela 18. Compostos isolados do extrato de <i>C. cervicornis</i>	71
Tabela 19. Dados espectrais de ¹ H RMN da substância Cc2 em comparação com dados da literatura para 4 α -acetóxi-9 β ,14 α -dihidroxiolasta-1(15),7-dieno.	81
Tabela 20. Dados espectrais de ¹ H RMN da substância Cc4 obtidos em comparação com a literatura para 4 α -acetóxi-14 α -hidroxidolasta-1(15),7,9-trieno.	88
Tabela 21. Compostos isolados do extrato de <i>D. mertensii</i>	90
Tabela 22. Dados espectrais de ¹ H RMN da substância Dm1 obtidos em comparação com a literatura para ftalato de dipentila.	93
Tabela 23. Dados espectrais de ¹ H RMN para hidrogênios alifáticos da substância Dm2 em comparação com os dados descritos na literatura para acetato de dictyol B.	99
Tabela 24. Dados espectrais de ¹ H RMN da substância Dm3 obtidos em comparação com a literatura para 10-acetóxi-18-hidroxidolabela-2,7-dieno.	114
Tabela 25. Dados espectrais de ¹ H RMN da substância Dm4 obtidos em comparação com a literatura para fucosterol.	119

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, SIGLAS, UNIDADES E FÓRMULAS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
AA	Ácido ascórbico
AcOEt	Acetato de etila
ATP	Trifosfato de adenosina
Benzeno- <i>d</i> ₆	Benzeno deuterado
CCA	Cromatografia em coluna aberta
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCI ₃	Clorofórmio deuterado
cHex	Ciclohexano
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLMP	Cromatografia líquida de média pressão
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
COSY	Espectro de correlação (<i>Correlated spectroscopy</i>)
d	Dupleto
dd	Duplo duplete
ddd	Duplo duplo duplete
dl	Dupleto largo
DMAPP	Difosfato de dimetilalila
DO	Densidade óptica
dt	Duplo tripleto
EFS	Extração em fase sólida
eV	Elétron-volts
FDA	Food and Drug Administration
Hex	Hexano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMBC	Correlação heteronuclear através de múltiplas ligações (<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>)
HSQC	Correlação heteronuclear de quantum-simples (<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>)
Hz	Hertz
iPOH	Isopropanol

IPP	Difosfato de isopentila
J	Constante de acoplamento
L	Litro
m	Multiplete
m/z	Razão massa/carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramas
MHz	Mega-Hertz
mL	Mililitro
Mult.	Multiplicidade
n.a.	Não atribuído
N.I.	Não identificado
nm	Nanômetro
PN	Produtos naturais
PNM	Produtos naturais marinhos
ppm	Partes por milhão
Rf	Fator de retenção (<i>Retardation factor</i>)
RMN	Ressonância magnética nuclear
¹³C RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
¹H RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
sp	Septeto
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
UFC	Unidades formadoras de colônia
δ_C	Deslocamento químico em ppm no espectro de ¹³ C RMN
δ_H	Deslocamento químico em ppm no espectro de ¹ H RMN

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
1.1 INTRODUÇÃO	29
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	30
1.2.1 Metabólitos primários e secundários.....	30
1.2.2 Produtos naturais marinhos.....	31
1.2.3 As algas.....	33
1.2.3.1 Ordem Dictyotales e família Dictyotaceae.....	34
1.2.3.1.1 <i>Canistrocarpus cervicornis</i>	37
1.2.3.1.2 <i>Dictyota mertensii</i>	41
1.2.4 Atividade antioxidante.....	42
1.2.5 Atividade antimicrobiana.....	43
2 OBJETIVOS.....	45
2.1 OBJETIVO GERAL	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
3.1 MATERIAIS	47
3.1.1 Material vegetal.....	47
3.1.2 Solventes, adsorventes e reagentes.....	48
3.1.3 Equipamentos	49
3.2 MÉTODOS	49
3.2.1 Coleta e obtenção dos extratos	49
3.2.2 Procedimentos de fracionamento.....	49
3.2.2.1 CLV do extrato bruto de <i>C. cervicornis</i> – CLVCC.....	50
3.2.2.1.1 CCA da fração CLV9 – Coluna A	51
3.2.2.1.1.1 CLMP da fração CA6 – Coluna E.....	51
3.2.2.1.1.1.1 CLAE da fração CE6 – CLAE 6	52
3.2.2.1.1.1.2 CLAE da fração CE7 – CLAE 7	52
3.2.2.1.1.1.3 CLAE da fração CE8-9 – CLAE 8	52
3.2.2.1.1.1.4 CLAE da fração CE14 – CLAE 2	52
3.2.2.1.1.1.5 CLAE da fração CE15 – ESF 1 e CLAE 1.....	52
3.2.2.1.2 CLMP da fração CLV11 – Coluna C	53
3.2.2.1.2.1 CCA da fração CC10 – Coluna F.....	53
3.2.2.1.2.1.1 CLAE da fração CF5 – CLAE 9.....	54
3.2.2.1.2.1.2 CLAE da fração CF7 – CLAE 10.....	54
3.2.2.1.2.2 CCA da fração CC11 – Coluna G	54
3.2.2.1.2.3 CCA da fração CC14 – Coluna H	55
3.2.2.1.2.3.1 CLAE da fração CH4 – CLAE 12.....	55
3.2.2.1.3 CLMP da fração CLV14 – Coluna D.....	56
3.2.2.1.3.1 CCA da fração CD8 – Sephadex 2.....	56

3.2.2.2 CLV do extrato bruto de <i>D. mertensii</i> - CLVDM.....	58
3.2.2.2.1 CCA da fração CLV9-10 – Coluna A.....	58
3.2.2.2.2 CCA da fração CLV4 – Coluna C.....	59
3.2.2.2.2.1 CLAE da fração CC5 – CLAE 1.....	60
3.2.2.2.2.2 CLAE da fração CC9 – CLAE 3.....	60
3.2.2.2.2.3 CLAE da fração CC10 – CLAE 2.....	60
3.2.2.2.2.4 CLAE da fração CC17 – CLAE 7.....	60
3.2.2.2.3 CCA da fração CLV5 – Coluna E.....	61
3.2.2.2.3.1 CLAE da fração CE5 – CLAE 6.....	61
3.2.2.2.4 CCA da fração CLV6 – Coluna G.....	61
3.2.2.2.4.1 CLAE da fração CG10 – CLAE 13.....	62
3.2.2.2.5 EFS da fração CLV11 – EFS 3 e CLAE 5.....	62
3.2.3 Identificação ou elucidação estrutural.....	64
3.2.4 Determinação do potencial redutor.....	64
3.2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	64
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4.1 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS BRUTOS.....	67
4.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS.....	67
4.2.1 Determinação do potencial redutor.....	67
4.2.2 Determinação da atividade antimicrobiana.....	68
4.3 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO.....	71
4.3.1 <i>Canistrocarpus cervicornis</i>.....	71
4.3.1.1 Substância Cc1.....	72
4.3.1.2 Substância Cc2.....	74
4.3.1.3 Substância Cc3.....	82
4.3.1.4 Substância Cc4.....	84
4.3.2 <i>Dictyota mertensii</i>.....	90
4.3.2.1 Substância Dm1.....	90
4.3.2.2 Substância Dm2.....	93
4.3.2.3 Substância Dm3.....	100
4.3.2.4 Substância Dm4.....	115
4.3.2.5 Substância Dm5.....	119
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
5.1 ASPECTOS QUÍMICOS.....	123
5.2 ASPECTOS DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	125
6 CONCLUSÕES.....	129
REFERÊNCIAS.....	131
APÊNDICE A – PROCEDIMENTOS CROMATOGRÁFICOS DE <i>C. cervicornis</i> QUE NÃO RESULTARAM EM ISOLAMENTO DE COMPOSTOS.....	149

**APÊNDICE B – PROCEDIMENTOS CROMATOGRÁFICOS DE
D. mertensii QUE NÃO RESULTARAM EM ISOLAMENTO DE
COMPOSTOS. 150**

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais (PN) vem sendo utilizados na medicina tradicional de vários povos por milênios, para o tratamento de doenças prevalentes (CHIN et al., 2006). Eles possuem uma diversidade estrutural original em comparação com o padrão da química combinatória. Uma vez que menos de 10% da biodiversidade do mundo foi avaliada em relação ao potencial de atividade biológica, existem inúmeros compostos naturais potencialmente ativos para serem descobertos (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Alguns dos primeiros registros de PN foram feitos aproximadamente em 2600 a.C. em tábuas de argila, na Mesopotâmia, onde foi documentado que os óleos de *Cupressus sempervirens* (cipreste) e espécies de *Commiphora* (mirra) eram usados (e continuam sendo) para tratar tosse, resfriados e inflamações. No século XV a.C., um registro egípcio, conhecido como Papiro de Ebers, documentou mais de 700 medicamentos à base de plantas (CRAGG; NEWMAN, 2005). Essas e outras práticas medicinais tradicionais desenvolvidas durante os séculos, constituíram a base da maior parte dos primeiros medicamentos que seguiram estudos químicos, farmacológicos e clínicos (BUTLER, 2004). Exemplos dos primeiros medicamentos, que são amplamente utilizados na clínica até hoje, são a morfina (isolada inicialmente de *Papaver somniferum*), vincristina (presente em *Catharanthus roseus*), taxol (isolado de plantas do gênero *Taxus*), artemisinina (presente em *Artemisia annua*), entre outros (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Em relação aos produtos naturais marinhos (PNM), provavelmente os registros mais antigos foram feitos pelos povos orientais, em torno de 3.000 a.C. (KOLANJINATHAN; GANESH; SARANRAJ, 2014). Os antigos fenícios também já empregavam uma secreção de cor roxa, produzida por moluscos marinhos, para tingir tecidos, enquanto as algas eram utilizadas como fertilizantes (CRAGG; NEWMAN, 2013). Muitas indicações de algas para o tratamento de enfermidades podem ser encontradas em farmacopeias chinesas (LIU et al., 2012). Existem relatos do uso de algumas algas vermelhas tais como *Chondrus crispus* e *Mastocarpus stellatus* para o tratamento de resfriados, dores de garganta e infecções pulmonares, incluindo a tuberculose (MOLONEY, 1919; VICKERY, 1995); ainda *Porphyra umbilicalis* (Linnaeus) Kützing é usada para o tratamento de alguns tipos de câncer, em especial câncer de mama (DIAS; URBAN; ROESSNEREM, 2012).

Uma análise detalhada dos novos medicamentos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) entre 1981 e 2010 revelou que 34% desses medicamentos foram baseados em PN ou derivados (HARVEY, 2015).

Nos últimos anos, a pesquisa acerca do ambiente marinho tem aumentado, originando uma grande variedade de compostos com expressiva diversidade de atividades biológicas (BLUNT et al., 2014). Atualmente existem oito fármacos relacionados a substâncias de origem marinha, sendo eles: os antitumorais citarabina, trabectedina (Yondelis[®]), mesilato de eribulina (Halaven[®]) e brentuximabe vedotina (Adcetris[®]); os antivirais vidarabina e iota-carragenina (Carragelose[®]); o analgésico neuropático ziconotídeo (Prialt[®]); e os ésteres etílicos do ácido ômega-3 (Lovaza[®]), utilizados para o tratamento de hipertrigliceridemia. Além destes, vários outros se encontram em testes clínicos (RANGEL; FALKENBERG, 2015; MARTINS et al., 2014).

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Metabólitos primários e secundários

O metabolismo vegetal consiste em um conjunto complexo de reações que ocorrem em cada célula (rota metabólica), que visam a produção de energia através de trifosfato de adenosina (ATP) e biossíntese de substâncias indispensáveis à sua sobrevivência (CAPASSO; PASQUALE; GRANDOLINI, 2011). Os compostos químicos produzidos pelo metabolismo são chamados de metabólitos, que podem ser classificados como primários e secundários (PATRA et al., 2013).

Os metabólitos primários são essenciais ao crescimento e à vida e incluem aminoácidos, lipídeos, monossacarídeos, entre outros. Já os metabólitos secundários, também chamados de PN, geralmente não são essenciais para o crescimento, o desenvolvimento e a reprodução. Eles são produzidos como forma de adaptação do organismo ao ambiente circundante ou agem como mecanismos de defesa contra predadores (auxiliando na sobrevivência do organismo) (COLEGATE; MOLYNEUX, 2008; DEWICK, 2002) para controlar a competição por espaço, luz e nutrientes; como meio de comunicação entre espécies, entre outras funções (MARTINS et al., 2014). PN incluem alcaloides, esteroides, taninos, saponinas, flavonoides, terpenos, entre outros; são estes metabólitos que geralmente conferem propriedades terapêuticas às espécies (ANARAT-CAPPILLINO; SATTELY, 2014).

1.2.2 Produtos naturais marinhos

Os oceanos cobrem 71% da superfície do planeta Terra, contêm cerca de 97% da água do planeta (NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION, 2016) e abrangem uma ampla variedade de ecossistemas (CAMPOS et al., 2010). O Brasil com seu extenso litoral, cerca de 9.200 km de extensão, apresenta um grande potencial em biodiversidade marinha. Apesar disso, o esforço empregado para o conhecimento das espécies marinhas é muito menor em relação ao ambiente terrestre (JOLY et al., 2011; MARCOLIN, 2010) e grande parte desta riqueza permanece ainda inexplorada e subutilizada (MATTA et al., 2011).

Apesar de promissores, os organismos marinhos passaram a ser investigados de maneira sistemática apenas recentemente, devido principalmente ao difícil acesso (COSTA-LOTUFO et al., 2009). Até a metade do século XX, o potencial de PNM era pouco conhecido, restringindo-se ao uso de algas marinhas na medicina tradicional e na culinária de alguns países asiáticos (SMIT, 2004; HAEFNER, 2003).

O início da moderna química de PNM aconteceu em 1951, quando os pesquisadores Bergmann e Feeney isolaram da esponja *Cryptotethya crypta* [cujo nome aceito atualmente é *Tectitethya crypta* (de Laubenfels, 1949) (SOEST, 2016)] os nucleosídeos espongotimidina e espongouridina que possuíam como monossacarídeo a arabinose, ao invés da ribose que compõe os nucleosídeos humanos. Sabendo-se que os sistemas biológicos reconheceriam esses nucleosídeos com porções de açúcares modificados, estudos químicos levaram à síntese de vários análogos de nucleosídeos que hoje são utilizados como antivirais (vidarabina e zidovudina), e antitumorais (citarabina). O desenvolvimento desses fármacos estimulou o interesse por substâncias provenientes de organismos marinhos (FENICAL, 2006; MOLINSKI et al., 2009; RANGEL; FALKENBERG, 2015). Cabe destacar que, a exploração do ambiente marinho tornou-se viável somente após a introdução de técnicas de mergulho autônomo na década de 1970, sendo fortalecida nos anos 90 com a introdução de veículos operados remotamente (MAYER et al., 2010).

As pesquisas com PNM no Brasil tiveram início na década de 1960, no Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Nas décadas subsequentes, a produção científica em relação a PNM tendeu a concentrar-se na região sudeste, abrangendo especialmente algas e esponjas (BERLINCK et al., 2004).

Nos últimos anos observou-se um aumento de investimentos por parte da indústria farmacêutica nesta área (RANGEL; FALKENBERG, 2015).

Os organismos marinhos sésseis (como algas, esponjas e corais) possuem capacidades metabólicas únicas, que resultam na síntese de uma grande variedade de metabólitos secundários (MARTINS et al., 2014). Esses metabólitos apresentam uma maior diversidade em comparação com os obtidos de fontes terrestres (MONTASER; LUESCH, 2011), por se desenvolverem em um ambiente extremamente inóspito. Condições de temperatura, salinidade, exposição à radiação solar, ação das ondas e pressão atmosférica (conforme a profundidade), além de sazonalidade e fase do ciclo vital, são fatores que influenciam seu metabolismo (AL-AMOUDI et al, 2009; STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

A distribuição taxonômica de metabólitos secundários depende da presença de genes responsáveis pela codificação de enzimas envolvidas na biossíntese de uma composição química altamente complexa. Em muitos casos, as diferenças bioquímicas caracterizam e delimitam as espécies, porém a existência de diferentes grupos de algas é frequentemente subestimada, por não serem levadas em conta fontes de variabilidade na composição química das algas. Fatores ecológicos e ambientais, poderiam explicar o isolamento de uma heterogeneidade de compostos isolados de uma mesma espécie, coletadas em locais diferentes (STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

Os PNM possuem um grande potencial por si mesmos, ou como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos (SCHEUER, 1996; BLUNT et al., 2003). Estima-se que dos mais de 15.000 PMN isolados, cerca de 4.200 são biologicamente ativos (HU et al., 2015), e incluem: alcaloides, terpenos, esteroides, lactonas, quinonas, peptídeos, entre outros. Entre as propriedades biológicas de PNM descritas, destaca-se a atividade citotóxica, seguida das atividades antibacteriana, antifúngica, inseticida e antiviral (HU et al, 2015).

Diante da notoriedade que os produtos naturais marinhos vêm ganhando nos últimos anos, foram criadas algumas empresas voltadas especificamente para atuar neste ramo, como a empresa espanhola PharmaMar, divisão do grupo Zeltia, voltada para o desenvolvimento de fármacos antitumorais de origem marinha (COSTA-LOTUFO et al., 2009). Além disso, outras vertentes têm sido exploradas, como aplicações nas áreas de nutracêuticos, aquicultura, produção de agentes anti-incrustantes, inibidores de biofilmes e em biorremediação, substituição de tecidos e ossos, indústria alimentícia, entre outras (FELÍCIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012).

1.2.3 As algas

As algas foram uns dos primeiros organismos vivos a habitar a Terra e ocorrem em todas as condições ambientais (LEE,1999). Além disso, estão entre os maiores produtores de biomassa do ambiente marinho (KOLANJINATHAN; GANESH; SARANRAJ, 2014), em que são a base da cadeia alimentar (CLERCK; BOGAERT; LELIAERT, 2012). Podem fazer parte do *bentos* (quando fixas no substrato) ou do *plâncton* (quando suspensas na água) (STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011) e são representadas por cerca de 30.000 espécies em todo o mundo. As algas fornecem oxigênio para a atmosfera, são utilizadas na medicina, além de servirem de alimento para os peixes, outros invertebrados e o homem (FAULKNER, 2002).

As macroalgas são talófitas, ou seja, são carentes de raiz, caule e folhas (LEE, 1999). A grande diversidade de tamanho (0,2 mm até 60 m de comprimento), estrutura celular, níveis de organização e morfologia, pigmentos para a fotossíntese e reserva, entre outras características, reflete as origens evolutivas variadas deste conjunto heterogêneo de organismos (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

As algas são ricas em PN biologicamente ativos (KOLANJINATHAN; GANESH; SARANRAJ, 2014) como: polissacarídeos, proteínas, minerais, vitaminas, antioxidantes, ácidos graxos e ácidos graxos poli-insaturados e seus conteúdos variam de acordo com a localização geográfica, condições ambientais, estações do ano, entre outros (MOHAMED; HASHIM; RAHMAN, 2012).

Em função do tipo de material de reserva e de pigmentos presentes nas células, podem ser classificadas como: verdes (Chlorophyta), pardas (Ochrophyta) e vermelhas (Rhodophyta), sendo as duas últimas consideradas de maior interesse químico (BLUNT et al., 2015).

As algas pardas estão divididas em 18 ordens e 54 famílias (SILBERFELD; ROUSSEAU; REVIERS, 2014). A cor pode variar do marrom-escuro ao verde-oliva, conforme a proporção dos pigmentos marrom (fucoxantina) e verde (clorofila) (ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA, 2015). Algumas são relativamente pequenas (alguns milímetros), no entanto algumas espécies, como as do gênero *Macrocystis*, podem alcançar até 40 metros (WOMERSLEY, 1954 apud ROUSSEAU et al., 2001). Na costa brasileira, apesar de não haver algas pardas tão grandes, este grupo constitui o mais importante em termos de biomassa (OLIVEIRA-FILHO 1977 apud FLEURY et al., 1994a), sendo representado principalmente pelas ordens Dictyotales e Fucales

(TEIXEIRA, 2013). Extratos de algas pardas são complexas misturas geralmente compostas majoritariamente por polissacarídeos, compostos fenólicos, ácidos graxos, proteínas, peptídeos, pigmentos, vitaminas, terpenos e esteroides (BALBOA et al., 2013).

1.2.3.1 Ordem Dictyotales e família Dictyotaceae

A ordem Dictyotales consiste na grande família Dictyotaceae, em que são conhecidos cerca de 20 gêneros, incluindo os gêneros *Dictyota*, *Dictyopteris*, *Canistrocarpus* e *Padina* (CLERCK et al., 2006; SILBERFELD; ROUSSEAU; REVIERS, 2014), e mais de 100 espécies (VALLIM et al., 2005). O gênero *Canistrocarpus* foi criado no ano de 2012 por Clerck e colaboradores, através de uma revisão fitogenética de algumas algas pardas.

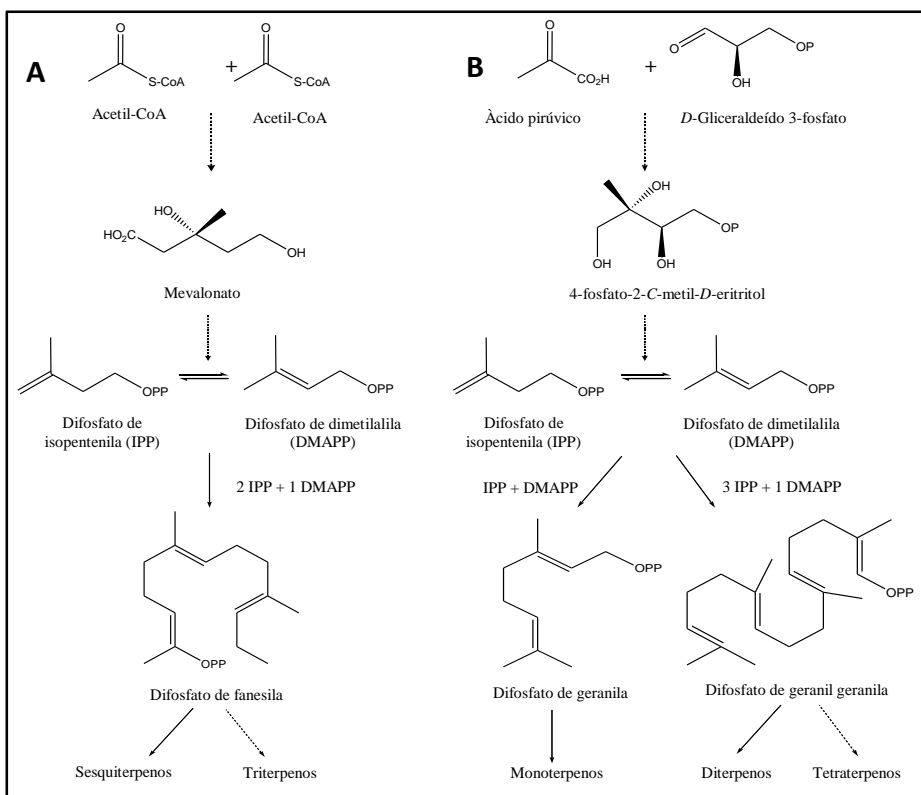
Os gêneros compreendidos na ordem Dictyotales podem ser divididos em três grupos químicos, de acordo com a sua composição química: grupo *Styopodium* (produtores de meroditerpenos - diterpenos unidos a fenóis e esteroides), grupo *Dictyopteris* (produtores de sesquiterpenos unidos ou não a fluoroglucinol, esteroides e substâncias com enxofre) e grupo *Dictyota* (produtores de diterpenos policíclicos e esteroides) (TEIXEIRA, 2013; VALLIM et al., 2005).

Espécies da família Dictyotaceae são conhecidas por produzirem uma ampla variedade de metabólitos secundários bioativos, que já demonstraram potencial antifúngico, antibacteriano (ZANFARDINO; GAVAGNIN, 2009), antiviral (ABRANTES et al., 2009; BARBOSA et al., 2004; CIRNE-SANTOS et al., 2008; PEREIRA et al., 2005), além de exercerem múltiplas funções nas algas, agindo como compostos anti-incrustantes e defesa contra herbívoros e organismos patogênicos (BARBOSA et al., 2007; BIANCO et al., 2009; ENGEL; JENSEN; FENICAL, 2002; PEREIRA et al., 2010).

Muitos estudos químicos têm sido realizados, resultando no isolamento de mais de 300 diterpenos, representantes de diferentes classes estruturais, de pelo menos 35 espécies coletadas ao redor do mundo (VALLIM et al., 2005). Os diterpenos fazem parte da classe dos terpenos, que são metabólitos secundários lipofílicos construídos a partir de duas vias: a do mevalonato-acetato (Figura 1A) e a via independente de mevalonato (Figura 1B). A primeira ocorre no citosol e dá origem aos sesquiterpenos e triterpenos, e a segunda ocorre nos plastídios, e origina monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos. Os terpenos derivam do precursor universal difosfato de isopentenila (IPP), que isomeriza com difosfato de dimetilalila (DMAPP), por meio das enzimas

preniltransferases. Dependendo do número de unidades de IPP adicionadas, tem-se a formação de difosfato de geranila (1 IPP, 10 carbonos), difosfato de farnesila (2 IPP - 15 carbonos) e difosfato de geranyl-geranila (3 IPP - 20 carbonos), os quais sofrem a ação de terpenoides sintases (ciclases) originando os diversos compostos terpênicos (DAVIS; CROTEAU, 2000).

Figura 1. Vias de formação dos compostos terpênicos pela via do mevalonato-acetato (A) e via independente de mevalonato (B).



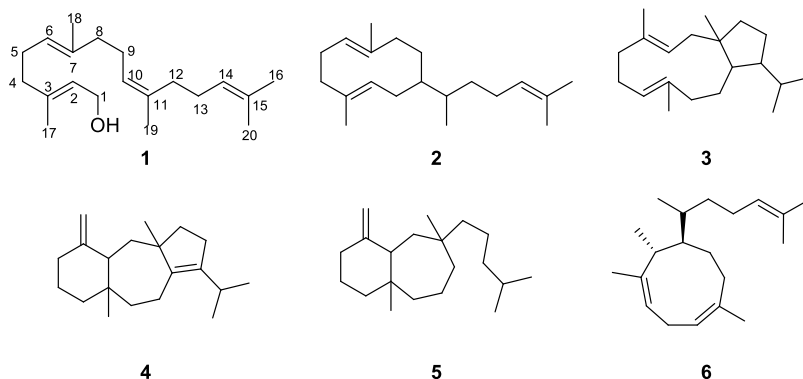
Fonte: Davis; Croteau, 2000.

Os terpenos podem ser agrupados em hemi-, mono-, sesqui-, di-, ses-, tri-, tetraterpenos (carotenoides) ou politerpenos, de acordo com a quantidade de átomos de carbonos presentes na sua estrutura. Diterpenos apresentam 20 carbonos em sua estrutura (SIMÕES; SPITZER, 2010), e

alguns são exclusivos de organismos marinhos, podendo ser utilizados como marcadores taxonômicos (BALBOA et al., 2013).

Tem sido proposto que os principais metabólitos secundários encontrados na família Dictyotaceae estão diretamente relacionados ao controle da herbivoria (VALLIM et al., 2005). Alguns estudos sugerem que os diterpenos isolados de espécies da família podem ser divididos em três grupos químicos, dependendo da forma da primeira ciclização do precursor comum geranyl-geraniol (**1**). O grupo I contém diterpenos resultantes da primeira ciclização entre as posições um e dez, e são derivados prenilados de sesquiterpenos conhecidos em plantas, e são chamados de diterpenos do tipo guaiano prenilado (**2**). Os diterpenos pertencentes ao grupo IIA e IIB derivam da primeira ciclização entre os carbonos 1 e 11, formando os dolabelanos (IIA) (**3**), os dolastanos (IIB) (**4**) e os secodolastanos (IIB) (**5**). Por fim, nos diterpenos do grupo III, a ciclização ocorre entre os carbonos dois e dez, produzindo os xenianos (**6**) e seus derivados (Figura 2) (TEIXEIRA; KELECOM, 1988; VALLIM et al., 2005).

Figura 2. Exemplos de estruturas de grupos químicos de diterpenos isolados de espécies da família Dictyotaceae.



Teixeira (2013), a partir de uma análise minuciosa, determinou que os diterpenos podem ser utilizados como marcadores taxonômicos e propôs que algas da ordem Dictyotales podem ser agrupadas em três grupos, levando em conta a sua capacidade de produzir os diferentes tipos de diterpenos. De acordo com esta autora, as espécies do grupo A produzem diterpenos pertencentes aos grupos I (guaianos prenilados) e III (xenianos). São representantes do grupo A as espécies *Dictyota*

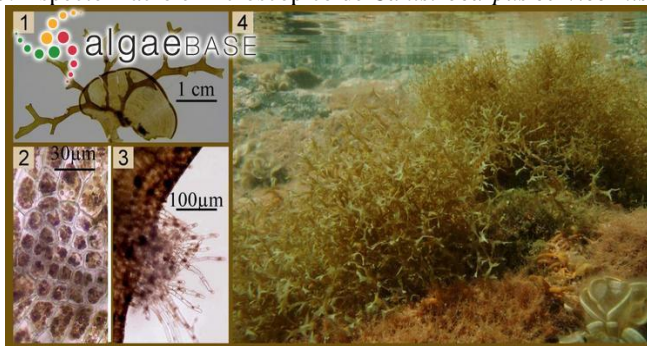
mertensii, *Dictyota menstrualis*, *Dictyota ciliolata*, *Dictyota crenulata* e *Dictyota guineensis*. O grupo taxonômico B é formado por espécies que produzem diterpenos do grupo IIA (dolabelanos), como *Dictyota pfaffii* (cujo nome aceito pelo site Algaebase é *Dictyota friabilis* Stechell) e *Dictyota dolabellana*. Por último, do grupo C, que inclui as algas do gênero *Canistrocarpus*, são isolados diterpenos do grupo IIB (dolastanos e secodolastanos), que apesar de serem formados da mesma forma que os do grupos IIA (ciclização entre os carbonos um e 11), possuem estereoquímica diferente nos centros quirais (TEIXEIRA, 2013; VALLIM et al., 2005). Teixeira (2013) propõe que não ocorreriam diterpenos de dois tipos diferentes em uma mesma espécie, com exceção dos grupos I e III.

1.2.3.1.1 *Canistrocarpus cervicornis*

O gênero *Canistrocarpus* De Paula & De Clerck é composto por quatro espécies: *Canistrocarpus cervicornis* (Kützting) De Paula & De Clerck, *Canistrocarpus cervicornis* f. *pseudohamatus* (Cribb) M. J. Wynne, *Canistrocarpus crispatus* (J. V. Lamouroux) De Paula & De Clerck (holótipo) e *Canistrocarpus magneanus* (De Clerck & Coppejans) De Paula & De Clerk (GUIRY; GUIRY, 2016).

C. cervicornis (Kützting) De Paula & De Clerck (Figura 3) pertence ao grupo químico *Dictyota* (TEIXEIRA, 2013; VALLIM et al., 2005) e foi descrita inicialmente pelo basônimo *Dictyota cervicornis* (KÜTZING, 1859).

Figura 3. Aspecto macro e microscópico de *Canistrocarpus cervicornis*.



Fonte: GUIRY; GUIRY, 2016.

Há 10 anos, de Clerck e colaboradores (2006) propuseram uma revisão da classificação de algumas espécies de *Dictyota*, que resultou na proposição de um novo gênero, denominado *Canistrocarpus*. *C. cervicornis* ocorre em diversas partes do mundo e é considerada uma importante e abundante alga da costa brasileira (GUIRY; GUIRY, 2016; FALCÃO; MENEZES DE SZÉCHY, 2005).

