



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

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Laurencia*
Lamouroux NA COSTA SUL BRASILEIRA

TESE DE DOUTORADO

CINTIA LHULLIER

Florianópolis

2009

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

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Laurencia*
Lamouroux NA COSTA SUL BRASILEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Farmácia por Cíntia
Lhullier com requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em
Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel

Co-orientador: Profa. Dra. Miriam Falkenberg

Florianópolis

2009

“Não há nada como um sonho para criar o futuro”.

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel, pela orientação, por todo o conhecimento e atenção dedicados durante esses quatro anos de doutorado. E por se dedicar a trabalhar com um assunto o qual foi fascinante e desafiador ao mesmo tempo para nós dois.

A Profa. Dra. Miriam Falkenberg, pelo apoio, co-orientação, conhecimento e companherismo na viagem a Atenas. E por continuar acreditando em um sonho.

Ao Prof. Dr. Vassilios Roussis, da Universidade de Atenas, por todo o conhecimento na área de produtos naturais marinhos, disposição e atenção de me receber em seu laboratório no estágio de doutorado-sanduíche. E ao grupo de trabalho da Universidade de Atenas, pelo carinho e atenção.

Ao Prof. Dr Paulo Horta e todo grupo de trabalho, do Departamento de Ciências Biológicas (UFSC), pelo conhecimento em taxonomia e ecologia de macroalgas e pela amizade e companherismo nestes anos todos de trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge Palermo, da Universidade de Buenos Aires, pela realização dos espectros de ressonância magnética nuclear e por todo seu conhecimento na área de produtos naturais marinhos passados por meio de palestras nestes anos de cooperação com o grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Miguel Soriano Valparada Caro, do Departamento de Química (UFSC), pela realização dos espectros de ressonância magnética nuclear.

Aos Profs Drs Cláudia Simões, Mario Stendeil e Rosa Ribeiro-Do-Valle, dos Departamentos de Ciências Farmacêuticas, Ciências Biológicas e Farmacologia (UFSC), pela cooperação científica e os resultados de atividades biológicas presentes neste trabalho.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação em Farmácia por toda a minha formação durante estes quatro anos de doutorado.

As agências financiadoras, CAPES e CNPq pelas bolsas de doutorado e doutorado-sanduíche.

As técnicas de laboratório, Cláudia e Solange, pelo carinho, amizade e dedicação.

Aos meus colegas de laboratório, Geison, Karen, Maria Isabel, Tatiana, Andressa, Simone e Vanessa por todo carinho, amizade e troca de conhecimentos. Especial a Silvana, além de sermos colegas de doutorado, pela grande amizade durante esses quatro anos.

A minha querida amiga Dra. Danusa Menegaz por toda nossa amizade e companherismo.

A minha família, meus pais, Jacira e Francisco, por todo amor, carinho, amizade e por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos. A minha irmã Cristina pelo carinho.

Ao meu marido, Luciano Krug, por toda a paciência nestes quatro anos de doutorado. Pelo carinho, companherismo e muito amor.

SUMÁRIO

Listas de Figuras	
Listas de Quadros	
Lista de Abreviaturas	
Resumo	
Abstract	
Apresentação	14
Capítulo 1: Gênero <i>Laurencia</i> Lamouroux	18
Gênero <i>Laurencia</i> Lamouroux – Taxonomia	20
Gênero <i>Laurencia</i> Lamouroux – Estudos químicos	22
Gênero <i>Laurencia</i> Lamouroux – Atividades biológicas	26
Capítulo 2: Gênero <i>Laurencia microcladia</i>	29
Introdução	30
Publicação: Isolation of elatol from <i>Laurencia microcladia</i> and its palatability to the sea urchin <i>Echinometra lucunter</i>	35
Capítulo 3: Gênero <i>Laurencia catarinensis</i>	42
1. Introdução	43
2. Materiais e Métodos	44
2.1. Material Vegetal	44
2.2. Procedimentos Gerais	44
2.3. Procedimentos de Extração e Isolamento dos compostos de <i>L. catarinensis</i>	44
3. Resultados e Discussão	51
Capítulo 4: Gênero <i>Laurencia flagellifera</i>	240
1. Introdução	241
2. Materiais e Métodos	242
2.1. Material Vegetal	242
2.2. Procedimentos Gerais	242
2.3. Procedimentos de Extração e Isolamento dos compostos de <i>L. flagellifera</i>	242
3. Resultados e Discussão	244
Considerações Finais	259
Conclusões	264
Referências	267
Anexos – Capítulo 2	280

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1: Exemplos das diferentes classes de substâncias produzidas por espécies do gênero *Laurencia* Lamouroux. Sendo, sesquiterpenos halogenados (1) ou não (2), diterpenos (3), triterpenos (4), acetogeninas (5), isômeros de 6,7-diidroxipentadeca- 3,9,12-trienino-1 (lauredióis) (6) e éter cíclico de oito carbonos (7) (TEXEIRA; PEREIRA, 1999)..... 23

Figura 2: Estruturas dos compostos isolados do gênero *Laurencia* Lamouroux com atividades biológicas..... 28

Capítulo 2

Figura 1: Compostos isolados de *Laurencia microcladia*..... 31

Figura 2: CCD do extrato bruto de *Laurencia microcladia* (L.M) e ouriço do mar *Echinometra lucunter* (E.L), fase móvel: n-hexano:acetato de etila (9:1), revelador: anisaldeído-sulfúrico. A mancha azul representa o composto elatol..... 32

Capítulo 3

Figura 1: Organograma do isolamento dos compostos de *Laurencia catarinensis*..... 49

Figura 2: CCD do extrato orgânico de *Laurencia catarinensis*, fase móvel: n-hexano:acetato de etila (9:1), revelador: anisaldeído-sulfúrico..... 50

Figura 3: Sistema de spins $\text{CH}_{\text{ax}}\text{CH}_2\text{CH}_{\text{ax}}$ e estrutura parcial do anel oxigenado proposto para o composto 1..... 52

Figura 4: Anel A do composto 1..... 52

Figura 5: Anel B do composto 1..... 52

Figura 6: Correlações HMBC do composto 1..... 53

Figura 7: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização química do composto 1..... 54

Figura 8: Espectro de ^1H RMN do composto 1 (LC2) em CDCl_3 (400 MHz)..... 56

Figura 9: Espectro de ^{13}C RMN do composto 1 (LC2) em CDCl_3 (50 MHz)..... 57

Figura 10: Espectro HSQC-HSQC-DEPT do composto 1 (LC2) em CDCl_3 (400 MHz)..... 58

Figura 11: Espectro HMBC do composto 1 (LC2) em CDCl_3 (400 MHz)..... 59

Figura 12: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 1 (LC2) em CDCl_3 (400 MHz)..... 60

Figura 13: Espectro de massas por ionização química do composto 1 (LC2)..... 61

Figura 14: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização eletrônica do composto 2..... 62

Figura 15: Estrutura do composto 2 com dados observados no espectro de hidrogênio..... 63

Figura 16: Espectro de ^1H RMN do composto 2 (LC18) em CDCl_3 (400 MHz)..... 64

Figura 17: Espectro de massas por ionização eletrônica do composto 2 (LC18)..... 65

Figura 18: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização eletrônica do composto 3..... 66

Figura 19: Estrutura do composto 3 com correlações NOE e NOE diferencial..... 67

Figura 20: Espectro de ^1H RMN do composto 3 (LC7) em CDCl_3 (400 MHz)..... 69

Figura 21: Espectro HSQC-HSQC-DEPT do composto 3 (LC7) em CDCl_3 (400 MHz)..... 70

Figura 22: Espectro HMBC do composto 3 (LC7) em CDCl_3 (400 MHz)..... 71

Figura 23: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 3 (LC7) em CDCl_3 (400 MHz)..... 72

Figura 24: Espectro NOE do composto 3 (LC7) em CDCl_3 (400 MHz)..... 73

Figura 25: Espectro de massas por ionização eletrônica do composto 3 (LC7)..... 74

Figura 26: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 3 (LC7)..... 75

Figura 27: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização química do composto 4..... 76

Figura 28: Estrutura do composto 4 com correlações ^1H - ^1H COSY e NOE diferencial..... 77

Figura 29: Espectro de ^1H RMN do composto 4 (LC4) em CDCl_3 (400 MHz)..... 79

Figura 30: Espectro de ^{13}C RMN do composto 4 (LC4) em CDCl_3 (50 MHz)..... 80

Figura 31: Espectro HSQC-HSQC-DEPT do composto 4 (LC4) em CDCl_3 (400 MHz)..... 81

Figura 32: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 4 (LC4) em CDCl_3 (400 MHz)..... 82

Figura 33: Espectro NOE do composto 4 (LC4) em CDCl_3 (400 MHz)..... 83

Figura 34: Espectro de massas por ionização química do composto 4 (LC4)..... 84

Figura 35: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 4 (LC4).....	85
Figura 36: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização química do composto 5.....	86
Figura 37: Estrutura do composto 5.....	87
Figura 38: Espectro de ^1H RMN do composto 5 (LC5) em CDCl_3 (400 MHz).....	89
Figura 39: Espectro de ^{13}C RMN do composto 5 (LC5) em CDCl_3 (50 MHz).....	90
Figura 40: Espectro HSQC-HSQC-DEPT do composto 5 (LC5) em CDCl_3 (400 MHz).....	91
Figura 41: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 5 (LC5) em CDCl_3 (400 MHz).....	92
Figura 42: Espectro NOE do composto 5 (LC5) em CDCl_3 (400 MHz).....	93
Figura 43: Espectro de massas por ionização química do composto 5 (LC5).....	94
Figura 44: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 5 (LC5).....	95
Figura 45: Estrutura do composto 6.....	96
Figura 46: Espectro de ^1H RMN do composto 6 (LC8) em CDCl_3 (400 MHz).....	98
Figura 47: Fragmentação observada no espectro de massas por impacto de elétron do composto 7.....	99
Figura 48: Estrutura do composto 7 com correlações NOE diferencial.....	100
Figura 49: Espectro de ^1H RMN do composto 7 (LC22) em CDCl_3 (400 MHz).....	102
Figura 50: Espectro HSQC-HSQC-DEPT do composto 7 (LC22) em CDCl_3 (400 MHz).....	103
Figura 51: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 7 (LC22) em CDCl_3 (400 MHz).....	104
Figura 52: Espectro de massas por ionização eletrônica do composto 7 (LC22).....	105
Figura 53: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 7 (LC22).....	106
Figura 54: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização química do composto 8.....	107
Figura 55: Estrutura do composto 8 com correlações COSY e NOE diferencial.....	108
Figura 56: Espectro de ^1H RMN do composto 8 (LC26) em CDCl_3 (400 MHz).....	110
Figura 57: Espectro de HSQC-HSQC-DEPT do composto 8 (LC26) em CDCl_3 (400 MHz).....	111
Figura 58: Espectro de HMBC do composto 8 (LC26) em CDCl_3 (400 MHz).....	112
Figura 59: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 8 (LC26) em CDCl_3 (400 MHz).....	113
Figura 60: Espectro NOE do composto 8 (LC26) em CDCl_3 (400 MHz).....	114
Figura 61: Espectro de massas por ionização química do composto 8 (LC26).....	115
Figura 62: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 8 (LC26).....	116
Figura 63: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização eletrônica do composto 9.....	117
Figura 64: Estrutura do composto 9.....	118
Figura 65: Espectro de ^1H RMN do composto 9 (LC19) em CDCl_3 (400 MHz).....	120
Figura 66: Espectro de ^{13}C RMN do composto 9 (LC19) em CDCl_3 (50 MHz).....	121
Figura 67: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 9 (LC19) em CDCl_3 (400 MHz).....	122
Figura 68: Espectro de massas por ionização eletrônica do composto 9 (LC19).....	123
Figura 69: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização eletrônica do composto 10.....	125
Figura 70: Estrutura do composto 10 com correlações ^1H - ^1H COSY e HMBC.....	126
Figura 71: Espectro de ^1H RMN do composto 10 (LC10) em CDCl_3 (400 MHz).....	128
Figura 72: Espectro de ^{13}C RMN do composto 10 (LC10) em CDCl_3 (50 MHz).....	129
Figura 73: Espectro HSQC-HSQC-DEPT do composto 10 (LC10) em CDCl_3 (400 MHz).....	130
Figura 74: Espectro HMBC do composto 10 (LC10) em CDCl_3 (400 MHz).....	131
Figura 75: Espectro H-H COSY do composto 10 (LC10) em CDCl_3 (400 MHz).....	132
Figura 76: Espectro NOE do composto 10 (LC10) em CDCl_3 (400 MHz).....	133
Figura 77: Espectro NOE diferencial do composto 10 (LC10) em CDCl_3 (400 MHz).....	134
Figura 78: Espectro NOE diferencial do composto 10 (LC10) em CDCl_3 (400 MHz).....	135
Figura 79: Espectro de massas por ionização eletrônica do composto 10 (LC10).....	136
Figura 80: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 10 (LC10).....	137
Figura 81: Estrutura do composto 11 com correlações HMBC.....	138
Figura 82: Espectro de ^1H RMN do composto 11 (LC20) em CDCl_3 (400 MHz).....	140
Figura 83: Espectro HSQC-DEPT do composto 11 (LC20) em CDCl_3 (400 MHz).....	141
Figura 84: Espectro HMBC do composto 11 (LC20) em CDCl_3 (400 MHz).....	142