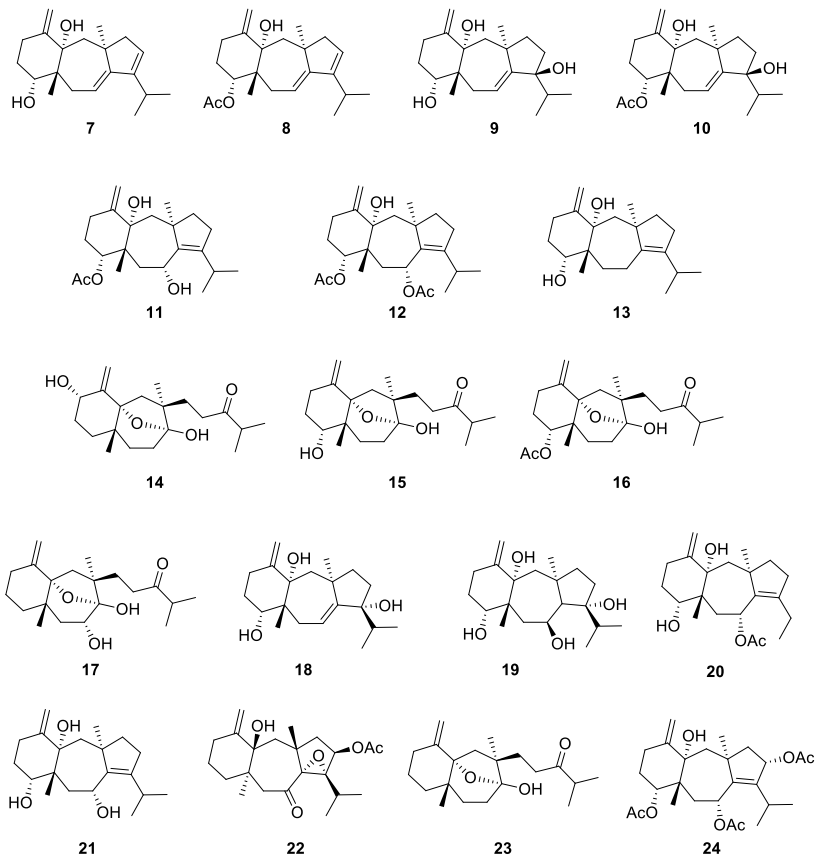
Estudos químicos da espécie levaram ao isolamento principalmente de diterpenos dos tipos dolastano e secodolastano (grupo IIB). Um trabalho pioneiro, desenvolvido por Teixeira e colaboradores (1986a), levou ao isolamento de sete diterpenos do tipo dolastano: 4 α ,14 α -dihidroxiolasta-1(15),7,9-trieno (7) 4 α -acetóxi-14 α -hidroxidolasta-1(15),7,9-trieno (8) 4 α ,9 β ,14 α -trihidroxiolasta-1(15),7-dieno (9) 4 α -acetóxi-9 β ,14 α -dihidroxiolasta-1(15),7-dieno (10) 4 α -acetóxi-7 α ,14 α -dihidroxiolasta-1(15),8-dieno (11) 4 α ,7 α -diacetóxi-14 α -hidroxidolasta-1(15),8-dieno (12) e amijiol (13); e três diterpenos do tipo secodolastano: linearol (14) isolinearol (15) e acetato de isolinearol (16). Ainda em 1986 (b), Teixeira, Tomassini e Kelecom descreveram o isolamento do secodolastano cervicol (17). Dois anos mais tarde foram isolados da espécie os dolastanos 4 α ,9 α ,14 α -trihidroxiolasta-1(15),7-dieno (18), 4 α ,8 β ,9 α ,14 α -tetrahidroxidolasta-1(15),-eno (19) e 7 α -acetóxi-4 α ,14 α -dihidroxiolasta-1(15),8-dieno (20) (KELECOM; TEIXEIRA, 1988).

Mais recentemente, análises químicas da espécie levaram ao isolamento dos diterpenos 4 α ,7 α ,14 α -trihidroxiolasta-1(15),8-dieno (21), além de (10), já relatado para a espécie (VALLIM et al., 2010) e 10 β -acetóxi-8 α ,9 α -epóxi-14 β -hidroxi-7-oxodolasta-1(15)-eno (22), indicol (23) e 4 α -acetóxi-amijidictyol (24), além dos diterpenos (14) e (15), já relatados para a espécie (BIANCO et al., 2015a, BIANCO et al., 2015b). Heterofucanos (CAMARA et al., 2011; COSTA et al., 2010), ácidos graxos (FERREIRA et al., 2012; HEIBA et al., 1997; KHOTIMCHENKO et al., 1994) e esteroides (FLEURY et al., 1994b) também foram relatados para a espécie (Figura 4).

Por apresentar de tal diversidade de metabólitos secundários, houve grande interesse na pesquisa de atividade biológica, tanto de extratos quanto das substâncias isoladas da espécie. Extratos de *C. cervicornis* apresentaram atividade larvicida (*Aedes aegypti*) (BIANCO et al., 2013b; KOISHI et al., 2012) antiprotozoária contra promastigotas de *Leishmania amazonensis*, (SANTOS et al., 2011); e de *L. braziliensis* (BIANCO et al., 2013a). Extrato obtido com diclorometano e metanol (2:1) apresentou propriedade anti-incrustante (mexilhão *Perna perna*) (BIANCO et al., 2009). O extrato diclorometânico foi capaz de inibir a

atividade de coagulação do sangue provocada pelo veneno da lagarta *Lonomia obliqua* (DOMINGOS et al., 2009) e de inibir a coagulação, a atividade proteolítica e a agregação plaquetária causadas pelo veneno de *Lachesis muta*, além de possuir um efeito protetor contra hemorragia em ratos (DOMINGOS et al., 2011; MOURA et al., 2011a, b).

Figura 4. Estruturas de diterpenos relacionados para a espécie *C. cervicornis*.



Para os metabólitos isolados de extratos da espécie também foram relatadas interessantes atividades descritas no Quadro 1.

Quadro 1. Atividades biológicas descritas para substâncias isoladas de *C. cervicornis*.

Metabólito	Atividade (Referência)
8	Anti-herbivoria (<i>Lytechinus variegatus</i>) (BIANCO et al., 2010)
10	Anti-incrustante (<i>Perna perna</i>) (BIANCO et al., 2009) Antiprotozoária (<i>Leishmania amazonensis</i>) (SANTOS et al., 2011) Anticoagulante e antiplaquetária (MOURA et al., 2011a) Anti-herbivoria (<i>Lytechinus variegatus</i>) (BIANCO et al., 2010) Inibição da Na ⁺ K ⁺ -ATPase de mamíferos (GARCIA et al., 2009) Inibição da hemólise e neutralização da coagulação, hemorragia e proteólise causada pelo veneno de <i>Lachesis muta</i> (MOURA et al., 2011b) Inibição da replicação do HIV-1 (BARROS et al., 2015)
12	Anti-incrustante (<i>Perna perna</i>) (BIANCO et al., 2009) Anti-herbivoria (<i>Lytechinus variegatus</i>) (BIANCO et al., 2010; ORTÍZ-RAMÍREZ et al., 2013) Inibição da Na ⁺ K ⁺ -ATPase de mamíferos (GARCIA et al., 2009) Inibição da replicação do HIV-1 (BARROS et al., 2015)
13	Anti-herbivoria (<i>Astrea latispina</i>), quando em mistura com 14 (PEREIRA et al., 2002) Inibição da hemólise e proteólise causada pelo veneno de <i>Bothrops jararaca</i> (DOMINGOS et al., 2015) Inibição da hemólise e proteólise causada pelo veneno de <i>Lachesis muta</i> (DOMINGOS et al., 2011)
14	Anti-herbivoria (<i>Astrea latispina</i>), quando em mistura com 13 (PEREIRA et al., 2002) Anti-incrustante (<i>Perna perna</i>) (BIANCO et al., 2009) Inibição da hemólise e proteólise causada pelo veneno de <i>Bothrops jararaca</i> (DOMINGOS et al., 2015)
16	Inibição da replicação do HIV-1 (BARROS et al., 2015)
20	Antiviral (HSV-1) (VALLIM et al., 2010)
Heterofucanos	Atividade anticoagulante (via intrínseca e/ou comum) e prolongamento do tempo de coagulação (CAMARA et al., 2011) Antioxidante (COSTA et al., 2010; NARIYOSHI et al., 2013)

1.2.3.1.2 *Dictyota mertensii*

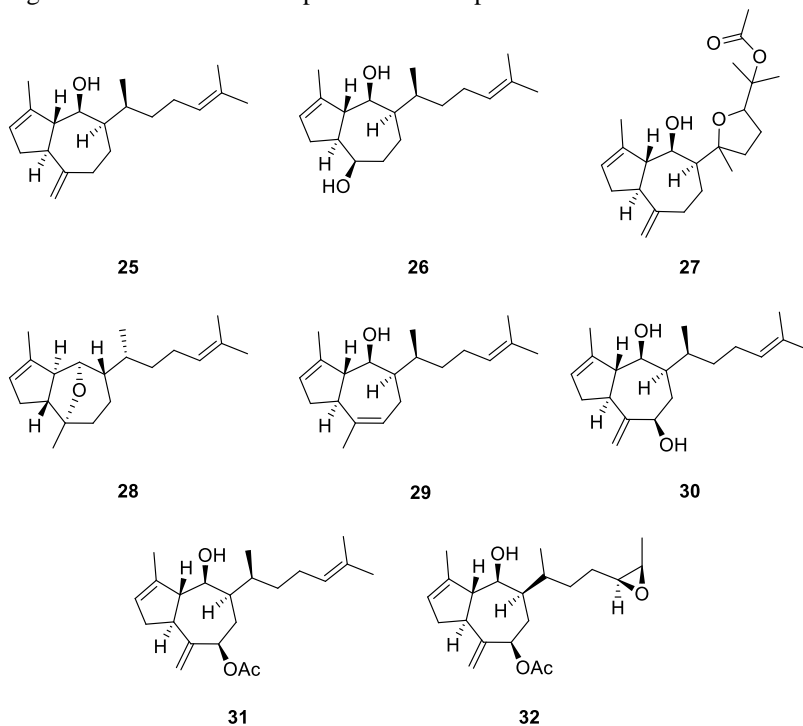
O gênero *Dictyota* J. V. Lamouroux é composto por 90 espécies (GUIRY; GUIRY, 2016). *Dictyota mertensii* (Martius) Kützing (Figura 5), pertencente ao grupo químico *Dictyota* (TEIXEIRA, 2013; VALLIM et al., 2005), foi descrita inicialmente pelo seu basônimo *Ulva mertensii* (Martius). No entanto, alguns anos mais tarde, Kützing (1859) propôs uma revisão da classificação da espécie, que passou a ser chamada de *Dictyota mertensii* (Martius) Kützing, que ocorre em diversas partes do mundo (GUIRY; GUIRY, 2016).

Figura 5. Aspecto macro e microscópico de *Dictyota mertensii*.



Fonte: GUIRY; GUIRY, 2016

Estudos químicos da espécie levaram ao isolamento principalmente de diterpenos do tipo guaiano prenilado (grupo I). Um trabalho desenvolvido por Alvarado e Gerwick (1985) levou ao isolamento dos diterpenos pachidictyol A (**25**), dictyol C (**26**) e dictyol H (**27**). Mais recentemente, Freitas e colaboradores (2007), isolaram da espécie os diterpenos dictyóxido (**28**), isopachidictyol (**29**), dictyol B (**30**) e seu acetato (**31**), além de outros diterpenos que já haviam sido isolados da espécie: (**25**), (**26**) e (**27**). No mesmo ano Vallim e colaboradores (2007), isolaram epoxipachidictyol (**32**). Heterofucanos (QUEIROZ et al., 2008), esteroides (FLEURY et al., 1994b) e ácidos graxos (FREITAS et al., 2007), também foram relatados para a espécie (Figura 6).

Figura 6. Estruturas de diterpenos relacionados para *D. mertensii*.

Estudos de atividade biológica realizados com o extrato de *D. mertensii* demonstraram atividade antiprotozoária (*L. amazonensis*) (ALIANÇA et al., 2014), anti-herbivoria (espécies de peixe) (MARQUES et al., 2006) anti-incrustante (*Pachygrapsus transversus* e *L. variegatus*) (VALLIM et al., 2007). Os heterofucanos demonstraram atividade de inibição da transcriptase reversa do vírus HIV (QUEIROZ et al., 2008).

1.2.4 Atividade antioxidante

O interesse por produtos naturais com propriedades antioxidantes está particularmente relacionado à prevenção dos efeitos deletérios dos radicais livres no corpo humano (ZHELEVA-DIMITROVA; ZHELEV; DIMITROVA-DYULGEROVA, 2011), os quais podem conduzir a diversas formas de dano celular. A sua cronicidade pode estar envolvida com o desenvolvimento de numerosas

doenças, entre elas as doenças neurodegenerativas e o câncer (SASIKUMAR et al., 2012). Apesar disso, as lesões celulares causadas pelos radicais livres podem ser reduzidas ou até mesmo prevenidas através do uso de substâncias com propriedades antioxidantes.

Uma definição da palavra antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada à do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (NIKI, 2010). Substâncias com estas propriedades podem ser produzidas por uma ampla variedade de organismos terrestres e marinhos (ROCHA et al., 2007).

As algas estão sempre submetidas ao estresse oxidativo causado pelas rápidas variações de intensidade de luz e concentrações de O₂ e CO₂ ao longo da coluna de água. Portanto, sua sobrevivência depende de uma resposta eficiente a estas condições, a qual leva à produção de metabólitos com atividade antioxidante (MATSUKAWA et al., 1997). Por essa razão, propriedades antioxidantes são comuns em algas marinhas. Uma série de compostos isolados de algas pardas apresentam propriedades antioxidantes, e a maioria deles são polissacarídeos, proteínas, além de compostos fenólicos (BALBOA et al., 2013).

1.2.5 Atividade antimicrobiana

O uso de antibióticos na medicina moderna levou à redução da mortalidade infantil, além de aumentar a expectativa de vida. Apesar disso, infecções causadas por bactérias multirresistentes tem aumentado muito, elevando conseqüentemente a frequência de infecções intratáveis. Neste sentido, a descoberta e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos podem ser uma saída para contornar ou neutralizar os mecanismos de resistência (BLAIR et al., 2014).

O termo “antibiótico” foi inserido em 1942 por Selman A. Waksman, que se referiu originalmente a qualquer produto antagonista ao crescimento de micro-organismos. Atualmente o termo “antibiótico” descreve qualquer composto capaz de matar (bactericida) ou de inibir o crescimento (bacteriostático) de bactérias (HUGHES, 2010).

Muitos dos antibióticos em uso hoje em dia são derivados de produtos naturais. O oceano abrange uma ampla variedade de organismos e a água do mar abriga cerca de 10⁶ células bacterianas e 10³ células fúngicas por milímetro cúbico. Além disso, muitos dos organismos marinhos possuem populações de micro-organismos na superfície ou até mesmo dentro de seus tecidos (HUGHES, 2010). Em estudos realizados com algas de diversas espécies, foram isolados inúmeros compostos com

atividade antimicrobiana (ALGHAZEER, 2013; AL-SAIF et al., 2014; DEMIREL et al., 2009; MANCINI et al., 2007), inclusive compostos com atividade frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (IOANNOU et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar investigação química de algas pardas do Atlântico Sul Brasileiro, a partir de coletas realizadas no âmbito dos Projetos Sisbiota-Mar e ProspecMar-Ilhas, selecionadas com base em triagem de atividades biológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar triagem de atividade antioxidante e antimicrobiana em extratos de algas pardas coletadas em diferentes pontos do litoral brasileiro;
- Isolar metabólitos secundários presentes nos extratos selecionados, através de fracionamento por métodos cromatográficos;
- Elucidar estruturalmente ou identificar metabólitos isolados, através de métodos espectroscópicos;
- Encaminhar os compostos isolados considerados promissores para avaliação de atividades biológicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A investigação química foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais do CIF/CCS/UFSC e na Divisão de Farmacognosia e Química de Produtos Naturais da Universidade de Atenas, incluindo os experimentos de extração, fracionamento, isolamento e purificação de compostos.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos inicialmente através de parceria com os professores Dr. Vassilios Roussis (Divisão de Farmacognosia e Química de Produtos Naturais) da Universidade de Atenas e Dr.^a Alessandra Leda Valverde (Instituto de Química) da Universidade Federal Fluminense. Alguns espectros foram obtidos em dezembro/2015 e janeiro/2016 no Laboratório do CIF/CCS/UFSC.

As avaliações das atividades biológicas foram realizadas na Fundação Universidade Regional de Blumenau (determinação do potencial redutor) através de parceria com a Prof.^a Dr.^a Michele Debiasi Alberton (Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais) e no Instituto Butantan (atividade antimicrobiana), sob a responsabilidade da Dr.^a Márcia Regina Franzolin.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Material vegetal

Para triagem de atividade biológica foram coletadas dezenas de amostras no âmbito dos projetos Sisbiota-Mar e PropecMar-Ilhas (ver dados de coletas nas Tabelas 16 e 17 dos itens 4.2.1 e 4.2.2, respectivamente).

A amostra de *C. cervicornis* utilizada para a investigação química foi coletada em agosto de 2012 na Pedra do Paraíso, Ceará e a amostra de *D. mertensii* foi coletada em agosto de 2014 na Ilha da Trindade (Figura 7). Ambas foram identificadas pelo Prof. Dr. Paulo Horta (BOT/CCB/UFSC) e uma exsicata de cada espécie é mantida no Herbário do Departamento de Botânica da UFSC (FLOR 54464 e FLOR 58465).

Figura 7. Locais das coletas dos materiais de *C. cervicornis* (1) e *D. mertensii* (2) utilizados para a investigação química.



Fonte: Google Earth™

3.1.2 Solventes, adsorventes e reagentes

Os solventes utilizados para extração, análise por cromatografia em camada delgada (CCD) e fracionamento cromatográfico foram de grau analítico, de procedência Synth[®], Lafar[®] e Vetec[®]. Foi utilizado gel de sílica 60 de procedência Vetec[®], com tamanho de partículas na faixa de 0,04–0,063 mm e resina Sephadex[®] LH20 como fase estacionária nos procedimentos cromatográficos. Na extração em fase sólida (EFS) foi utilizado cartucho Chromafix[®] pequeno da marca Macherey-Nagel e seringa preenchida com gel de sílica 60. Para cromatografia líquida de média pressão (CLMP) foi utilizada coluna de 23 cm x 15 mm, preenchida com gel de sílica 60. Para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizada coluna de sílica Supelcosil[®], nas dimensões de 25 cm x 10 mm, com tamanho de partícula de 5 µm e solventes de grau de pureza HPLC.

Para CCD foram utilizadas cromatoplasas de alumínio com gel de sílica 60 F₂₅₄, das marcas Macherey-Nagel[®] e Sigma Aldrich[®]. Como agentes reveladores foram utilizadas luz ultravioleta em 254 e 366 nm, soluções de ácido sulfúrico a 10% e solução de anisaldeído-sulfúrico, preparadas com reagentes de grau analítico.

Para a obtenção de espectros de RMN e massas foram utilizados os solventes clorofórmio deuterado (CDCl₃) e benzeno deuterado (benzeno-*d*₆).

3.1.3 Equipamentos

Os extratos e as frações obtidas nos procedimentos cromatográficos foram concentrados em rotaevaporador da marca Büchi®. Para o fracionamento, utilizaram-se colunas abertas ou sistema de CLMP SEPACORE/Syncore®. A purificação final das substâncias, quando necessária, foi realizada através de CLAE utilizando cromatógrafo modelo Pharmacia LKB 2252 equipado com detector de índice de refração RI-Shodex-102 ou cromatógrafo modelo Shimadzu SPD-10AV equipado com detector de ultravioleta SCL-10A. As placas de CCD foram reveladas sob luz ultravioleta (254 nm e 366 nm) em câmara de revelação modelo Prodicil® VA 50.

Os espectros de RMN foram obtidos em equipamentos Bruker dos modelos AC 200, Fourier 300 e DRX 400. Os espectros de massas de baixa resolução foram adquiridos em equipamento Hewlett Packard 5973.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Coleta e obtenção dos extratos

As coletas foram realizadas por colaboradores de várias universidades, através dos projetos Sisbiota-Mar e ProspecMar-Ilhas, com equipamentos de mergulho autônomo, em profundidades de até 30 metros. A conservação dos materiais foi feita em água do mar, sendo então removidas epífitas e outros organismos e, em seguida, os materiais foram secos sob ar frio.

O material vegetal seco foi rasurado e os extratos brutos obtidos por sucessivas macerações de todas as partes da alga com mistura de diclorometano e metanol na proporção 2:1, em temperatura ambiente, por um período de sete dias. Os extratos obtidos foram concentrados em rotaevaporador, sob pressão reduzida, em temperatura inferior a 40 °C.

3.2.2 Procedimentos de fracionamento

Para o fracionamento foram selecionados os extratos brutos que apresentaram rendimento, perfil cromatográfico e resultados de atividade biológica (ver itens 4.2.1 e 4.2.2) mais promissores. O fracionamento dos extratos brutos e frações foi realizado através de sucessivas separações cromatográficas sobre gel de sílica 60 e a eluição foi realizada geralmente por gradiente, com eluentes de polaridade crescente. Para o primeiro

fracionamento utilizou-se cromatografia líquida a vácuo (CLV), selecionando-se as frações viáveis para dar continuidade ao fracionamento (em função do rendimento e perfil cromatográfico em CCD). Para os demais fracionamentos, foram utilizadas cromatografia líquida de média pressão (CLMP) e cromatografia em coluna aberta (CCA). Para algumas frações a separação cromatográfica foi realizada por exclusão, utilizando-se a resina Sephadex[®] LH20 em CCA. A purificação final de metabólitos, quando necessária, foi realizada por EFS e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Em cada etapa foram utilizados eluentes com polaridade otimizada, através da realização de sucessivos testes em CCD, com vistas à melhoria da resolução.

As frações obtidas durante os fracionamentos foram reunidas de acordo com a semelhança observada em CCD e foram nomeadas da seguinte forma: Xy e Xz, onde “X” corresponde ao nome da coluna, e “y” e “z” aos limites do intervalo de frações reunidas.

3.2.2.1 CLV do extrato bruto de *C. cervicornis* – CLVCC

O extrato bruto de *C. cervicornis* (2,4 g) foi submetido à CLV (CLVCC) empregando gradiente de polaridade crescente com os solventes hexano e acetato de etila (Tabela 1). Cada fração foi coletada em frasco separado, obtendo-se um total de 20 frações, chamadas de CLV1 a CLV20. As frações consideradas mais promissoras em função dos rendimentos e perfis cromatográficos foram selecionadas para dar continuidade ao fracionamento. O fracionamento que resultou em substâncias isoladas está esquematizado na Figura 8. Os procedimentos cromatográficos que não resultaram em isolamento de compostos podem ser vistos no Apêndice A.

Tabela 1. Esquema de solventes utilizados na CLVCC.

Frações	Fase móvel	Volume (mL)
CLV1	n-Hex 100%	500
CLV2	n-Hex 95:5 AcOEt	200
CLV3-4	n-Hex 9:1 AcOEt	2 x 100
CLV5-6	n-Hex 85:5 AcOEt	2 x 100
CLV7-9	n-Hex 8:2 AcOEt	100
CLV10-12	n-Hex 7:3 AcOEt	3 x 100
CLV13	n-Hex 6:4 AcOEt	100
CLV14-16	n-Hex 1:1 AcOEt	3 x 100

3.2.2.1.1 CCA da fração CLV9 – Coluna A

A fração CLV9 (198,8 mg) foi submetida a separação cromatográfica em coluna aberta (Coluna A), em que foram utilizadas como fase móvel misturas de ciclohexano com proporções crescentes de isopropanol (Tabela 2). Obtiveram-se 117 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica em CCD, em oito frações, chamadas de CA1 a CA8 (Figura 8).

Tabela 2. Esquema de solventes utilizados na Coluna A.

Frações coletadas	Fase móvel	Volume (mL)
1-3	c-Hex 100%	100
4-24	c-Hex 98,5:1,5 iPOH	100
25-44	c-Hex 98,3:1,7 iPOH	100
45-64	c-Hex 97:3 iPOH	100
65-109	c-Hex 96:4 iPOH	400
110-118	MeOH 100%	100

3.2.2.1.1.1 CLMP da fração CA6 – Coluna E

A fração CA6 (frações 85 a 100, com rendimento de 132,6 mg) foi submetida a fracionamento por CLMP (Coluna E), utilizando-se misturas dos solventes hexano e acetato de etila de polaridade crescente como fase móvel (Tabela 3), com fluxo de 1 mL/min.

Tabela 3. Esquema de solventes utilizados na Coluna E.

Frações coletadas	Fase móvel	Volume (mL)
1	n-Hex 100%	35
2-4	n-Hex 98:2 AcOEt	20
5-13	n-Hex 95:5 AcOEt	40
14-25	n-Hex 93:7 AcOEt	60
26-47	n-Hex 9:1 AcOEt	100
48-63	n-Hex 87:13 AcOEt	80
64-75	n-Hex 85:15 AcOEt	60
76-84	n-Hex 8:2 AcOEt	40
85-93	n-Hex 7:3 AcOEt	40
94-99	n-Hex 1:1 AcOEt	30
100-102	AcOEt 100%	10
103-104	MeOH 100%	10

Foram obtidas 104 frações com volumes de 5 mL/fração, reunidas em função do perfil cromatográfico em 18 frações, chamadas de CE1 a CE18 (Figura 8).

3.2.2.1.1.1.1 CLAE da fração CE6 – CLAE 6

A fração CE6 (frações 52 a 55, com rendimento de 5,1 mg) foi purificada por CLAE (CLAE 6), utilizando eluição isocrática de ciclohexano e acetato de etila na proporção 95:5. Foram obtidas sete frações duas frações, chamadas de CE6A e CE6B (Figura 8).

3.2.2.1.1.1.2 CLAE da fração CE7 – CLAE 7

Para a fração CE7 (frações 56 a 63, com rendimento de 7,5 mg) foi empregada CLAE (CLAE 7), com sistema isocrático de eluição, utilizando os solventes ciclohexano e acetato de etila na proporção de 95:5. Foram obtidas três frações, codificadas como CE7A a CE7C (Figura 8).

3.2.2.1.1.1.3 CLAE da fração CE8-9 – CLAE 8

A fração CE8-9 (frações 64 a 72, com rendimento de 10,8 mg) foi purificada utilizando-se CLAE (CLAE 8), com eluição isocrática na proporção de 95:5 com os solventes ciclohexano e acetato de etila. Foram obtidas três frações, denominadas CE8-9A a CE8-9C (Figura 8).

3.2.2.1.1.1.4 CLAE da fração CE14 – CLAE 2

A fração CE14 (fração 89, com rendimento de 1,0 mg) foi purificada com o uso de CLAE (CLAE 2), utilizando-se como fase móvel a mistura de ciclohexano e acetato de etila na proporção de 9:1. Foram obtidas duas frações, chamadas de CE14A a CE14B (Figura 8).

3.2.2.1.1.1.5 CLAE da fração CE15 – ESF 1 e CLAE 1

A fração CE15 (frações 90 a 93, com rendimento de 6,1 mg) foi submetida inicialmente a EFS (EFS 1), utilizando-se como fase móvel misturas dos solventes ciclohexano e acetato de etila, nas proporções 95:5 e 9:1 (10 mL de cada) e 20 mL de acetato de etila. Foram obtidas três frações, chamadas de CE15A a CE15C. A fração CE15A (2,1 mg) foi purificada por CLAE (CLAE 1), utilizando ciclohexano e acetato de etila

na proporção 9:1. Foram obtidas três frações, chamadas de CE15A1 e CE15A3 (Figura 8).

3.2.2.1.2 CLMP da fração CLV11 – Coluna C

A fração CLV11 (309,2 mg) foi submetida a CLMP (Coluna C), utilizando-se como fase móvel misturas de polaridade crescente dos solventes hexano e acetato de etila (Tabela 4), com fluxo de 1,5 mL/min. O fracionamento originou 149 frações, com volume de 5 mL/fração, que foram reunidas de acordo com a semelhança cromatográfica em 16 frações, denominadas CC1 a CC16 (Figura 8).

Tabela 4. Esquema de solventes utilizados na Coluna C.

Frações coletadas	Fase móvel	Volume (mL)
1	n-Hex 100%	65
2-9	n-Hex 95:5 AcOEt	30
10-24	n-Hex 9:1 AcOEt	50
25-40	n-Hex 87:13 AcOEt	60
41-63	n-Hex 86:14 AcOEt	60
64-80	n-Hex 85:15 AcOEt	60
81-97	n-Hex 8:2 AcOEt	80
98-103	n-Hex 7:3 AcOEt	20
104-130	n-Hex 1:1 AcOEt	90
131-158	AcOEt 100%	20

3.2.2.1.2.1 CCA da fração CC10 – Coluna F

A fração CC10 (frações 110 a 117, com rendimento de 54,8 mg) foi submetida à CCA (Coluna F), utilizando como fase móvel eluentes de polaridade crescente preparados com os solventes ciclohexano e acetato de etila (Tabela 5). Foram obtidas 64 frações, reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em 12 frações, codificadas como CF1 a CF12 (Figura 8).

Tabela 5. Esquema de solventes utilizados na Coluna F.

Frações coletadas	Fase móvel	Volume (mL)
1	c-Hex 100%	50
2-5	c-Hex 95:5 AcOEt	50
6-30	c-Hex 9:1 AcOEt	300
31-35	c-Hex 85:15 AcOEt	50
36-44	c-Hex 8:2 AcOEt	100
45-49	c-Hex 7:3 AcOEt	50
50-54	c-Hex 1:1 AcOEt	50
55-63	AcOEt 100%	100
64	MeOH 100%	100

3.2.2.1.2.1.1 CLAE da fração CF5 – CLAE 9

A fração CF5 (frações 27 a 29, com rendimento de 5,0 mg) foi purificada por CLAE (CLAE 9), utilizando-se ciclohexano e acetato de etila na proporção de 9:1. Foram obtidas quatro frações, chamadas de CF5A a CF5D (Figura 8).

3.2.2.1.2.1.2 CLAE da fração CF7 – CLAE 10

A fração CF7 (frações 33 a 38, com rendimento de 4,4 mg) foi purificada por CLAE (CLAE 10), empregando-se ciclohexano e acetato de etila na proporção de 9:1. Foram obtidas quatro frações, denominadas CF7A a CF7B (Figura 8).

3.2.2.1.2.2 CCA da fração CC11 – Coluna G

A fração CC11 (frações 118 a 122, com rendimento de 85,2 mg) foi fracionada utilizando-se CCA (Coluna G), empregando eluentes de polaridades crescentes, preparados através de misturas dos solventes ciclohexano e acetato de etila (Tabela 6). Foram obtidas 63 frações, reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em 11 frações, sendo chamadas de CG1 a CG11 (Figura 8).

Tabela 6. Esquema de solventes utilizados na Coluna G.

Frações coletadas	Fase móvel	Volume (mL)
1	c-Hex 95:5 AcOEt	100
2-32	c-Hex 9:1 AcOEt	350
33-37	c-Hex 85:15 AcOEt	50
38-42	c-Hex 8:2 AcOEt	50
43-47	c-Hex 7:3 AcOEt	50
48-57	c-Hex 1:1 AcOEt	100
58-62	AcOEt 100%	50
63	MeOH 100%	50

3.2.2.1.2.3 CCA da fração CC14 – Coluna H

Para o fracionamento da fração CC14 (132 a 134, com rendimento de 46,8 mg), utilizou-se CCA (Coluna H), com um sistema de gradiente de polaridade crescente, empregando-se os solventes ciclohexano e acetato de etila (Tabela 7). Foram obtidas 40 frações, que foram reunidas em função da semelhança cromatográfica em 12 frações, codificadas como CH1 a CH12 (Figura 8).

Tabela 7. Esquema de solventes utilizados na Coluna H.

Frações coletadas	Fase móvel	Volume (mL)
1	c-Hex 100%	100
2-7	c-Hex 8:2 AcOEt	100
8-10	c-Hex 75:25 AcOEt	50
11-23	c-Hex 7:3 AcOEt	200
24-29	c-Hex 6:4 AcOEt	100
30-35	c-Hex 1:1 AcOEt	100
36-39	AcOEt 100%	100
40	MeOH 100%	50

3.2.2.1.2.3.1 CLAE da fração CH4 – CLAE 12

A purificação da fração CH4 (frações 9 a 11, com rendimento de 4,6 mg) foi realizada através de CLAE (CLAE 12), sendo empregada mistura dos solventes ciclohexano e acetato de etila na proporção de 8:2. Foram obtidas duas frações, denominadas CH4A e CH4B (Figura 8).

3.2.2.1.3 CLMP da fração CLV14 – Coluna D

A fração CLV14 (100,4 mg) foi fracionada utilizando-se CLMP (Coluna D) e a eluição foi realizada por gradiente, com misturas de solventes de polaridade crescente, empregando os solventes ciclohexano e acetato de etila (Tabela 8). Foram obtidas 97 frações, que foram reunidas em 11 frações de acordo com o perfil cromatográfico, denominadas CD1 a CD11 (Figura 8).