Figura 85: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 11 (LC20) em CDCl_3 (400 MHz).....	143
Figura 86: Espectro de massas por ionização eletrônica do composto 11 (LC20).....	144
Figura 87: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização química do composto 12.....	145
Figura 88: Estrutura do composto 12 com correlações HMBC e NOE diferencial.....	146
Figura 89: Espectro de ^1H RMN do composto 12 (LC27) em CDCl_3 (400 MHz).....	149
Figura 90: Espectro de ^{13}C RMN do composto 12 (LC27) em CDCl_3 (50 MHz).....	149
Figura 91: Espectro HSQC-HSQC-DEPT do composto 12 (LC27) em CDCl_3 (400 MHz).....	150
Figura 92: Espectro HMBC do composto 12 (LC27) em CDCl_3 (400 MHz).....	151
Figura 93: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 12 (LC27) em CDCl_3 (400 MHz).....	152
Figura 94: Espectro NOE do composto 12 (LC27) em CDCl_3 (400 MHz).....	153
Figura 95: Espectro NOE diferencial do composto 12 (LC27) em CDCl_3 (400 MHz).....	154
Figura 96: Espectro NOE diferencial do composto 12 (LC27) em CDCl_3 (400 MHz).....	155
Figura 97: Espectro de massas por ionização química do composto 12 (LC27).....	156
Figura 98: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 12 (LC27).....	157
Figura 99: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização química do composto 13.....	158
Figura 100: Estrutura do composto 13 com base em experimentos NOE diferencial.....	159
Figura 101: Espectro de ^1H RMN do composto 13 (LC28) em CDCl_3 (400 MHz).....	160
Figura 102: Espectro de ^{13}C RMN do composto 13 (LC28) em CDCl_3 (50 MHz).....	161
Figura 103: Espectro HSQC-HSQC-DEPT do composto 13 (LC28) em CDCl_3 (400 MHz).....	162
Figura 104: Espectro HMBC do composto 13 (LC28) em CDCl_3 (400 MHz).....	163
Figura 105: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 13 (LC27) em CDCl_3 (400 MHz).....	164
Figura 106: Espectro NOE do composto 13 (LC28) em CDCl_3 (400 MHz).....	165
Figura 107: Espectro NOE diferencial do composto 13 (LC28) em CDCl_3 (400 MHz).....	166
Figura 108: Espectro NOE diferencial do composto 13 (LC28) em CDCl_3 (400 MHz).....	167
Figura 109: Espectro de massas por ionização química do composto 13 (LC28).....	168
Figura 110: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 13 (LC28).....	169
Figura 111: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização química do composto 14.....	171
Figura 112: Estrutura do composto 14 com correlações ^1H - ^1H COSY.....	172
Figura 113: Espectro de ^1H RMN do composto 14 (LC3) em CDCl_3 (400 MHz).....	174
Figura 114: Espectro de ^{13}C RMN do composto 14 (LC3) em CDCl_3 (50 MHz).....	175
Figura 115: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 14 (LC3) em CDCl_3 (400 MHz).....	176
Figura 116: Espectro de massas por ionização química do composto 14 (LC3).....	177
Figura 117: Estrutura do composto 15 com base nos dados de ^1H RMN.....	178
Figura 118: Espectro de ^1H RMN do composto 15 (LC6) em CDCl_3 (400 MHz).....	179
Figura 119: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização química do composto 16.....	180
Figura 120: Estrutura do composto 16 com correlações HMBC.....	181
Figura 121: Espectro de ^1H RMN do composto 16 (LC14) em CDCl_3 (400 MHz).....	182
Figura 122: Espectro de ^{13}C RMN do composto 16 (LC14) em CDCl_3 (50 MHz).....	183
Figura 123: Espectro HSQC-DEPT do composto 16 (LC14) em CDCl_3 (400 MHz).....	184
Figura 124: Espectro HMBC do composto 16 (LC14) em CDCl_3 (400 MHz).....	185
Figura 125: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 16 (LC14) em CDCl_3 (400 MHz).....	186
Figura 126: Espectro NOE do composto 16 (LC14) em CDCl_3 (400 MHz).....	187
Figura 127: Espectro de massas por ionização química do composto 16 (LC14).....	188
Figura 128: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 16 (LC14).....	189
Figura 129: Estrutura do composto 17 com correlações ^1H - ^1H COSY e HMBC.....	190
Figura 130: Espectro de ^1H RMN do composto 17 (LC25) em CDCl_3 (400 MHz).....	192
Figura 131: Espectro de ^{13}C RMN do composto 17 (LC25) em CDCl_3 (50 MHz).....	193
Figura 132: Espectro de HSQC-DEPT do composto 17 (LC25) em CDCl_3 (400 MHz).....	194
Figura 133: Espectro de HMBC do composto 17 (LC25) em CDCl_3 (400 MHz).....	195
Figura 134: Espectro de ^1H - ^1H COSY do composto 17 (LC25) em CDCl_3 (400 MHz).....	196
Figura 135: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização eletrônica do composto	

18	197
Figura 136: Estrutura do composto 18 com correlações ^1H - ^1H COSY.....	198
Figura 137: Espectro de ^1H RMN do composto 18 (LC12) em CDCl_3 (400 MHz).....	200
Figura 138: Espectro de ^{13}C RMN do composto 18 (LC12) em CDCl_3 (50 MHz).....	201
Figura 139: Espectro de HSQC-DEPT do composto 18 (LC12) em CDCl_3 (400 MHz).....	202
Figura 140: Espectro de HMBC do composto 18 (LC12) em CDCl_3 (400 MHz).....	203
Figura 141: Espectro de ^1H - ^1H COSY do composto 18 (LC12) em CDCl_3 (400 MHz).....	204
Figura 142: Espectro de massas por ionização eletrônica do composto 18 (LC12).....	205
Figura 143: Fragmentação proposta através do espectro de massas por ionização química do composto 19	206
Figura 144: Estrutura do composto 19 com correlações ^1H - ^1H COSY e HMBC.....	207
Figura 145: Espectro de ^1H RMN do composto 19 (LC24) em CDCl_3 (400 MHz).....	209
Figura 146: Espectro de ^{13}C RMN do composto 19 (LC24) em CDCl_3 (50 MHz).....	210
Figura 147: Espectro de HSQC-DEPT do composto 19 (LC24) em CDCl_3 (400 MHz).....	211
Figura 148: Espectro de HMBC do composto 19 (LC24) em CDCl_3 (400 MHz).....	212
Figura 149: Espectro de ^1H - ^1H COSY do composto 19 (LC24) em CDCl_3 (400 MHz).....	213
Figura 150: Espectro de massas do composto 19 (LC24) por ionização química.....	214
Figura 151: Fragmentação em relação ao espectro de massas do composto 20 por ionização eletrônica.....	215
Figura 152: Estrutura do composto 20 com correlações ^1H - ^1H COSY e HMBC.....	216
Figura 153: Espectro de ^1H RMN do composto 20 (LC15) em CDCl_3 (400 MHz).....	218
Figura 154: Espectro de ^{13}C RMN do composto 20 (LC15) em CDCl_3 (50 MHz).....	219
Figura 155: Espectro de HSQC-DEPT do composto 20 (LC15) em CDCl_3 (400 MHz).....	220
Figura 156: Espectro de HMBC do composto 20 (LC15) em CDCl_3 (400 MHz).....	221
Figura 157: Espectro de ^1H - ^1H COSY do composto 20 (LC15) em CDCl_3 (400 MHz).....	222
Figura 158: Espectro de massas do composto 20 (LC15) por ionização eletrônica.....	223
Figura 159: Fragmentação através de espectro de massas do composto 21 por ionização eletrônica.....	224
Figura 160: Estrutura do composto 21 com correlações ^1H - ^1H COSY e HMBC.....	225
Figura 161: Espectro de ^1H RMN do composto 21 (LC21) em CDCl_3 (400 MHz).....	227
Figura 162: Espectro de ^{13}C RMN do composto 21 (LC21) em CDCl_3 (50 MHz).....	228
Figura 163: Espectro de HSQC-DEPT do composto 21 (LC21) em CDCl_3 (400 MHz).....	229
Figura 164: Espectro de HMBC do composto 21 (LC21) em CDCl_3 (400 MHz).....	230
Figura 165: Espectro de ^1H - ^1H COSY do composto 21 (LC21) em CDCl_3 (400 MHz).....	231
Figura 166: Espectro de massas do composto 21 (LC21) por ionização eletrônica.....	232
Figura 167: Estrutura do composto 22	233
Figura 168: Estrutura do composto 23	233
Figura 169: Estrutura do composto 24	233
Figura 170: Espectro de ^1H RMN do composto 22 (LC01) em CDCl_3 (400 MHz).....	234
Figura 171: Espectro de ^{13}C RMN do composto 22 (LC01) em CDCl_3 (50 MHz).....	235
Figura 172: Espectro de ^1H RMN do composto 23 (LC11) em CDCl_3 (400 MHz).....	236
Figura 173: Espectro de ^{13}C RMN do composto 23 (LC11) em CDCl_3 (50 MHz).....	237
Figura 174: Espectro de ^1H RMN do composto 24 (LC17) em CDCl_3 (400 MHz).....	238
Capítulo 4	
Figura 1: Organograma do isolamento dos compostos de <i>Laurencia flagellifera</i>	243
Figura 2: Estrutura do composto PPTLF com correlações ^1H - ^1H COSY.....	244
Figura 3: Espectro ^1H RMN do composto PPTFL em DMSO (500 MHz).....	246
Figura 4: Espectro de correlação HSQC do composto PPTFL em DMSO (500 MHz).....	247
Figura 5: Espectro de correlação ^1H - ^1H COSY do composto PPTFL em DMSO (500 MHz).....	248
Figura 6: Espectro ^1H RMN do composto PPTFL acetilado em CDCl_3 (300 MHz).....	249
Figura 7: Espectro ^{13}C RMN do composto PPTFL acetilado em CDCl_3 (75 MHz).....	250
Figura 8: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto PPTFL acetilado em CDCl_3 (300 MHz).....	251
Figura 9: Estrutura geral do composto GLIF6 com dados obtidos do espectro de hidrogênio.....	253
Figura 10: Espectro de ^1H RMN do composto GLIF6 em MeOD (500 MHz).....	254
Figura 11: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto GLIF6.....	255

Figura 12: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto GLIF6.....	256
Figura 13: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto GLIF6.....	257
Figura 14: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto GLIF6.....	258
Considerações Finais	
Figura 1: Reação química catalizada pela V- BrPO (CARTER-FRANKLIN & BUTLER, 2004).....	261
Figura 2: Sequência da biogênese dos sesquiterpenos caespitol e isocaespitol proposta por GONZÁLEZ et al. (1976), adaptado.....	262
Anexos – Capítulo 2	
Figura 1: Espectro de ¹ H RMN do extrato orgânico de <i>Laurencia microcladia</i> em CDCl ₃ (400 MHz).....	281
Figura 2: Espectro de ¹ H RMN com integração da substância elatol em CDCl ₃ (500 MHz).....	282
Figura 3: Expansão do espectro de ¹ H RMN da substância elatol em CDCl ₃ (500 MHz).....	283
Figura 4: Expansão do espectro de ¹ H RMN da substância elatol em CDCl ₃ (500 MHz).....	284
Figura 5: Espectro de ¹³ C RMN da substância elatol em CDCl ₃ (125 MHz).....	285
Figura 6: Espectro de DEPT 135 da substância elatol em CDCl ₃ (125 MHz).....	286
Figura 7: Espectro de correlação HSQC da substância elatol em CDCl ₃ (500 MHz).....	287
Figura 8: Espectro de correlação HMBC da substância elatol em CDCl ₃ (500 MHz).....	288
Figura 9: Espectro de correlação ¹ H - ¹ H COSY da substância elatol em CDCl ₃ (500 MHz).....	289
Figura 10 Espectro de correlação ROESY da substância elatol em CDCl ₃ (500 MHz).....	290
Figura 11: Espectro de massas por ionização eletrônica da substância elatol.....	291

LISTA DE QUADROS

Capítulo 1

Quadro 1: Algas marinhas do gênero *Laurencia* Lamouroux e seus respectivos metabólitos conforme revisões publicadas entre 1998 a 2001 (FAULKNER) e 2002 a 2008 (BLUNT et al.)..... **24, 25 e 26**

Capítulo 3

Quadro 1: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 1 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0) com a literatura (Wessel et al. 2000; González et al. 1979)..... **55**

Quadro 2: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 2 (400 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0) com a literatura (Wessel et al., 2000)..... **63**

Quadro 3: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 3 (400 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0)..... **68**

Quadro 4: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 4 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0)..... **78**

Quadro 5: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 5 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0)..... **88**

Quadro 6: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 6 (400 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0) comparados com a literatura (Wessel et al., 2000; González et al., 1979)..... **97**

Quadro 7: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 7 (400 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0)..... **101**

Quadro 8: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 8 (400 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0)..... **109**

Quadro 9: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 9 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0) comparados com a literatura (Chang et al., 1989)..... **119**

Quadro 10: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 10 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0)..... **127**

Quadro 11: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 11 (400 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0) em comparação com a literatura (Wessel et al., 2000)..... **139**

Quadro 12: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 12 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0)..... **147**

Quadro 13: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 13 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0)..... **159**

Quadro 14: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 14 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0) em comparação com a literatura (González et al., 1975, 1979)..... **173**

Quadro 15: Dados de ^1H do composto 15 (400 MHz; CDCl_3 H= 7,24) em comparação com a literatura (González et al., 1980)..... **178**

Quadro 16: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 16 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0)..... **181**

Quadro 17: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 17 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0)..... **191**

Quadro 18: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 18 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0)..... **199**

Quadro 19: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 19 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0)..... **208**

Quadro 20: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 20 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0) em comparação com a literatura (Britto et al., 2006)..... **217**

Quadro 21: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 21 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0)..... **226**

Capítulo 4

Quadro 1: Dados de ^1H e ^{13}C (DMSO) do composto PPTFL e do composto acetilado (CDCl_3)..... **245**

Quadro 2: Dados de ^1H RMN do composto GLIF6 (MeOD) em comparação com dados da literatura (Keusgen et al., 1997; Sasaki et al., 2001)..... **253**

LISTA DE ABREVIATURAS

¹³C RMN: ressonância magnética nuclear de carbono 13

¹H RMN: ressonância magnética nuclear de hidrogênio

AcOEt: acetato de etila

CC₅₀ : concentração citotóxica 50%

CCD : cromatografia em camada delgada

CCV : coluna cromatográfica a vácuo

CDCl₃: clorofórmio deuterado

CE₅₀ : concentração efetiva 50%

CI₅₀ : concentração inibitória 50%

CIMS : espectros de massas por ionização química

CLAE : cromatografia líquida de alta eficiência

DMSO : dimetilsulfóxido

EIMS : espectros de massas por ionização eletrônica

HSV1: vírus herpético simples tipo 1

HSV2: vírus herpético simples tipo 2

IV: infravermelho

MeOH : metanol

MTT : ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium

UV : ultravioleta

RESUMO

RESUMO

O complexo *Laurencia* Lamouroux (Rhodophyceae) compreende quatro gêneros com grande variabilidade morfológica que representam os maiores produtores de metabólitos secundários do ambiente marinho. As substâncias provenientes destas algas são predominantemente sesquiterpenos, diterpenos e C₁₅-acetogeninas que usualmente são caracterizados pela presença de átomos de halogênio em suas estruturas. Existem mais de 19 espécies catalogadas e na região sul observa-se a presença das espécies *Laurencia obtusa*, *L. microcladia*, *L. majuscula*, *L. catarinensis* e *L. flagellifera*. O estudo químico do extrato orgânico de *Laurencia microcladia* indicou a presença de um metabólito majoritário conhecido como elatol, encontrado em outras espécies de *Laurencia* Lamouroux. Estudos em cromatografia delgada demonstraram a presença dessa substância em extratos de organismos como ouriço do mar (*Echinometra lucunter*) e pepino do mar (*Holothuria grisea*). Foram realizados ensaios de herbivoria com ouriços do mar indicando que este composto apesar de apresentar atividade anti-herbivoria foi consumido pelos ouriços até a concentração de 0,2 mg/pellets. A investigação de atividades biológicas com o elatol obtido neste trabalho, indicou atividade tripanocida frente ao *Trypanosoma cruzi* (CI₅₀ = 13,86 (12,39-15,51) µM) e leishmanicida frente a *Leishmania amazonensis* (CI₅₀ = 2,54 (2,44-2,64) µM) e *L. chagasi* (CI₅₀ = 2,56 (1,94-3,38) µM), mas não apresentou atividade antiviral frente aos vírus herpéticos do tipo 1 (2 cepas) [modelo viral de genoma DNA], e do rotavírus SA-11 [modelo viral de genoma RNA]. Também apresentou atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* para células B16F10 (melanoma). A investigação química do extrato orgânico de *Laurencia catarinensis* resultou no isolamento de cerca de 40 compostos puros, dentre os quais, 21 possuem características estruturais semelhantes. Destes 21 compostos, treze compostos são inéditos na literatura e identificados como: o-metilfurocaespitano e seu estereoisômero, o isômero do caespitano, o derivado 5-acetoxi do caespitol, o derivado 5-acetoxi do caespitano, o derivado 5-acetoxi do 8-acetilcaespitol, o derivado 5-hidroxi do 8-acetilcaespitol, o derivado 5-acetoxi do laucapiranóide A, o derivado 5-hidroxi laucapiranóide, o derivado do isocaespitol, dois derivados do caespitol e derivado do sniderol. Adicionalmente, os compostos caespitol e isocaespitol foram submetidos a avaliação antitumoral em células T47D (tumor de mama), U373 (glioblastoma), A549 (câncer de pulmão) e PC3 (câncer de próstata) verificando-se atividade nas três últimas linhagens. Os compostos caespitol e derivado 5-acetoxi do caespitol não apresentaram atividade antiviral frente aos vírus herpéticos do tipo 1 (2 cepas) [modelo viral de genoma DNA], e do rotavírus SA-11 [modelo viral de genoma RNA]. O estudo químico do extrato aquoso de *Laurencia flagellifera* indicou a presença de dois compostos majoritários conhecidos como monogalactopiranosilglicerol e sulfoquinovosildiacilglicerol.

Palavras-chaves: *Laurencia microcladia*, *Laurencia catarinensis*, *Laurencia flagellifera*, *Echinometra lucunter*, herbivoria, sesquiterpenos, glicolipídeos

ABSTRACT

The complex *Laurencia* Lamouroux (Rhodophyceae) is formed by four genus with morphologic variability that represents the more important producers of secondary metabolites from the marine environment. The substances that come from this seaweed are predominantly sesquiterpenes, diterpenes and C₁₅-acetogenins that usually are characterized by the presence of halogen atoms in their structures. There are more than 19 species catalogued. In Brazilian south area we can observed the following species: *Laurencia obtusa*, *L. catarinensis*, *L. majuscula*, *L. flagellifera*. The chemical investigation of the organic extract from *Laurencia microcladia* show the presence of one metabolite known as elatol, found in other species of *Laurencia* Lamouroux. Studies in thin layer chromatography had demonstrated the presence of this substance in extracts of organisms like sea urchin (*Echinometra lucunter*) and sea cucumber (*Holothuria grisea*). Experiments of herbivory with sea urchin showed that elatol in despite of anti-herbivory activity was consumed by the urchin until the concentration of 0,2mg/pellets. The investigation of biological activities with the elatol obtained in this work, indicated trypanocide activity to the *Trypanosoma cruzi* (IC₅₀ = 13,86 (12,39-15,51) μM) and leishmanicide to the *Leishmania amazonensis* (IC₅₀ = 2,54 (2,44-2,64 μM) and *L. chagasi* (IC₅₀ = 2,56 (1,94-3,38μM), but didn't show antiviral activity to the herpetic virus type 1 (2 cepas) [viral model of genome DNA], and rotavirus SA-11 [viral model of genome RNA]. Also showed antitumoral activity *in vitro* and *in vivo* for cells B16F10 (melanoma). Through chemical investigation of organic extract of *Laurencia catarinensis* we could isolate about 40 pure compounds, amongst which, 21 have similar structural characteristics. Among these 21 compounds, we found thirteen unknown compounds and identified as: o-metilfurocaespitane and his stereoisomer, one isomer from caespitane, one derived 5-acetyloxy from caespitol, one derived 5-acetyloxy from caespitane, one derived from 5-acetyloxy of 8-acetylcaespitol, one derived 5-hidroxy from 8-acetylcaespitol, one derived from 5-acetoxy laucapyranoide, one derived from 5-hidroxy laucapyranoide, one derivative from isocaespitol, two derivated from caespitol and one derivaved from snyderol. The compounds caespitol and isocaespitol had been tested by partners for antitumoral activity in cells T47D (breast tumor), U373 (glioblastoma), A549 (lung cancer) and PC3 (prostate cancer) and was verified activity in the three last culture of cells. The compounds caespitol and one derived 5-acetoxy from caespitol didn't show antiviral activity against herpetic virus type 1 (2 cepas) [viral model of genome DNA], and rotavirus SA-11 [viral model of genome RNA]. The chemical investigation of *Laurencia flagellifera*'s water extract showed the presence of two known majority compounds as monogalactopyranosilglycerol and sulfoquinovosyldiacilglycerol.

Key words: *Laurencia microcladia*, *Laurencia catarinensis*, *Laurencia flagellifera*, *Echinometra lucunter*, herbivory, sesquiterpenes, glycolipids

APRESENTAÇÃO

1. APRESENTAÇÃO

O oceano é considerado uma grande fonte para candidatos a fármacos. Produtos naturais marinhos têm despertado interesses no mundo científico nas últimas cinco décadas. O grande potencial das novas substâncias descobertas vem atraindo cientistas de diversas áreas, como química orgânica, farmacologia, química farmacêutica, biologia e ecologia. Em virtude do descobrimento do amplo potencial biológico dos produtos naturais de origem marinha aliada à sua variedade estrutural e o desenvolvimento de bioensaios *in vitro*, ocorreu, nos últimos anos, um aumento significativo no número de grupos de pesquisa em todo o mundo, resultando em mais de 9.000 substâncias identificadas, incluindo acetogeninas, policetídeos, terpenos, alcalóides, peptídeos, entre outros ((BHAKUNI; RAWAT, 2005; BLUNT et al., 2008).

Por volta de 1960, houve grande investimento por parte de indústrias farmacêuticas na busca de substâncias bioativas a partir dos organismos marinhos. A descoberta de grandes quantidades de prostaglandinas em um octocoral (*Plexaura homomalla*) despertou o interesse dos cientistas (WEINHEIMER; SPRAGGINS, 1969; VALMSEN et al., 2001; SCHNEIDER et al., 2002). O primeiro estudo referente à química de organismos marinhos no Brasil tratou do isolamento do colesterol a partir do organismo *Echinometra lucunter*, em 1963, por Tursch, Barreto e Sharapin, sendo que o primeiro era, na ocasião, professor da Universidade de Bruxelas, Bélgica. O Prof. Dr. Bernard Tursch é considerado o pioneiro do estudo da química marinha no contexto nacional e seus estudos foram realizados quando ele aqui residiu, por dois anos, como pesquisador visitante, iniciando um grupo de pesquisas no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) da UFRJ.

Após seu regresso à Bélgica, as pesquisas prosseguiram graças ao Prof. Dr. Alphonse Kelecom. Os trabalhos liderados por este pesquisador serviram para nuclear dois fortes grupos na área de química de produtos marinhos no Brasil: Aquele liderado pela Profa. Dra. Rosângela Epifânio (Instituto de Química/UFF) e o coordenado pelo Prof. Dr. Ângelo da Cunha Pinto (Instituto de Química/UFRJ). Adicionalmente, formou-se um terceiro grupo, coordenado pelo Prof. Dr. Roberto Berlinck (Instituto de Química/Universidade Federal de São Carlos).

Como exemplo de trabalhos conduzidos pela primeira equipe, pode-se citar aqueles realizados com gorgônias, esponjas, ascídeas e octocorais (MARTINS; EPIFANIO, 1998; EPIFANIO et al., 1999; MAIA et al., 1999; VERVOORT; FENICAL; EPIFANIO, 2000; MAIA; EPIFANIO; FENICAL, 2000; EPIFANIO; MAIA; FENICAL, 2000; COUTINHO et al., 2002). Pode-se também citar o trabalho realizado pelo segundo grupo (KAISER; PITOMBO; PINTO, 2001). Os trabalhos do grupo do Prof. Berlinck iniciaram-se em 1996, quando se conduziu o primeiro estudo com extratos brutos de esponjas, objetivando a detecção de atividades citotóxica e hemolítica, entre outras (BERLINCK et al., 1996) e, recentemente, ele publicou uma grande revisão a respeito do estudo de produtos marinhos no Brasil (BERLINCK

et al., 2004). Além disso, o grupo da UFRGS publicou uma triagem das atividades quimiotática, antibacteriana e antifúngica de esponjas coletadas na costa catarinense (MONKS et al., 2002).

Em relação ao estudo de substâncias produzidas por algas marinhas brasileiras, o grupo das algas pardas é majoritário na produção bibliográfica, sendo rico em compostos terpênicos, especialmente da classe dos diterpenos (KELECOM, 1997, FLEURY et al., 1994; TEIXEIRA et al., 1991; KELECOM; TEIXEIRA, 1987). Em relação a outras macroalgas, como as Rodofitas (algas vermelhas), cujas espécies predominam no litoral de Santa Catarina (OLIVEIRA FILHO, 1977; HORTA et al., 2001), a maior parte dos estudos internacionais concentra-se no gênero *Laurencia*, mas as espécies da costa brasileira ainda são muito pouco estudadas. Atualmente, estão sendo desenvolvidas pesquisas na área de produtos naturais marinhos, em várias instituições brasileiras, tais como UFRJ, UFF, UFPR, UFC, USP, UFBA, UFRGS e, mais recentemente, na própria UFSC.

Na América Latina, há a existência de dois grandes grupos, um localizado na Universidade de Buenos Aires (Argentina) e outro na Universidade Nacional da Colômbia. No que diz respeito aos trabalhos conduzidos pelos grupos de pesquisa liderados pelos Professores Drs. Jorge Palermo (Argentina) e Carmenza Duque (Colômbia), eles tratam principalmente de investigações químicas e farmacológicas de algas, tunicatos, corais e esponjas, coletados em diferentes regiões destes dois países (FRANCO et al., 1998; PALERMO et al., 1998; 2000; BRASCO et al., 2001; PETRICHTCHEVA et al., 2002; ZULETA et al., 2002; CALDERON et al., 2004; PUYANA et al., 2004; URUBIRU et al., 2004).