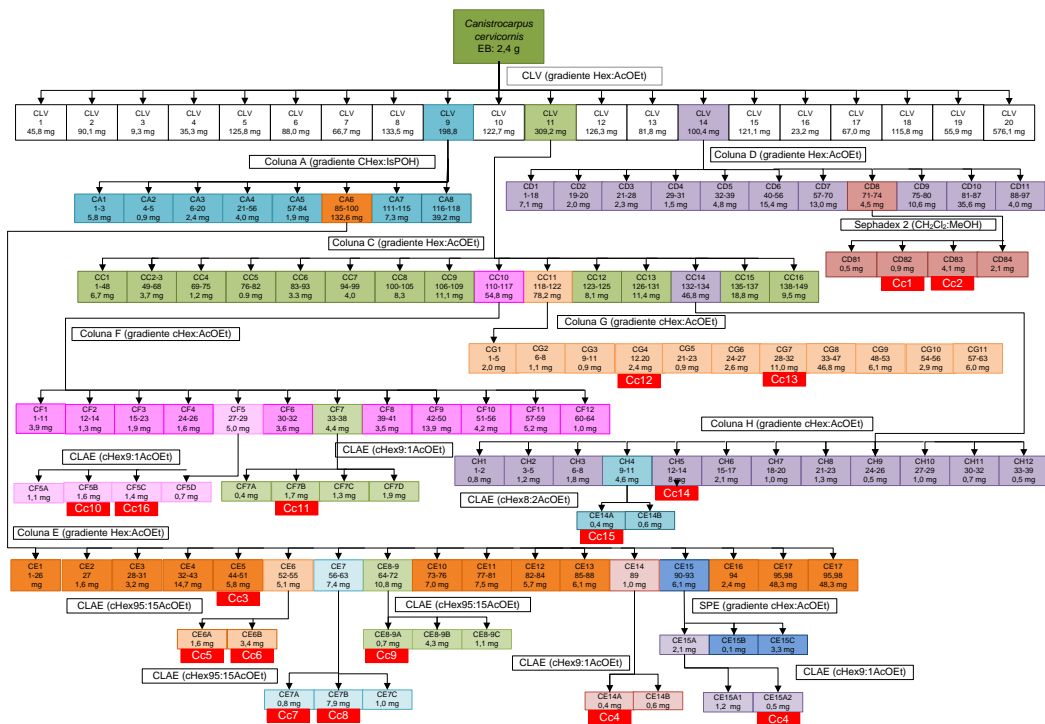
Tabela 8. Esquema de solventes utilizados na Coluna D.

Frações coletadas	Fase móvel	Volume (mL)
1	c-Hex 100%	35
2-4	c-Hex 95:5 AcOEt	20
5-9	c-Hex 95:5 AcOEt	20
10-21	c-Hex 87:13 AcOEt	60
22-35	c-Hex 86:14 AcOEt	80
36-54	c-Hex 85:15 AcOEt	100
55-69	c-Hex 84:16 AcOEt	80
70-83	c-Hex 8:2 AcOEt	60
84-92	c-Hex 1:1 AcOEt	60
93-95	AcOEt 100%	20
96-97	MeOH 100%	20

3.2.2.1.3.1 CCA da fração CD8 – Sephadex 2

A fração CD8 (frações 71 a 74, com rendimento de 4,5 mg) foi purificada utilizando-se cromatográfica de exclusão (Sephadex 2), com Sephadex® LH20 como fase estacionária e os solventes diclorometano e metanol, na proporção de 1:1 como fase móvel. Foram obtidas nove frações, reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em quatro frações, denominadas CD81 a CD84 (Figura 8).

Figura 8. Esquema geral do fracionamento de *C. cervicornis* que resultou no isolamento de compostos.



3.2.2.2 CLV do extrato bruto de *D. mertensii* - CLVDM

O extrato bruto de *D. mertensii* (4,9 g) foi submetido à CLV com gel de sílica 60. Como fase móvel, foi utilizado um gradiente de polaridade crescente com os solventes hexano, acetato de etila e metanol (Tabela 9). Cada fração foi coletada em frasco separado, obtendo-se um total de 18 frações, chamadas de CLV1 a CLV18. As frações mais promissoras, em função dos rendimentos e perfis cromatográficos foram selecionadas para dar continuidade ao fracionamento, que será descrito abaixo. O esquema geral do fracionamento que resultou em substâncias isoladas está na Figura 9 e os procedimentos cromatográficos que não resultaram em isolamento de compostos não serão descritos abaixo, mas podem ser vistos no Apêndice B.

Tabela 9. Esquema de solventes utilizados na CLVDM.

Fração	Fase móvel	Volume (mL)
CLV1	n-Hex 100%	300
CLV2	n-Hex 95:5 AcOEt	200
CLV3	n-Hex 9:1 AcOEt	200
CLV4-5	n-Hex 85:15 AcOEt	2 x 100
CLV6-7	n-Hex 8:2 AcOEt	2 x 100
CLV8-10	n-Hex 7:3 AcOEt	3 x 100
CLV11-12	n-Hex 6:4 AcOEt	2 x 100
CLV13	n-Hex 1:1 AcOEt	300
CLV14	n-Hex 3:7 AcOEt	100
CLV15	n-Hex 2:8 AcOEt	100
CLV16	AcOEt 100%	100
CLV17	MeOH 100%	100
CLV18	MeOH 1:1 H ₂ O	200

3.2.2.2.1 CCA da fração CLV9-10 – Coluna A

A fração CLV9-10 (279,3 mg) foi fracionada utilizando-se CCA (Coluna A), empregando eluentes de polaridades crescentes, preparados através de misturas dos solventes ciclohexano e acetato de etila (Tabela 10). Foram obtidas 114 frações, reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em 21 frações, sendo chamadas de CA1 a CA21 (Figura 9).

Tabela 10. Esquema de solventes utilizados na Coluna A.

Fração	Fase móvel	Volume (mL)
1	c-Hex 100%	100
2	c-Hex 95:5 AcOEt	75
3-13	c-Hex 9:1 AcOEt	250
14-19	c-Hex 85:15 AcOEt	100
20-46	c-Hex 8:2 AcOEt	150
47-55	c-Hex 75:25 AcOEt	50
6-64	c-Hex 7:3 AcOEt	50
64-73	c-Hex 65:25 AcOEt	50
74-82	c-Hex 6:4 AcOEt	50
83-91	c-Hex 1:1 AcOEt	50
92-100	AcOEt 100%	50
101-109	MeOH 100%	50
110-114	MeOH 1:1 H ₂ O	50

3.2.2.2.2 CCA da fração CLV4 – Coluna C

A fração CLV4 (443,4 mg) foi submetida a cromatografia líquida em coluna aberta (Coluna C), utilizando-se misturas dos solventes ciclohexano e acetato de etila, em gradiente de polaridade crescente (Tabela 11).

Tabela 11. Esquema de solventes utilizados na Coluna C

Frações coletadas	Fase móvel	Volume (mL)
1-21	c-Hex 95:5 AcOEt	300
22-29	c-Hex 94:6 AcOEt	200
30-43	c-Hex 93:7 AcOEt	250
44-67	c-Hex 92:8 AcOEt	400
68-82	c-Hex 91:9 AcOEt	300
83-98	c-Hex 9:1 AcOEt	350
99-113	c-Hex 88:12 AcOEt	300
114-127	c-Hex 85:15 AcOEt	300
128-143	c-Hex 82:18 AcOEt	300
144-156	c-Hex 8:2 AcOEt	350
157-169	c-Hex 75:25 AcOEt	300
170-183	c-Hex 7:3 AcOEt	300
184-194	c-Hex 65:35 AcOEt	200
195-204	c-Hex 6:4 AcOEt	200
205-222	c-Hex 1:1 AcOEt	320
223-258	c-Hex 3:7 AcOEt	200

O fracionamento originou 258 frações que foram reunidas de acordo com a semelhança cromatográfica em 21 frações, que foram denominadas CC1 a CC21 (Figura 9).

3.2.2.2.2.1 CLAE da fração CC5 – CLAE 1

A fração CC5 (frações 66 a 74, com rendimento de 26,7 mg) foi submetida inicialmente a extração em fase sólida (ESF 1), utilizando a mistura dos solventes ciclohexano e acetato de etila na proporção 93:7 e acetato de etila 100%. Foram obtidas duas frações, chamadas de CC5A e CC5B. A fração CC5A (10,6 mg) foi purificada por CLAE (CLAE 1), utilizando eluição isocrática de ciclohexano e acetato de etila na proporção 93:7. Foram obtidas cinco frações, chamadas de CC5A1 a CC5A5 (Figura 9).

3.2.2.2.2.2 CLAE da fração CC9 – CLAE 3

A purificação da fração CC9 (frações 99 a 104, com rendimento de 11,5 mg) foi realizada através de CLAE (CLAE 3), sendo empregada mistura dos solventes ciclohexano e acetato de etila na proporção de 88:12. Foram obtidas quatro frações, chamadas de CC9A a CC9D (Figura 9).

3.2.2.2.2.3 CLAE da fração CC10 – CLAE 2

Para a fração CC10 (frações 105 a 111, com rendimento de 8,8 mg) foi empregada CLAE (CLAE 2), com sistema isocrático de eluição, utilizando os solventes ciclohexano e acetato de etila na proporção de 88:12. Foram obtidas cinco frações, codificadas como CC10A a CC10E (Figura 9).

3.2.2.2.2.4 CLAE da fração CC17 – CLAE 7

A fração CC17 (frações 182 a 194 com rendimento de 13,6 mg) foi purificada por CLAE (CLAE 7), utilizando eluição isocrática com ciclohexano e acetato de etila na proporção 9:1. Foram obtidas dez frações, reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em três frações, chamadas de CC17A a CC17C (Figura 9).

3.2.2.2.3 CCA da fração CLV5 – Coluna E

A fração CLV5 (229,1 mg) foi fracionada por CCA (Coluna E), utilizando gradiente de polaridade crescente, preparado com ciclohexano e acetato de etila (Tabela 12). Foram obtidas 157 frações, reunidas de acordo com a semelhança cromatográfica em 25 frações, chamadas de CE1 a CE25 (Figura 9).

Tabela 12. Esquema de solventes utilizados na Coluna E.

Frações coletadas	Fase móvel	Volume (mL)
1-30	c-Hex 9:1 AcOEt	300
31-42	c-Hex 89:11 AcOEt	200
43-69	c-Hex 88:12 AcOEt	200
70-88	c-Hex 87:13 AcOEt	250
89-97	c-Hex 86:14 AcOEt	100
98-106	c-Hex 85:15 AcOEt	100
107-115	c-Hex 8:2 AcOEt	100
116-124	c-Hex 7:3 AcOEt	150
125-131	c-Hex 6:4 AcOEt	100
132-143	c-Hex 1:1 AcOEt	150
144-150	c-Hex 3:7 AcOEt	100
151-157	AcOEt 100%	100

3.2.2.2.3.1 CLAE da fração CE5 – CLAE 6

A fração CE5 (frações 18 a 23, com rendimento de 5,1 mg) foi purificada com o uso de CLAE (CLAE 6), utilizando-se como eluente ciclohexano e acetato de etila na proporção de 9:1. Foram obtidas quatro frações, chamadas de CE5A a CE5D (Figura 9).

3.2.2.2.4 CCA da fração CLV6 – Coluna G

A fração CLV6 (267,2 mg) foi submetida a CCA (Coluna G), utilizando como eluente um gradiente com polaridade crescente, empregando-se os solventes hexano e acetato de etila (Tabela 13). Foram obtidas 81 frações, reunidas em função do perfil cromatográfico em nove frações, codificadas como CG1 a CG9 (Figura 9).

Tabela 13. Esquema de solventes utilizados na Coluna G.

Frações coletadas	Fase móvel	Volume (mL)
1-39	n-Hex 9:1 AcOEt	500
40-47	n-Hex 85:15 AcOEt	100
48-55	n-Hex 8:2 AcOEt	100
56-63	n-Hex 7:3 AcOEt	100
64-71	n-Hex 1:1 AcOEt	100
72-80	AcOEt 100%	100
81	MeOH 100%	100

3.2.2.2.4.1 CLAE da fração CG10 – CLAE 13

A fração CG10 (frações 35-37, com rendimento de 2,6 mg) foi purificada por CLAE (CLAE 13), utilizando como eluente os solventes ciclohexano e acetato de etila na proporção 85:15. Foram obtidas três frações, CG10A a CG10C (Figura 9).

3.2.2.2.5 EFS da fração CLV11 – EFS 3 e CLAE 5

A fração CLV11 (128,9 mg) foi submetida inicialmente a EFS (EFS 3) utilizando-se uma seringa preenchida com sílica gel 60 e como fase móvel diferentes misturas dos solventes ciclohexano e acetato de etila, com polaridades crescentes (Tabela 14). Foram obtidas 11 frações, chamadas de CLV11A a CLV11L (Figura 9). Com a fração CLV11D (17,5 mg) foi realizada CLAE (CLAE 5), utilizando-se uma mistura dos solventes ciclohexano e acetato de etila na proporção 75:25. Foram obtidas seis frações, denominadas CLV11D1 a CLV11D6 (Figura 9).

Tabela 14. Esquema de solventes utilizados na EFS 3

Fração	Fase móvel	Volume (mL)
1	c-Hex 9:1 AcOEt	30
2	c-Hex 85:15 AcOEt	30
3	c-Hex 8:2 AcOEt	30
4	c-Hex 75:25 AcOEt	30
5	c-Hex 7:3 AcOEt	30
6	c-Hex 65:25 AcOEt	30
7	c-Hex 6:4 AcOEt	30
8	c-Hex 55:45 AcOEt	30
9	c-Hex 1:1 AcOEt	30
10	c-Hex 25:75 AcOEt	30
11	AcOEt 100%	30

3.2.3 Identificação ou elucidação estrutural

A identificação ou elucidação estrutural dos metabólitos isolados foi realizada através da obtenção e análise de espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN, em experimentos uni- e bidimensionais, além da consulta a base de dados MarinLit[®]. Os espectros foram calibrados através do sinal correspondente ao residual de hidrogênio do solvente utilizado para a análise e, quando presente, através do sinal do tetrametilsilano (TMS). Quando possível, também foram obtidos espectros de massas e os dados obtidos foram comparados com os de compostos semelhantes, publicados na literatura.

3.2.4 Determinação do potencial redutor

Para avaliação da atividade antioxidante, foi realizada a determinação do potencial redutor como um método de triagem, com diferentes amostras de extratos de algas pardas (ver Tabela 16, item 4.2.1). Para o ensaio foi preparada uma solução de cada amostra (soluções amostra), através da diluição das mesmas em metanol (1 mg/mL) e o ensaio foi realizado em triplicata. Este ensaio foi baseado no método de Price e Butler, proposto por Waterman e Mole (1994). A 100 μL da amostra foram adicionados 8,5 mL de água destilada e 1,0 mL da solução de FeCl_3 0,1 M, e, após 3 minutos, 1,0 mL da solução de ferrocianeto de potássio 0,08 M. Após 15 minutos, foi realizada a leitura da absorbância da solução em espectrofotômetro a 720 nm. Utilizou-se como branco uma solução preparada da mesma forma, porém substituindo-se a amostra por 100 μL de metanol. Uma curva de calibração foi feita utilizando-se solução de ácido ascórbico diluído em metanol, obtendo-se a seguinte equação da reta: $y = 0,0019x + 0,0698$, $r^2 = 0,9967$. O potencial redutor das amostras foi expresso em mg de ácido ascórbico/g de amostra (mg de AA/g de extrato).

Os resultados obtidos foram organizados e analisados por estatística descritiva e foi utilizada análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey-Kramer (para $\alpha = 0,05$) para comparação entre médias (IBM SPSS Statistics[®]).

3.2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os extratos de algas pardas (ver Tabela 17, item 4.2.2) foram testados frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 90112,

utilizando a metodologia de microdiluição em caldo em placas de ELISA de 96 poços de fundo chato. Foram colocados 50 μ L dos extratos na concentração de 2 mg/mL por poço e em seguida, foram aplicados 50 μ L de Caldo Mueller-Hinton contendo 10^6 UFC/L de cada bactéria. A concentração final bacteriana foi de 5×10^5 UFC/mL (RANGEL et al., 2011) e a concentração dos extratos foi de 1 mg/mL. A placa foi vedada com parafilme e incubada a 37 °C por 18 horas e, em seguida, foram realizadas as leituras das densidades ópticas (DO) a 595 nm em leitor de ELISA Multiskan®EX (Thermo Fisher Scientific, EUA) para avaliação da atividade antimicrobiana. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do crescimento microbiano, observados através da comparação do valor da DO das amostras com o controle, que foi preparado da mesma forma que os testes, porém sem adição de extratos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS BRUTOS

Os rendimentos obtidos para os extratos que foram analisados de *C. cervicornis* (C2) e *D. mertensii* (D5) estão dispostos na Tabela 15.

Tabela 15. Rendimentos dos extratos brutos obtidos a partir das espécies estudadas.

Espécie	Massa da alga seca (g)	Extrato bruto g (%)*
<i>C. cervicornis</i> (C2)	29,0	2,4 (8,28)
<i>D. mertensii</i> (D5)	54,9	4,9 (8,92)

* Calculados em g/100 g de alga seca utilizada na extração.

Na sequência serão apresentados os resultados de atividades biológicas e, logo após, a elucidação estrutural das substâncias isoladas.

4.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS

Os extratos testados para atividade antioxidante foram obtidos a partir de coletas realizadas no ano de 2012 e os extratos testados para atividade antimicrobiana foram obtidos no ano de 2014. Uma vez que as atividades biológicas foram realizadas conforme disponibilidade dos grupos parceiros, não foi possível obter resultados de ambas as atividades para todos os extratos.

4.2.1 Determinação do potencial redutor

A determinação do potencial redutor, utilizando o método de Price e Butler, proposto por Waterman e Mole (1994) é realizada a partir da detecção de um complexo azul $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$. O complexo é formado a partir da oxidação de hidroxilas fenólicas (presentes nos compostos e extratos vegetais) e redução de íons férricos (adicionados à solução na forma de FeCl_3) para íons ferrosos, com o reagente ferrocianeto de potássio (WATERMAN; MOLE, 1994). A partir da formação do complexo, empregou-se uma curva de calibração com diversas concentrações de ácido ascórbico. Valores mais elevados significam maior capacidade redutora. Os resultados obtidos para o ensaio estão descritos na Tabela 16.

Balboa e colaboradores (2013) ressaltam que a propriedade antioxidante dos extratos está relacionada com fatores de variabilidade natural (como os citados anteriormente) e outros de processamento do material. Entre as etapas mais importantes do processamento do material estão a secagem e a seleção do solvente para extração de compostos ativos. Compostos fenólicos podem ser responsáveis por grande parte da propriedade antioxidante dos extratos, devido à presença e posição de hidroxilas (SKERGET et al., 2005) e podem ser degradados durante a secagem em forno ou estufa (BALBOA et al., 2013). Além disso, maiores conteúdos de compostos fenólicos são esperados nos extratos preparados com metanol, etanol, acetona, acetato de etila, entre outros, já que esses compostos possuem característica polar e tendem a ser extraídos mais facilmente com aqueles solventes (ALOTHMAN; BHAT; KARIM, 2009).

Uma vez que fatores ambientais podem levar a uma heterogeneidade de compostos de uma mesma espécie coletada em locais diferentes, a avaliação de extratos diferentes espécies e, ainda, de amostras de uma mesma espécie coletadas em locais diferentes foi realizada, para que o extrato mais promissor fosse selecionado.

Os extratos coletados na costa do nordeste brasileiro apresentaram maior potencial redutor quando comparados com os extratos obtidos na Ilha da Trindade, com destaque para: C1 ($102,99 \pm 1,99$), C2 ($105,97 \pm 0,80$) e D4 ($100,71 \pm 1,10$), os quais apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais extratos analisados. Dessa forma, o extrato C2 foi selecionado para o fracionamento cromatográfico, motivado principalmente pelo resultado do teste de potencial redutor, bem como o perfil cromatográfico em CCD e rendimento obtidos.

4.2.2 Determinação da atividade antimicrobiana

Considerando que a produção de metabólitos bioativos está sujeita à variação sazonal e geográfica (STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011) a avaliação de extratos de diferentes espécies e, ainda, de extratos de uma mesma espécie coletados em locais diferentes também foi realizada em relação à atividade antimicrobiana.

Os resultados obtidos (Tabela 17) demonstram que esta variação realmente ocorre, uma vez que são observadas diferenças nos resultados obtidos para extratos de uma mesma espécie coletados em diferentes locais, além das diferenças entre as espécies.

Tabela 16. Resultados obtidos para extratos de algas pardas dos gêneros *Dictyota* e *Canistrocarpus* no teste de potencial redutor.

Espécie	Local de coleta (rendimento)	Data de coleta	Código	PR (mg AA/g)**
<i>C. cervicornis</i>	Pedra do Marice – Ceará (593,2 mg)	21/04/2012	C1	102,99 ± 1,99 ^{a,b}
<i>C. cervicornis</i>	Pedra do Paraíso – Ceará (2,4 g)	20/08/2012	C2	105,97 ± 0,80 ^a
<i>C. cervicornis</i>	Ilha da Trindade – Espírito Santo* (123,8 mg)	18/06/2012	C3	56,68 ± 1,33
<i>C. cervicornis</i>	Praia Orelhas - Ilha da Trindade – Espírito Santo* (485,5 mg)	25/06/2012	C4	37,73 ± 0,80
<i>C. cervicornis</i>	Praia Orelhas - Ilha da Trindade – Espírito Santo* (698,3 mg)	30/06/2012	C5	48,43 ± 1,90
<i>C. cervicornis</i>	Túnel - Ilha da Trindade – Espírito Santo* (123,8 mg)	20/06/012	C6	52,47 ± 1,10
<i>C. cervicornis</i>	Risca do Meio – Ceará (311,6 mg)	18/04/2012	C7	96,50 ± 0,61
<i>D. bartayresiana</i>	Ilha da Trindade – Espírito Santo (481,3 mg)	26/06/2012	D1	70,36 ± 0,80 ^c
<i>D. bartayresiana</i>	Paredão - Ilha da Trindade – Espírito Santo (512,0 mg)	26/06/2012	D2	69,31 ± 0,61 ^c
<i>D. mertensii</i>	Arraial d’Ajuda – Bahia (881,3 mg)	11.03.2012	D3	88,26 ± 1,99
<i>D. ciliolata</i>	Ilha Escalvada – Espírito Santo (738,6 mg)	28.03.2012	D4	100,71 ± 1,10 ^b

*Amostras dos mesmos locais foram coletadas em pontos diferentes. **PR: Potencial redutor (miligrama de ácido ascórbico/grama de extrato). Os resultados são expressos como média ± desvio padrão da média (n = 3). A presença de letras nas células indica que não há diferença significativa (p > 0,05) em relação às amostras correspondentes (ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer).

Tabela 17. Resultados em porcentagem de inibição obtidos para extratos de algas pardas dos gêneros *Dictyota* e *Canistrocarpus* no teste de atividade antimicrobiana.

Espécie	Local de coleta (rendimento)	Época de coleta	Código	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>C. albicans</i> ATCC 90112
<i>C. cervicornis</i>	Atol das Rocas, RN* (1,92 g)	03/2015	C8	31,9	60,2	78,7
<i>C. cervicornis</i>	Atol das Rocas, RN* (2,00 g)	03/2015	C9	54,8	71,4	77,5
<i>C. cervicornis</i>	Atol das Rocas, RN* (1,43 g)	03/2015	C10	46,3	13,3	95,6
<i>C. cervicornis</i>	Atol das Rocas, RN* (0,41 g)	03/2015	C11	55,6	60,2	88,5
<i>C. cervicornis</i>	Sapata, Fernando de Noronha, PE* (0,09 g)	11/2014	C12	73,7	96,3	88,1
<i>C. cervicornis</i>	Cabras, Fernando de Noronha, PE* (0,05 g)	11/2014	C13	79,0	69,3	99,4
<i>C. cervicornis</i>	Fernando de Noronha, PE* (0,06 g)	01/2015	C14	52,3	13,3	91,3
<i>C. cervicornis</i>	Praia da Calheta, Ilha da Trindade, ES* (2,99 g)	08/2014	C15	99,6	73,5	60,4
<i>C. cervicornis</i>	Pedra do Paraíso, CE (2,4 g)	20/08/2012	C2	50,7	59,3	38,2
<i>D. mertensii</i>	Ilha da Trindade, ES* (4,9 mg)	08/2014	D5	100,0	55,9	100,0

*Amostras dos mesmos locais foram coletadas em pontos diferentes.

D5 foi o extrato que apresentou os melhores resultados, sendo selecionado para o fracionamento cromatográfico por apresentar além de um resultado de atividade antimicrobiana promissor, perfil cromatográfico e rendimento promissores.

Estudos realizados por outros pesquisadores mostraram que de uma maneira geral, extratos de algas pardas são mais ativos contra bactérias Gram positivas do que contra bactérias Gram negativas (DEMIREL et al., 2009). No entanto, os resultados obtidos para alguns dos extratos mostram o contrário, como é o caso do extrato considerado mais promissor (D5).

4.3 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO

4.3.1 *Canistrocarpus cervicornis* (C2)

O fracionamento do extrato bruto de *C. cervicornis* (C2) que levou ao isolamento de substâncias foi realizado através de uma CLV, seis CCA (sendo cinco em sílica gel e uma em Sephadex[®] LH20), uma EFS e oito CLAE (Figura 8). As frações utilizadas nos procedimentos de fracionamento foram selecionadas por apresentarem perfil cromatográfico e rendimento promissores.

A partir do fracionamento do extrato bruto de *C. cervicornis* foram isoladas 16 substâncias (Tabela 18), denominadas Cc1 a Cc16.

Tabela 18. Compostos isolados do extrato de *C. cervicornis*

Substância	Identificação	Quantidade (mg)
Cc1	Ácido graxo saturado	0,9
Cc2	4 α -acetóxi-9 β ,14 α -dihidroxiolasta-1(15),7-dieno	4,1
Cc3	hidrocarboneto	5,8
Cc4	4 α -acetóxi-14 α -hidroxiolasta-1(15),7,9-trieno	0,9
Cc5-Cc16	N.I.	0,8 a 11,0

N.I. = Não identificado (amostras encaminhadas à UFF, espectros ainda não recebidos).

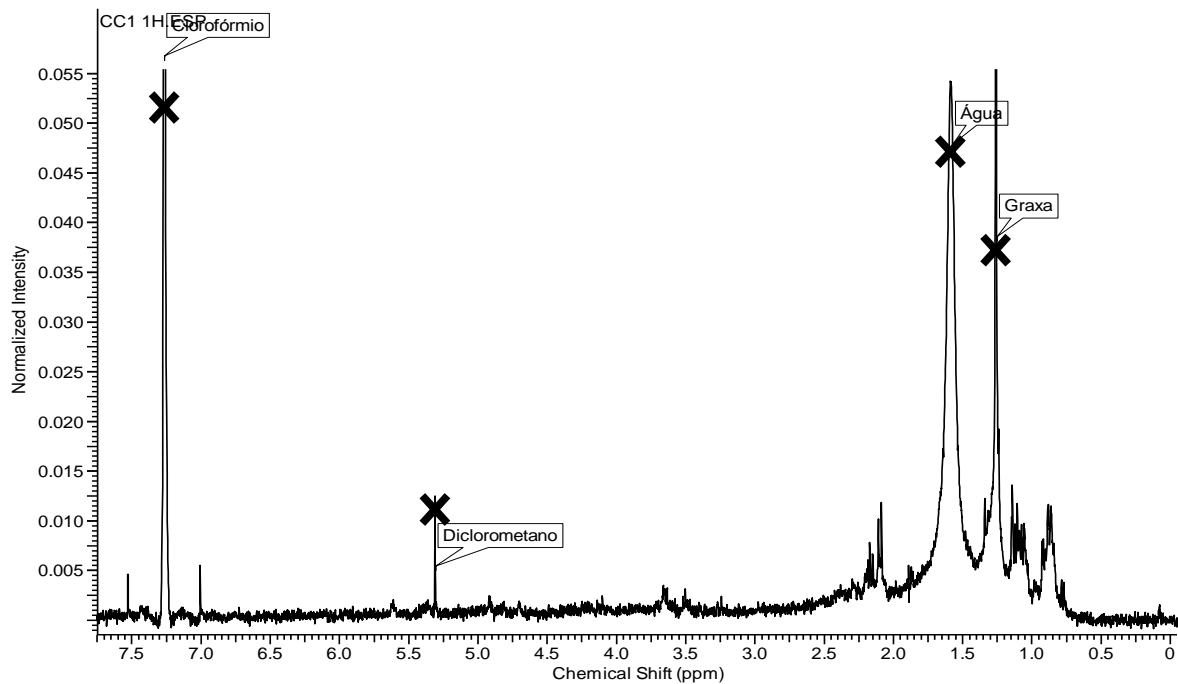
A seguir serão descritas a elucidação/identificação estrutural e as características das substâncias isoladas de *C. cervicornis*.

4.3.1.1 Substância Cc1

Cc1 foi obtida como um óleo de coloração amarelada da fração CD82 (Sephadex 2), com rendimento de 0,9 mg. Apresenta-se na CCD em Hex/AcOEt (8:2) como uma mancha em Rf 0,35; após revelação com anisaldeído sulfúrico adquire coloração roxa de imediato, ficando marrom após algum tempo. A substância não apresenta extinção de fluorescência em 254 nm e não apresenta fluorescência em 366 nm.

O espectro de ^1H RMN (Figura 10) sugeriu tratar-se de ácido graxo saturado, motivo pelo qual não foram obtidos outros espectros (^{13}C RMN, mapas de correlação e massas).

Figura 10. Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) de Cc1.



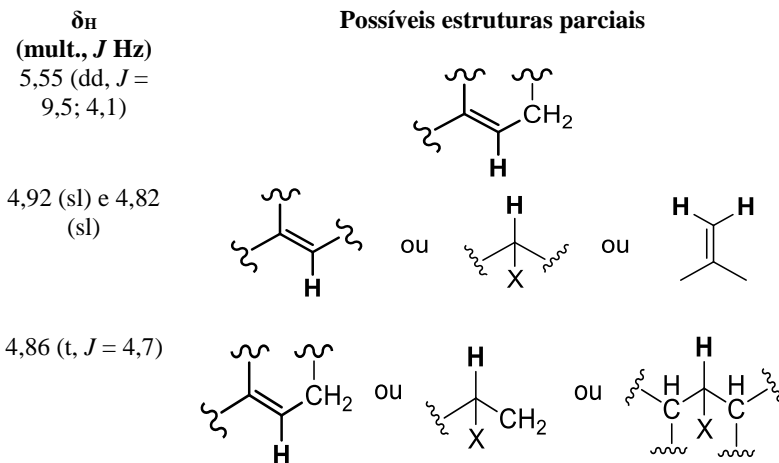
4.3.1.2 Substância Cc2

A substância Cc2 (4,1 mg) foi obtida da fração CD83 (Sephadex 3), como um óleo de coloração amarelada, com rendimento de 4,1 mg. Apresenta-se na CCD em Hex/AcOEt (8:2) como uma mancha em Rf 0,4 sem fluorescência própria em 366 nm, nem extinção de fluorescência em 254 nm. Após revelação com solução de anisaldeído sulfúrico adquire coloração roxa de imediato, ficando marrom após algum tempo.

O espectro de ^1H RMN em CDCl_3 (Figuras 12, 13 e 14 e dados descritos na Tabela 19) apresenta em 0,84 ppm e 1,04 ppm dois dupletos, ambos integrando para 3H, com valor de constante de acoplamento de 6,8 Hz. A integração determina que se tratam de hidrogênios de duas metilas e o desdobramento indica que possuem acoplamento vicinal com hidrogênio metínico. Em 0,90 ppm e 1,24 ppm, são observados simpletos integrando para 3H, sugestivos de hidrogênios de metilas que não possuem acoplamento vicinal. Em 1,95 ppm, um multipletto integrando para 1H sugere a presença de um metino com acoplamento vicinal. Um simpleto em 2,17 ppm, integrando para 3H, sugere a presença de uma metila de grupamento acetóxi. Na região de 1,4 a 3,1 ppm, há sinais sugestivos de hidrogênios metilênicos. Um duplo dupletto em 5,55 ppm ($J = 9,5; 4,1$ Hz), integrando para 1H, sugere a presença de hidrogênio olefínico. Em 4,92 ppm e 4,82 ppm são observados dois simpletos largos e em 4,86 ppm um tripleto largo ($J = 4,7$ Hz), sugestivos de hidrogênios olefínicos ou hidrogênios geminais a átomo eletronegativo (Figura 11) (PAVIA et al., 2009). O desdobramento do último sinal é sugestivo de acoplamento vicinal a dois hidrogênios equivalentes. Os simpletos largos também podem tratar-se de metileno exocíclico [a semelhança do já observado em sesquiterpenos do gênero *Laurencia*, como no elatol, conforme Lhullier e colaboradores (2009)].