O complexo *Laurencia* Lamouroux (Rhodophyceae) compreende quatro gêneros com grande variabilidade morfológica (NAM, 2006): *Laurencia sensu stricto*, *Chondrophycus* (Tokida et Saito) Garbary et J.T. Harper, *Palisada* K.W. Nam e *Osmundea* Stackhouse que representam os maiores produtores de metabólitos secundários do ambiente marinho (WRIGHT et al., 2003; LYAKHOVA et al., 2004). As substâncias provenientes destas algas são predominantemente sesquiterpenos, diterpenos e C₁₅-acetogeninas que usualmente são caracterizados pela presença de átomos de halogênio em suas estruturas (KÖNIG; WRIGHT, 1997).

A ocorrência de espécies do gênero *Laurencia* Lamouroux na costa brasileira já foi mapeada por pesquisadores da USP e está disponível no site Algamare (www.ib.usp.br/algamare-br/). Existem mais de 19 espécies catalogadas e na região sul observa-se a presença das espécies *Laurencia obtusa*, *microcladia*, *majuscula*, *catarinensis* e *Palisada flagellifera*. A espécie *Laurencia obtusa* está distribuída em praticamente todos os estados da costa brasileira, exceto em Pernambuco e Maranhão.

Dentre as espécies catalogadas para a costa sul brasileira a espécie *Laurencia obtusa*, seguida por *Laurencia majuscula* são as que possuem mais estudos químicos, sendo isolados compostos na sua maioria pertencentes à classe de terpenos (FAULKNER, 1998, 1999, 2000,

2001; BLUNT et al., 2003). Já para espécie *Laurencia microcladia* observa-se a predominância de compostos pertencentes à classe dos sesquiterpenos halogenados (KLADI et al., 2005, 2006, 2007; GUELLA et al., 2002, 2003) e diterpenos (GUELLA et al., 1997, 1998, 2000). Para as espécies *Palisada flagellifera* e *Laurencia catarinensis* não foram encontrados trabalhos relacionados com o isolamento e elucidação estrutural de metabólitos secundários.

Como objetivos específicos, foram estabelecidos:

Isolamento e elucidação estrutural de compostos majoritários da espécie *Laurencia microcladia* Kützing.

Avaliação do possível papel ecológico dos compostos majoritários da espécie *Laurencia microcladia* em ouriços da espécie *Echinometra lucunter*.

Isolamento e elucidação estrutural de compostos presentes na espécie *Laurencia catarinensis* Codeiro-Marino et M.T. Fujii.

Isolamento e elucidação estrutural de compostos presentes na espécie *Laurencia flagellifera* J. Agarh.

O presente trabalho está organizado em quatro capítulos.

O primeiro capítulo apresenta uma revisão da literatura sobre o gênero *Laurencia* Lamouroux englobando tópicos sobre taxonomia, aspectos químicos e atividade biológica de metabólitos encontrados em espécies deste gênero.

O segundo capítulo apresenta o isolamento e a elucidação estrutural do composto majoritário presente na espécie *Laurencia microcladia*, sua atividade ecológica frente a ouriços marinhos da espécie *Echinometra lucunter* e possíveis atividades farmacológicas deste composto.

O terceiro capítulo apresenta o isolamento e a elucidação estrutural de 21 compostos presentes na espécie *Laurencia catarinensis* que possuem propriedades estruturais semelhantes ao caespitol e 3 compostos com estruturas não semelhantes ao caespitol.

O quarto capítulo apresenta o isolamento e a elucidação estrutural de dois compostos majoritários presentes no extrato aquoso da espécie *Laurencia flagellifera*.

CAPÍTULO 1: GÊNERO *Laurencia Lamouroux*

O ambiente marinho é um sistema extremamente competitivo, colonizado por uma grande variedade de algas e invertebrados, os quais competem por espaço (substratos sólidos), luz e nutrientes. Além disso, devem defender-se de microorganismos patógenos e de possíveis predadores. Os invertebrados marinhos, em particular as esponjas, tunicados e celenterados, carecem de sistema imunológico, defesa física e de possibilidade de escape, já que são, de modo geral, organismos frágeis. Portanto, devem biossintetizar ou incorporar na dieta suas próprias armas químicas de defesa, que permitirão sua sobrevivência em ecossistemas tão competitivos. Para os organismos fixados em um substrato sólido, a competição pelo substrato é crucial, e por isso, muitos destes produzem substâncias com atividade “antifouling”, isto é, que inibem o assentamento de larvas ou células de organismos competidores. Esses compostos apresentam toxicidade elevada para células de alta taxa de reprodução, e por isso não surpreende que exista uma alta correlação entre essa atividade e a atividade antitumoral (FAULKNER, 1998, 1999, 2000, 2001).

Algas são organismos pertencentes a grupos polifiléticos que possuem clorofila a e um talo não diferenciado em raiz, caule ou folhas, com hábito predominantemente aquático. Neste ambiente, as algas podem fazer parte dos bentos (indivíduos fixos no substrato) ou plâncton (indivíduos suspensos na água). A faixa litorânea que as algas bênticas habitam pode estar dividida em: supralitoral, mesolitoral e infralitoral. O supralitoral corresponde à faixa mais alta do litoral, nunca ficando submerso. O mesolitoral pode estar temporariamente descoberto nas marés-baixas. Já o infralitoral corresponde à faixa que nunca fica exposta ao ar (HORTA, 2000)

Harvey (1836) classificou as algas baseando-se na sua composição pigmentar e esta persiste até hoje. Dentre as principais linhagens eucarióticas podemos citar: Chlorophyta (algas verdes), Euglenofita (alga flagelada), Rhodophyta (algas vermelhas) e Phaeophyta (algas pardas), Bacillariofita (diatomáceas) e Dinofita (dinoflagelados). As algas vermelhas são o grupo de macroalgas que possui o maior número de substâncias isoladas, sendo ricas em compostos de reserva e ficobiliproteínas. O gênero mais estudado é *Laurencia*, pertencente à família Rhodomelaceae, e atualmente as pesquisas se concentram na síntese de seus metabólitos e em estudos pré-clínicos e clínicos (BOURGUET-KONDRACKI & KORNPROBST, 2005).

O presente capítulo constituiu uma revisão não exaustiva dos estudos taxonômicos, químicos e farmacológicos encontrados na literatura no período de 1990 até 2008. Para a busca foram utilizadas as bases de dados Scincefinder, Scopus, Marinlit, Science direct e Portal Capes.

1. Gênero *Laurencia* Lamouroux – Taxonomia

O complexo *Laurencia* agrupa atualmente quatro gêneros relacionados: *Laurencia sensu stricto*, *Chondrophycus* (Tokida et Saito) Garbary et J.T. Harper, *Palisada* K.W. Nam e *Osmundea* Stackhouse. Este compreende cerca de 150 espécies, amplamente distribuídas em mares tropicais, subtropicais e temperados (MCDERMID, 1988, GUIRY & GUIRY, 2005), e é facilmente reconhecido dentro de Rhodomelaceae pela presença de célula apical sempre imersa em uma depressão nos ápices de eixos e ramos, rodeada por tricoblastos ramificados, segmento axial reconhecível somente próximo ao ápice e presença de corticação ao longo do talo (FALKENBERG, 1901; KYLIN, 1923, 1956). Embora os gêneros do complexo sejam de fácil reconhecimento, a maioria das espécies é de difícil identificação, reflexo da grande plasticidade fenotípica que apresentam (SAITO, 1969a; FUJII, 1990, 1998; SENTÍES & FUJII, 2002; FUJII & SENTÍES, 2005). A dificuldade na identificação das espécies desse complexo é patente em diversas partes do mundo (MASUDA & ABE, 1993). A grande variação morfológica encontrada, a falta de descrições completas e uniformes e a dificuldade na observação de alguns caracteres para uma identificação segura dos táxons têm contribuído para aumentar a confusão em torno da classificação, identificação, sinonímia e nomenclatura desse complexo (SENTÍES & FUJII, 2002).

Espécies do complexo *Laurencia* têm ampla distribuição no litoral brasileiro, estendendo-se do Ceará (PINHEIRO-JOVENTINO et al., 1998) ao Rio Grande do Sul (BAPTISTA, 1977), constituindo um elemento importante da flora ficológica brasileira (OLIVEIRA FILHO, 1969, 1977; FUJII, 1990; FUJII & SENTÍES, 2005). As primeiras referências sobre o complexo *Laurencia* no Brasil foram feitas por pesquisadores estrangeiros como Saint-Hilaire (1833), Martens (1870, 1871) e Möbius (1889) através de listagens de material coletado em diferentes pontos do país (FUJII & SENTÍES, 2005).

O estudo do complexo *Laurencia* no Brasil iniciou-se de forma sistemática a partir da década de 80 com o trabalho de Cordeiro-Marino et al. (1983). Em trabalho subsequente, Cordeiro-Marino & Fujii (1985) descreveram uma nova espécie para a ciência: *Laurencia catarinensis* Cordeiro-Marino et M.T. Fujii. Durante o estudo das macroalgas marinhas da região de Cabo Frio, RJ, Yoneshigue (1985) também descreveu uma espécie nova, *L. oliveirana* Yoneshigue. O trabalho de Fujii (1990) reconheceu onze espécies, sendo elas: *L. arbuscula* Sonder, *L. intricata* J. V. Lamouroux (como *L. implicata* J. Agardh), *L. scoparia* J. Agardh, *L. oliveirana* Yoneshigue, *Palisada corallopsis* (Montagne) Senties, Fujii et Díaz (como *L. corallopsis* (Montagne) M.A. Howe, *P. flagellifera* (J. Agardh) K.W. Nam (como *L. flagellifera* J. Agardh) e *P. papillosa* (C. Agardh) K.W. Nam (como *L. papillosa* C. Agardh), além de quatro táxons aos quais não foram atribuídos epítetos específicos, sendo designados como *Laurencia* sp.1, *Laurencia* sp.2, *Laurencia* sp.3 e *Laurencia* sp.4. Mais tarde, Cordeiro-Marino

& Fujii *in* Cordeiro-Marino *et al.* (1994) descreveram uma terceira espécie, nova para a ciência, a partir de material brasileiro: *Chondrophyucus furcatus* (Cordeiro-Marino *et* M.T. Fujii) M.T. Fujii *et* Senties, como *Laurencia furcata*.

Posteriormente, *Laurencia* sp.1 foi descrita como uma nova espécie sob o epíteto *L. translucida* Fujii *et* Cordeiro-Marino (FUJII & CORDEIRO-MARINO, 1996). As espécies *Laurencia* sp.2, *Laurencia* sp.3 e *Laurencia* sp.4 foram definidas por Fujii (1998) como formas de *L. filiformis*, sendo que *Laurencia* sp.2 corresponde à *L. filiformis* f. *dendritica sensu* Saito & Womersley (1974), *Laurencia* sp.3 à *L. filiformis* f. *heteroclada sensu* Saito & Womersley (1974) e *Laurencia* sp.4 à forma típica de *L. filiformis sensu* Saito & Womersley (1974). Fujii (1998) estudou aspectos morfológicos, quimiotaxonômicos e citogenéticos de quatro espécies do complexo *Laurencia*: *L. filiformis*, *L. translucida*, *Palisada flagellifera* (como *Laurencia flagellifera*) e *Chondrophyucus furcatus*, representando quatro grupos taxonomicamente distintos. Fujii (1998) salientou que devido à enorme problemática na delimitação de espécies do complexo *Laurencia* do litoral brasileiro, principalmente em representantes de *Laurencia sensu stricto* que apresentam uma gama de variação inter- e intraespecífica, a identificação e separação das espécies baseadas unicamente em caracteres morfológicos tornam-se inviáveis. Desta forma, Fujii (1998) agregou ao estudo morfológico, dados químicos dos metabólitos secundários das espécies selecionadas e aprofundou os estudos citológicos iniciados por Fujii (1990) como ferramentas adicionais para a identificação das espécies. Fujii (1998) ainda avaliou os critérios morfológicos empregados na taxonomia do grupo visando estabelecer caracteres estáveis para uma determinação mais segura dos táxons.

Fujii & Senties (2005) compilaram as diversas citações das espécies do complexo *Laurencia* para o litoral do Brasil, totalizando 24 espécies reportadas até aquela data. Entretanto, os autores advertiram que alguns táxons citados na fase anterior ao desenvolvimento ficológico no Brasil, nunca foram recoletados e outros não tiveram suas exsiccatas examinadas para confirmação. Portanto, algumas espécies permanecem como citações duvidosas para o litoral brasileiro. Das vinte e quatro espécies listadas por Fujii & Senties (2005), 12 foram confirmadas para o Brasil. As doze restantes não confirmadas ou foram reduzidas a sinônimos pelos autores ou não foram reencontradas nem examinadas por falta de material de referência em herbário, ou ainda por falta de descrições diagnósticas adequadas.

A ocorrência de espécies do gênero *Laurencia* Lamouroux na costa brasileira já foi mapeada por pesquisadores da USP e está disponível no site Algamare (www.ib.usp.br/algamare-br/), existem mais de 19 espécies catalogadas e na região sul predominam as espécies *Laurencia catarinensis*, *L. microcladia*, *L. obtusa* e *Palisada flagellifera*.

2. Gênero *Laurencia* Lamouroux – Estudos químicos

Os estudos sobre os constituintes químicos de espécies do gênero *Laurencia* tiveram início quando Obata e Fukuzumi (1953) verificaram que o óleo essencial de *L. glandulifera* apresentava sesquiterpenos como componentes majoritários. A partir de 1965, Irie e colaboradores iniciaram estudos clássicos de isolamento, purificação e elucidação estrutural de diferentes substâncias de *Laurencia* (IRIE et al., 1965, 1966, 1967, 1968, 1969a,b,c e 1970). Seguiram-se outros trabalhos que resultaram, em última análise, no fato de *Laurencia* ser o gênero de algas marinhas mais estudado até o momento (TEIXEIRA; KELECOM, 1991).

Atualmente, sabemos que diversas espécies de *Laurencia* são capazes de sintetizar diferentes classes de substâncias (**Figura 1**), como sesquiterpenos halogenados (**1**) ou não (**2**), diterpenos (**3**), triterpenos (**4**) e acetogeninas (**5**), totalizando mais de quinhentos metabólitos secundários (FAULKNER, 1996). Vários destes representam tipos estruturais exclusivos, ainda não observados em outros organismos, contribuindo significativamente para o aumento do número de substâncias com esqueletos carbônicos novos e fornecendo subsídios para proposições sobre a biogênese de produtos naturais do mar.

As acetogeninas são frequentemente isoladas de espécies de *Laurencia* e de moluscos herbívoros (FAULKNER, 1984). A maioria destas substâncias pode ser derivada de isômeros de 6,7-diidroxipentadeca- 3,9,12-trienino-1 (lauredióis) (**6**) (FUKUSAWA et al., 1993) ou, em menor número, tendo como base um éter cíclico de oito carbonos (**7**) (FAULKNER, 1984). Devido a grande variação estrutural que apresentam, aliada a ampla distribuição nas espécies de *Laurencia*, as acetogeninas parecem também promissoras, juntamente com os sesquiterpenos, como marcadores taxonômicos deste gênero.

Os diterpenos encontrados em espécies do gênero *Laurencia* são representados por poucos tipos estruturais e um reduzido número de esqueletos (BRENNAN; ERICKSON, 1982). Do mesmo modo que os sesquiterpenos halogenados, a ciclização induzida pelo íon bromônio constitui um passo indispensável à formação dos diterpenos. Dos triterpenos, os mais raros terpenos de *Laurencia* e do meio marinho, existem poucos exemplos conhecidos (BLUNT et al., 1978). Os sesquiterpenos são mais abundantes e característicos de espécies de *Laurencia* (ERICKSON, 1983) seguidos pelas acetogeninas, diterpenos e triterpenos.

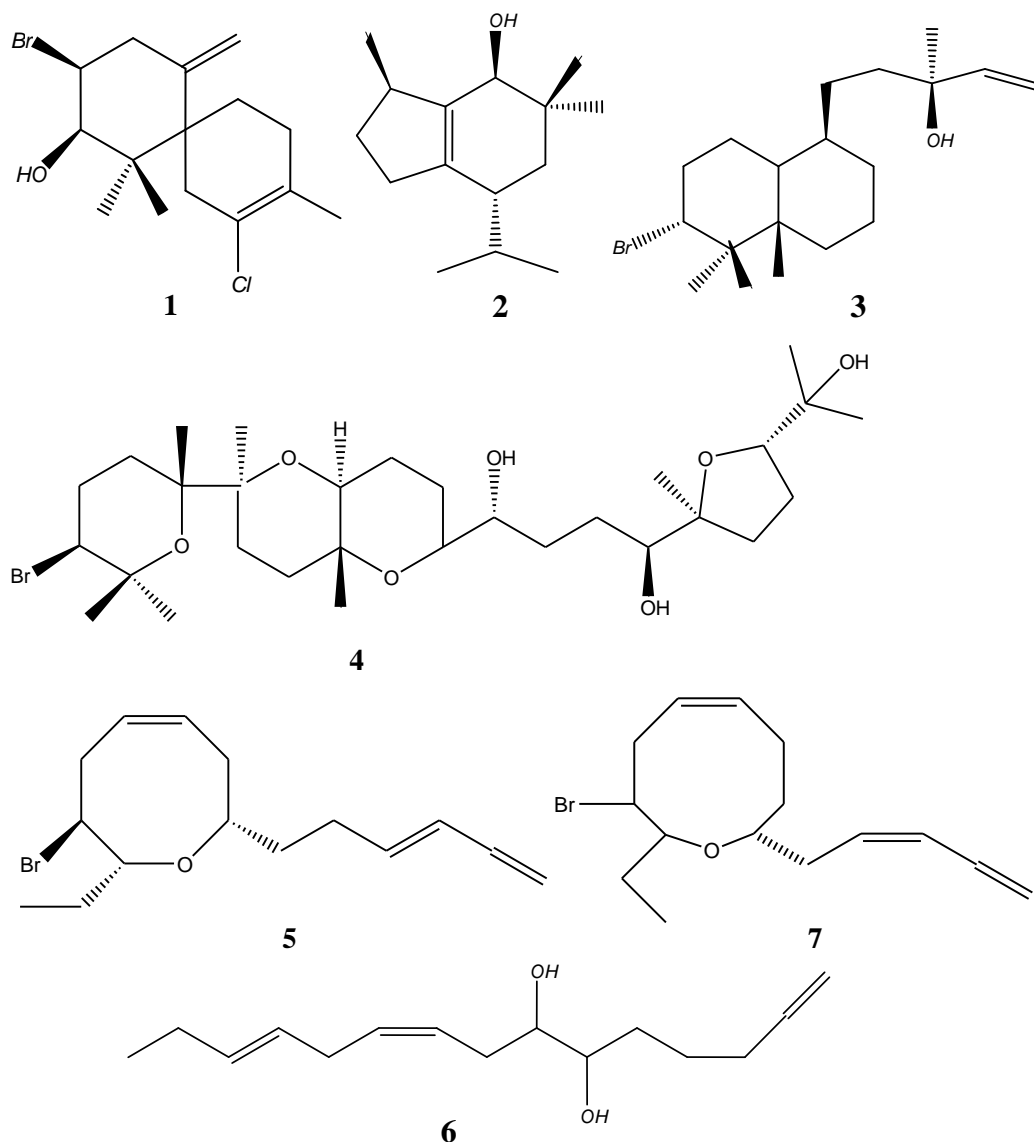


Figura 1: Exemplos das diferentes classes de substâncias produzidas por espécies do gênero *Laurencia* Lamouroux. Sendo, sesquiterpenos halogenados (1) ou não (2), diterpenos (3), triterpenos (4), acetogeninas (5), isômeros de 6,7-diidroxipentadeca-3,9,12-trienino-1 (lauredióis) (6) e éter cíclico de oito carbonos (7) (TEXEIRA; PEREIRA, 1999).

Revisões realizadas por pesquisadores do grupo coordenado por John Faulkner observaram um grande interesse da comunidade científica em metabólitos secundários provenientes de espécies do gênero *Laurencia*, como demonstrado no **quadro 1**.

Quadro 1: Algas marinhas do gênero *Laurencia* Lamouroux e seus respectivos metabólitos conforme revisões publicadas entre 1998 a 2002 (FAULKNER) e 2003 a 2008 (BLUNT et al.).

Ano	Alga	Metabólito	Referências
1996	<i>Laurencia spectabilis</i>	laurenciona	Bernart, M.W. et al. <i>Phytochemistry</i> , 31 , 1273, 1992.
	<i>Laurencia spp.</i>	(2E)-tridecilheptadec-2-enal	De Rosa, S. et al. <i>Phytochemistry</i> , 40 , 995, 1995.
	<i>Laurencia pannosa</i>	pannosaleno	Suzuki, M. et al. <i>Phytochemistry</i> , 41 , 1101, 1996.
	<i>Laurencia nipponica</i>	neisoprelaurefucina	Suzuki, M et al. <i>Phytochemistry</i> , 1996, 43 , 121, 1996.
	<i>Laurencia karlae</i>	benkarlaol	Zeng, L.M. et al. <i>Chin.J. Chem</i> , 14 , 370, 1996.
	<i>Laurencia filiformis</i>	6 derivados do parguerana	Rochfort, S.J.; Capon, R.J. <i>Aust. J. Chem</i> , 49 , 19., 1996.
	<i>Laurencia viridis</i>	viridióis A e B 10-epideidrotirsiferol e isodeidrotirsiferol	Norte, M. et al. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 37 , 2671, 1996.
1997	<i>Laurencia majuscula</i>	iodolactona	Su, J.Y. et al. <i>Chem. J. Chin. Univ.</i> , 18 , 1333, 1997.
	<i>Laurencia obtusa</i>	obtusaleno IV scanlonenina	Guella, G. et al. <i>Chem. Eur. J.</i> , 3 , 1223, 1997. Suzuki, M. et al. <i>Tetrahedron</i> , 53 , 4271, 1997.
	<i>Laurencia claviformis</i>	(3Z)-1,3-epipinnatifidenina	San-Martín, A. et al. <i>Nat. Prod. Lett.</i> , 10 , 303, 1997.
	<i>Laurencia pinnata</i>	(+)-isolaurepinnacina	Berger, D. et al. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 119 , 2446, 1997.
	<i>Laurencia nipponica</i>	trans-desacetilkumausina	Suzuki, T. et al. <i>Chem. Lett.</i> , 1643, 1983.
	<i>Laurencia glandulifera</i>	(+)-laurencina	Irie, T. et al. <i>Tetrahedron</i> , 24 , 4193, 1968.
	<i>Laurencia obtusa</i>	alolaurineterol	König, G.M.; Wright, A. D. <i>Planta Med.</i> , 63 , 186, 1997.
	<i>Laurencia rígida</i>	3-acetoxi-E- γ -bisaboleno (-)-10 α -bromo-9 β -hidroxi- α - chamigreno rigidol (+)-(10S)-10-bromo- β - chamigreno	König, G.M.; Wright, A. D. <i>J. Nat. Prod.</i> , 60 , 967, 1997.
	<i>Laurencia cartilaginea</i>	norchamigrano, mailiona, alo-isoobtusol	Juagdan, E.G. et al. <i>Tetrahedron</i> , 53 , 521, 1997.
	<i>Laurencia subopposita</i>	oppositol	Hall, S.S. et al. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 95 , 7178, 1973.
	<i>Laurencia paniculata</i>	paniculatol	Briand, A. et al. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 38 , 3399, 1997.
<i>Laurencia viridis</i>	tirsenóis A e B	Norte, M. et al. <i>Tetrahedron</i> , 53 , 4649, 1997.	
1998	<i>Laurencia nipponica</i>	laurenciol	Suzuki, T. et al. <i>Chem. Lett.</i> , 1643, 1983.
	<i>Laurencia japonensis.</i>	anhidroaplisidiol	Takahashi, Y. et al. <i>Phytochemistry</i> , 48 , 987, 1998.
	<i>Laurencia sp</i>	cartigineol, alo-isoobtusol	Guella, G. et al. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 38 , 8261, 1997.
	<i>Laurencia filiformis</i>	filiforminol	Kazlauskas, R. et al. <i>Aust.J. Chem.</i> , 29 , 2533, 1976.
	<i>Laurencia glandulifera</i>	éter bromado de filiforminol	Suzuki M.; Kurosawa, E. <i>Bull. Chem. Soc. Jpn.</i> , 52 , 3349, 1979.
	<i>Laurencia satoi</i>	3 diterpenos	Kurata, K. et al. <i>Phytochemistry</i> , 47 , 363, 1998.
1999	<i>Laurencia japonensis</i>	japoneninas A e B	Takahashi, Y. et al. <i>Phytochemistry</i> , 50 , 799, 1999.
	<i>Laurencia sp.</i>	bisezquinas A e B	Suzuki, M. et al. <i>Phytochemistry</i> , 51 , 657, 1999.
	<i>Laurencia obtusa</i>	laurencienina B, (+)-obtusenina, teuritena	Mihopoulos, M. et al. <i>Nat. Prod.Lett.</i> , 13 , 151, 1999.
	<i>Laurencia nipponica</i>	(-)-kumausaleno	Suzuki, T. et al. <i>Chem. Lett.</i> , 1639, 1983.
	<i>Laurencia pinnatifida</i>	obtuseninas	Norte, M. et al. <i>Tetrahedron</i> , 47 , 9411, 1991.
	<i>Laurencia claviformis</i>	claviol	Rovirosa, J. et al. <i>Phytochemistry</i> , 50 , 745, 1999.
	<i>Laurencia nidifica</i>	14 derivados do chamigrano	Kimura, J. et al. <i>Bull. Chem. Soc. Jpn.</i> , 72 , 289, 1999.
	<i>Laurencia spp.</i>	aplisina, debromoaplisina, aplisinol, debromoaplisinol, isoaplisina, isolaurenterol e debromoisolaurinterol	Irie, T. et al. <i>Bull. Chem. Soc. Jpn.</i> , 42 , 843, 1969. Irie, T. et al. <i>Tetrahedron</i> , 26 , 3271, 1970. McMillan, J.A; Paul, I.C. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 17 , 4219, 1976.
2000	<i>Laurencia obtusa</i>	obtusalenos V, VI, VII, VIII e IX	Guella, G. et al. <i>Helv. Chim. Acta</i> , 83 , 336, 2000.
	<i>Laurencia nipponica</i>	trans (+)-laurediol, (+)-prelaureatina, (+)-lauraleno	Kurosawa, E. et al. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 2121, 1972. Fukuzawa, A. et al. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 32 , 5597, 1991. Fukuzawa A.; Kurosawa, E. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 2797, 1979.
	<i>Laurencia glandullifera</i>	(\pm)-lauraleno	Irie, T. et al. <i>Tetrahedron</i> , 25 , 459, 1969.