O espectro de massas obtido para Cc2 (Figura 15) não apresentou o pico do íon molecular em m/z 362 ($\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4$), mas apresentou fragmentos como $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ em m/z 344, $[\text{M}-\text{AcOH}]^+$ em m/z 302 e $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{AcOH}]^+$ em m/z 284. O índice de insaturação para Cc2, calculado a partir da fórmula molecular ($\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_3$) é igual a seis.

Figura 11. Estruturas parciais sugeridas a partir do espectro de ^1H RMN de Cc2.



De acordo com os dados obtidos no espectro de ^1H RMN e espectro de massas, a substância apresenta seis insaturações e hidrogênios correspondentes a cinco metilas (duas como dupletos e três como simpleto, sendo uma em grupamento acetóxi), um metino e quatro hidrogênios olefínicos ou ligados a átomo eletronegativo. A partir do conjunto de dados espectrais, foi realizada uma busca na base de dados MarinLit[®]. Esta base de dados foi criada nos anos 1970, pelos professores John Blunt e Murray Munro, na Universidade de Canterbury, na Nova Zelândia e possui uma compilação extremamente abrangente de dados publicados para metabólitos de origem marinha (ROYAL, 2016). A partir da busca, em que são consideradas as presenças ou ausências de determinadas características estruturais, são sugeridas uma série de hipóteses com base em metabólitos marinhos já descritos (estruturas que apresentam as características propostas na pesquisa). Para a pesquisa realizada com os dados obtidos para Cc2, foram sugeridas cerca de 30 hipóteses; os deslocamentos químicos descritos para as estruturas apontadas como possíveis, foram comparados com os valores obtidos para Cc2. O único composto que apresentou compatibilidade com os dados obtidos (Tabela 19) foi o 4 α -acetóxi-9 β ,14 α -dihidroxidolosta-1(15),7-dieno (Figura 16), um diterpeno tricíclico do tipo dolastano (GARCIA et al., 2009; GONZÁLEZ et al., 1983), que pertence ao grupo de IIB (TEIXEIRA; KELECOM, 1988; VALLIM et al., 2005).

Figura 12. Espectro de ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) de Cc2.

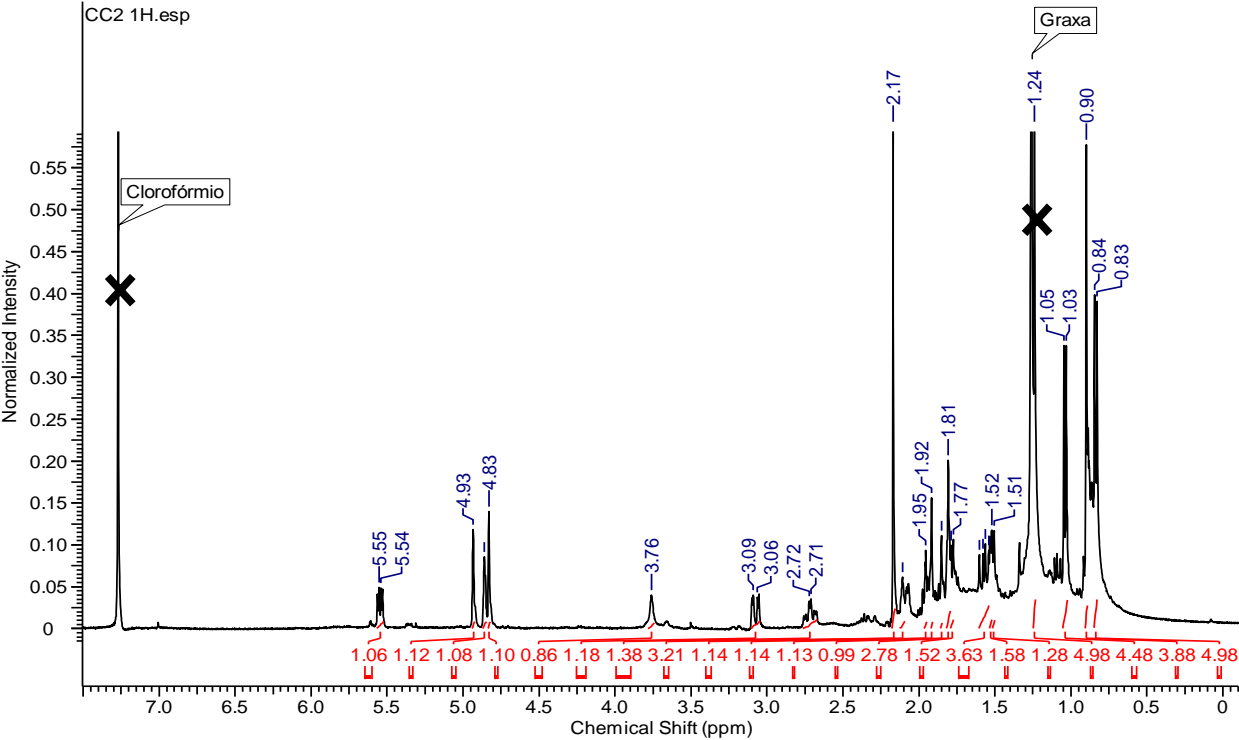


Figura 13. Detalhe ampliado do espectro de ^1H RMN (5,6-2,5 ppm) de Cc2 (400 MHz, CDCl_3).

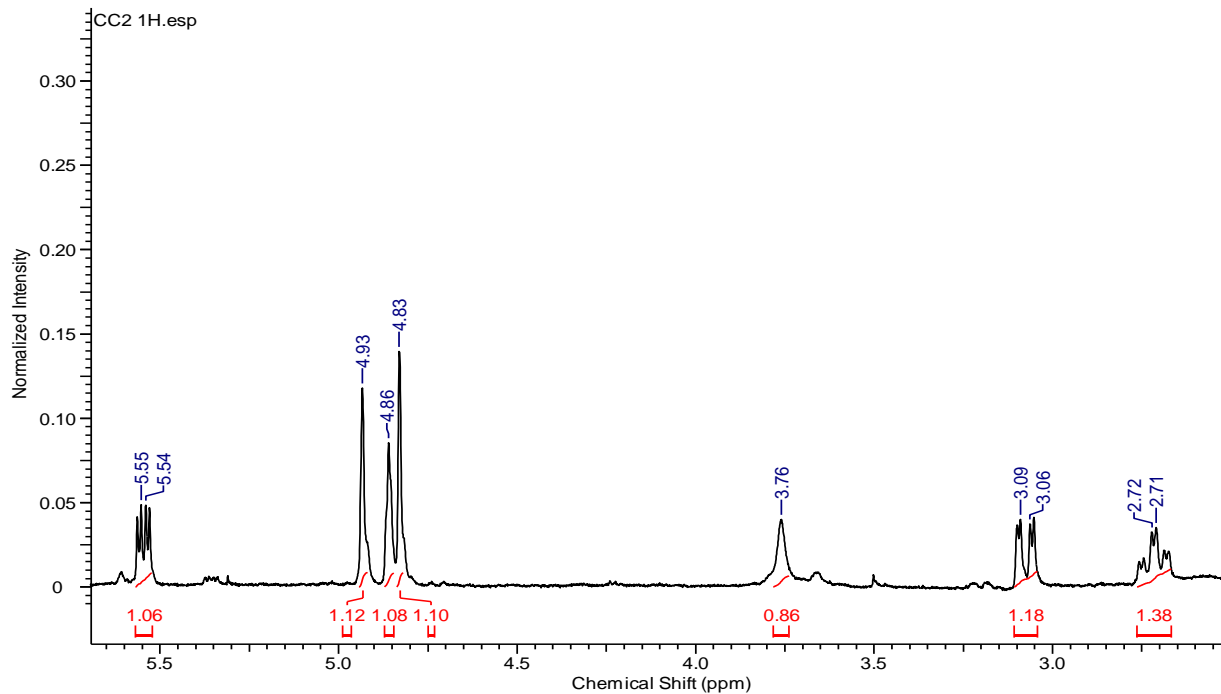


Figura 14. Detalhe ampliado do espectro de ^1H RMN (2,3-0,5 ppm) de Cc2 (400MHz, CDCl_3).

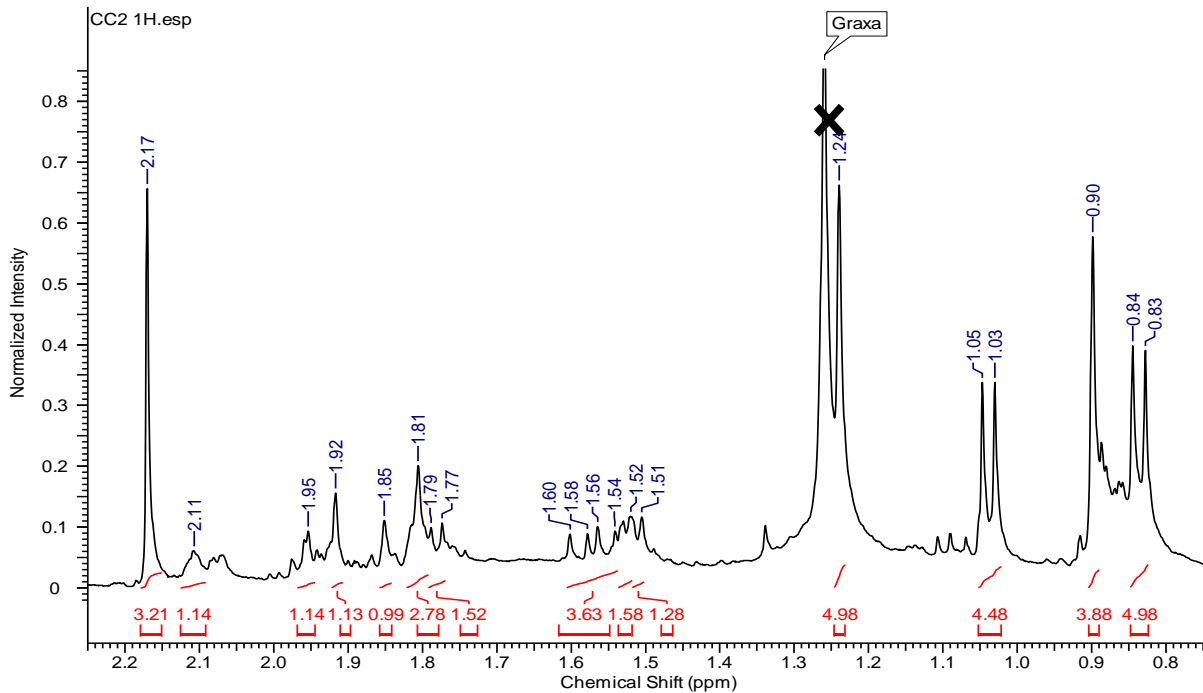


Figura 15. Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) de Cc2.

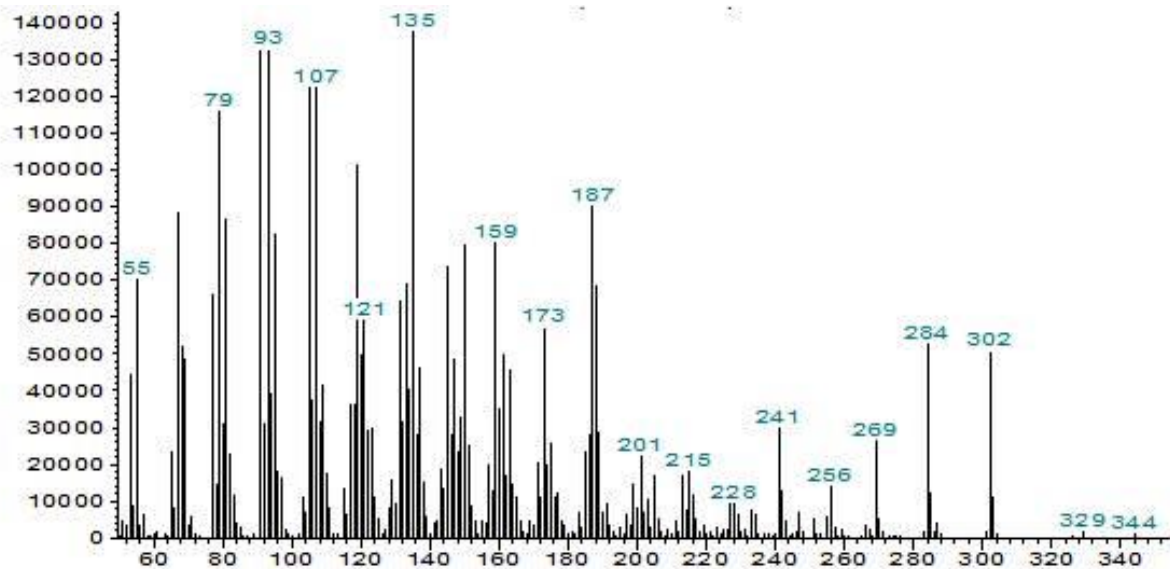
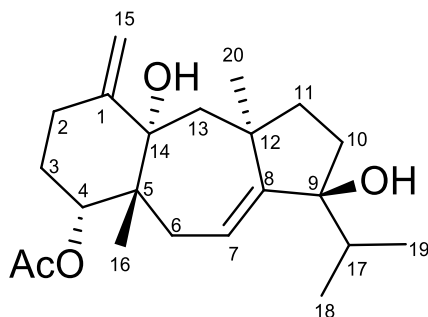


Figura 16. Estrutura proposta para a substância Cc2 (4 α -acetóxi-9 β ,14 α -dihidroxidolasta-1(15),7-dieno);



A posição do grupamento acetóxi em C4 (ao invés de C9 ou C14) é sugerida pelo deslocamento químico do hidrogênio geminal que é de 4,86 ppm, compatível com hidrogênio oxi-metínico. Na ausência do grupamento acetóxi nessa posição, o hidrogênio em C4 estaria menos desblindado, com deslocamento químico entre 3,20 e 3,80 ppm. Além disso, os hidrogênios da metila C16 (ligada a C5) possuem deslocamento químico de 0,90 ppm, sugestivo de efeito de desblindagem pela carbonila do éster (PAVIA et al., 2009).

Este diterpeno foi isolado pela primeira vez de *Dictyota linearis* (C. Agardh) Greville, [cujo nome aceito atualmente, conforme o site Algaebase, é *D. implexa* (Desfontaines) J.V. Lamouroux], coletada na Ilha de Roatan, localizada no Caribe (CREWS et al., 1982) e teve a configuração absoluta definida por González e colaboradores em 1983. De *C. cervicornis*, foi isolado pela primeira vez alguns anos mais tarde, por Teixeira e colaboradores (1986a), de uma amostra coletada no Rio de Janeiro.

Crews e colaboradores (1982) observaram que ocorre uma desidratação deste diterpeno (dieno) em CDCl_3 . Assim que foi aventada a hipótese de Cc2 corresponder a essa estrutura, a solução da amostra foi concentrada para aquisição de espectros complementares em benzeno deuterado, mas a desidratação parcial já havia ocorrido. Esse fato, apesar de colaborar com a confirmação da identidade da estrutura, impediu que outros espectros (^{13}C RMN e mapas de correlação) fossem obtidos com a amostra pura.

Tabela 19. Dados espectrais de ^1H RMN da substância Cc2 em comparação com dados da literatura para 4α -acetóxi- 9β , 14α -dihidroxiolasta-1(15),7-dieno.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz)		
	Cc2 (400 MHz, CDCl_3)	González et al. (1983) (360 MHz, CDCl_3)	Garcia et al. (2009) (300 MHz, CDCl_3)
2	2,71 (ddd, 13,1; 13,1; 5,1) 2,10 (m)	2,71 (ddd, 14,0; 5,0) n.a.	2,71 (ddd, 13,8; 13,8; 5,4) 2,10 (d, 13,8)
3	1,81 (m) 1,97 (m)	n.a. n.a.	1,80 (m) 1,97 (m)
4	4,86 (tl, 2,5)	4,85 (tl)	4,85 (t, 3,0)
6	3,07 (dd, 15,0; 4,1) 1,57 (dd 15,0; 9,5)	3,06 (dd, 15,0; 4,0) n.a.	3,07 (dd, 15,0; 4,8) 1,56 (dd, 15,0; 9,6)
7	5,55 (dd, 9,5; 4,1)	5,53 (dd, 9,5; 4,0)	5,54 (dd, 9,6; 4,8)
9-OH	3,75 (sl)	n.a.	3,75 (sl)
10	1,51 (m) 1,78 (m)	n.a. n.a.	1,50 (m) 1,77 (m)
11	1,52 (m) 1,81 (m)	n.a. n.a.	1,53 (m) 1,80 (m)
13	1,81 (sl) 1,92 (sl)	n.a. n.a.	1,82 (d, 14,4) 1,93 (d, 14,4)
14-OH	n.a.	3,73 (d, 2,4)	n.a.
15	4,82 (sl) 4,92 (sl)	4,82 (sl) 4,92 (sl)	4,82 (s) 4,93 (sl)
16	0,90 (s)	0,89 (s)	0,89 (s)
17	1,95 (m)	1,95 (qq, 6,8; 6,8)	1,95 (qq, 6,9; 6,6)
18	0,84 (d, 6,8)	0,83 (d, 6,8)	0,83 (d, 6,9)
19	1,04 (d, 6,8)	1,03 (d, 6,8)	1,03 (d, 6,9)
20	1,24 (s)	1,23 (s)	1,24 (s)
O-Ac	2,17 (s)	2,15 (s)	2,16 (s)

n.a.: não atribuído.

Para o composto com a estrutura proposta para Cc2, 4α -acetóxi- 9β , 14α -dihidroxiolasta-1(15),7-dieno, foram relatadas atividades anticoagulante e antiplaquetária (MOURA et al., 2011a); antiprotozoária frente a *Leishmania amazonensis* (SANTOS et al., 2011); inibição da hemólise e neutralização da coagulação, hemorragia e proteólise causada pelo veneno da serpente *Lachesis muta* (MOURA et al., 2011b); além de inibição da Na^+K^+ -ATPase de mamíferos (GARCIA et al., 2009).

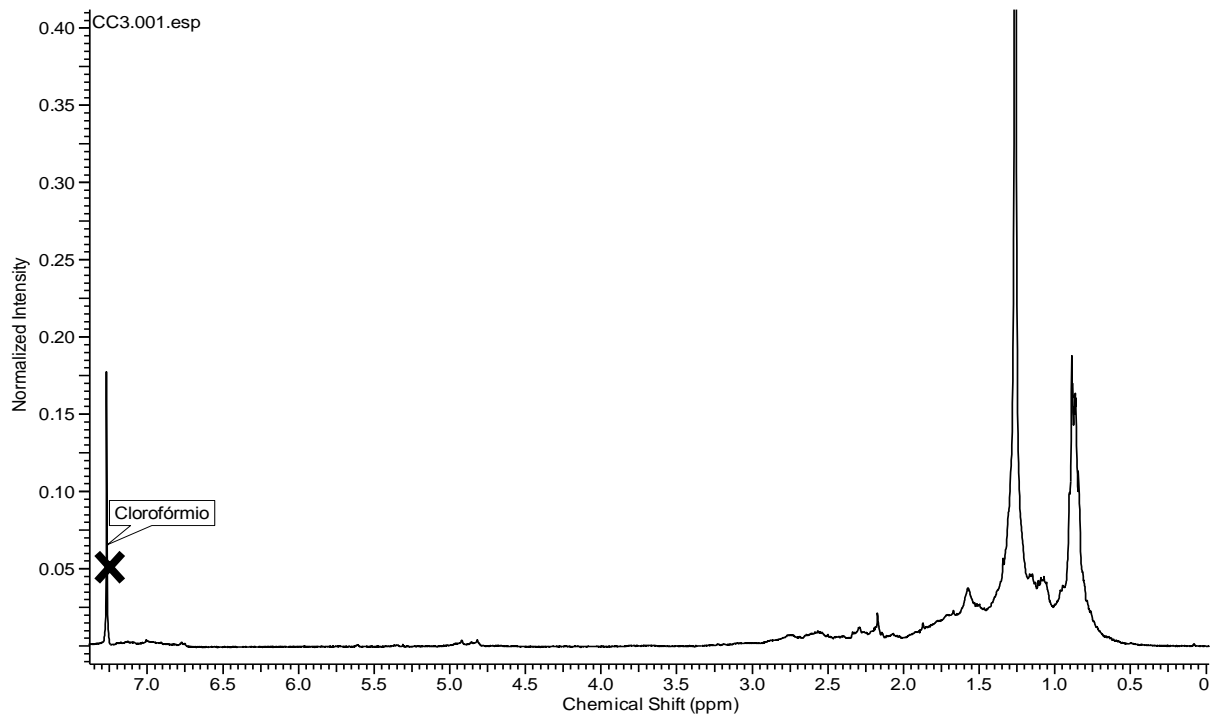
As atividades ecológicas relatadas para o dieno são: anti-herbivoria contra a espécie de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (BIANCO et al., 2010) atividade repelente contra *Tetranychus urticae* (BORN et al., 2012) e anti-incrustante frente ao mexilhão *Perna perna* (BIANCO et al., 2009).

4.3.1.3 Substância Cc3

Cc3 foi obtida como um óleo de coloração amarelada da fração CE5 (Coluna E), com rendimento de 5,8 mg. Apresenta-se na CCD em Hex/AcOEt (8:2) como uma mancha em Rf 0,65; após revelação com anisaldeído sulfúrico adquire coloração roxa de imediato, ficando marrom após algum tempo. A substância não apresenta extinção de fluorescência em 254 nm e não apresenta fluorescência em 366 nm.

O espectro de ^1H RMN (Figura 17) sugeriu tratar-se de um hidrocarboneto ou ácido graxo, motivo pelo qual não foram obtidos outros espectros (^{13}C RMN, mapas de correlação e massas).

Figura 17. Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) de Cc3.



4.3.1.4 Substância Cc4

A substância Cc4 foi obtida como um óleo de coloração amarelado das frações CE14A (CLAE 2) e CE15A2 (CLAE 1), com rendimento total de 0,9 mg. Apresenta-se na CCD em Hex/AcOEt (9:1) como uma mancha em Rf 0,25; após revelação com anisaldeído sulfúrico adquire coloração roxa de imediato, ficando marrom após algum tempo. A substância apresenta extinção de fluorescência em 254 nm, mas não apresenta fluorescência em 366 nm.

Já à primeira vista, o espectro de ^1H RMN em benzeno- d_6 (Figura 18 e 19 e dados descritos na Tabela 20), sugeriu que Cc4 teria uma estrutura bastante semelhante a Cc2. A principal diferença entre os compostos obtidos está no número de sinais desblindados característicos de hidrogênios olefínicos (sinais entre 4,5 e 6,5 ppm) ou geminais a átomo eletronegativo (sinais entre 2,7 a 4,8 ppm) (PAVIA et al., 2009), sendo que Cc4 apresenta cinco sinais, enquanto Cc2 apresenta quatro sinais. Entre os sinais desblindados, são observados quatro simpletos largos em 5,56, 4,89, 4,81 e 4,75 ppm, além de um duplo duplete em 5,35 ppm ($J = 9,5; 4,5$ Hz). O desdobramento do último sinal sugere a presença de um hidrogênio olefínico com acoplamento vicinal a hidrogênios metilênicos não equivalentes. Outros sinais observados no espectro de ^1H RMN, são os dupletos em 1,02 ppm e 1,07 ppm, que integram para 3H, com valor de $J = 6,8$ Hz. A integração indica que se tratam de hidrogênios de duas metilas e o desdobramento, que possuem acoplamento vicinal com um hidrogênio metínico. Em 0,80 ppm e 1,31 ppm, são observados simpletos integrando para 3H, característicos de hidrogênios de metilas que não possuem acoplamento vicinal. Um simpleto em 2,14 ppm integrando para 3H sugere a presença de uma metila de grupamento acetóxi. Em 2,42 ppm tem-se um multiplete integrando para 1H, sugestivo de metino com acoplamento vicinal.

De acordo com os dados obtidos, a substância apresenta cinco metilas (dois como duplete e três como simpleto, sendo uma de grupamento acetóxi), um metino, dois hidrogênios olefínicos e três hidrogênios que podem ser olefínicos ou geminais a átomo eletronegativo. A partir do conjunto de dados espectrais e da observação das semelhanças com Cc2, foi realizada uma busca na base de dados MarinLit[®] e, entre as hipóteses apresentadas, a substância que apresentou maior compatibilidade com os dados obtidos foi o 4 α -acetóxi-14 α -hidroxidolasta-1(15),7,9-trieno (Figura 20), um diterpeno tricíclico do tipo dolastano (Tabela 20), que se trata justamente da forma desidratada do composto Cc2 (CREWS et al., 1982; SUN et al., 1981).

Figura 18. Espectro de ^1H RMN (400 MHz, benzeno- d_6) de Cc4.

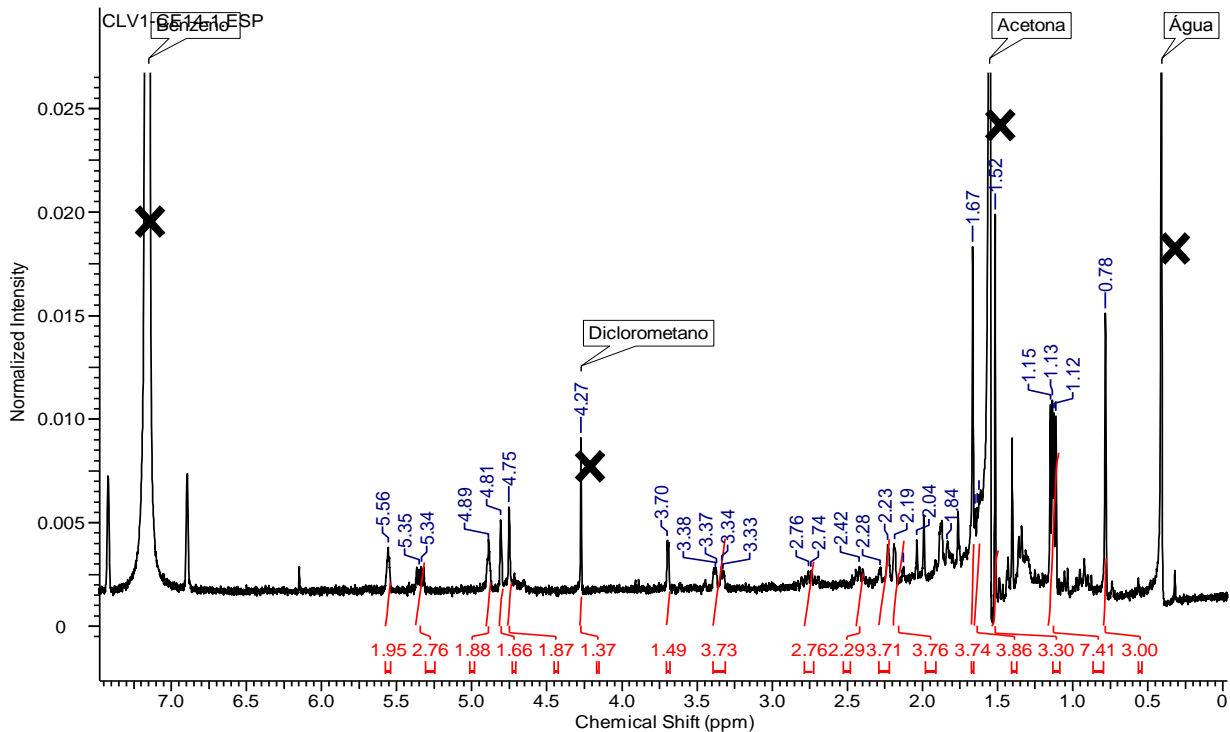


Figura 19. Detalhe ampliado do espectro de ^1H RMN (3,2-5,7 ppm) de Cc4 (400 MHz, benzeno- d_6).

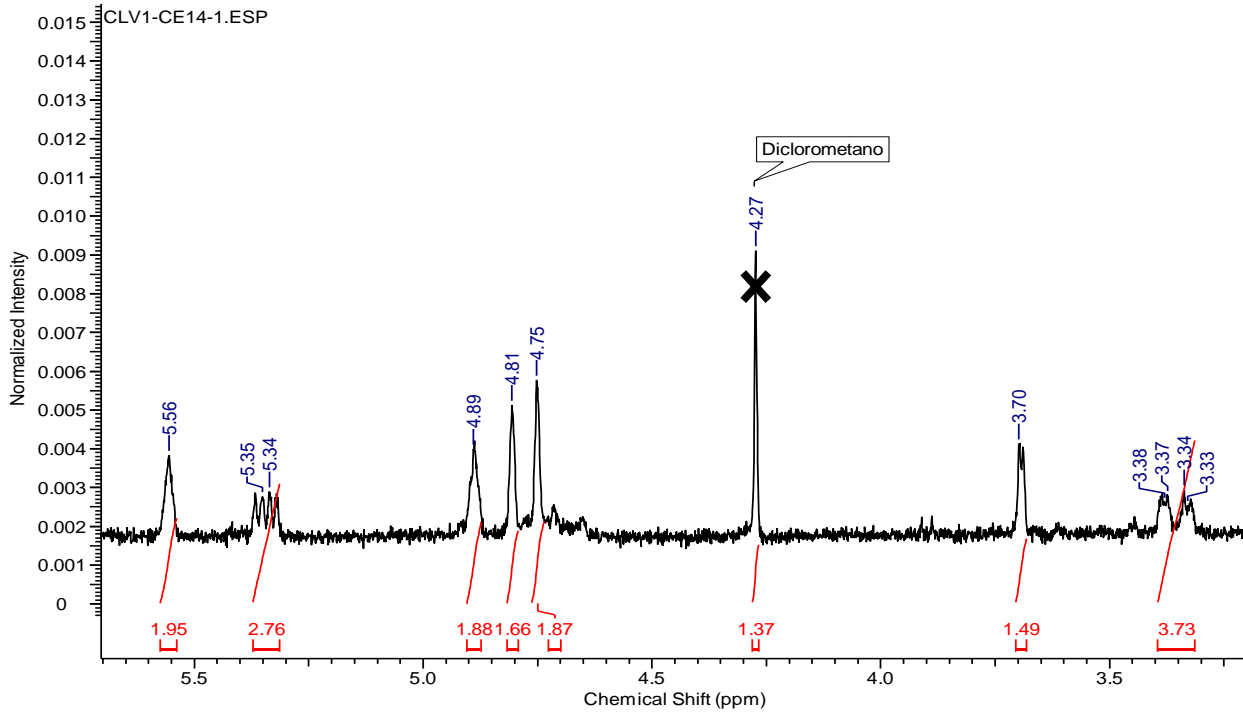
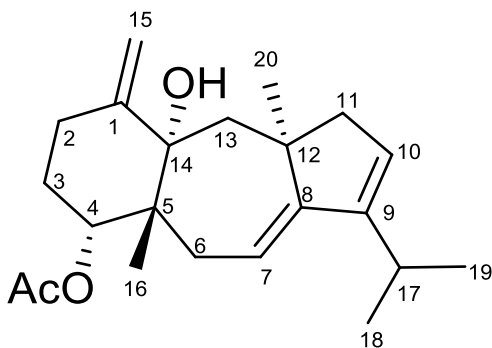


Figura 20. Estrutura proposta para a substância Cc4 (4 α -acetóxi-14 α -hidroxidolasta-1(15),7,9-trieno).



Crews e colaboradores (1982) descrevem detalhes de dados experimentais, que ajudaram a confirmar que Cc4 se trata da forma desidratada de Cc2. Entre as características observadas destacam-se a presença de quatro sinais olefínicos no espectro de ^1H RMN de Cc2 e de cinco sinais no espectro de Cc4, como descrito anteriormente. Além disso, eles destacam a diferença de deslocamentos químicos entre as metilas das posições 18 e 19, que para Cc2 é de $\Delta\delta$ 0,20, enquanto que para Cc4 é de apenas $\Delta\delta$ 0,02 (relacionada à presença de uma hidroxila na posição C9 de Cc2). A fácil desidratação que ocorre de Cc2, como descrito na seção 4.3.1.2, levou à suspeita de que Cc4 se tratava de um artefato. No entanto, Crews e colaboradores (1982), observaram sinais característicos de Cc4 no espectro de ^1H RMN do extrato bruto de uma amostra de *D. divaricata*, fato este que os levou a confirmar que a substância se trata de um produto natural obtido da alga.