Gênero *Laurencia* Lamouroux

	<i>Laurencia luzonensis</i>	3-bromo-barekoixida	Kuniyoshi, M. et al. <i>Chem. Commun.</i> , 1155, 2000.
	<i>Laurencia obtusa</i>	23-acetato de tirsiferil	Suzuki, T. et al. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 26 , 1329, 1985.
2001	<i>Laurencia majuscula</i>	sesquiterpenos 8-bromochamigrenos derivado do estigmasterol	Xu, X. et al. <i>Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa</i> , 13 , 5, 2001.
	<i>Laurencia nipponica</i>	(-)-isolauraleno	Crimmins, M.T.; Emmitte, K.A. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 123 , 1533, 2001.
	<i>Laurencia pannosa</i>	pannosanol, pannosano, (3Z)-chlorofucina	Suzuki, M. et al. <i>J. Nat. Prod.</i> , 64 , 597, 2001.
	<i>Laurencia luzunensis</i>	isopalisol, luzonensol, acetato de luzonensol, luzonensina, (3Z,6E)-1-bromo-2-hidroxi- 3,7,11-trimetildodeca-3,6,10- trieno	Rudi A.; Kashman, Y. <i>J. Nat. Prod.</i> , 55 , 1408, 1992.
	<i>Laurencia cartilaginea</i>	(6S, 9R, 10S) ma'ílina	Juagdan, E.G. et al. <i>Tetrahedron</i> , 53 , 521, 1997.
	<i>Laurencia viridis</i>	martiriol, pseudodehydrotirsiferol, dioxepandehidrotirsiferol, 16-epihidroxidehidrotirsiferol	Manríquez, C.P. et al. <i>Tetrahedron</i> , 57 , 3117, 2001.
	<i>Laurencia sp.</i>	lembinos A e B	Francisco, M.E.Y.; Erickson, K.L. <i>J. Nat. Prod.</i> , 64 , 790, 2001.
	<i>Laurencia mariannensis</i>	(12E)-lembino A	Vairappan, C.S. et al. <i>Phytochemistry</i> , 58 , 517, 2001.
	<i>Laurencia majuscula</i>	(6R, 9R, 10S)-10-bromo-9- hidroxi chamigra-2,7(14)- dieno	Vairappan, C.S. et al. <i>Phytochemistry</i> , 58 , 517, 2001.
	<i>Laurencia obtusa</i>	prevezols A e B	Mihopoulos, N. et al. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 42 , 3749, 2001.
2002	<i>Laurencia intricata</i>	isomanalenos A e B, itamanol	Suzuki, M. et al. <i>Phytochemistry</i> , 60 , 861, 2002.
	<i>Laurencia yonaguniensis</i>	neoirietetraol, (3Z)-laurenino	Takahashi, Y. et al. <i>J. Nat. Prod.</i> , 65 , 395, 2002.
	<i>Laurencia obtusa</i>	13-epillaurencienina, 13-epipinnatifidenina, perforenona D, oxachamigrano, 5-acetoxioxachamigrano	Iliopoulou, D. et al. <i>Org. Lett.</i> , 4 , 3263, 2002.
	<i>Laurencia filiformis</i>	derivado do 5-acetato de prepacifenol	Howard, B.M.; Fenical, W. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 1687, 1975.
	<i>Laurencia viridis</i>	clavidol, 3-epi-dehidrotirsiferol, lactodehidrotirsiferol	Souto, M.L. et al. <i>Tetrahedron</i> , 58 , 8119, 2002.
2003	<i>Laurencia aldingensis</i>	aldingenina A	De Carvalho, L.R. et al. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 44 , 2637, 2003.
	<i>Laurencia perforata</i>	sesquiterpenos 4-hidroxi-1,8-epi-isotenerona	Wright, A.D. et al. <i>J. Nat. Prod.</i> , 66 , 435, 2003.
	<i>Laurencia obtusa</i>	prevezol C-e E, neorogioldiol B	Iliopoulou, D. et al. <i>J. Org. Chem.</i> , 68 , 7667, 2003.
2004	<i>Laurencia otusa</i>	isômero da neoisoprelaurefucina	Suzuki, M. et al. <i>Phytochemistry</i> , 43 , 121, 1996.
	<i>Laurencia nipponica</i>	15-bromoparguer-9 (11)-eno- 16-ol, 15-bromoparguer-7- eno-16-ol	Lyakhova, E.G. et al. <i>Phytochemistry</i> , 65 , 2527, 2004.
	<i>Laurencia intricata</i>	laurenditerpenol	Mohammed, K.A. et al. <i>J. Nat. Prod.</i> , 67 , 2002, 2004.
2005	<i>Laurencia brongiartii</i>	Indols polibromados, bisindols polibromados	El-Gamal, A.A. et al. <i>J. Nat. Prod.</i> , 68 , 815, 2005. Kubota, N.K. et al. <i>Heterocycles</i> , 65 , 2675, 2005.
	<i>Laurencia tristicha</i>	10-hidroxiapiplisina, 10-hidroxiapiplisina, 10-hidroxibromoepiapiplisina	Yamada, K. et al. <i>Tetrahedron</i> , 25 , 3509, 1969. Nemoto, H. et al., <i>J. Org. Chem.</i> , 59 , 74, 1994.
	<i>Laurencia okamurai</i>	laureperóxido, 10-bromoisoapiplisina, isodebromolaurintesol, 10-hidroxiisolaurano	Mao, S.; Guo, Y. <i>Helv. Chim. Acta</i> , 88 , 1034, 2005.

Gênero *Laurencia* Lamouroux

	<i>Laurencia</i> sp.	E-dactilohidroperóxido A, Z-dactilohidroperóxido A, dactilohidroperóxido B e C, puctateno, chinzaleno	Fernández, J.J. et al. <i>Tetrahedron</i> , 61 , 8910, 2005.
	<i>Laurencia luzonensis</i>	luzodiol, 5 sesquiterpenos do tipo sniderano	Kuniyoshi, M. et al. <i>J. Nat. Prod.</i> , 68 , 1314, 2005.
	<i>Laurencia karlae</i>	laukarlaol	Justicia, J. et al. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 127 , 14911, 2005.
2006	<i>Laurencia okamurai</i>	laurakamurenos A e B	Mao, S.C.; Guo, Y.W. <i>J. Nat. Prod.</i> , 69 , 1209, 2006.
	<i>Laurencia scoparia</i>	sesquiterpenos β -bisabolenos halogenados	Davyt, D. et al. <i>J. Nat. Prod.</i> , 69 , 1113, 2006.
	<i>Laurencia aldingensis</i>	aldingeninas B-D	De Carvalho, L.R. et al. <i>Phytochemistry</i> , 67 , 1331, 2006.
	<i>Laurencia obtusa</i>	3,7-dihidroxihidrolaureno, perforenol B	Kladi, M. et al. <i>Tetrahedron</i> , 62 , 182, 2006.
	<i>Laurencia nipponica</i>	nipponaleno, neonipponaleno	Lyakhova, E.G. et al. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 47 , 6549, 2006.
	<i>Laurencia majuscula</i>	majapoleno B, laurencenona C	Erickson, K.L. et al. <i>J. Nat. Prod.</i> , 58 , 1848, 1995.

A espécie *Laurencia obtusa* é a que mais possui estudos químicos, sendo isolados compostos na sua maioria pertencentes à classe de terpenos (FAULKNER, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002; BLUNT et al., 2003, 2004, 2005, 2006, 2007 e 2008). Para a espécie *Laurencia microcladia* a revisão de metabólitos secundários se encontra no capítulo 2 deste trabalho. Já para as espécies *Palissada flagellifera* e *Laurencia catarinensis* não foram encontrados trabalhos relacionados com o isolamento e elucidação estrutural de metabólitos secundários.

3. Gênero *Laurencia* Lamouroux – Atividades biológicas

Em relação às atividades apresentadas para extratos e substâncias isoladas de espécies de *Laurencia* sabe-se que alguns metabólitos halogenados possuem atividade inseticida (EL SAYED et al., 1997), antibacteriana (CACCAMESE et al., 1980), antifúngica (KÖNIG; WRIGHT, 1997) e antiviral (SAKEMI et al., 1986).

Atividade fungicida (*Ustilago violacea*, *Mycotypha microspora*, *Eurotium repens* e *Fusarium oxysporum*) e bactericida (*Bacillus megaterium* e *Escherichia coli*) foi observada para o composto allolaurinterol encontrado no extrato de *Laurencia obtusa* e para os compostos 3-acetoxi-E- γ -bisaboleno, (-)-10 α -bromo-9 β -hidroxi- α -chamigrano, rigidol, (+)-(10S)-10-bromo- β -chamigrano, descloroelatol, elatol e (-)-(10R)-10-bromo- α -chamigrano encontrados no extrato de *Laurencia rigida* (KÖNIG & WRIGHT, 1997a, 1997b).

Estudos realizados com o composto elatol encontrado no extrato de *Laurencia majuscula* apresentou atividade antibacteriana para as colônias de *Chromobacterium violaceum*, *Clostridium fallax*, *Escherichia coli* entre outros. Já para os compostos iso-obtusol e lembino A observou-se atividade antibacteriana contra *Chromobacterium violaceum*, *Clostridium cellobioparum*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium helmiphilum*, *Proteus mirabilis* e *Vibrio parahaemolyticus* (VAIRAPPAN et al., 2001; VAIRAPPAN, 2003).

Estudo utilizando extrato de *Laurencia microcladia* apresentou atividade promissora contra forma promastigota de *Leishmania mexicana* (FREILE-PELEGRIN et al., 2008). Para o composto elatol foi observado ação frente ao *Trypanosoma cruzi* (VEIGA-SANTOS et al., 2008). Também para atividade anti-helmíntica uma série de metabólitos isolados de *Laurencia scoparia* revelou atividade moderada contra o estágio L4 de *Nippostrongylus brasiliensis* (DAVYT, 2001).

Atividade citotóxica contra *Artemia salina* e atividade antibacteriana contra *Alcaligenes aquamarinus* e *Escherichia coli* foram observadas para os compostos neoirietetraol e (3Z)-laurenina encontrados no extrato de *Laurencia yonaguniensis* (TAKAHASHI et al., 2002). Em estudos realizados por Topcu e colaboradores (2003) observou-se que compostos derivados do sniderol encontrados no extrato de *Laurencia obtusa* apresentou atividade contra clones D6 e W2 do parasita malárico *Plasmodium falciparum*.

Suzuki e colaboradores (1985) observaram atividade inibitória da proteína fosfatase 2A para o composto 23 acetato de tirsiferil encontrado no extrato de *Laurencia obtusa*. Para o composto laurenditerpenol encontrado no extrato de *Laurencia intricata* foi observado uma atividade inibitória de hipóxia ativada pelo fator 1 indutor de hipóxia e pelo fator indutor de hipóxia angiogênico VEGF em células T47D (MOHAMMED et al., 2004).

Iliopoulou e colaboradores (2002) observaram atividade antiviral para metabólitos isolados de *Laurencia obtusa* contra cepas do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1 (III_B), HIV-2 (ROD), vírus de estomatite vesicular, Coxsackie B4, vírus respiratório sincicial, entre outros vírus.

Estudos realizados com metabólitos halogenados de *Laurencia cartilaginea* revelam atividade citotóxica para linhagens celulares cancerígenas P-388, A-549, MEL-28 e especialmente HT-29 (carcinoma de cólon) (JUAGDAN et al., 1997). Já para diterpenos halogenados da alga vermelha *Laurencia obtusa* foram encontradas atividades citotóxicas para as linhagens celulares MCF7 (derivada do adenocarcinoma mamário), PC3 (derivada do adenocarcinoma prostático), entre outras linhagens celulares (ILIOPOULOU et al., 2003). Para o metabólito maíliohidrina encontrado no extrato de *Laurencia* sp. foi observado citotoxicidade para células tumorais NCI 60 e para linhagem celular de tumor de mama NCI/ADRES (FRANCISCO & ERICKSON, 2001).

Pec e colaboradores (2003) observaram apoptose em células de tumores de mama dependente e independente de estrogênio quando testado o composto dehidrotirsiferol encontrado no extrato de *Laurencia pinnatifida*. Para os compostos indólicos polibromados encontrados no extrato de *Laurencia brongniartii* observou-se atividade antitumoral contra células D388 e HT-29 (EL-GAMAL et al., 2005). Já para o composto laurinterol encontrado no extrato de *Laurencia obtusa* foi observada atividade para cinco linhagens de tumores de células humanas e para linhagem de células tumorais de ovário de hamster (KLADI et al., 2006).

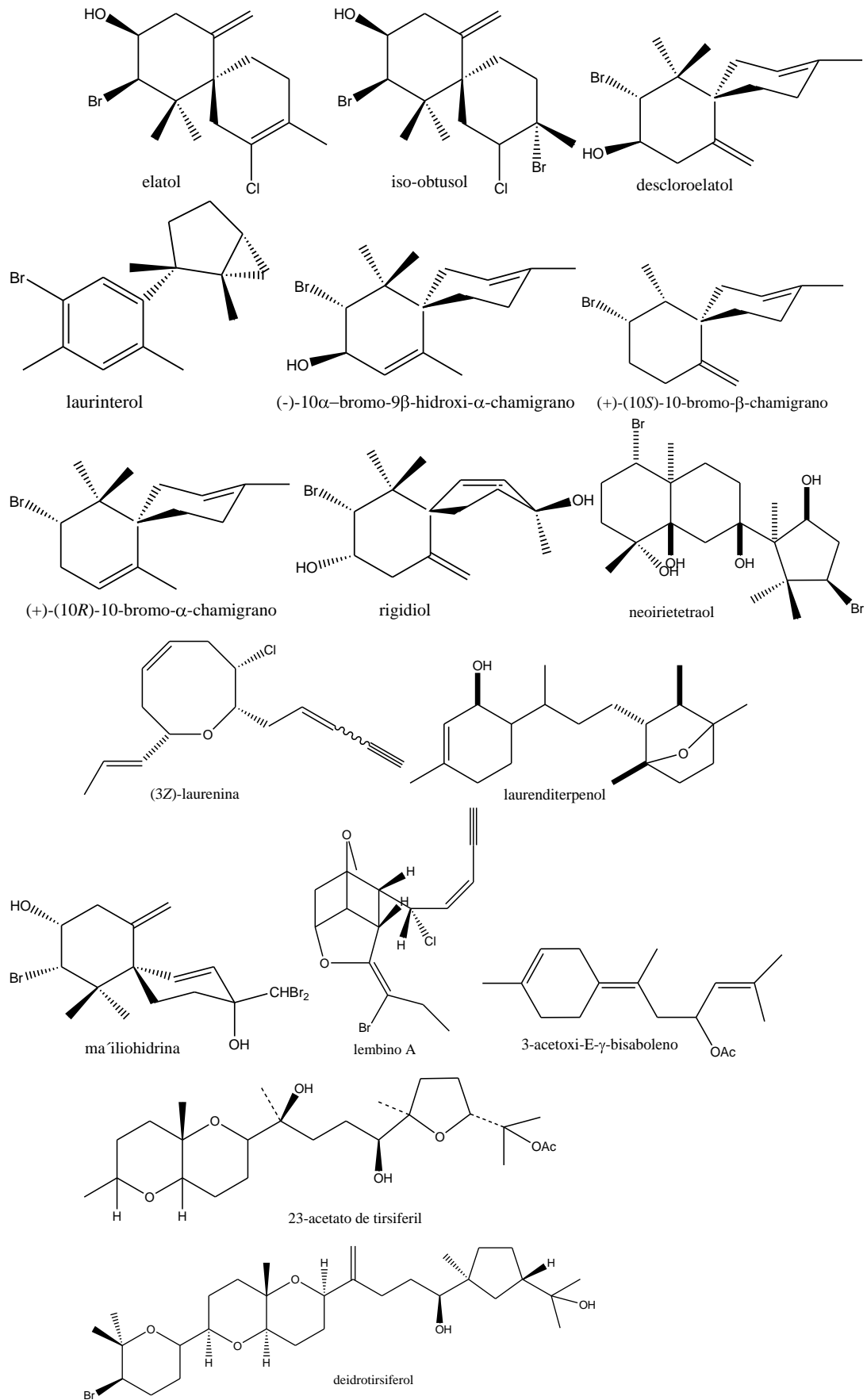


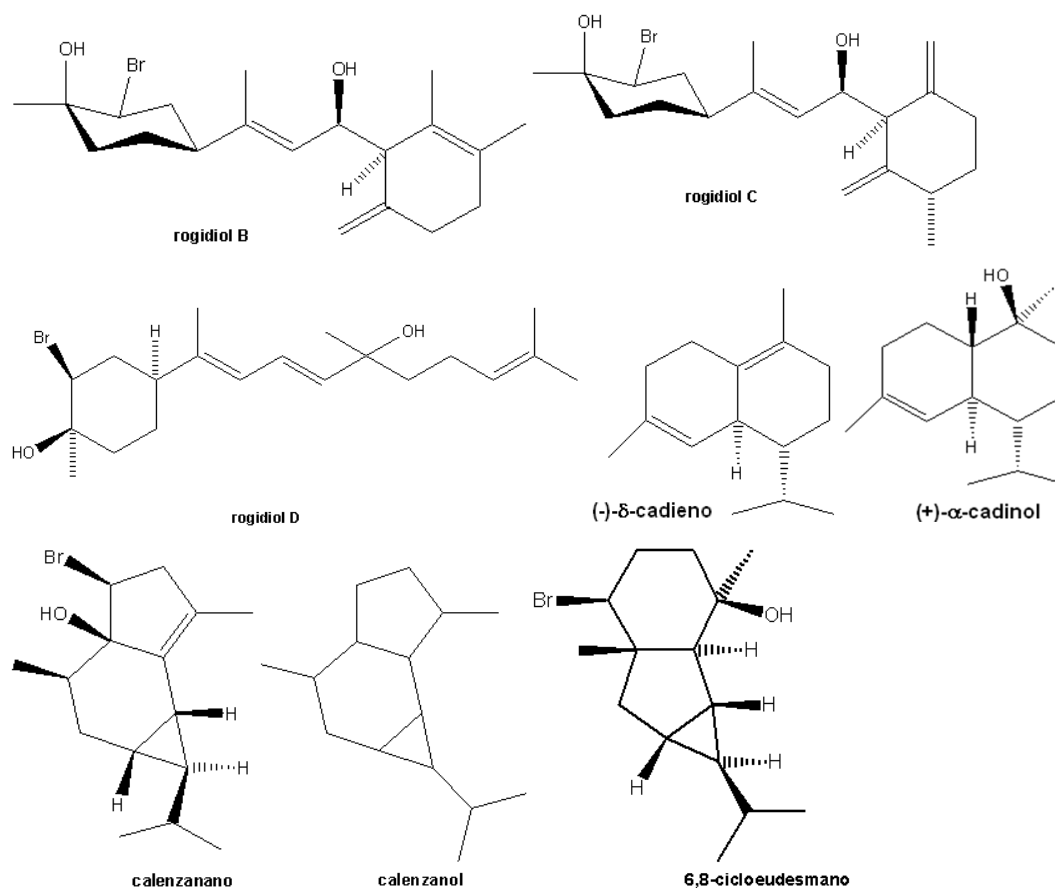
Figura 2: Estruturas dos compostos isolados do gênero *Laurencia* Lamouroux com atividades biológicas.

CAPÍTULO 2: *Laurencia microcladia*

1. INTRODUÇÃO

As algas vermelhas (Rhodophyta) são reconhecidas como as maiores produtoras de substâncias halogenadas no meio marinho (FENICAL, 1975; TEIXEIRA; KELECOM, 1991). Dentre elas, o gênero *Laurencia* Lamouroux (Rhodomelaceae, Ceramiales) destaca-se como uma fonte fascinante de novos produtos naturais (ERICKSON, 1983).

Em relação à investigação química da espécie *Laurencia microcladia* na literatura, observa-se o isolamento de sesquiterpenos do tipo rogidiol (GUELLA; MARCHETTI; PIETRA, 1997, 1998, 2000), calenzanol e calenzanano (GUELLA et al., 2001), 6,8-cicloeuodesmano, (-)- δ -cadieno e (+)- α -cadinol de amostras coletadas na ilha de Elba, Itália (GUELLA et al., 2002). Recentemente, foram isolados sesquiterpenos do tipo cuparenos (KLADI et al., 2005) de amostras coletadas na ilha de Chios, Grécia, além de um sesquiterpeno do tipo ciclolaurano, (E)-2-triadecil-2-heptadecenal, bromolaurenisol, laurinterol e seu derivado com anel aromático (KLADI et al., 2006), dibromofenol, sesquiterpeno do tipo bisaboleno, (+)- α -isobromocupareno e (-)- α -bromocupareno e três sesquiterpenos aromáticos (KLADI et al., 2007) (**Figura 1**).



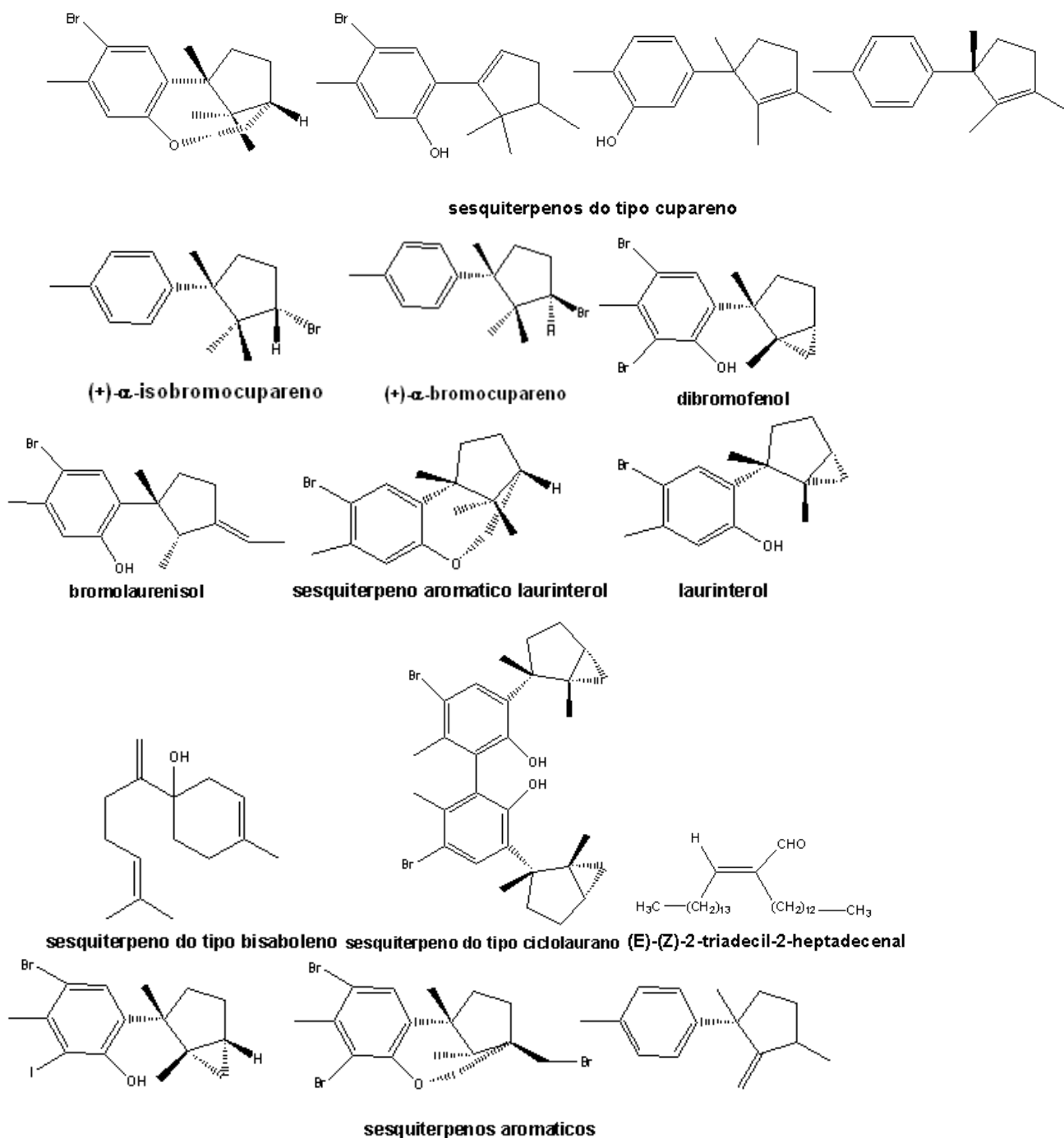


Figura 1: Compostos isolados de *Laurencia microcladia*.

Espécies do gênero *Laurencia* produzem compostos que exibem defesa química contra diversos herbívoros marinhos, como os peixes presentes nos recifes de corais (HAY et al., 1987; PAUL et al., 1988), ouriços marinhos da espécie *Diadema* (HAY et al., 1987) e *Lytechinus variegatus* (PEREIRA et al., 2003), espécies de cobras marinhas como *Littorina strata* e *Osilinus atratus* (GRANADO; CABALLERO, 1995), bivalvos da espécie *Perna perna* (PEREIRA et al., 2003) e carangueijos da espécie *Pachygrapsus transversus* (PEREIRA et al., 2003).

Os ouriços do mar do gênero *Echinometra* são geralmente encontrados em regiões tropicais e subtropicais (MORTENSEN, 1943). Investigações ecológicas mostraram que as espécies do gênero *Echinometra* coletadas na ilha de Okinawa, Japão, possuem habitat diferentes e que essa diferença física e biológica poderia estar influenciando na herbivoria dos mesmos (HIRTSUKA & UCHARA, 2007).

Durante a investigação preliminar por cromatografia em camada delgada de extratos etanólicos de organismos marinhos da costa do estado de Santa Catarina, incluindo algas marinhas das espécies do gênero *Laurencia*, ouriços marinhos (*Echinometra lucunter*) e pepinos do mar (*Holothuria grisea*), foi observada a presença de uma substância com o mesmo comportamento cromatográfico nos extratos de *Laurencia microcladia* e em *Echinometra lucunter*, sugerindo a hipótese de herbivoria (**Figura 2**). Esse fato chamou a atenção devido a relatos na literatura que indicavam que compostos halogenados presentes em espécies de *Laurencia* seriam tóxicos para ouriços marinhos (HAY et al., 1987; PEREIRA et al., 2003) e também, o espectro de ^1H RMN indicava claramente a predominância de mais de 80% do composto no extrato orgânico de *Laurencia microcladia* (**Figura 1, anexo capítulo 2**).