No espectro de massas obtido para Cc4 (Figura 21) foi observado o pico do íon molecular $[\text{M}]^+$ em m/z 344 ($\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_3$), bem como os fragmentos $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ em m/z 326, $[\text{M}-\text{AcOH}]^+$ em m/z 284 e $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{AcOH}]^+$ em m/z 266, estando de acordo com o apresentado na literatura (SUN et al., 1981).

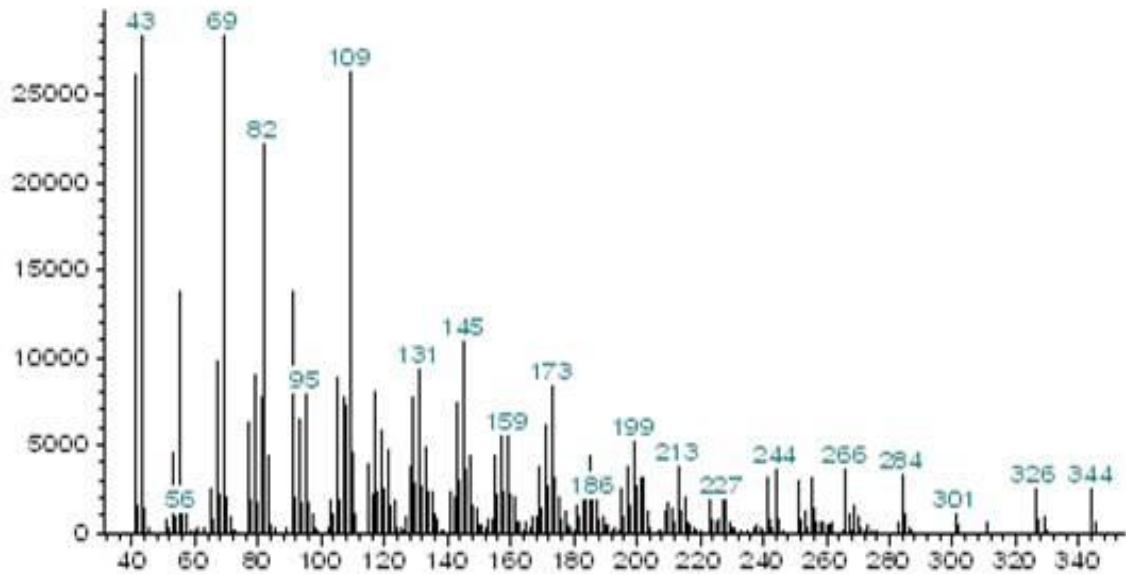
Tabela 20. Dados espectrais de ^1H RMN da substância Cc4 obtidos em comparação com a literatura para 4 α -acetóxi-14 α -hidroxidolasta-1(15),7,9-trieno

Posição	δ_{H} (mult., J Hz)	
	Cc4 (400 MHz, Benzeno- d_6)	Crews et al. (1982) (360 MHz, Benzeno- d_6)
2	2,75 (m)	2,74 (dt, 13; 6,3)
	1,63 (m)	1,64 (dd, 13; 3,8; 3,4)
3	n.a.	n.a.
4	4,89 (sl)	4,88 (t, 3)
6	3,35 (dd, 14,6; 4,5)	3,34 (dd, 15,3; 4,2)
7	5,34 (dd, 9,3; 4,5)	5,34 (dd, 9,2; 4,2)
10	5,56 (sl)	5,55 (tl, 4)
11	2,25 (dl, 15,2)	2,24 (dl, 16,7)
	2,17 (dl, 15,2)	2,16 (dl, 16,7)
13	2,04 (sl)	2,04 (d 14,4)
	1,84 (sl)	1,84 (d, 14,4)
15	4,81 (sl)	4,80 (sl)
	4,75 (sl)	4,74 (sl)
16	0,78 (s)	0,78 (s)
17	2,42 (m)	2,41 (s, 7,2)
18	1,14 (d, 7,0)	1,14 (d, 7,2)
19	1,12 (d, 7,0)	1,12 (d, 7,2)
20	1,52 (s)	1,51 (s)
C ₁₄ OH	3,70 (s)	3,70 (s)
O-Ac	1,67 (s)	1,66 (s)

n.a.: não atribuído.

O diterpeno correspondente a Cc4 foi isolado pela primeira vez de *Dictyota divaricata* J.V. Lamouroux [cujo o nome aceite atualmente, conforme o site Algaebase é *D. implexa* (Desfontaines) J.V. Lamouroux], de uma amostra coletada nas Ilhas Virgens, no Caribe (SUN et al., 1981) e teve a configuração absoluta definida por González e colaboradores em 1983. De *C. cervicornis* foi isolado pela primeira vez por Teixeira e colaboradores (1986a). Um único estudo de atividade biológica (papel ecológico) foi relatado para a substância, que demonstrou potencial anti-herbivoria contra o ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (BIANCO et al., 2010).

Figura 21. Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) de Cc4.



As demais 11 substâncias isoladas de *C. cervicornis* durante o presente projeto, para as quais espectros ainda estão sendo obtidos para a identificação, correspondem a compostos sólidos amorfos ou oleosos, sem fluorescência em 366 nm e sem extinção de fluorescência em 254 nm, com exceção de Cc14 que estingue fluorescência em 254 nm; esta substância também se diferencia das demais ainda não identificadas, pela cor em CCD apresentada após revelação com anisaldeído sulfúrico, apresentando coloração azulada, assim como Cc12, enquanto as demais apresentam cor roxa. A julgar pelo espectro de ^1H RMN, a substância Cc14 pode tratar-se de um diterpeno ainda não reportado para *C. cervicornis*.

4.3.2 *Dictyota mertensii* (D5)

O fracionamento do extrato bruto de *D. mertensii* (D5) que levou ao isolamento de substâncias foi realizado através de uma CLV, quatro CCA em sílica gel, duas EFS e sete CLAE (Figura 9). As frações utilizadas nos procedimentos de fracionamento foram selecionadas por apresentarem perfil cromatográfico e rendimento promissores.

A partir do fracionamento do extrato bruto de *D. mertensii* foram isoladas 11 substâncias (Tabela 21), denominadas Dm1 a Dm11.

Tabela 21. Compostos isolados do extrato de *D. mertensii*.

Substância	Identificação	Quantidade (mg)
Dm1	ftalato de dipentila	1,8
Dm2	Acetato de dictyol B	2,8
Dm3	10-acetóxi-18-hidroxi-2,7-dieno	8,1
Dm4	Ésterioide	2,0
Dm5	Adipato de bis(2-(2-butoxi)etila)	2,8
Dm6 - Dm11	N.I.	0,8 - 2,2

N.I. = Não identificado (amostras encaminhadas à UFF, espectros ainda não recebidos).

4.3.2.1 Substância Dm1

A substância Dm1 foi obtida como um óleo grumoso transparente da fração CA2 (Coluna A), com rendimento de 1,8 mg. Apresenta-se na CCD em cHex/AcOEt (75:25) como uma mancha em Rf 0,7; apresenta extinção de fluorescência em 254 nm e não apresenta fluorescência em

366 nm. Após revelação com anisaldeído sulfúrico adquire cor roxa, tornando-se rosada com o tempo.

À primeira vista, o espectro de ^1H RMN em CDCl_3 (Figura 22 e dados descritos na Tabela 22), apresenta em 0,93 ppm um tripleto ($J = 7,2$ Hz) integrando para 3H, sugestivo de hidrogênios de metila com acoplamento vicinal com hidrogênios metilênicos. Os multipletos em 1,32, 1,42 e 1,69 ppm que integram pra 2H, são sugestivos de hidrogênios metilênicos. Um multipletos em 4,23 ppm integrando para 2H, sugere hidrogênios vicinais a átomo eletronegativo. Na região mais desblindada do espectro, observam-se dois duplo dupletos, 7,54 e 7,71 ppm, sugestivos de hidrogênios aromáticos com constantes de acoplamento de 5,8 e 3,4 Hz que sugerem acoplamento em *orto* e *meta*, respectivamente (PAVIA et al., 2005).

De acordo com os dados espectrais, a substância apresentaria um anel aromático, com cadeia lateral contendo quatro metilenos, sendo um metileno ligado a átomo eletronegativo e uma metila. Entretanto, o número de hidrogênios aromáticos, bem como o número de metilas, sugerem tratar-se de uma estrutura simétrica dissubstituída, com dois carbonos quaternários e quatro metinos (dd, 7,54 ppm e 7,71 ppm). Dessa forma, procedeu-se a integração dos sinais considerando que cada um deles deveria integrar para o dobro de hidrogênios que as integrações obtidas primeiramente. O espectro mostrou-se bastante semelhante ao de ftalatos, com sinais bem característicos em 7,71 e 7,54 ppm e, portanto, procedeu-se a comparação com dados espectrais de literatura. A substância que apresentou compatibilidade com os dados obtidos foi o ftalato de dipentila (Figura 23 e dados da Tabela 22) (YAMAJI, et al., 2016).

Figura 22. Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) de Dm1.

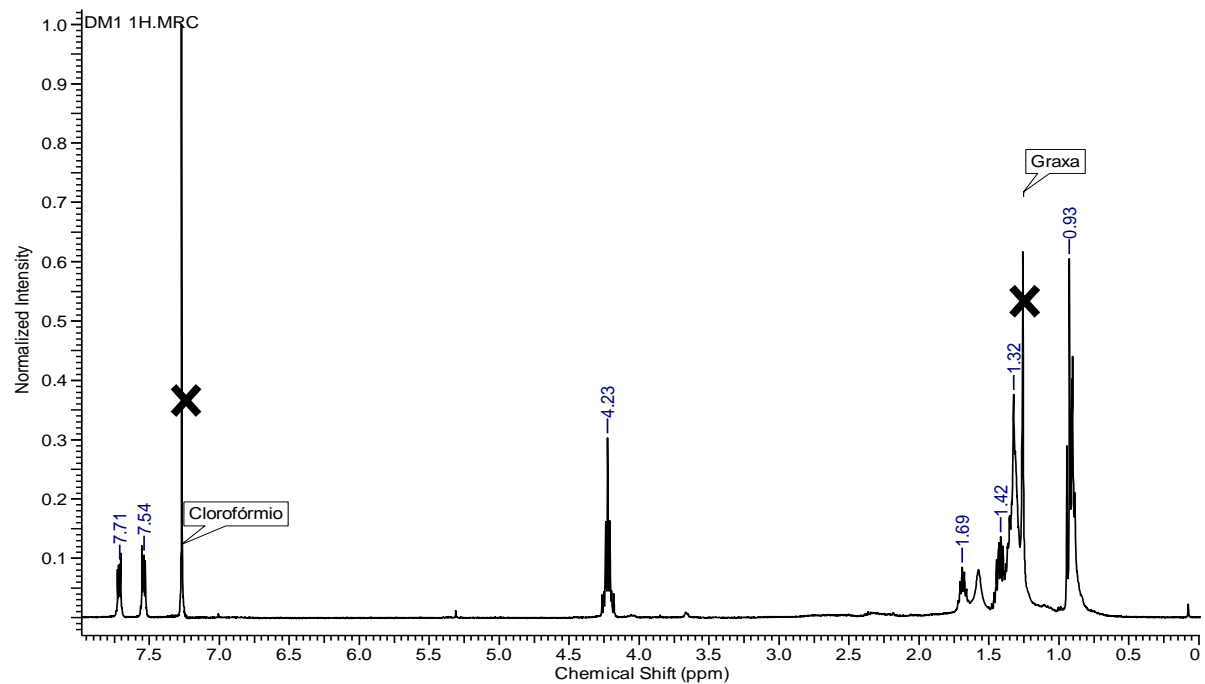


Figura 23. Estrutura da substância Dm1 (ftalato de dipentila).

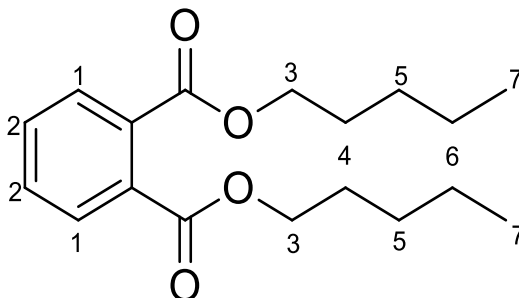


Tabela 22. Dados espectrais de ^1H RMN da substância Dm1 obtidos em comparação com a literatura para ftalato de dipentila.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz)	
	Dm1 (400 MHz, CDCl_3)	Yamaji et al. (2016) (90 MHz, CDCl_3)
1	7,71 (dd, 5,8; 3,4)	7,70
2	7,54 (dd, 5,8; 3,4)	7,53
3	4,23 (sp, 10,9; 5,8)	4,29
4	1,69 (m)	1,74
5	1,42 (m)	1,38
6	1,32 (m)	1,38
7	0,93 (t 7,17)	0,93

Ainda há polêmica quanto à origem de ftalatos em produtos naturais, se resultariam de produtos de contaminação adquiridos durante a extração ou o fracionamento ou encontram-se acumulados no organismo devido a uma contaminação da água do mar. Alguns autores sustentam a hipótese da ocorrência natural de ftalatos em organismos marinhos (CHEN, 2004; GRESSLER et al., 2010; NAMIKOSHI, 2006). Ftalato de dipentila foi relatado como produto natural em 1967 por Hayashi e colaboradores, que o isolaram da planta *Cryptotaenia canadensis*, da família Apiaceae.

4.3.2.2 Substância Dm2

Dm2 foi obtida como sólido branco da fração CC5A2 (CLAE 1), com rendimento de 2,8 mg. Apresenta-se na CCD em cHex/AcOEt (9:1) como uma mancha em R_f 0,25. A substância não apresenta fluorescência

própria em 366 nm e não extingue fluorescência em 254 nm; após revelação com anisaldeído sulfúrico adquire cor roxa, tornando-se marrom com o tempo.

O espectro de ^1H RMN em CDCl_3 (Figuras 24 e 25 e dados descritos na Tabela 23), apresenta em 1,03 ppm ($J = 6,3$ Hz) um duplete integrando para 3H, sugestivo de hidrogênios de metila em acoplamento vicinal com hidrogênio metínico. Em 1,62, 1,69 e 1,80 ppm, são observados simpletos integrando para 3H, característicos de hidrogênios de metilas sem acoplamento vicinal. Um simpleto em 2,16 ppm integrando para 3H, sugere que há uma metila de grupamento acetóxi. Na região mais desblindada do espectro há um multiplete em 3,93 ppm integrando pra 1H, sugestivo de hidrogênio geminal a átomo eletronegativo. Três simpletos largos em 4,94, 4,99 e 5,35 ppm e dois multipletos em 5,12 e 5,17 ppm, cada um integrando para 1H, são sugestivos de hidrogênios olefínicos ou geminais a átomo eletronegativo (PAVIA et al., 2009).

De acordo com os dados espectrais obtidos, a substância apresenta cinco metilas (um duplete e quatro simpletos, sendo um de grupamento acetóxi) e seis hidrogênios olefínicos ou geminais a átomo eletronegativo.

O espectro de massas obtido para Dm2 (Figura 26) apresentou o pico do íon molecular $[\text{M}]^+$ em m/z 346 ($\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_3$). Adicionalmente pode-se observar os fragmentos $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ em m/z 328, $[\text{M}-\text{AcOH}]^+$ em m/z 286 e $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{AcOH}]^+$ em m/z 268. O índice de insaturação para Dm3, calculado a partir da fórmula molecular ($\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_3$), foi de seis.

Figura 24. Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) de Dm2.

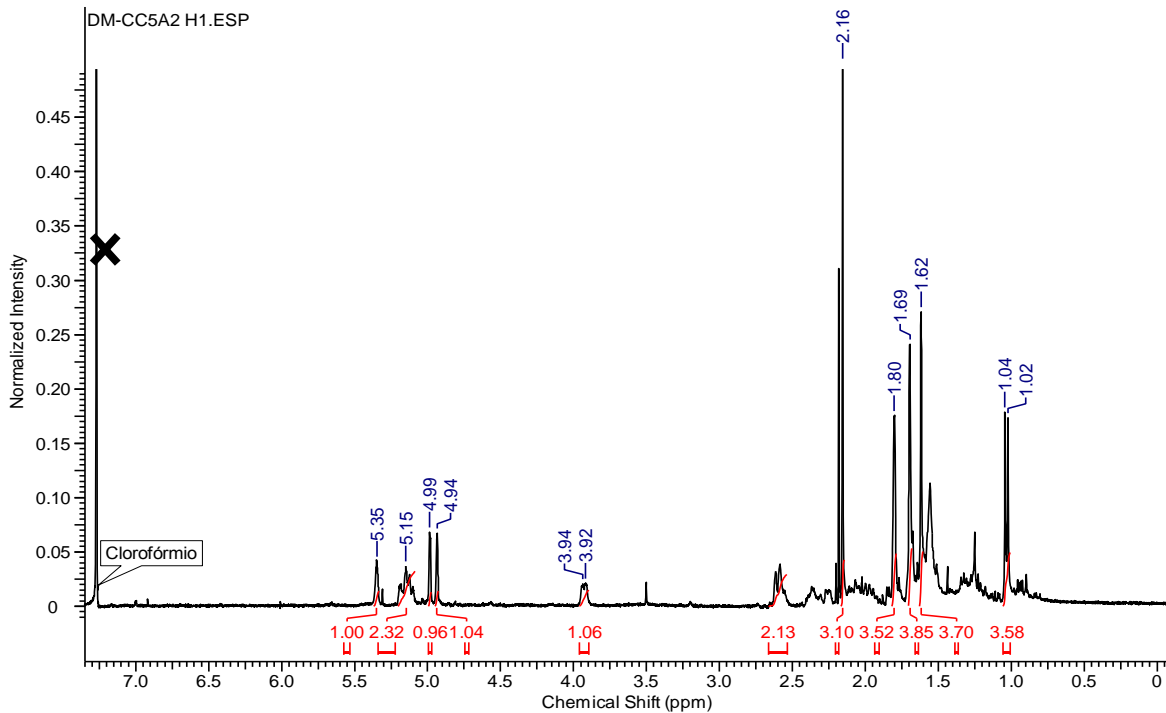


Figura 25. Detalhe ampliado do espectro de ^1H RMN (3,9-5,5 ppm) de Dm2 (400 MHz, CDCl_3).

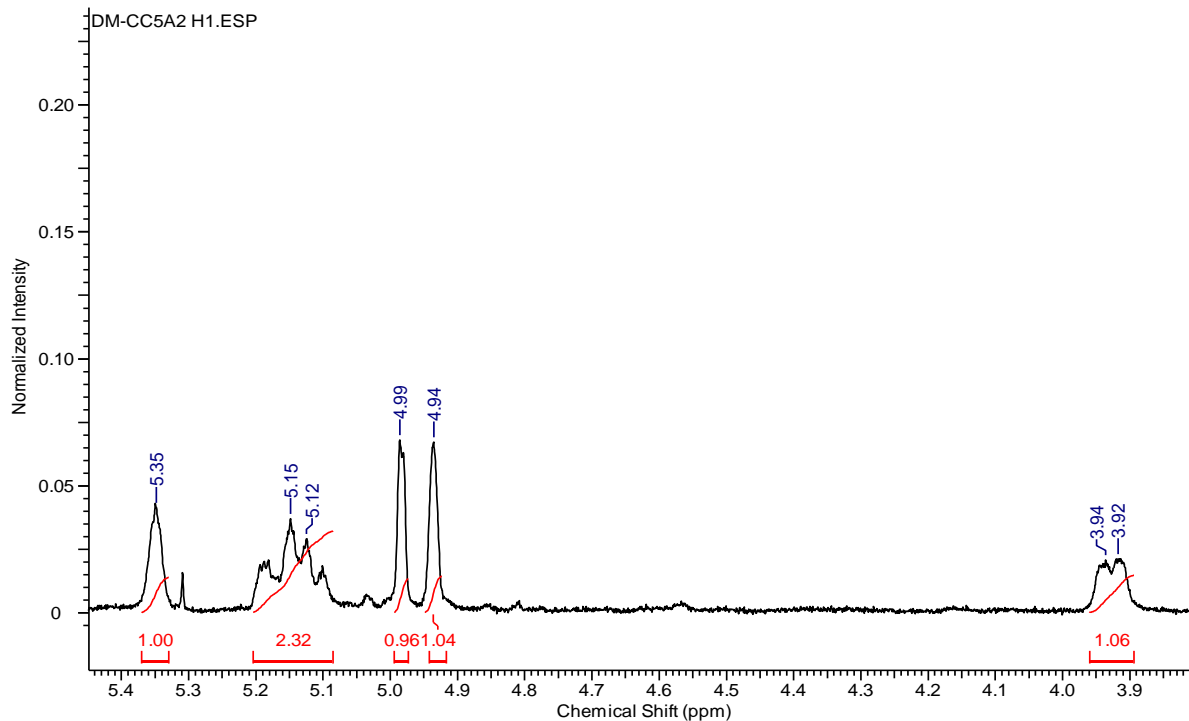
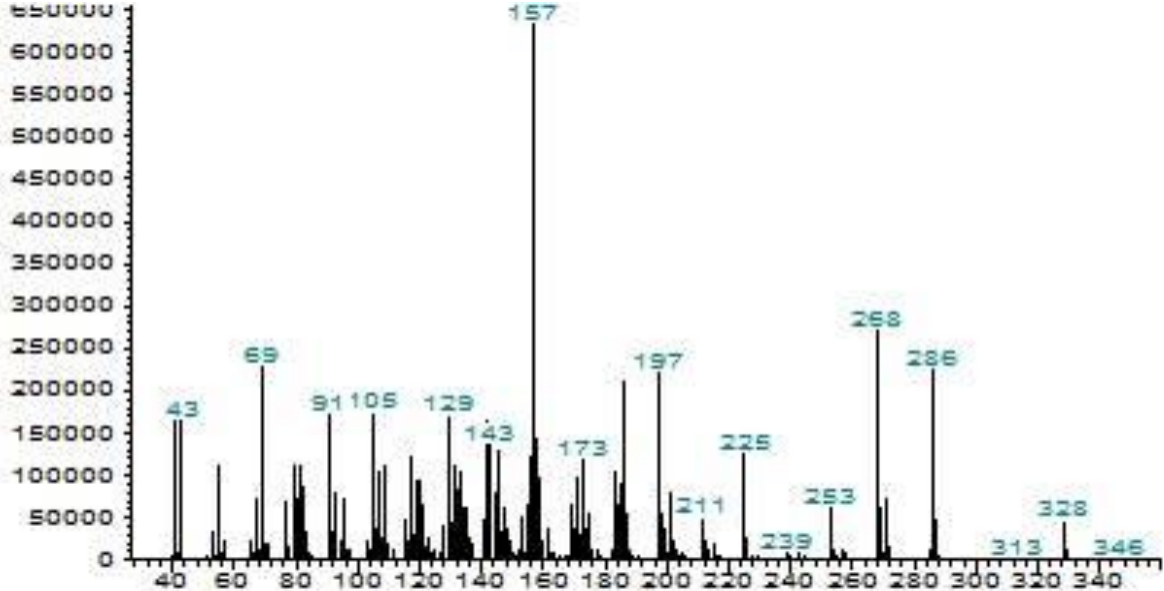
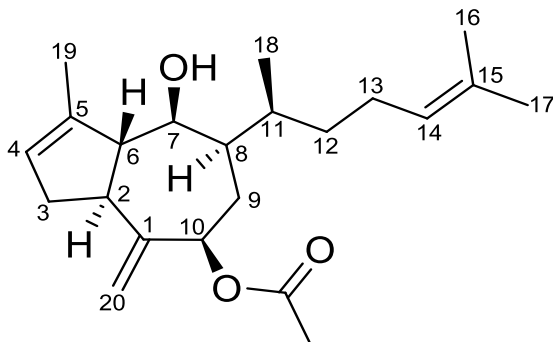


Figura 26. Espectro de massas de baixa resolução (IE, 70 eV) de Dm2.



A partir do conjunto de dados espectrais foi realizada uma busca na base de dados MarinLit[®] e das hipóteses apresentadas a única substância que apresentou compatibilidade com os dados obtidos foi o acetato de dictyol B (Figura 27 e dados descritos na Tabela 23), um diterpeno bicíclico do tipo guaiano prenilado (FAULKNER et al., 1977).

Figura 27. Estrutura proposta para a substância Dm2 (acetato de dictyol B).



Faulkner e colaboradores (1977) não estabeleceram as atribuições de sinais para todos os hidrogênios, no entanto, o espectro de ¹H RMN de Dm2 apresentou sinais com os mesmos deslocamentos químicos descritos pelos autores. Na tentativa de estabelecer as posições dos hidrogênios, foram adquiridos espectros adicionais, no entanto, provavelmente devido à pequena quantidade isolada, os espectros não se apresentaram com resolução adequada para análise. Dessa forma, o reisolamento da substância é necessário para que melhores espectros sejam adquiridos.

Tabela 23. Dados espectrais de ^1H RMN para hidrogênios alifáticos da substância Dm2 em comparação com os dados descritos na literatura para acetato de dictyol B.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz)	
	Dm2 (400 MHz, CDCl_3)	Faulkner et al. (1977) (100 MHz, CDCl_3)
2	n.a.	n.a.
3	n.a.	n.a.
4	5,35 (sl)*	5,35 (sl)*
6	n.a.	n.a.
7	3,93 (dd, 6,9; 2,5)	3,95 (m)
9	n.a.	n.a.
10	5,17 (m)	5,16 (t, 7)
11	n.a.	n.a.
12	n.a.	n.a.
13	n.a.	n.a.
14	5,12 (m)*	5,12 (t, 7)*
16	1,62 (s)	1,63 (s)
17	1,69 (s)	1,71 (s)
18	1,03 (s)	1,03 (d, 7)
19	1,80 (s)	1,81 (s)
20	4,94 (sl)	4,94 (sl)
	4,99 (sl)	5,00 (sl)
OCOCH₃	2,16 (s)	2,16 (s)

*sinais intercambiáveis uma vez que não foram atribuídos na literatura.

A impossibilidade de adquirir espectros adicionais impediram atribuição.

n.a.: não atribuído.

Acetato de dictyol B foi isolado a primeira vez de *D. dichotoma* var. *implexa* (Huds.) Lamouroux por Faulkner e colaboradores em 1977 e foi reisolado da mesma espécie alguns anos depois (ROSA, et al., 1986). De *D. mertensii*, foi isolado pela primeira vez em de 2007 por Freitas e colaboradores. Outras espécies das quais o diterpeno foi isolado são *D. ciliolata* (CRONIN; HAY, 1996) e *D. menstrualis* (CRONIN et al., 1995).

Estudos demonstram que o metabólito possui atividade anti-alimentar contra o ouriço-do-mar *Arbacia punctulata*, o peixe *Lagodon rhomboides* e os anfípodas *Gammarus mucronatus*, *Amphitoe valida* e *Ampithoe longimana* (CRONIN; HAY, 1996; DUFFY; HAY, 1994); e toxicidade para a cianobactéria *Oscillatoria peromata* (NAGLE et al., 2009).

Acetato de dictyol B apresenta ainda atividades com potencial farmacológico, como atividade antiproliferativa sobre as células MCF-7

(células de câncer de mama) e SiHA (células de carcinoma cervical imortalizadas por HPV-16) (CAAMAL-FLUENTES et al., 2014).

4.3.2.3 Substância Dm3

Dm3 foi obtida como um óleo amarelado das frações CC10C (CLAE 2) e CC9C (CLAE 3), com rendimento total de 8,1 mg. Apresenta-se na CCD em cHex/AcOEt (9:1) em Rf 0,25; após revelação (anisaldeído sulfúrico) adquire cor roxa. A substância não apresenta extinção de fluorescência em 254 nm, nem fluorescência em 366 nm.

O espectro de massas de Dm3 (Figura 28), apresenta o pico do íon molecular $[M]^+$ em m/z 348 ($C_{22}H_{36}O_3$). Adicionalmente observam-se os fragmentos $[M-H_2O]^+$ em m/z 330, $[M-AcOH]^+$ em m/z 288 e $[M-H_2O-AcOH]^+$ em m/z 270. O índice de instauração para Dm3, calculado a partir da fórmula molecular ($C_{22}H_{36}O_3$), foi de cinco insaturações.

O espectro de 1H RMN em $CDCl_3$ (Figuras 29 e 30 e dados descritos na Tabela 24), apresenta simpletos integrando para 3H (sugestivos de hidrogênios de metilas sem acoplamento vicinal) em 0,88, 1,19, 1,27 e 1,65 ppm. Em 0,96 ppm há um duplete, com integração para 3H ($J = 6,9$ Hz), sugerindo uma metila cujos hidrogênios apresentam acoplamento vicinal com hidrogênio metínico. Um simpleto em 2,08 ppm, também integrando para 3H, sugere a presença de uma metila de grupamento acetóxi, confirmado pelo sinal em 169,1 ppm no espectro de ^{13}C RMN (Figura 32), região característica de carbono de carbonila de éster (PAVIA et al., 2009). Entre 1,4 e 2,37 ppm, ressonam sinais correspondentes a metilenos e metinos saturados. Na região mais desblindada observam-se sinais em 4,82 (ddd, $J = 2,2; 2,7; 10,9$ Hz), 5,12 (tl, $J = 7,0$ Hz), 5,07 (d, $J = 15,8$ Hz) e 5,25 ppm (dd, $J = 15,8; 7,4$ Hz), todos integrando para 1H, com deslocamentos químicos sugestivos de hidrogênios olefínicos ou geminais a átomo eletronegativo. As constantes de acoplamento de 15,8 Hz dos sinais em 5,09 e 5,24 ppm caracterizam sistema *trans* olefínico (Figura 31) (PAVIA et al., 2009) que corresponde a uma das cinco insaturações calculadas a partir da fórmula molecular.

Figura 28. Espectro de massas (IE, 70 eV) de Dm3.

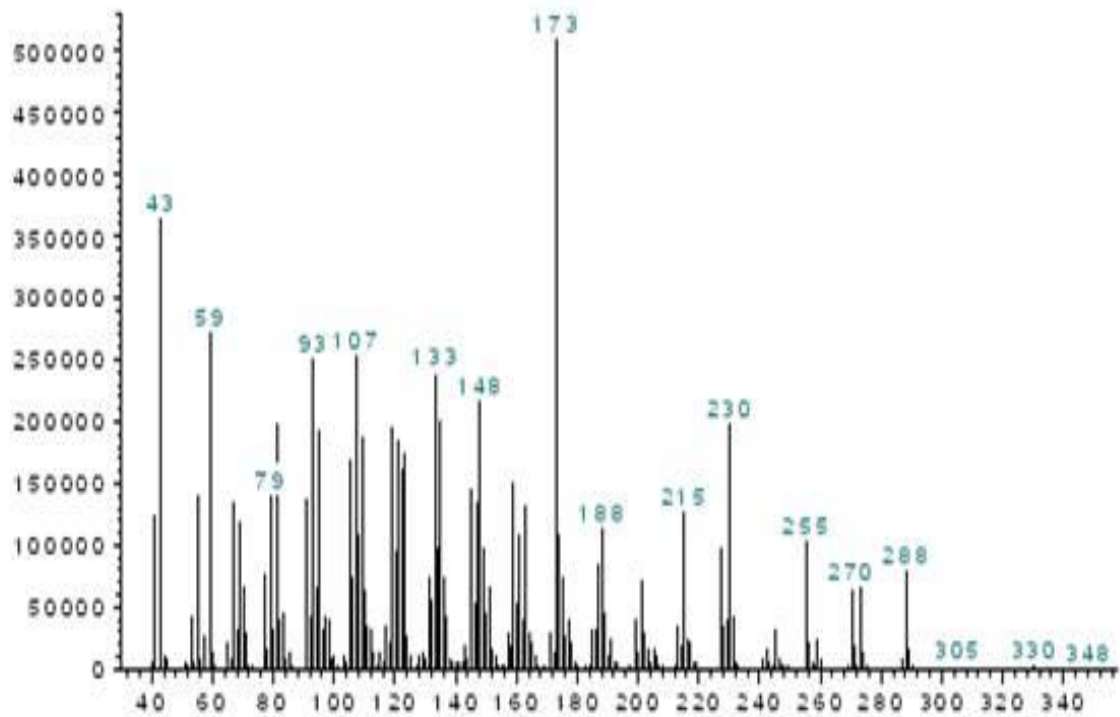


Figura 29. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) de Dm3.

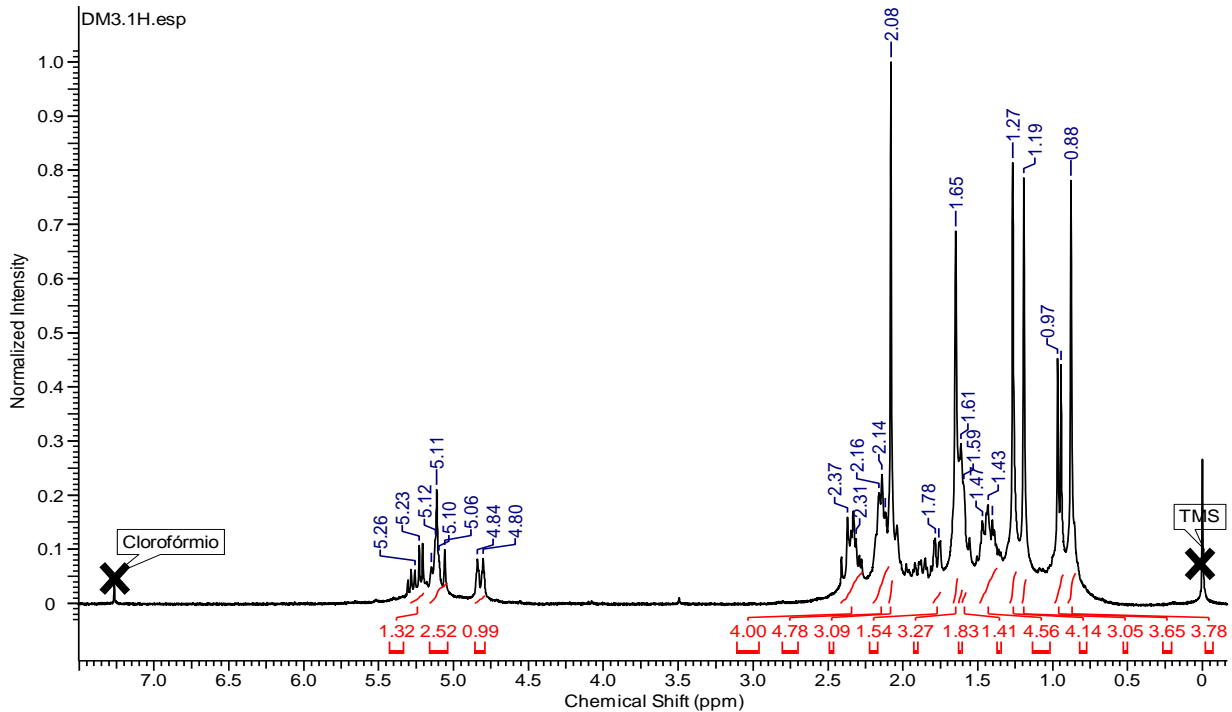


Figura 30. Detalhe ampliado do espectro de ^1H RMN (4,5-5,5 ppm) de Dm3 (300 MHz, CDCl_3).

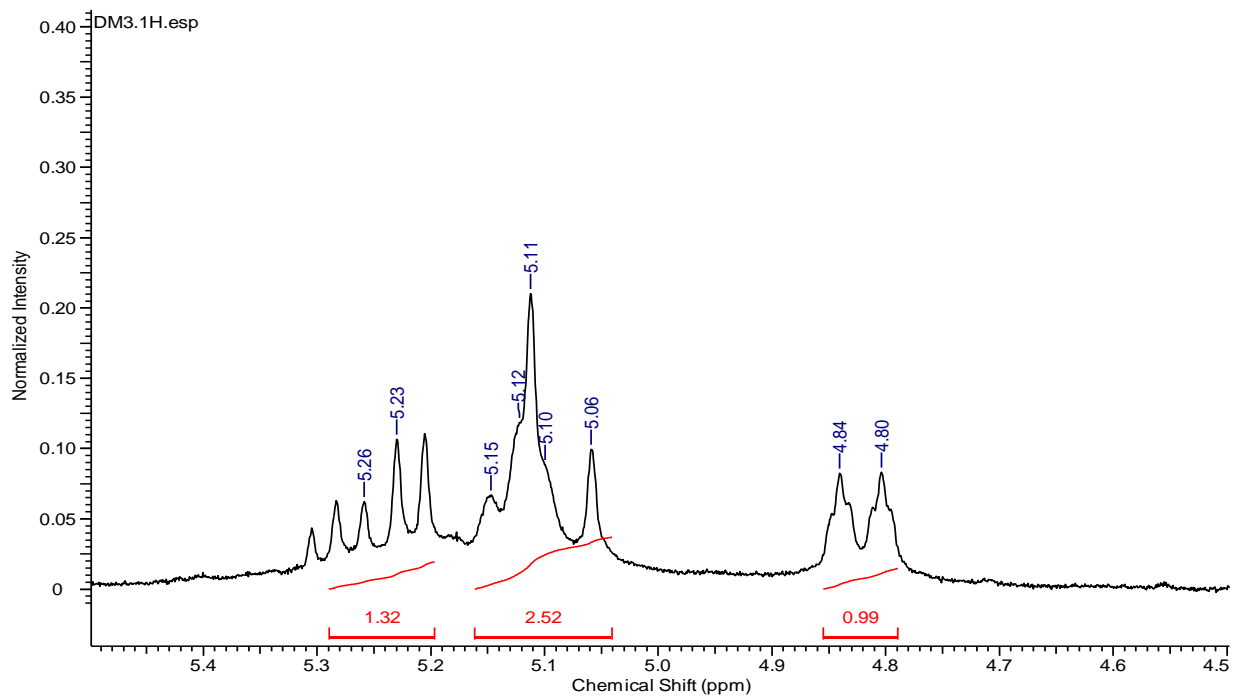
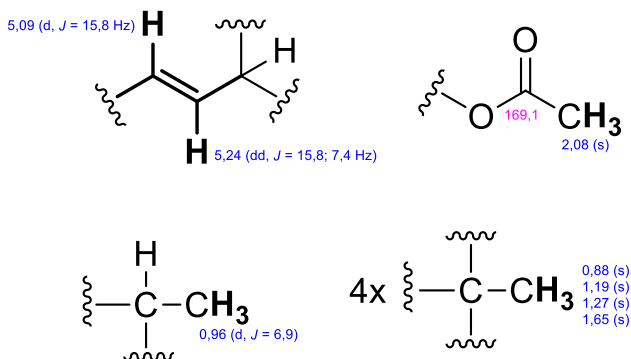


Figura 31. Primeiras estruturas parciais propostas para Dm3.



No espectro de ^{13}C RMN (Figura 32 e dados descritos na Tabela 24), são observados sinais de 22 carbonos. Entre 127,2 e 135,1 ppm, região sugestiva de carbonos olefínicos, são observados quatro sinais, sendo que dois deles fazem parte do sistema olefínico (Figura 31) já observado no espectro de ^1H RMN e os outros dois sugerem a presença de mais uma insaturação. Em 71,7 e 73,0 ppm, são observados sinais sugestivos de carbonos saturados ligados a átomos eletronegativos (PAVIA et al., 2009). Os sinais do carbono em 169,1 ppm e dos hidrogênios em 2,08 ppm sugerem a presença de um grupamento acetóxi. A presença de uma estrutura principal com 20 carbonos sugere que Dm3 se trata de um diterpeno. Além disso, com o grupamento acetóxi já se identifica mais uma das insaturações presentes na estrutura.

O mapa de correlação HSQC (Figura 33 e dados descritos na Tabela 24) permitiu que fossem estabelecidas as conectividades entre hidrogênios e carbonos presentes na estrutura. A ausência de conectividade com hidrogênios dos carbonos 169,1, 127,2, 73,00 e 46,8 ppm, determina que se tratam de carbonos quaternários. Os carbonos em 45,3, 39,2, 37,6, 35,7 e 26,7 ppm apresentaram conectividade com dois hidrogênios cada e, portanto, tratam-se de carbonos metilênicos. O mapa apresenta ainda sinais de seis metilas e de sete metinos. Três dos metinos observados possuem carbonos e hidrogênios com deslocamento químico sugestivo de olefínicos, sendo que os hidrogênios de dois deles possuem acoplamento *trans* olefínico. Além disso, um dos metinos apresenta carbono e hidrogênio com deslocamentos químicos sugestivos de conectividade com átomo eletronegativo (Figura 34).

Figura 32. Espectro de ^{13}C RMN de Dm3 (75 MHz, CDCl_3).

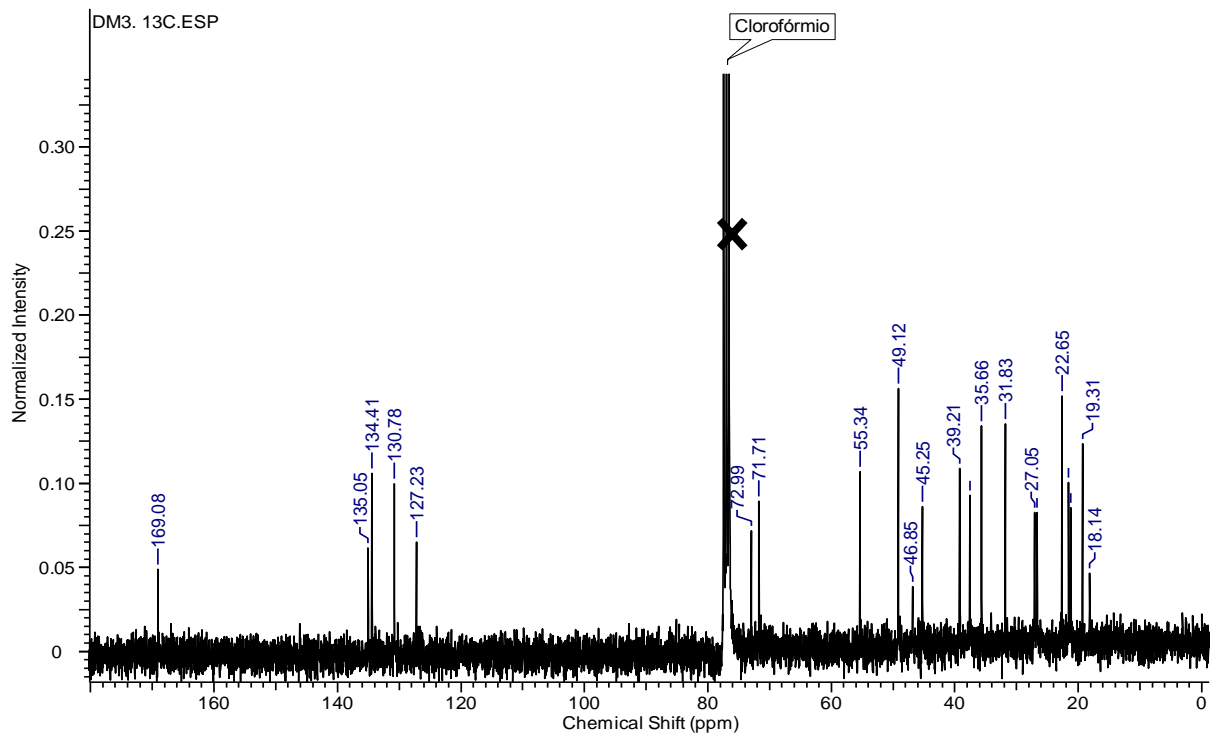


Figura 33. Mapa de correlação HSQC (300 MHz, CDCl_3) de Dm3.

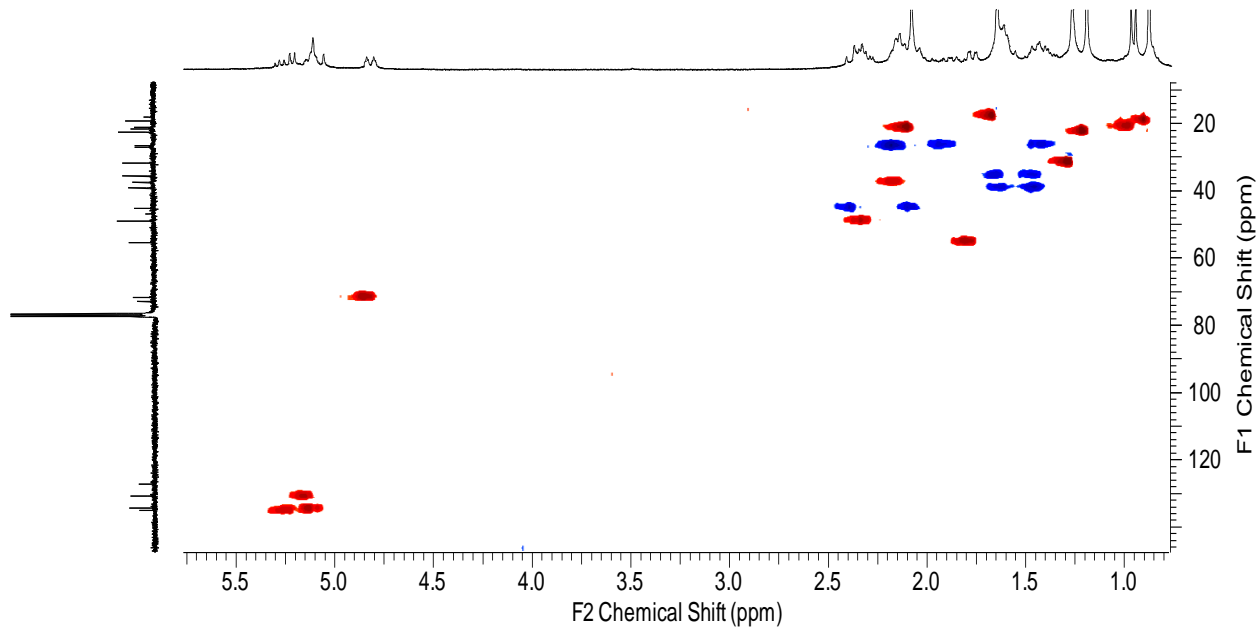
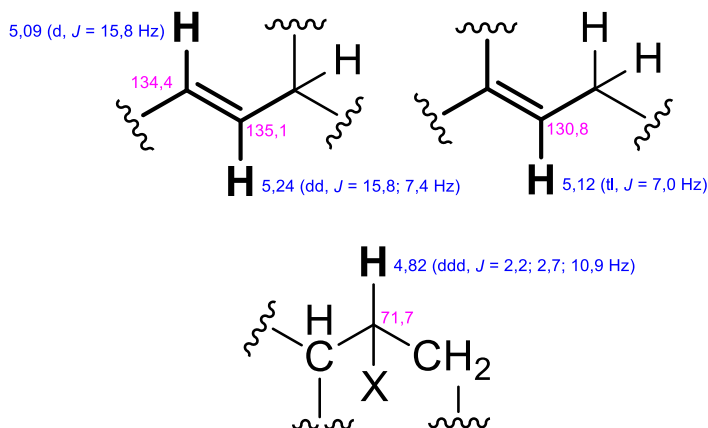


Figura 34. Novas estruturas parciais propostas para Dm3 a partir do mapa de correlação HSQC.



A análise detalhada dos mapas de correlação HMBC (Figura 35 e dados presentes na Tabela 24) e ^1H - ^1H COSY (Figura 36), permitiu que fossem conectadas as estruturas parciais obtidas anteriormente.

No mapa de correlação HMBC foi observada uma correlação, do carbono em 135,1 ppm com os hidrogênios em 0,96 ppm, que por sua vez correlacionam com o hidrogênio metínico em 2,14 ppm (dado observado no ^1H - ^1H COSY, Figura 36). Os hidrogênios metínicos em 0,96 ppm correlacionam ainda com os carbonos em 35,7 e 37,6 ppm. Foram observadas correlações entre os carbonos em 127,2 e 130,8 ppm e os hidrogênios em 2,16 ppm. Além disso, foram observadas correlações entre os carbonos em 127,2 e 130,8 ppm com os hidrogênios em 1,65 ppm (correspondentes a hidrogênios de metila). Com estes dados foi possível propor a conectividade entre estruturas parciais propostas anteriormente, como pode ser visualizado na Figura 37. Além disso, nesta figura estão representadas outras correlações observadas que permitiram estabelecer a conectividade da metila em 19,3 ppm, do carbono quaternário em 46,9 ppm e do metino em 55,3 ppm.

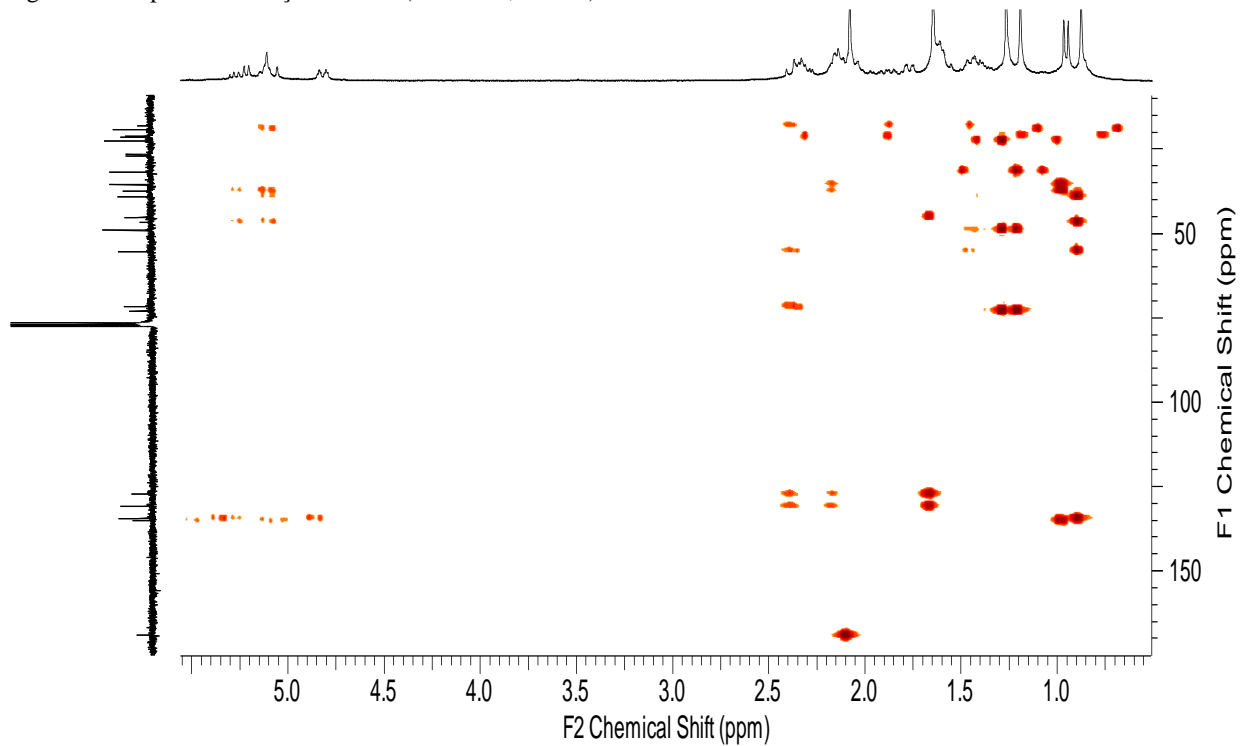
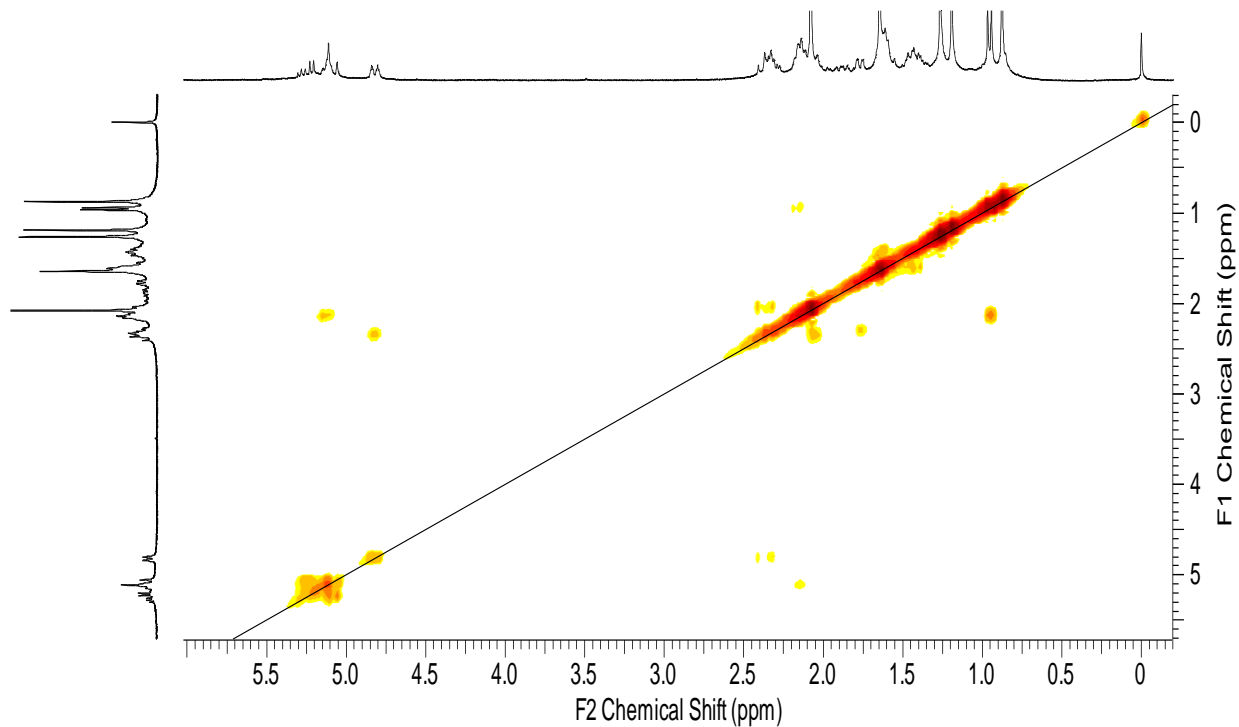
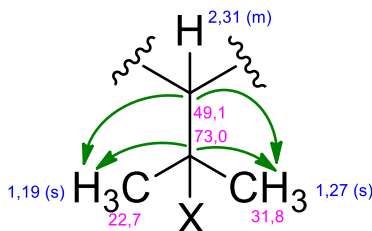
Figura 35. Mapa de correlação HMBC (300 MHz, CDCl_3) de Dm3.

Figura 36. Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY (300 MHz, CDCl_3) de Dm3.



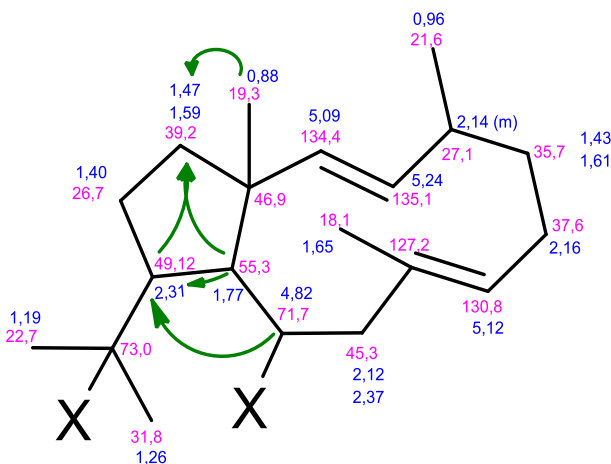
Uma nova estrutura parcial foi proposta a partir das correlações observadas entre os carbonos em 73,0 e 49,1 ppm e os hidrogênios metílicos em 1,19 e 1,27 ppm (Figura 39).

Figura 39. Correlações entre os sinais de carbonos e hidrogênios da nova estrutura parcial proposta a partir do mapa de correlação HMBC obtido para Dm3.



A conectividade da quarta estrutura parcial proposta foi sugerida conforme a Figura 40, uma vez que foram observadas correlações dos carbonos em 71,7 e 55,3 ppm com o hidrogênio em 2,31 ppm. A posição do carbono em 39,2 ppm foi estabelecida pela correlação observada dos carbonos em 55,3, 49,1 e 19,3 ppm com o hidrogênio em 1,47 ppm. Com essa estrutura parcial, identifica-se a última insaturação (anel de cinco membros) deduzida a partir da fórmula molecular.

Figura 40. Estrutura parcial proposta para Dm3 a partir de dados obtidos nos mapas de correlação HMBC.

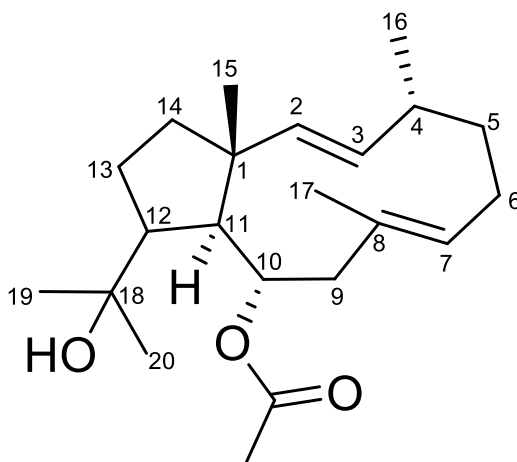


A partir dos dados espectrais obtidos e da estrutura cíclica sugerida para Dm3, foi realizada uma busca na base de dados MarinLit® e o diterpeno bicíclico do tipo dolabelano (grupo IIA), 10-acetóxi-18-hidroxi-dolabela-2,7-dieno (Figura 41 e 42) foi o único que apresentou compatibilidade com os dados obtidos (Tabela 24) (IRELAND et al., 1976; OTHMANI et al., 2014). Adicionalmente, Ireland e Faulkner (1977) utilizaram cristalografia de raio-x para confirmar a estrutura.

A posição da acetila em C10 (e não em C18) em Dm3 é confirmada pelo deslocamento químico do carbono de 71,7 ppm e seu respectivo hidrogênio em 4,82 ppm (ddd, $J = 10,9; 2,7; 2,2$), uma vez que sem a acetila nessa posição, conforme a literatura, o carbono teria um deslocamento químico de 68,9 ppm e o hidrogênio em 3,43 ppm (ddd, $J = 12,1; 11,1; 2,0$). Além disso, o carbono em C18 tem deslocamento químico de 73,0 ppm, diferentemente do carbono nessa mesma posição do diterpeno acetilado em C18, que apresenta deslocamento de 87,0 ppm (DURÁN et al., 1997).

Segundo Teixeira (2013), a espécie *D. mertensii* seria capaz de produzir apenas diterpenos dos grupos I e III e, portanto, pertenceria ao grupo taxonômico A (ver seção 1.2.3.1). Entretanto, o diterpeno 10-acetóxi-18-hidroxi-dolabela-2,7-dieno isolado não faz parte dos grupos I ou III, como é o caso do acetato de dictyol B (Dm2), um diterpeno do tipo guaiano prenilado, também isolado da espécie. Assim, o isolamento de Dm3 a partir de *D. mertensii* representa, no mínimo, uma exceção à regra proposta por Teixeira (2013). A Profa. Dra. Valéria Teixeira (UFF) acumula uma ampla experiência na investigação de algas marinhas, especialmente pardas, das regiões Sudeste e Nordeste (VALERIA LENAUVILLE TEIXEIRA, 2016), no entanto, não foi encontrado em sua vasta produção bibliográfica nenhum registro de estudos com material da Ilha de Trindade, como é o caso do presente trabalho. Assim, este resultado sugere que estudos adicionais com espécimes coletados em outras ilhas oceânicas e outras regiões podem contribuir para reavaliar a distribuição dos diterpenos entre as espécies de Dictyotaceae.

Figura 41. Estrutura proposta para substância Dm3 (10-acetóxi-18-hidroxi-18-hidroxidolabela-2,7-dieno).



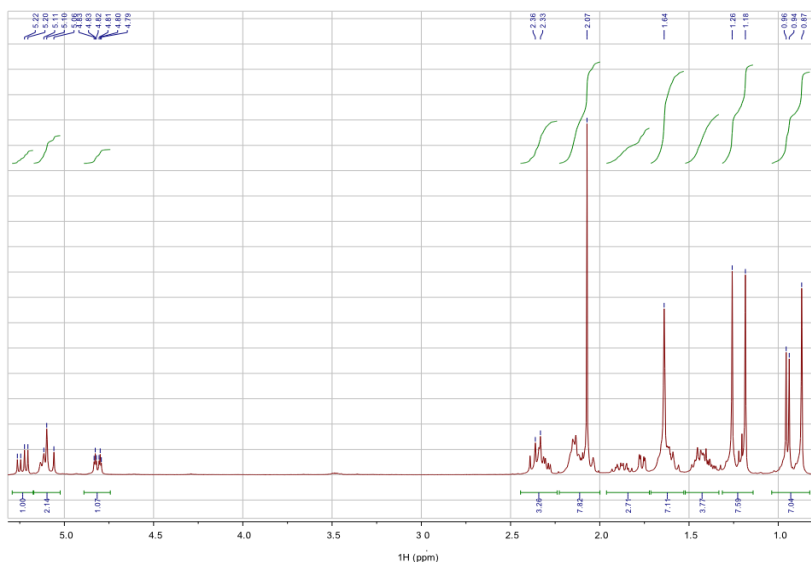
O diterpeno foi isolado pela primeira vez do invertebrado marinho *Dollabella californica*, por Ireland e colaboradores, em 1976 e foi o primeiro relato de diterpenos do tipo dolabelano na literatura. Foi neste trabalho que os pesquisadores batizaram os diterpenos que possuem um esqueleto 5,11-bicíclico, de diterpenos do tipo dolabelano (grupo IIA). A primeira espécie de alga da qual 10-acetóxi-18-hidroxi-18-hidroxidolabela-2,7-dieno foi isolado foi *Dictyota dichotoma* (AMICO et al., 1979; DURÁN et al., 1997; TAKIKAWA et al., 1998; SIAMOPOULOU et al., 2004), mas também foi reportada para uma série de outras espécies de Dictyotaceae: *Dilophus spiralis* (IOANNOU et al., 2011); *Dictyota* sp. (VIANO et al., 2009); *Dictyota* spp. (OTHMANI et al., 2014); *Dilophus okamurae* (SUZIKI et al., 2002); *Dictyota mediterraneus* (GOEZ et al., 1994); e *Glossophora galapagensis* (SUN; FENICAL, 1979).

Tabela 24. Dados espectrais de ^1H RMN da substância Dm3 obtidos em comparação com a literatura para 10-acetóxi-18-hidroxidolabela-2,7-dieno

Posição	δ_{H} (mult., J Hz)		δ_{C}	
	Dm3 (300 MHz, CDCl_3)	Ireland et al. (1976 e 1977) (220 MHz, CDCl_3)	Dm3 (75 MHz, CDCl_3)	Ireland et al. (1977) (20 MHz, benzeno- d ₆)
1	-	-	46,1	n.a.
2	5,09 (d, 15,8)	5,07 (d, 16)	134,4	130,9
3	5,24 (dd, 15,8; 7,5)	5,22 (dd, 16; 9)	135,1	135,1
4	2,14 (m)	n.a.	27,1	n.a.
5	1,61 (m) 1,43 (m)	n.a.	35,7	n.a.
6	2,16 (m)	n.a.	37,6	n.a.
7	5,12 (tl, 7,0)	5,10 (tl, 7)	130,8	127,8
8	-	-	127,2	126,8
9	2,37 (m) 2,12 (m)	n.a.	45,3	n.a.
10	4,82 (dt, 10,9; 2,7; 2,2)	4,81 (dt, 9; 1; 1)	71,7	n.a.
11	1,77 (dd, 9,8; 2,2)	n.a.	55,3	n.a.
12	2,31 (m)	n.a.	49,1	n.a.
13	1,40 (m)	n.a.	26,7	n.a.
14	1,59 (m) 1,47 (m)	n.a.	39,2	n.a.
15	0,88 (s)	0,82 (s)	19,3	20,8
16	0,96 (d, 6,9)	0,94 (d, 6,9)	21,6	n.a.
17	1,65 (s)	1,62 (s)	18,1	n.a.
18	-	-	73,0	71,7
19	1,27 (s)	1,25 (s)	31,8	n.a.
20	1,19 (s)	1,18 (s)	22,7	n.a.
OCOCH_3	2,08 (s)	2,05 (s)	21,2	n.a.
OCOCH_3	-	-	169,1	168,5

n.a.: sinais não atribuídos pelos autores.

Figura 42. Espectro de ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) obtido por Othmani e colaboradores (2014) para 10-acetóxi-18-hidroxidolabela-2,7-dieno.



Estudos de atividade com potencial ecológico demonstram que o metabólito apresenta diversas atividades: toxicidade contra a cianobactéria *Oscillatoria peromata* (NAGLE et al., 2009); pesticida contra *Polydora websterii* (prejudicial no cultivo de pérolas de ostras) (TAKIKAWA et al., 1998); anti-alimentar contra o gastrópode *Haliotis discus hannai* (SUZUKI et al., 2002) e inibição de formação de biofilme por *Pseudoalteromonas* sp. (VIANO et al., 2009).

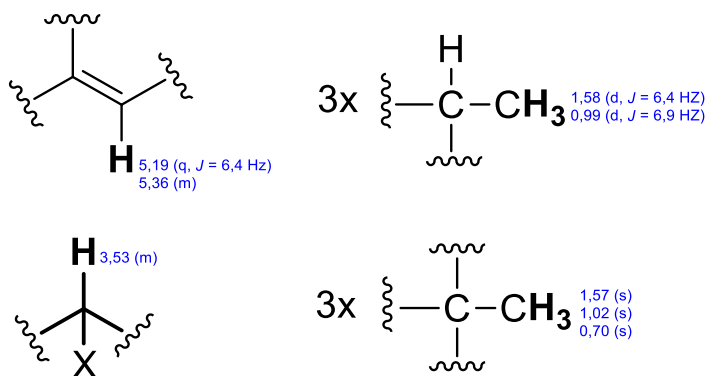
Um estudo de atividade biológica apontou atividade antibacteriana frente a uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) (IOANNOU et al., 2011).

4.3.2.4 Substância Dm4

A substância Dm4, um sólido branco, foi obtida das frações CC10D (CLAE 2) e CC9D (CLAE 3), com rendimento total de 2,0 mg. Apresenta-se na CCD em cHex/AcOEt (85:15) como uma mancha em R_f 0,2; após revelação com anisaldeído sulfúrico adquire cor roxa, tornando-se marrom-alaranjada com o tempo. A substância não apresenta extinção de fluorescência em 254 nm, nem fluorescência em 366 nm.

O espectro de ^1H RMN em CDCl_3 (Figura 45) apresenta em 0,70 ppm, 1,02 ppm e 1,57 ppm, simpletos integrando para 3H. A integração sugere que se tratam de três metilas e a multiplicidade, que não possuem acoplamento vicinal. Sinais em 1,58 ppm ($J = 6,4$ Hz) integrando para 3H e em 0,99 ppm ($J = 6,9$ Hz) integrando para 6H correspondem a dupletos típicos de hidrogênios metilas com acoplamento vicinal. O espectro apresenta ainda um multipletto em 2,23 ppm, integrando para 1H, típico de hidrogênio metínico. Em 3,53 ppm, o espectro apresenta um multipletto sugestivo de hidrogênio geminal a átomo eletronegativo. Na região mais desblindada do espectro, em 5,36 ppm (m) e 5,19 ppm (q, $J = 6,4$ Hz), são observados dois sinais integrando para 1H, sugestivos de hidrogênios olefínicos (Figura 43) (PAVIA et al., 2009).

Figura 43. Primeiras estruturas parciais sugeridas a partir do espectro de ^1H RMN de Dm4.



De acordo com os dados obtidos no espectro de ^1H RMN, a substância apresenta três metilas sem acoplamento vicinal, três metilas com acoplamento vicinal, um metino, um hidrogênio geminal a átomo eletronegativo, dois hidrogênios olefínicos, além de sinais sugestivos de hidrogênios de metilenos. Os dados, como o número de metilas e a presença de hidrogênios olefínicos, são sugestivos de esteroide. Uma vez que fucosterol (Figura 44) é o esteroide mais abundante no gênero (FREITAS et al., 2007), procedeu-se a comparação dos dados espectrais com os obtidos para Dm4 (Tabela 25). Apesar dos deslocamentos químicos serem bastante semelhantes aos do fucosterol, a ausência de um dupletto de metila em 0,92 ppm ($J = 6,4$) e a presença de um simpleto de metila em 1,57 ppm no espectro de ^1H RMN de Dm4 sugerem que este

composto não é o fucosterol (JUNG et al., 2013). Para que a estrutura de Dm4 seja identificada, seria necessário o reisolamento, para aquisição de espectros adicionais.

Figura 44. Estrutura do fucosterol.

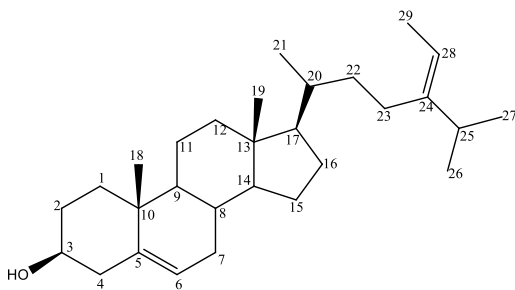


Figura 45. Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) de Dm4.

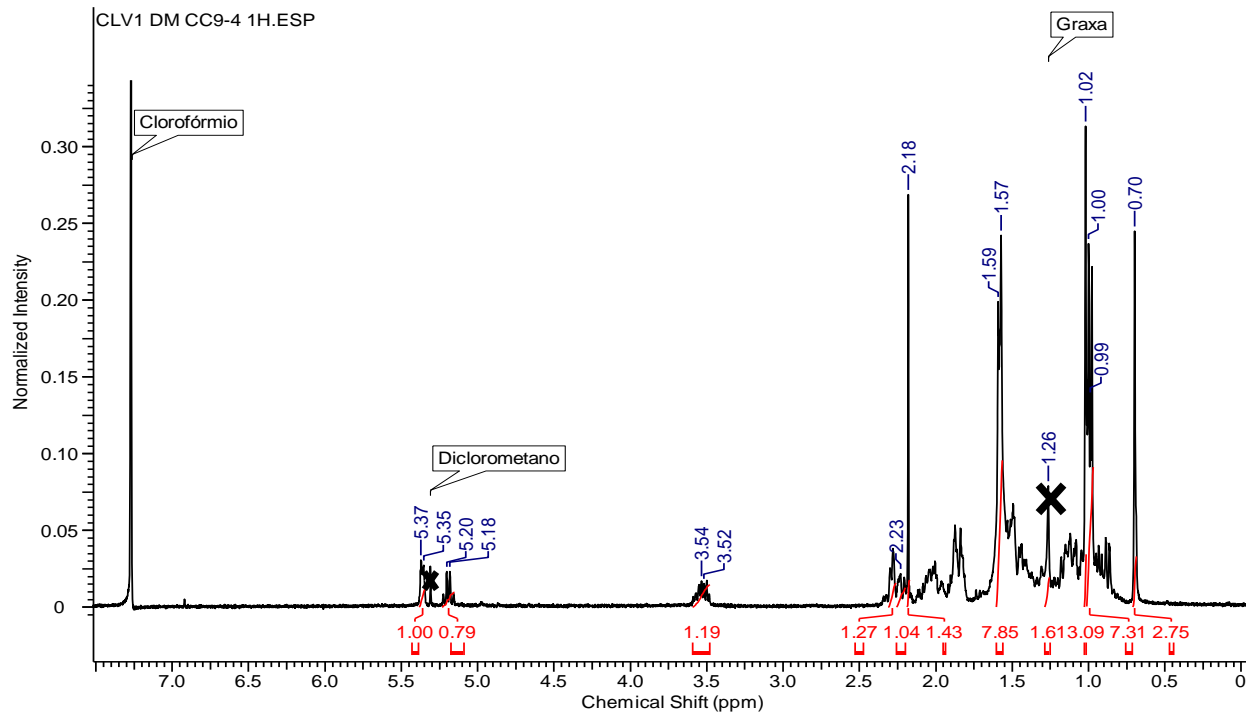


Tabela 25. Dados espectrais de ^1H RMN da substância Dm4 obtidos em comparação com a literatura para fucosterol.

Posição	δ_{H} (mult., J Hz)	
	Dm4 (400 MHz, CDCl_3)	Fucosterol Ireland et al. (1976) (220 MHz, CDCl_3)
1	n.a.	n.a.
2	n.a.	n.a.
3	3,53 (m)	3,49 (m)
4	n.a.	n.a.
6	5,36 (m)	5,33 (dl, 5,2)
7	n.a.	n.a.
8	n.a.	n.a.
9	n.a.	n.a.
10	n.a.	n.a.
11	n.a.	n.a.
12	n.a.	n.a.
14	n.a.	n.a.
15	n.a.	n.a.
16	n.a.	n.a.
18	0,70 (s, 3H)	0,66 (s, 3H)
19	1,02 (s, 3H)	0,98 (s, 3H)
20	n.a.	n.a.
21	1,57 (s, 3H)	0,92 (d, 6,4, 3H)
22	n.a.	n.a.
23	n.a.	n.a.
25	2,23 (m)	2,18 (m)
26	0,99 (d, 6,9, 3H)	0,95 (d, 6,8, 3H)
27	0,99 (d, 6,9, 3H)	0,95 (d, 6,8, 3H)
28	5,19 (q, 6,4)	5,08 (q, 6,8)
29	1,58 (d, 6,4, 3H)	1,56 (d, 6,8, 3H)

n.a.: não atribuído.

4.3.2.5 Substância Dm5

A substância Dm5 foi obtida como óleo amarelado da fração CLV11D5 (CLAE 5), com rendimento de 2,8 mg. Apresenta-se na CCD em cHex/AcOEt (9:1) como uma mancha em R_f 0,2; após revelação com anisaldeído sulfúrico adquire cor roxa, tornando-se marrom com o tempo. A substância não apresenta extinção de fluorescência em 254 nm e não apresenta fluorescência em 366 nm.

O espectro de ^1H RMN em CDCl_3 (Figura 47) apresentou um tripleto em 0,92 ppm ($J = 7,3$ Hz) integrando para 3H, sugestivo de

hidrogênios de metila com acoplamento vicinal com hidrogênios metilênicos. Em 1,37, 1,58 e 1,67 ppm há multipletos integrando para 2H, sugestivos de hidrogênios metilênicos. Observa-se ainda em 2,37 ppm um tripleto largo, integrando pra 2H, sugestivo de acoplamento vicinal com hidrogênios metilênicos. O deslocamento químico do último sinal é sugestivo de metileno vicinal a carbonila de cetona ou éster (PAIVA et al., 2009). Na região mais desblindada do espectro, são observados multipletos em 3,59 e 3,65 ppm e tripletos em 3,47 ($J = 6,8$ Hz), 3,71 ($J = 4,6$ Hz) e 4,24 ppm ($J = 4,6$ Hz), com deslocamentos sugestivos de hidrogênios geminais a átomo eletronegativo.

Os dados espectrais sugerem a presença de uma metila, nove metilenos, sendo cinco ligados a átomos eletronegativos e um vicinal à carbonila de éster ou cetona. Entretanto, considerando a ausência de outro elemento terminal (além da única metila), foi aventada a possibilidade de tratar-se de uma estrutura simétrica. Dessa forma, procedeu-se a reintegração dos sinais considerando que cada um deles deveria integrar para o dobro de hidrogênios que as integrações obtidas primeiramente. O espectro não mostrou semelhança com substâncias previamente isoladas da espécie e a partir de uma busca na literatura, predição espectral com o programa ChemDraw® e posterior comparação com os dados obtidos, sugere-se que Dm5 trata-se de um conhecido plasticida, o adipato de bis (2-(2-butoxietoxi) etila (Figura 46).

Figura 46. Estrutura proposta para a substância Dm5 (adipato de bis (2-(2-butoxietoxi) etila) com deslocamentos químicos obtidos (números em azul) e deslocamentos químicos calculados através da predição espectral (números em laranja).

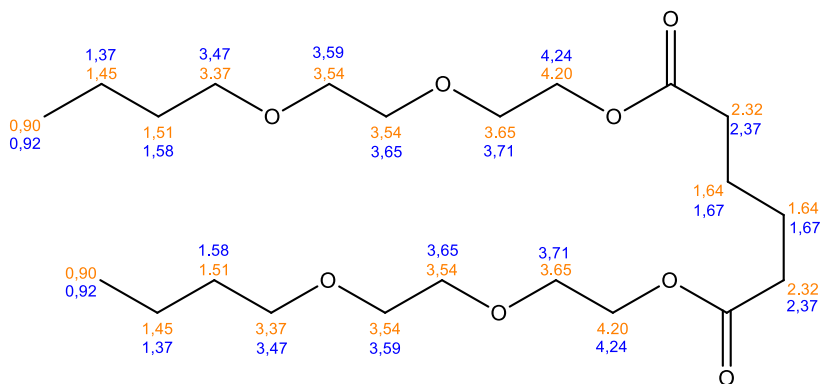
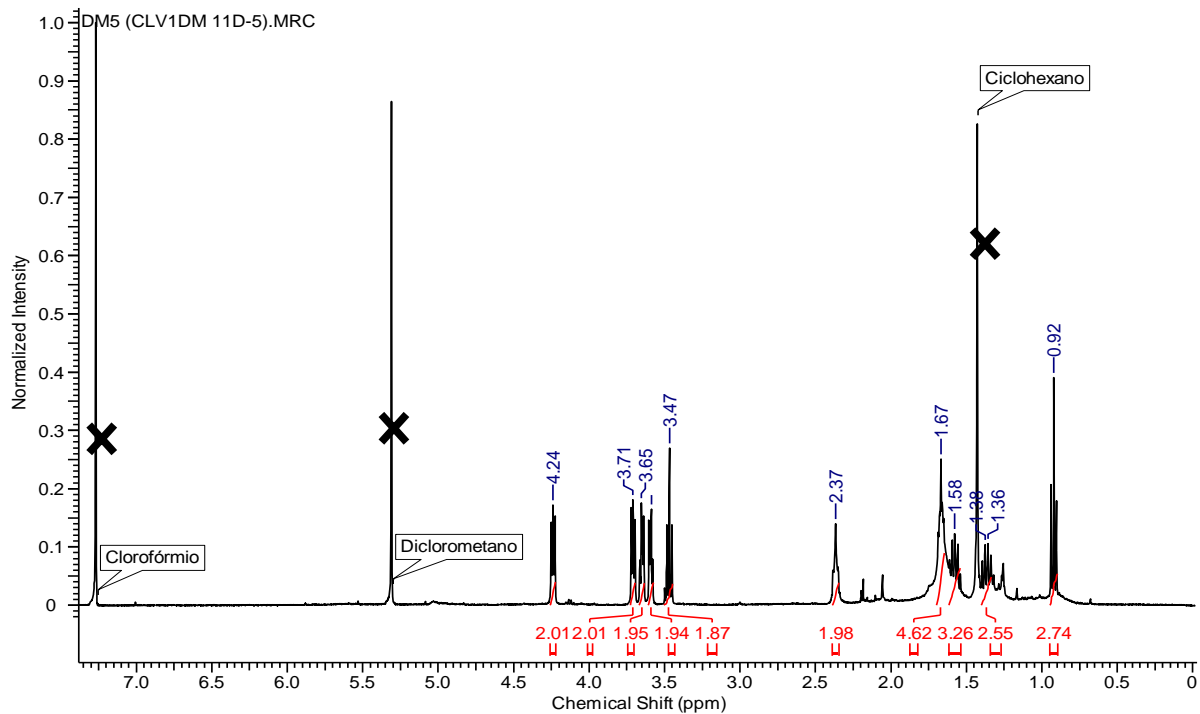


Figura 47. Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) de Dm5.



Diferentemente do ftalato de dipentila (Dm1), o plasticida cuja estrutura é proposta para Dm5 não possui relatos de isolamento como produto natural. Dessa forma, pode trata-se de um contaminante adquirido durante as etapas de isolamento ou acumulado no organismo devido à contaminação da água do mar.

As demais seis substâncias isoladas de *D. mertensii* durante o presente projeto, para as quais espectros ainda estão sendo obtidos, correspondem a compostos sólidos amorfos, sem fluorescência em 366 nm e sem extinção de fluorescência em 254 nm, com cor roxa em CCD apresentada após revelação com anisaldeído sulfúrico.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 ASPECTOS QUÍMICOS

No âmbito do presente trabalho foram isolados diterpenos de três tipos: dois dolastanos de *C. cervicornis*, um dolabelano e um guaiano prenilado de *D. mertensii*.

Os diterpenos tricíclicos isolados de *C. cervicornis* (Cc2 e Cc4) são comumente encontrados não só na espécie (Figura 4, estruturas **7 a 13** e **18 a 22**) (TEIXEIRA et al., 1986a; KELECOM; TEIXEIRA, 1988; VALLIM et al., 2010; BIANCO et al., 2015a), mas também no gênero *Canistrocarpus* como um todo (TEIXEIRA, 2013). Os dolastanos diferem entre si pelo grau e posição de oxigenações e insaturações. Os grupamentos metila das posições C16 e C20 possuem sempre estereoquímica *trans*, em sua maioria são oxigenados na posição C14 e possuem um metileno exocíclico em C1 (TO, 2008).

Os metabólitos identificados até o momento da amostra de *C. cervicornis* estudada no âmbito deste trabalho já haviam sido descritos para esta espécie; entretanto, é possível que entre aquelas amostras cujos espectros estão sendo obtidos venha a ser caracterizado algum metabólito inédito para a espécie.

Já os diterpenos isolados de *D. mertensii* pertencem a dois grupos químicos diferentes, sendo que a estrutura proposta para Dm2 pertence ao grupo I (guaianos prenilados) e a estrutura proposta para Dm3 ao grupo IIa (dolabelanos). Diterpenos do tipo guaiano prenilado são comumente encontrado na espécie (Figura 6) (VALLIM et al., 2005) e são considerados marcadores taxonômicos da mesma (FREITAS et al., 2007). Outras espécies das quais diterpenos pertencentes a esse grupo já foram isolados são: *Dictyota menstrualis*, *Dictyota ciliolata*, *Dictyota crenulata* e *Dictyota guineenses* (VALLIM et al., 2005). Os guaianos prenilados diferem entre si pelo grau e posição de oxigenações e insaturações, são bicíclicos e, em sua maioria, são oxigenados na posição C7.

Freitas e colaboradores (2007), em um estudo realizado com cinco amostras de *D. mertensii* coletadas em diferentes locais da costa brasileira (uma delas, no Atol das Rocas), observaram variações na presença e abundância de diterpenos encontrados na espécie, porém todos pertenciam ao grupo dos guaianos prenilados. Esses autores propuseram que aquelas diferenças podem ter sido influenciadas por fatores ambientais, consideração esta que é respaldada por inúmeros autores (BALBOA et al., 2013; STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

A obtenção do dolabelano (Dm3) a partir de *D. mertensii* no presente trabalho contraria a teoria proposta por Teixeira (2013) de que esta espécie poderia apresentar apenas guaianos prenilados e xenianos. Uma vez que a amostra de *D. mertensii* analisada neste trabalho foi coletada em Trindade, ES, uma ilha oceânica, diferentemente de grande parte dos materiais trabalhados por outros pesquisadores, que foram coletados na costa continental, o aspecto ambiental se destaca como possível explicação para este achado inesperado.

As ilhas oceânicas possuem um ecossistema único em termos de temperatura, salinidade, ação das ondas e pressão atmosférica (conforme a profundidade) (STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011), refletindo em uma grande biodiversidade (BORGES et al., 2009). Algas do arquipélago de Trindade foram muito pouco estudadas, e é provável que este seja o primeiro estudo químico realizado com amostras de lá, não sendo, portanto, possível estabelecer se outras espécies apresentam diferenças de perfil químico em relação a material da costa continental.

Além disso, a sazonalidade e fase do ciclo vital são outros fatores que poderiam estar contribuindo para a composição química diferenciada dos materiais analisados (AL-AMOUDI et al, 2009), mas Freitas e colaboradores (2007) não especificaram detalhes quanto às datas das coletas realizadas, nem quanto ao estágio de desenvolvimento das algas coletadas.

Um fato interessante é que Dm2 (acetato de dictyol B) foi reportado para *Dictyota dichotoma* var. *implexa* (Desfontaines) J.Ag. [cujo nome aceito pelo site Algaebase é *D. implexa* (Desfontaines) J.V. Lamouroux] e Dm3 (10-acetóxi-18-hidroxidolabela-2,7-dieno) foi isolado de *Dictyota dichotoma* (AMICO et al., 1979; DURÁN et al., 1997; TAKIKAWA et al., 1998; SIAMOPOULOU et al., 2004; FAULKNER et al., 1977; ROSA et al., 1986). Estas espécies não foram incluídas nos estudos realizados por Teixeira (2013), que fundamentaram a sua teoria com relação a diterpenos de Dictyotaceae.

Clerck e colaboradores (2006) realizaram análise filogenética de Dictyotaceae, que incluía uma amostra de *D. mertensii* coletada em Ann's Bay, Jamaica (cerca de 150 km de distância de outras Ilhas do Caribe) e amostras de *D. dichotoma* coletada na França e Japão. Estas espécies foram alocadas em um mesmo clado (CLERCK et al., 2006), reforçando a evidência de similaridade sugerida pelos dados químicos.

Os ftalatos e outros plastificantes, tais como os correspondentes a Dm1 e Dm5, são usados como aditivos em tintas, adesivos, corantes e, além disso, são amplamente utilizados na indústria química para conferir flexibilidade a cloretos de polivinila (REIS, 2015). Entre os mais comuns

estão os ftalatos de di-(2-etilexila) (DEHP) e de di-*n*-butila (DBP), que são encontrados como poluentes provenientes de materiais plásticos expostos no ambiente (CHEN, 2004) e detectados no solo, sedimentos, águas e em organismos vivos (NAMIKOSHI et al., 2006). Assim, diversos tipos de ftalatos tem sido isolados de extratos de plantas (HAYASHI et al., 1967), algas (CHEN, 2004; GRESSLER et al., 2010) e outros organismos marinhos (HOANG et al., 2008).

No sentido de verificar a origem dos ftalatos nos organismos, Chen (2004) cultivou filamentos da alga vermelha *Bania atropurpurea* em água do mar artificial (livre de contaminação e com fonte de carbono) e em água do mar natural. Os conteúdos de DEHP e DBP do material cultivado indicaram que a alga em questão foi capaz de sintetizar ftalatos. Outro estudo realizado nas mesmas condições sugeriu que outras espécies de algas vermelhas também são capazes de sintetizar ftalatos (GRESSLER et al., 2010). Um terceiro estudo, desenvolvido por Namikoshi e colaboradores (2006), utilizou condições semelhantes aos estudos anteriores, mas com fontes de carbono enriquecidos de ^{14}C , e seus resultados reforçam a evidência de que organismos vivos, como as algas, podem sintetizar ftalatos. Nesse estudo, os pesquisadores avaliaram a abundância de ^{14}C em ftalatos obtidos de três diferentes algas marinhas (duas pardas e uma verde) cultivadas em água do mar artificial (livre de contaminação e com fonte de carbono enriquecida de ^{14}C) e em água do mar natural. Os ftalatos obtidos das algas cultivadas em água do mar artificial apresentavam cerca de 50-80% de ^{14}C , enquanto que os ftalatos produzidos industrialmente possuíam quantidades abaixo do limite de detecção.

Considerando esses fatos, sugere-se que o ftalato Dm1 isolado neste trabalho, pode tratar-se de um produto natural, sendo o primeiro relato de ftalato isolado do gênero *Dictyota*. Já o plasticida Dm5, mais provavelmente, deve tratar-se de um contaminante, uma vez que não existem relatos deste composto como produto natural. No entanto, estudos adicionais contribuiriam para a confirmação desta hipótese.

5.2 ASPECTOS DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Embora apenas dois dos extratos avaliados nas triagens tenham sido selecionados para investigação química, foi possível verificar diferenças significativas no potencial redutor e na atividade antimicrobiana dentro da mesma espécie, entre amostras originárias de arquipélagos distintos e também de diferentes pontos de coleta dentro do mesmo arquipélago. Em relação a atividade antioxidante, foi observada

uma tendência de maior potencial redutor para extratos obtidos na costa continental, quando comparados com extratos de materiais obtidos em ilhas oceânicas. Estas variações devem ser reflexo de diversidade química, a qual pode estar relacionada tanto à variação quali-, como quantitativa na produção de metabólitos secundários.

Importantes atividades com potencial farmacológico e ecológico já foram relatadas para os diterpenos isolados e estão resumidos no Quadros 2 e 3. Entretanto, outras atividades ainda não investigadas poderiam ser de grande interesse, considerando o potencial que produtos naturais marinhos apresentam em relação principalmente às atividades citotóxica e antimicrobiana.

Extratos de ambas as espécies estudadas, bem como os metabólitos Dm2, Dm3 e Cc4 foram encaminhados para avaliação de atividade citotóxica na Universidade Federal do Ceará, pelo grupo do Prof. Dr. Diego Wilke. Sendo Dm2 e Dm3 os diterpenos majoritários no extrato de *D. mertensii* investigado, e considerando que esse extrato apresentou atividade antimicrobiana, esses compostos foram também encaminhados para avaliação de atividade antimicrobiana no Instituto Butantan.

Do ponto de vista ecológico, para algumas das substâncias isoladas há estudos que sugerem que estes diterpenos poderiam ser responsáveis pela proteção contra micro-organismos e herbívoros, assim, estudos adicionais poderiam estabelecer de maneira mais completa o papel fisiológico dos metabólitos.

Quadro 2. Atividades biológicas relatadas na literatura para os diterpenos isolados de *C. cervicornis* no presente trabalho.

Diterpeno	Atividade com potencial farmacológico	Atividades com potencial ecológico
<p>4α-acetóxi-9β,14α-dihidroxiolasta-1(15),7-dieno (Cc2)</p>	<p>Anticoagulante e antiplaquetária (MOURA et al., 2011a); Antiprotozoária (SANTOS et al., 2011); Inibição da hemólise e neutralização da coagulação, hemorragia e proteólise causada por veneno de serpente (MOURA et al., 2011b); Inibição da Na⁺K⁺-ATPase de mamíferos (GARCIA et al., 2009)</p>	<p>Anti-herbivoria frente a ouriços-do-mar (BIANCO et al., 2009); Repelente frente a ácaros (BORN et al., 2012); Anti-incrustante frente a mexilhões (BIANCO et al., 2009).</p>
<p>4α-acetóxi-14α-hidroxidolasta-1(15),7,9-trieno (Cc4)</p>	<p>-</p>	<p>Anti-herbivoria frente a mexilhões (BIANCO et al., 2009).</p>

Quadro 3. Atividades biológicas relatadas na literatura para os diterpenos isolados de *D. mertensii* no presente trabalho.

<p>Acetato de dictyol B (Dm2)</p>	<p>Antiproliferativa (CAAMAL-FLUENTES et al., 2014)</p>	<p>Anti-alimentar frente a ouriços-do-mar, peixes e anfípodes (CRONIN; HAY, 1996; DUFFY; HAY, 1994); Toxicidade para cianobactérias (NAGLE et al., 2009),</p>
<p>10-acetóxi-18-hidroxi-2,7-dieno (Dm3)</p>	<p>Antibacteriana (IOANNOU et al., 2011)</p>	<p>Toxicidade para cianobactérias (NAGLE et al., 2009); Pesticida (TAKIKAWA et al., 1998); Anti-alimentar frente a gastrópodes (SUZUKI et al., 2002); Inibição da formação de biofilme microbiano (VIANO et al., 2009).</p>

6 CONCLUSÕES

- De 11 extratos testados, C2 (*C. cervicornis*, Pedra do Paraíso, Ceará) apresentou o melhor resultado de atividade antioxidante no modelo de potencial redutor; e de 10 extratos testados, D5 (*D. mertensii*, Ilha da Trindade, Espírito Santo) apresentou os melhores resultados de atividade antimicrobiana;

- O fracionamento do extrato de *C. cervicornis* da Pedra do Paraíso (C2) levou ao isolamento de dois dolastanos: 4 α -acetóxi-9 β ,14 α -dihidroxiolasta-1(15),7-dieno (Cc2) e 4 α -acetóxi-14 α -hidroxidolasta-1(15),7,9-trieno (Cc4), que podem ter relevância como estratégias de defesa contra predação e *fouling*; além de um hidrocarboneto, um ácido graxo e outras 12 substâncias ainda não identificadas;

- O fracionamento do extrato de *D. mertensii* da Ilha da Trindade (D5) levou ao isolamento do guaiano prenilado Dm2 (acetato de dictyol B), do dolabelano Dm3 (10-acetóxi-18-hidroxiolabela-2,7-dieno), de dois plasticidas (ftalato de dipentila e adipato de bis(2-(2-butoxi)etoxi) etila), além de seis substâncias ainda não identificadas;

- O diterpeno Dm3 deve estar envolvido na atividade do extrato frente a *S. aureus*, é inédito na espécie *D. mertensii* e seu isolamento contraria a teoria da distribuição de diterpenos entre espécies de Dictyotaceae; o ineditismo apontado pode relacionar-se com a originalidade do material aqui investigado, procedente de uma ilha oceânica dotada de características ambientais peculiares;

- Considerando os resultados obtidos para ambas as espécies estudadas neste projeto e as variações químicas e biológicas observadas para os extratos em função do local de coleta, a continuidade dos seus estudos contribuiria para o esclarecimento da distribuição de metabólitos secundários entre as espécies, bem como do potencial farmacológico e ecológico dos mesmos.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, J. L.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, D.; PEREIRA, R.C.; FONTES, C.F.L.; TEIXEIRA, V.L.; SOUZA, T.M.L.; PAIXÃO, I.C.P. The effects of the diterpenes isolated from the Brazilian brown alga *Dictyota pfaflii* and *Dictyota menstrualis* against the herpes simplex type-1 replicative cycle. **Planta Medica**, v. 75, p. 1-6, 2009.
- AL-AMOUDI, O.A.; MUTAWIE, H.H.; PATEL, A.V.; BLUNDEN, G. Chemical composition and antioxidant activities of Jeddah cornice algae, Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 16, p. 23-29, 2009.
- ALGHAZEER, R.; WHIDA, F.; ABDUELRHMAN, E.; GAMMOUNDI, F.; AZWAI, S. Screening of antibacterial activity in marine green, red and brown macroalgae from the western coast of Libya. **Natural Science**, v. 5, n. 1, p. 7-14, 2013.
- ALIANÇA, A.S.S.; ANJOS, K.F.L.; REIS, T.N.V.; HIGINO, T.M.M.; BRELAZ-DE-CASTRO, M.C.A.; BIANCO, E.M.; FIQUEIREDO, R.C.B.Q. The *in vitro* biological activity of the Brazilian brown seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. **Molecules**, v. 19, p. 14052-14065, 2014.
- AL-SAIF, S.S.A.; ABDEL-RAOUF, N.; EL-WAZANAVI, H.A.; AREF, I.A. Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea, Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 57-64, 2014.
- ALVARADO, A.B.; GERWICK, W.H. Dictyol H, a new tricyclic diterpenoid from the brown seaweed *Dictyota dentata*. **Journal of Natural Products**, v. 48, n.1, p. 132-134, 1985.
- AMICO, V.; ORIENTE, G.; PIATTELLI, M.; TRINGALI, C. Diterpenes based on the dolabellane skeleton from *Dictyota dichotoma*. **Tetrahedron**, v. 36, p. 1409-1414, 1979.
- ANARAT-CAPPILLINO, G.; SATTELY, E. S. The chemical logic of plant natural product biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 19, p. 51-58, 2014.

BALBOA, E.M.; CONDE, E.; MOURE, A.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. **Food Chemistry**, v. 13, p. 1764-1785, 2013.

BARBOSA, J. P.; FLEURY, B.G.; GAMA, B.A.P.; TEIXEIRA, V.L.; PEREIRA, R.C. Natural products as antifoulants in the Brazilian brown alga *Dictyota pfafii* (Phaeophyta, Dictyotales). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 549-553, 2007.

BARBOSA, J. P.; PEREIRA, R.C.; ABRANTES, J.L.; CIRNE-SANTOS, C.C.; REBELLO, M.A.; GRUGULHETTI, I.C.; TEIXEIRA, V.L. *In vitro* antiviral diterpenes from the Brazilian brown alga *Dictyota pfafii*. **Planta Medica**, v. 70, p. 856-860, 2004.

BARROS, C.S.; CIRNE-SANTOS, C.C.; GARRIDO, V.; BARCELOS, I.; STEPHENS, P.R.S.; GIONGO, V.; TEIXEIRA, V.L.; PAIXÃO, I.C.N.P. Anti-HIV-1 activity of compounds derived from marine alga *Canistrocarpus cervicornis*. **Journal of Applied Phycology**, 2015.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology**. Taylor & Francis, 2006.

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

BERLINCK, R.G.S.; HAJDU, E.; ROCHA, R.M.; OLIVEIRA, J.H.H.L.; HERNÁNDEZ, I.L.C.; SELEGHIM, M.H.R.; GRANATO, A.C.; ALMEIDA, E.V.R.; NUÑEZ, C.V.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; CAVALCANTI, B.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; THIEMANN, 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, 2004.

BIANCO, E. M.; ROGERS, R.; TEIXEIRA, V.L.; PEREIRA, R.C. Antifoulant diterpenes produced by the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, p. 341-346, 2009.

BIANCO, E.M.; TEIXEIRA, V.L.; PEREIRA, R.C. Chemical defenses of the tropical marine seaweed *Canistrocarpus cervicornis* against herbivory by sea urchin. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58, n. 3, p. 213-218, 2010.

BIANCO, E.M.; OLIVEIRA, S.Q.; RIGOTTO, C.; TONINI, M.L.; GUIMARÃES, T.R.; BITTENCOURT, F.; GOUVÊA, L.P.; ARESI, C.; ALMEIDA, M.T.R.; MORITZ, M.I.G.; MARTINS, C.D.L.; SCHERNER, F.; CARRARO, J.L.; HORTA, P.A.; REGINATTO, F.H.; STEINDEL, M.; SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. Anti-infective potential of marine invertebrates and seaweeds from the Brazilian coast. **Molecules**, v. 18, p. 5761-5778, 2013a.

BIANCO, E.M.; PIRES, L.; SANTOS, C.G.K.N.; DUTRA, K.A.; REIS, T.N.V.; VASCONSELOS, E.R.T.P.P.; COCENTINO, A.L.M.; NAVARRO, D.M.A.F. Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*). **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 270-275, 2013b.

BIANCO, E.M.; FRANCISCO, T.M.; PINHEIRO, C.B.; AZEREDO, R.B.V.; TEIXEIRA, V.L.; PEREIRA, R.C. 10 β -Acetoxy-8 α ,9 α -epoxy-14 β -hydroxy-7-oxodolastane – A new diterpene isolated from the brazilian brown bacroalga *Canistrocarpus cervicornis*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 28, p. 785-194, 2015a.

BIANCO, E.M.; FRANCISCO, T.M.; PINHEIRO, C.B.; AZEREDO, R.B.V.; TEIXEIRA, V.L.; PEREIRA, R.C. 4 α -acetoxyamijidictyol – A New Antifeeding dolastane diterpene from the Brazilian Brown Alga *Canistrocarpus cervicornis*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 12, p. 1665-1677, 2015b.

BLAIR, J.M.A.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, A.J.; OGBOLU, D.O.; PIDDOCK, L.J.V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature**, v. 13, p. 42-51, 2015.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; KEYZERS, R.A.; MUNRO, M.H.G.; PRINSEP, M.R. Marine Natural Products. **Natural Products Reports**, v. 20, p. 1-48, 2003.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; KEYZERS, R.A.; MUNRO, M.H.G.; PRINSEP, M.R. Marine Natural Products. **Natural Products Reports**, v. 31, p. 160, 2014.

BLUNT, J.W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R.A.; MUNRO, M.H.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 2, p. 116-211, 2015.

BORN, F.S.; BIANCO, E.M.; CAMARA, C.A. Acaricidal and repellent activity of terpenoids from seaweeds collected in Pernambuco, Brazil. **Natural Products Communication**, v. 7, n. 4, p. 463-466, 2012.

BUTLER, M.S. The role of natural product in chemistry in drug discovery. **Journal of Natutal Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

CAAMAL-FUENTES, E.; MOO-PUC, R.; FREILE-PELEGRÍN, Y.; ROBLEDO, D. Cytotoxic and antiproliferative constituents from *Dictyota ciliolata*, *Padina sanctae-crucis* and *Turbinaria tricostata*. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 10, p. 1244-1248, 2014.

CAMARA, R.B.G.; COSTA, L.S.; FIDELIS, G.P.; NOBRE, L.T.D.B.; DANTAS-SANTOS, N.; CORDEIRO, S.L.; COSTA, M.S.S.P.; ALVES, L.G.; ROCHA, H.A.O. Heterofucans from the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with anticoagulant and antioxidant activities. **Marine Drugs**, v. 9, p. 124-138, 2011.

CAMPOS, T. F. C.; BEZERRA, F.H.R.; SRIVASTAVA, N.K.; VIEIRA, M.M.; VITA-FINZI, C. Holocene tectonic uplift of the St Peter and St Paul Rocks (Equatorial Atlantic) consistent with emplacement by extrusion. **Marine Geology**, Natal, v. 271, p. 177-186, Mai. 2010.

CAPASSO, F.; PASQUALE, R.; GRANDOLINI, G. **Farmacognosia: Botanica, chimica e farmacologia delle piante medicinali**. 2ª ed. Itália: Springer, 2011.

CHEN, C.Y. Biosynthesis of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-*n*-butyl phthalate (DBP) from red alga *Bangia atropurpurea*. **Water Research**, v. 38, p. 1014-1018, 2004.

CHIN, Y.; BALUNA, M.J.; CHAI, H.B.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from natural sources. **The American Association Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 8, n. 2, p. E239-E253, 2006.

CIRNE-SANTOS, C.C.; SOUZA, T.M.; TEIXEIRA, V.L.; FONTES, C.F.; REBELLO, M.A.; CASTELLO-BRANCO, L.R.; ABREU, L.R.; TANURI, A.; FRUGULHETTI, I.C.; BOU-HABIB, D.C. The dollabelane diterpene dolabelladienetriol is a typical noncompetitive inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase enzyme. **Antiviral Research**, v. 77, p. 64-71, 2008.

CLERCK, O.; BOGAERT, K. A.; LELIAERT, F. Diversity and evolution of algae: primary endosymbiosis. In: PIGANEAU, G. (ed.). **Genomic insights into the biology of algae**. London: Academic Press, 2012.

CLERCK, O.; LELIAERT, F.; VERBRUGGEN, H.; LANE, C.E.; DE PAULA, J.C.; PAYO, D.I.; COPPEJANS, E. A revised classification of the Dictyoteae (Dictyotales, Phaeophyceae) based on *rbcL* and 26S ribosomal DNA sequence data analyses. **Journal of Phycology**, v. 42, p. 1271-1288, 2006.

COLEGATE, S.M.; MOLYNEUX, R.J. **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structure Determination**. Boca Raton: CRC Press, 2008.

COSTA, L.S.; FIDELIS, G.P.; CORDEIRO, S.L.; OLIVEIRA, R.M., SADRY, D.A.; CÂMARA, R.B.G.; NOBRE, L.T.D.B.; COSTA, M.S.S.P.; ALMEIDA-LIMA, J.; FARIAS, E.H.C.; LEITE, E.L.; ROCHA, H.A.O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 21-28, 2010.

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**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure Applied Chemistry**, v. 77, p. 7-24, 2005.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CREWS, P.; KLEIN, T.E.; HOGUE, E.R.; MYERS, B.L. Tricyclic diterpenes from the brown marine algae *Dictyota divaricata* and *Dictyota linearis*. **American Chemical Society**, v. 47, p. 811-815, 1982.

CRONIN, G.; HAY, M.E. Susceptibility to herbivores depends on recent history of both the plant and animal. **Ecology**, v. 77, n. 5, p. 1531-1543, 1996.

CRONIN, G.; LINDQUIST, N.; HAY, M.E.; FENICAL, W. Effects of storage and extraction procedures on yields of lipophilic metabolites from the brown seaweeds *Dictyota ciliolata* and *D. menstrualis*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 119, p. 265-273, 1995.

DAVIS, E.; CROTEAU, R. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. In: LEEPER, F. J.; VEDERAS, J. C. (Eds.). **Biosynthesis: aromatic polyketides, isoprenoids, alkaloids** (Topics in Current Chemistry). New York: Springer, 2000.

DEMIREL, Z.; YILMAZ-KOZ, F.F.; KARABAY-YAVASOGLU, U.N.; OZDEMIR, G.; SUKATAR, A. Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from the Aegean Sea. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 74, n. 6, p. 619-628, 2009.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**, 2nd ed. West Sussex: John Wiley, 2002.

DIAS, D.A.; URBAN, S.; ROESSNEREM, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, n. 2, p. 303-336, 2012.

DOMINGOS, T. F. S.; CARVALHO, C.; MOURA, L.A.; TEIXEIRA, V.L.; PEREIRA, R.C.; BIANCO E.M.; FERREIRA, W.J.; RAMOS, C.J.B.; MIRANDA, A.L.P.; MELO P.A.; GUIMARÃES, J.A.; FULY, A.L. Antinomic effects of Brazilian brown seaweed extracts. **Natural Products Communications**, v. 4, n. 8, p. 1075-1078, 2009.

DOMINGOS, T. F. S.; VALLIM, M.A.; CARVALHO, C.; SANCHEZ, E.F.; TEIXEIRA, V.L.; FULY, A.L. Anti-snake venom effect of secodolastane diterpenes isolated from Brazilian marine brown alga *Canistrocarpus cervicornis* against *Lachesis muta* venom. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 2, p. 234-238, 2011.

DOMINGOS, T. F. S.; VALLIM, M.A.; CAVALCANTI, D.N.; SANCHEZ, E.F.; TEIXEIRA, V.L.; FULY, A.L. Effect of diterpenes isolated of the marine alga *Canistrocarpus cervicornis* against some toxic effects of the venom of the *Bothrops jararaca* snake. **Molecules**, v. 20, p. 3515-3526, 2015.

DUFFY, J. E.; HAY, M.E. Herbivore resistance to seaweed chemical defense: the roles of mobility and predator risk. **Ecology**, v. 75, p. 1304-1319, 1994.

DURÁN, R.; ZUBIA, E.; ORTEGA, M.J.; SALVÁ, J. New diterpenoids from the alga *Dictyota dichotoma*. **Tetrahedron**, v. 53, n. 25, p. 8675-8688, 1997.

ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. **Brown algae**. 2014. Disponível em: <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/81647/brown-algae>> Acesso em: 22 dez. 2015.

ENGEL, S.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Chemical ecology of marine microbial defense. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, p. 1971–1985, 2002.

FALCÃO, C.; MENEZES DE SZÉCHY, M. T. Changes in shallow phytobenthic assemblages in southeastern Brazil following the replacement of *Sargassum vulgare* (Phaeophyta) by *Caulerpa scalpelliformis* (Chlorophyta). **Botanica Marina**, v. 48, p. 208-217, 2005.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 19, p. 1–48, 2002.

FAULKNER, D.J.; RAVI, B.N.; FINER, J.; CLARDY, J. Diterpenes from *Dictyota dichotoma*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 991-993, 1977.

FELÍCIO, R.; OLIVEIRA, A. L. L.; DEBONSI, H. M. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 39-42, 2012.

FENICAL, W. Marine Pharmaceuticals: past, present and future. **Oceanography**, v. 19, n. 2, p. 110-119, 2006.

FERREIRA, L.S.; TURATTU, I.C.C.; LOPES, N.P.; GUARANTINI, T.; COLEPICOLA, P.; OLIVEIRA FILHO, E.C.; GARLA, R.C. Apolar compounds in seaweeds from Fernando de Noronha Archipelago (Northeastern Coast in Brazil). **International Journal of Analytical Chemistry**, p. 1-5, 2012.

FLEURY, B. G.; KELECOM, A.; PEREIRA, R. C.; TEIXEIRA, V. L. Polyphenols, terpenes and sterols in brazilian Dictyotales and Fucales (Phaeophyta). **Botanica Marina**, v. 37, n. 5, p. 457-462, 1994a.

FLEURY, B.G.; PEREIRA, M.V.; SILVA, J.R.P.; KAISIN, M.; TEIXEIRA, V.L.; KELECOM, A. Sterols from Brazilian marine brown algae. **Phytochemistry**, v. 37, n. 5, p. 1447-1449, 1994b.

FREITAS, O.S.P.; OLIVEIRA, A.S.; DE-PAULA, J.C.; PEREIRA, R.C.; CAVALCANTI, D.N.; TEIXEIRA, V.L. Chemical variation in the diterpenes from the Brazilian brown alga *Dictyota mertensii* (Dictyotaceae, Phaeophyta). **Natural Product Communications**, v. 2, n. 1, p. 13-15, 2007.

GARCIA, D. G.; BIANCO, E.M.; SANTOS, M.C.B.; PEREIRA, R.C.; FARIA, M.V.C.; TEIXEIRA, V.L.; BURTH, P. Inhibition of mammal Na⁺K⁺-ATPase by diterpenes extracted from the Brazilian brown alga *Dictyota cervicornis*. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 943-947, 2009.

GOEZ, C.E.; WRIGHT, A.D.; KÖNIG, G.M.; STICHER, O. Diterpenes from the brown alga *Dilophus mediterraneus*. **Phytochemical Analysis**, v. 5, p. 68-73, 1994.

GONZÁLEZ, A.G.; MARTÍN, J.D.; NORTE, M.; RIVEIRA, P. Sctructure and absolute configurations of *Dictyota* sp. diterpenes. **Tetrahedron**, v. 39, n. 20, p. 3355-227, 1983.

GRESSLER, V.; FUJII, M.T.; YOKOYA, N.S.; COLEPICCOLO, P.; PINTO, E. Identificação de ftalatos naturais em espécies de algas vermelhas marinhas coletadas no estado do Espírito Santo, Brasil. In: **33ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia, 2010. GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: <<http://www.algaebase.org/>>. Acesso em 14 Jan. 2016.

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

HARVEY, A.L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. The re-emergence of natural products for drug Discovery in the genomics era. **Nature Reviews - Drug Discovery**, v. 14, p. 111-129, 2015.

HAYASHI, S.; ASAKAWA, Y.; ISHIDA, T.; MASTURA, T. Phthalate esters of *Cryptotaenia canadensis* DC. **Tetrahedron Letters**, n. 50, p. 5061-5063, 1967.

HEIBA, H.I.; AL-EASA, H.S.; RIZK, A.M. Fatty acid composition of twelve algae from the coastal zones of Qatar. **Plant foods for human nutrition**, v. 51, p. 27-34, 1997.

HOANG, V.L.T; LI, Y.; KIM, S.W. Cathepsin B inhibitory activities of phthalates isolated from a marine *Pseudomonas* strain. **Bio-organic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 2083-2088, 2008.

HU, Y.; CHEN, J.; HU, G.; YU, J.; ZHU, X.; LIN, Y.; CHEN, S.; YUAN, J. Statistical Research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. **Marine Drugs**, v. 13, p. 202-221, 2015.

IOANNOU, E.; QUESADA, A.; RAHMAN, M.M.; GIBBONS, S.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. Dolabellanes with antibacterial activity from the brown alga *Dilophus spiralis*. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 213-222, 2011.

IRELAND, C.; FAULKNER, D.J. A novel diterpene from *Dollabella californica*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 98, n. 15, p. 4664-4665, 1976.

JOLY, C.A.; HADDAD, C.F.B.; VERDADE, L.M.; OLIVEIRA, M.C.; BOLZANI, V.S.; BERLINCK, R.G.S. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil, **Revista USP**, p. 114-133, 2011.

JUNG, H.A.; ISLAM, M.N.; LEE, C.M.; OH, S.H.; LEE, S.; JUNG, J.H.; CHOI, J.S. Kinetics and molecular docking studies of an anti-diabetic complication inhibitor fucosterol from edible brown algae *Eisenia bicyclis* and *Ecklonia stolonifera*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 206, p. 55-62, 2013.

KELECOM, A.; TEIXEIRA, V.L., Dolastane diterpenes from the marine brown alga *Dictyota cervicornis*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 9, p. 2907-2902, 1988.

KHOTIMCHENKO, S.V. Uncommon 16:1 (n-5) acid from *Dictyota dichotoma* and fatty acids of some brown algae of Dictyotaceae. **Phytochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1411-1415, 1995.

KOISHI, A.C.; ZANELLO, P.R.; BIANCO, E.M.; BORDIGNON, J.; SANTOS, C.N.D. Screening of dengue virus antiviral activity of marine seaweeds by an *in situ* enzyme-linked immunosorbent assay. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1-11, 2012.

KOLANJINATHAN, K.; GANESH, P.; SARANRAJ, P. Pharmacological importance of seaweeds: A review. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v. 6. n. 1, p. 1-15, 2014.

KÜTZING, F.T. **Tabulae phycologicae**; oder Abbildungen der Tange. Vol. IX pp. i-vii, 1-42, 100 pls. Nordhausen: Gedruckt auf Kosten des Verfassers (in Commission bei Wilhelm Köhne), 1859.

LEE, R.E. **Phycology**. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.

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, 2009.

LIU, L.; HEINRICH, M.; MYERS, S.; DWORJANYN, S. A. Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: a phytochemical and pharmacological review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 591-619, 2012.

MANCINI, I.; DEFANT, A.; GUELLA, G. recent synthesis of marine natural products with antibacterial activities. **Anti-infective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 17-48, 2007.

MARCOLIN, N. Para Conhecer o Mar. **Revista Pesquisa Fapesp**, São Paulo, p. 8-9, 2010.

MARQUES, L.V.; VILLAÇA, R.; PEREIRA, R.C. Susceptibility of macroalgae to herbivorous fishes at Rocal Atoll, Brazil. **Botanica Marina**, v. 49, p. 379-385, 2006.

MARTINS, A.; VIEIRA, H.; GASPAR, H.; SANTOS, S. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. **Marine Drugs**, v. 12, p. 1066-1101, 2014.

MATSUKAWA R.; DUBINSKI, Z.; KISHIMOTO, E.; MASAKI, K.; MASUDA, Y.; TAKEUCHI, T.; CHIHARA, M.; YAMAMOTO, T.; NIKI E.; KARUBE, I. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 29-35, 1997.

MATTA, C. B. B.; SOUZA, É. T.; QUEIROZ, A. C.; LIRA, D. P.; ARAÚJO, M. V.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; MIRANDA, G. E. C.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SANTOS, B. V. O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Antinociceptive and anti-inflammatory activity from algae of the genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**, v. 9, n. 3, p. 307-318, 2011.

MAYER. A.M; GLASER, K.B.; CUEVAS, C.; JACOBS, R.S.; KEM, W.; LITTLE, R.D.; MCINTOSH, J.M.; NEWMAN, D.J.; POTTS, B.C.; SHUSTER, D.E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 255-265, 2010.

MOHAMED, S.; HASHIM, S.N.; RAHMAN, H.A. Seaweeds : A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. **Trends in Food Science & Technology**, v.23, p. 83-96, 2012.

MOLINSKI, T.F.; DALISAY, D.S.; LIEVENS, S.; SALUDES, J.P. Drug development from marine natural products. **Nature Reviews - Drug Discovery**, v. 8, n. 1, p. 69-85, 2009.

MOLONEY, M.F. **Irish Ethno-botany and the Evolution of Medicine in Ireland**. Dublin: Gill and Son, 1919.

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

MOURA, L.A.; BIANCO, E.M.; PEREIRA, R.C.; TEIXEIRA, V.L.; FULY, A.L. Anticoagulation and antiplatelet effects of a dolastane diterpene isolated from the marine brown alga *Canistrocarpus*. **Journal of Thrombosis Thrombolysis**, v. 31, p. 235–240, 2011a.

MOURA, L. A.; SANCHEZ, E.F.; BIANCO, E.M.; PEREIRA, R.C.; TEIXEIRA, V.L.; FULY, A.L. Antiophidian properties of a dolastane diterpene isolated from the marine brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 1, p. 61–66, 2011b.

NAGLE, D.; SULTANA, G.N.N.; SCHRADER, K.K.; HOSSAIN, C.F.; STANIKUNAITE, R.; HAMANN, M.T.; RAJBANDARI, I. Secondary metabolites from plants and marine organisms as selective anti-cyanobacterial agents. **American Chemical Society Symposium Series**, v. 848, p. 179-194, 2009.

NAMIKHOSI, M.; FUJIWARA, T.; NISHIKAWA, T.; UKAI, K. Natural abundance ^{14}C content of dibutyl phthalate (DBP) from three marine algae. **Marine Drugs**, v. 4, p. 290-297, 2006.

NARIYOSHI, Y.N.; GUEDES, E.A.C.; ROCHA, H.A.O.; PINOTTI, L.M. Partial characterization and evaluation of antioxidant activity from fractionated polysaccharides obtained of brown algae. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 815-818, 2013.

NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION: United States Department of Commerce. **Ocean**. Disponível em: <<http://www.noaa.gov/ocean.html>>. Acesso em : 15 Jan. 2016.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, n. 4, p. 503-515, 2010.

ORTIZ-RAMÍREZ, F.A.; VALLIM, M.A.; CAVALCANTI, D.N.; TEIXEIRA, V.L. Effects of the secondary metabolites from *Canistrocarpus cervicornis* (Dictyotales, Phaeophyceae) on fertilization and early development of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 2, p. 296-304, 2013.

OTHMANI, A.; BOUZIDI, N.; VIANO, Y.; ALICHE Z.; SERIDI, H.; BLACHE, Y.; HATTAB, M.E.; BRIAND, J.F.; CULIOLI, G. Anti-microfouling properties of compounds isolated from several Mediterranean *Dictyota* spp. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 1573-1584, 2014.

PATRA, B.; SCHULUTTERNHOFER, C.; WU, Y.; PATTANAIK, S.; YUAN, L. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1829, p. 1236-1247, 2013.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introduction to spectroscopy**, 4^a ed, Cengage Learning, 2009.

PEREIRA, R.C.; PINHEIRO, M.D.; TEIXEIRA, V.L.; GAMA, B.A.P. Feeding preferences of the endemic gastropod *Astraea latispina* in relation to chemical defenses of Brazilian tropical seaweeds. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n.1, p. 33-40, 2002.

PEREIRA, H. S.; LEÃO-FERREIRA, L.L.; MOUSSATCHÉ, N.; TEIXEIRA, V.L.; CAVANCANTI, D.N.; COSTA, L.J.; DIAZ, R.; FRUGULHETTI, I.C. Effects of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* on HIV-1 reverse transcriptase. **Planta Medica**, v. 71, p. 1019-1024, 2005.

PEREIRA, R. C.; BIANCO, E.M.; BUENO, L.B.; OLIVEIRA, M.A.L.; PAMPLONA, O.D.; GAMA, B.A.P. Associational defense against herbivory between brown seaweeds. **Phycologia**, v. 49, p. 424-428, 2010.

QUEIROZ, K.C.S.; MEDEIROS, V.P.; QUEIROZ, L.S.; ABREU, L.R.D.; ROCHA, H.A.O.; FERREIRA, C.V.; JUCÁ, M.B.; AOYAMA, H.; LEITE, E.L. Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, p. 303-307, 2008.

RANGEL, M.; CABRERA, M. P. S.; KAZUMA, K.; ANDO, K.; WANG, X.; KATO, M.; NIHEI, K.; HIRATA, I. Y.; CROSS, T. J.; GARCIA, A. N.; FAQUIM-MAURO, E. L.; FRANZOLIN, M. R.; FUCHINO, H.; MORIYASUMOTO, K.; SEKITA, S.; KADOWAKI, M.; SATAKE, M.; KONNO, K. Chemical and biological characterization of four new linear cationic α -helical peptides from the venoms of two solitary eumenine wasps. **Toxicon**, v. 57, n. 7-8, p. 1081-1092, 2011.

RANGEL, M.; FALKENBERG, M. An overview of the marine natural products in clinical trials and on the market. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 3, n. 6, p. 421-428, 2015.

ROCHA, F. D.; PEREIRA, R.C; KAPLAN, M. A. C.; TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 631-639, 2007.

ROSA, S.; STEFANO, S.; ZAVODNIK, N. Hydroazulenoid diterpenes from the brown alga *Dictyota dichotoma* var. *implexa*. **Phytochemistry**, v. 5, n. 9, p. 2179-2181, 1986.

ROUSSEAU, F.; BURROWES, R.; PETERS, A. F.; KUHNENKAMP, R.; REVIERS, B. A comprehensive phylogeny of the Phaeophyceae based on nrDNA sequences resolves the earliest divergences. **Comptes rendus de L'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie**, v. 324, n. 4, p. 305-319, 2001.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. MarinLit: A database of the marine natural products literature. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/marinlit/>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

SANTOS, A.O.; BRITTA, E.A.; BIANCO, E.M.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; PEREIRA, R.C.; NAKAMURA, C.V. 4-Acetoxydolastane diterpene from the Brazilian brown algae *Canistrocarpus cervicornis* as antileishmanial agente. **Marine Drugs**, v. 9, p. 2369-2383, 2011.

SASIKUMAR, J.M.; PATHARAJ, J.; ADITHYA, E.S.; CHRISTABEL, P.H.; SHAMNA, R. Antioxidant capacity and phenolic content of *Elaeagnus kologa* Schlecht an underexploited fruit from India. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 3, p. 28-35, 2012.

SCHEUER P.J. Marine metabolites as drug leads – retrospect and prospect. In: LAZAROVICI, P. et al. (eds) **Biochemical aspects of marine pharmacology**, p.1-12, 1996.

SIAMOPOULOU, P.; BIMPLAKIS, A.; ILIOPOULOU, D.; VAGIAS, C.; COS, P.; BERGHE, D.V.; ROUSSIS, V. Diterpenes from the brown algae *Dictyota dichotoma* and *Dictyota linearis*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2025-2030, 2004.

SILBERFELD, T.; ROUSSEAU, F.; REVIERS, B. An updated classification of brown algae (Ochrophyta, Phaeophyceae). **Cryptogamie Algologie**, v. 35, n. 2, p. 117-156, 2014.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed, Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

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

SOEST, R.W.M; BOURY-ESNAULT, N.; HOOPER, J.N.A.; RÜTZLER, K.; DE VOOGD, N.J.; ALVAREZ DE GLASBY, B.; HAJDU, E.; PISERA, A.B.; MANCONI, R.; SCHOENBERG, C.; JANUSSEN, D.; TABACHNICK, K.R., KLAUTAU, M.; PICTON, B.; KELLY, M.; VACELET, J.; DOHRMANN, M.; DÍAZ, M.-C.; CÁRDENAS, P. World Porifera database: World Register of Marine Species. Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=170927>>. Acesso em: 22 Jan. 2016.

STENGEL, D.B.; CONNAN, S.; POPPER, Z.A. Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 5, p. 483-501, 2011.

SUN, H.H.; FENICAL, W. Diterpenoids of the brown seaweed *Glossophora galapagensis*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 340-341, 1979.

SUN, H.H.; MCCONNEL, O.J.; FENICAL, W.; HIROTSU, K.; CLARDY, J. Tricyclic diterpenoids of the dolastane ring system from the marine alga *Dictyota divaricata*. **Tetrahedron**, v. 37, p. 1237-1242, 1981.

SUZUKI, M.; YAMADA, H.; KURATA, K. Dicyterpenoids A and B, two novel diterpenoids with feeding-deterrent activity from the brown alga *Dilophus okamurae*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 121-125, 2002.

TAKIKAWA, M.; UNO, K.; OOI, T.; KUSUMI, T.; AKERA, S.; MURAMATSU, M.; MEGA, H.; HORITA, C. Crenulacetal C, a marine diterpene, and its synthetic mimics inhibiting *Polydora websteri*, a harmful lugworm damaging pearl cultivation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 3, p. 462-466, 1998.

TEIXEIRA, V.L. Produtos naturais de algas marinhas bentônicas. **Revista virtual de química**, 2013. Disponível em: <<http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewArticle/346>>. Acesso em: 10 Nov. 2015

TEIXEIRA, V.; KELECOM, A. A chemotaxonomic study of diterpenes from marine brown algae of the genus *Dictyota*. **The science of the total environment**, v. 75, p. 271-283, 1988.

TEIXEIRA, V.L.; TOMASSINI, T.; FLEURY, B.G.; KELECOM, A. Dolastane and secodolastane diterpenes from the marine brown alga, *Dictyota cervicornis*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 4, p. 570-575, 1986a.

TEIXEIRA, V.L.; TOMASSINI, T.; KELECOM, A. Cervicol, a further secodolastane diterpene from the marine brown alga *Dictyota cervicornis* Kützinger (Phaeophyceae, Dictyotaceae). **Bulletin des Sociétés Chimiques Belges**, v. 95, n. 4, 1986b.

TO, L.L. **Studies toward the total synthesis of C14-oxygenated dolastane natural products**. Hong Kong: The University of Hong Kong, 2008.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific, 1994. 238p.

VALERIA LENAUVILLE TEIXEIRA. Disponível em: < <http://lattes.cnpq.br/5633927174928633>>. Acesso em: 24 jan. 16.

VALLIM, M. A.; PAULA, J.C.; PEREIRA, R.C.; TEIXEIRA, V.L. The diterpenes from Dictyotacean marine brown algae in the Tropical Atlantic American region. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 1-16, 2005.

VALLIM, M.A.; BARBOSA, J.E.; CAVALCANTI, D.N.; DE-PAULA, J.C.; SILVA, V.A.G.G.; TEIXEIRA, V.L.; PAIXÃO, I.C.N.P. *In vitro* antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.4, n. 22, p. 2379-2382, 2010.

VALLIM, M.A.; TEIXEIRA, V.T.; PEREIRA, R.C. Feeding-deterrant properties of diterpenes of *Dictyota mertensii* (Phaeophyceae, Dictyotales). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 55, n. 3, p. 223-229, 2007.

VIANO, Y.; BONHOMME, D.; CAMPS, M.; BRIAND, J.; ORTALOMAGNÉ, A.; BLANCHE, Y.; PIOVETTI, L.; CULIOLI, G. Diterpenoids from the Mediterranean brown alga *Dictyota* sp. evaluated as antifouling substances against a marine bacterial biofilm. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1299-1304, 2009.

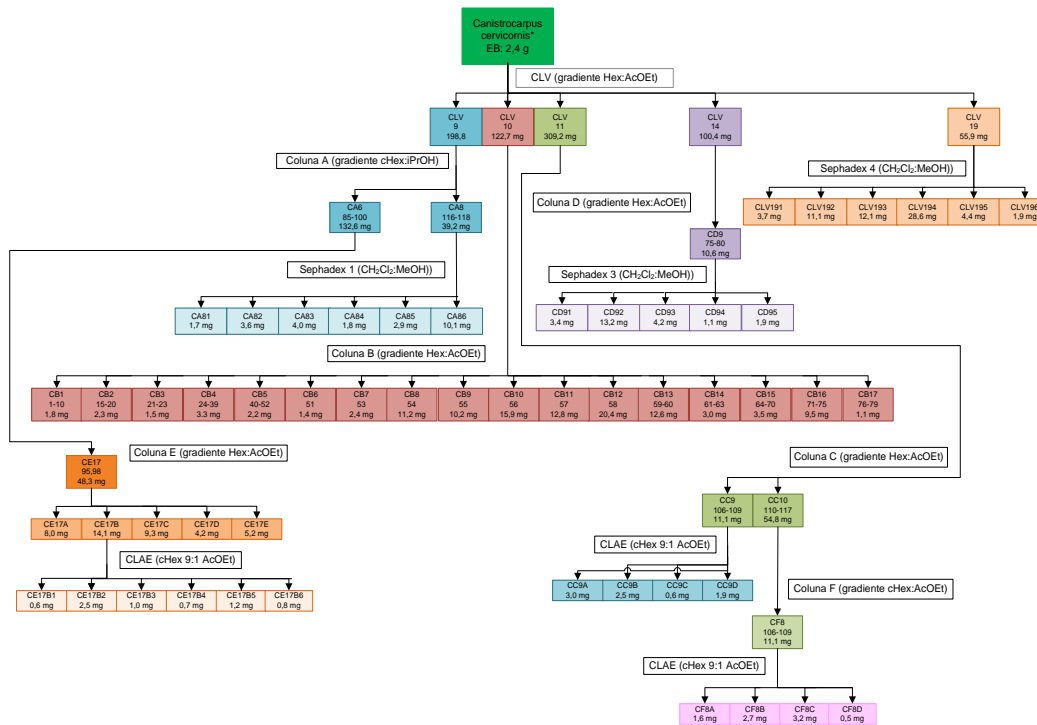
VICKERY, R. **A Dictionary of Plant-Lore**. Oxford: Oxford University Press, 1995.

YAMAJI, T.; SAITO, T.; HAYAMIZU, K.; YANAGISAWA, M.; YAMAMOTO, O. Spectral database for organic compounds: dipentyl phthalate. Disponível em: < http://sdfs.db.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct_frame_disp.cgi?sdfsno=3363>. Acesso em: 10 jan. 2016.

ZANFARDINO, A.; GAVAGNIN, M. Diterpene content of the alga *Dictyota ciliolata* from a Moroccan lagoon. **Phytochemical Letters**, v. 2, p. 211-215, 2009.

ZHELEVA-DIMITROVA, D.; ZHELEV, I.; DIMITROVA-DYULGEROVA, I. Antioxidant activity of some *Carduus* species growing in Bulgaria. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, n. 4, p. 15-20, 2011.

APÊNDICE A – PROCEDIMENTOS CROMATOGRÁFICOS DE *C. cervicornis* QUE NÃO RESULTARAM EM ISOLAMENTO DE COMPOSTOS.



APÊNDICE B – PROCEDIMENTOS CROMATOGRÁFICOS DE *D. mertensii* QUE NÃO RESULTARAM EM ISOLAMENTO DE COMPOSTOS.