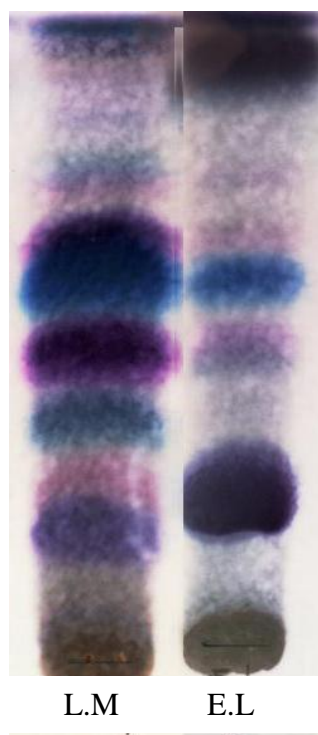


Figura 2: CCD do extrato hidroetanólico de *Laurencia microcladia* (L.M) e ouriço do mar *Echinometra lucunter* (E.L), fase móvel: n-hexano:acetato de etila (9:1), revelador: anisaldeído-sulfúrico. A mancha em Rf 0,61 representa o composto elatol.

Para investigar esta hipótese, foi realizado o isolamento do composto majoritário, identificado como elatol, do extrato bruto de *Laurencia microcladia* e procederam-se os experimentos de herbivoria com amostras de ouriços marinhos de diferentes profundidades e

tamanhos da espécie *Echinometra lucunter* juntamente com extratos etanólicos e algas frescas das espécies *Gracilaria domingensis*, *Ulva fasciata* e *Laurencia microcladia* presentes no habitat dos mesmos.

O artigo a seguir apresentado descreve os procedimentos de extração, isolamento e elucidação estrutural do elatol presente do extrato etanólico de *Laurencia microcladia*, além dos experimentos de herbivoria realizado com as espécies de alga *Gracilaria domingensis*, *Ulva fasciata* e *Laurencia microcladia* e com o ouriço do mar da espécie *Echinometra lucunter*.

Adicionalmente, atividades biológicas foram testadas para o elatol através de grupos de pesquisas parceiros pertencentes à Universidade Federal de Santa Catarina para testar sua atividade antiviral (coordenado pela Profa. Dra. Cláudia Simões), leishmanicida, tripanocida (coordenado pelo Prof. Dr. Mario Stendeil) e antitumoral (coordenado pela Profa. Dra. Rosa Ribeiro-Do-Valle).

Para a atividade antiviral, o elatol foi analisado para detecção dos seus níveis de citotoxicidade (CC₅₀) pelo ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT). A potencial atividade antiviral dos mesmos foi estudada frente aos vírus herpéticos do tipo 1 (2 cepas) [modelo viral de genoma DNA], e do rotavírus SA-11 [modelo viral de genoma RNA], através do ensaio de inibição do efeito citopático viral, do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT) e confirmada através do método das placas de lise, calculando-se os valores de CE₅₀ para o elatol, visando obter seu valor de índice de seletividade ($IS=CC_{50}/CE_{50}$). Os valores de citotoxicidade frente às células VERO utilizadas neste modelo experimental foram elevados, o que levou a não continuidade da investigação nessa linha de pesquisa.

A avaliação da atividade tripanocida foi realizada contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* da cepa Y. Para isso, o elatol foi testado em diferentes concentrações em uma suspensão de 5×10^6 epimastigotas/mL. Como controles, os parasitas foram mantidos na ausência do composto, e na presença de 1% de DMSO e de 100 µM de benznidazol. Para verificação da motilidade dos parasitas, se determinou o número de parasitas viáveis em câmara de Neubauer, após 72 h da adição do elatol. Foi determinada a concentração inibitória a 50% (CI₅₀) em relação aos controles negativos. O composto foi ativo frente às formas epimastigotas, com $CI_{50} = CI_{50} = 13,86 (12,39-15,51) \mu M$. Com este resultado positivo, foram propostos novos testes frente às formas tripomastigotas e amastigotas do *Trypanosoma cruzi* cepa Y, ainda não realizados.

A avaliação atividade leishmanicida foi realizada frente às formas promastigotas das cepas padrões de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/89/JSC89-H1) e *L. chagasi* (BH-46). Nessa metodologia, os parasitas foram cultivados em meio Schneider suplementado com 5% de soro fetal bovino e mantidos a 28°C. A avaliação foi realizada em placas de 96 cavidades, contendo uma suspensão de 5×10^6 parasitas/mL. As placas foram incubadas a 28°C por 72 h e avaliadas em microscópio invertido para verificação da motilidade dos parasitas. Posteriormente, o

número de parasitas viáveis (CI₅₀) foi determinado em câmara de Neubauer. Como controle positivo foi utilizado anfotericina B. Os resultados para o elatol foram positivos, com CI₅₀ *L. amazonensis* = 2,54 (2,44-2,64) µM e CI₅₀ *L. chagasi* = 2,56 (1,94-3,38) µM, o que levou os pesquisadores a dar continuidade ao projeto com testes *in vivo* que serão realizados.

Para a atividade antitumoral, o elatol foi testado *in vitro* nas concentrações de (0,1–100 µM) para verificar a viabilidade celular pelo teste do MMT das linhagens B16F10, C6, MCF7, DU145, A549 e L929. A proliferação celular de B16F10 foi analisada, pelo ensaio do MTT em intervalos de 4–48 h. Ensaio de citometria de fluxo, pelo método do iodeto de propídio, e *Western blot* foram realizados para investigar o mecanismo de ação do elatol (10 e 50 µM) sobre B16F10. Foram realizados ensaios *in vivo* em camundongos C57BL6A (análise do crescimento tumoral de células B16F10) para avaliar o potencial terapêutico do elatol (3–30 mg/kg v.o. ou 1–10 mg/kg i.p.) em comparação com a cisplatina (4 mg/kg i.p.). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da UFSC (PP000102). Os resultados demonstraram que o composto apresentou significativo efeito citotóxico, reduzindo a viabilidade celular das diferentes linhagens testadas e a proliferação em B16F10. As análises de *Western blot*, em B16F10, demonstraram que este pode interferir no ciclo celular (promovendo um atraso na transição de G1/S e entrada em S, e acelerar o processo apoptótico, corroborando com os resultados de citometria de fluxo. Nos experimentos *in vivo*, tanto o tratamento v.o. como i.p. foram capazes de reduzir o crescimento tumoral. Estudos complementares estão em andamento para confirmar o potencial do elatol como um composto antitumoral. Estes resultados foram apresentados em forma de dissertação de mestrado no Programa de Pós-graduação em Farmacologia em agosto de 2009.

PUBLICAÇÃO

**Isolation of elatol from *Laurencia microcladia* and its palatability to the sea urchin
*Echinometra lucunter***

Cíntia Lhullier, Alejandro Donnangelo, Miguel Caro, Jorge A. Palermo,
Paulo Antunes Horta, Miriam Falkenberg, Eloir P. Schenkel
Biochemical Systematics and Ecology, 2009.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Systematics and Ecology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochemsysecoIsolation of elatol from *Laurencia microcladia* and its palatability to the sea urchin *Echinometra lucunter*Cintia Lhullier^a, Alejandro Donnangelo^b, Miguel Caro^c, Jorge A. Palermo^d, Paulo Antunes Horta^b, Miriam Falkenberg^a, Eloir P. Schenkel^{a,*}^a Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Trindade, CEP 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil^b Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Trindade, CEP 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil^c Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Trindade, CEP 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil^d Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y UMYMFOR, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria Pab. 2, C1428EGA Buenos Aires, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 November 2008

Accepted 10 April 2009

Keywords:

Laurencia microcladia

Elatol

Black sea urchin

Echinometra lucunter

ABSTRACT

Elatol was isolated as the major compound from the red alga *Laurencia microcladia* Kütz. collected in Southern Brazil. This is the first report of elatol in this species. We also investigated the herbivore behaviour of the black sea urchin *Echinometra lucunter* (Linnaeus, 1758) towards *L. microcladia*, *Ulva fasciata* Delile and *Gracilaria domingensis* (Kütz.) Sond. ex Dickie through live algal multiple-choice feeding assay, as well as artificial feeding assay. The sea urchins ate the crude algae *L. microcladia* and pellets containing the powdered algae, extract and all tested concentrations of elatol, suggesting that this seaweed and its main compound are palatable for *E. lucunter*.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The *Laurencia* complex Lamouroux (Rhodophyceae) comprises three genera (Nam, 2006) that are some of the most prolific producers of secondary metabolites in the marine environment (Wright et al., 2003; Lyakhova et al., 2004). Secondary metabolites from these algae are predominantly sesquiterpenes like majapolene B from *Laurencia majuscula* (Blunt et al., 2008); diterpenes like neorogiolidol B from *Laurencia obtusa* (Blunt et al., 2005) and C₁₅-acetogenins like laurenynes from *Laurencia yonaguniensis* (Blunt et al., 2004; Wright et al., 1991; Bittner et al., 1985; Howard and Fenical, 1976) that usually are characterised by the presence of halogen atoms in their structures (König and Wright, 1997a).

Previous phytochemical investigations on *Laurencia microcladia* from the Mediterranean Sea lead to the isolation of calenzanol (Guella et al., 2001) and 6,8-cycloeuodesmane sesquiterpenes (Guella et al., 2002). Recently several cytotoxic cuparene sesquiterpenes (Kladi et al., 2005), besides (E)-2-tridecyl-2-heptadecenal, bromolaurenisol and laurinterol were isolated from the extracts of samples collected at Chios Island, in the North Aegean Sea (Kladi et al., 2006). From the same collection, other aromatic and cyclolaurane sesquiterpenes with cytotoxic activity, as well as (+)- α -isobromocuparene and (–)- α -bromocuparene were reported (Kladi et al., 2007).

During our ongoing investigation of marine organisms from the coast of Santa Catarina, Southern Brazil we performed thin layer chromatography (TLC) analysis of several crude extracts from these organisms, including the black sea urchin (*Echinometra lucunter*). A remarkable observation in this preliminary analysis was the detection of a compound with the same

* Corresponding author. Tel./fax: +55 48 3721 5076.

E-mail address: eloirschenkel@gmail.com (E.P. Schenkel).

chromatographic behaviour in the extracts of *Laurencia microcladia* and *Echinometra lucunter*, suggesting the hypothesis of herbivory.

To investigate this hypothesis we isolated the main compound from *Laurencia microcladia* collected in the coast of Santa Catarina, Brazil, and conducted herbivory experiments with the black sea urchin toward *L. microcladia*, *Gracilaria domingensis* and *Ulva fasciata*.

2. Materials and methods

2.1. Collection of organisms

The samples of *Laurencia microcladia* and *Echinometra lucunter* used for the chemical investigation were collected by hand in March 2006 at the lower intertidal zone of Praia da Sepultura (27°07'54"S and 48°31'40"W), Santa Catarina, Southern Brazilian coast.

For the herbivory experiments samples of the seaweeds *L. microcladia*, *G. domingensis* and *U. fasciata*, and of the black sea urchin were collected from the same place as above in December 2007 and March 2008. Voucher samples of these seaweeds are kept at the Herbarium of the Department of Botany, Federal University of Santa Catarina (FLOR 14516–14520).

2.2. Chemical experiments

2.2.1. Isolation of *Laurencia microcladia* major metabolite

Fresh material of *Laurencia microcladia* (2.1 kg) was exhaustively extracted with ethanol at room temperature for 3 days (three times). The extract after evaporation of the solvent afforded a green oily residue (9.5 g) that was partitioned with ethyl acetate and water, affording 4.5 g of aqueous fraction and 5 g of ethyl acetate fraction. This late fraction was further fractionated over silica gel (Merck 60), using n-hexane with increasing amounts of ethyl acetate as mobile phase. Fractions 2 (10% ethyl acetate in n-hexane) and 3 (20% ethyl acetate in n-hexane) were combined (1.6 g) and further purified by column chromatography on silica gel using chloroform with increasing amounts (5%) of ethyl acetate as mobile phase, to yield the pure compound **1**. The structure of compound **1** was established through ¹H, ¹³C NMR and correlation spectra (Bruker Avance 2), IR (Shimadzu -IR Prestige-21) and MS (Shimadzu QP-5000) analysis and comparison with literature data.

2.2.2. Chromatographic analysis

The internal organs from fresh individuals of the sea urchin *Echinometra lucunter* were separated from the skeleton and macerated in ethanol during 3 days. The fresh material of *Laurencia microcladia* was extracted in the same conditions. The ethanolic crude extracts were analysed by TLC (silica gel 60 F254, aluminium support plates, Macherey–Nagel) in chloroform:ethyl acetate (8:2) using compound **1** as reference and the plate was sprayed with anisaldehyde/H₂SO₄ reagent.

2.2.3. Feeding assays

Multiple-choice feeding assays were conducted according to Erickson et al. (2006) with live algae commonly found in the rocky shore habitat of Praia da Sepultura: *Laurencia microcladia*, *Gracilaria domingensis* and *Ulva fasciata*. One sea urchin and about 700 mg of each alga were placed into each aquarium (10 × 34 × 25 cm, 3 L) containing sea water under constant aeration for 7 days. A control aquarium without sea urchins was used to measure the biomass variation during the experiment. Water parameters as pH (8.0–8.5), temperature (22–25 °C) and salinity (35–36) were checked every day during the experiment as well and algae weight measurements were performed each 48 h. The ANOVA one way and post hoc Tukey's honest significant difference (HSD) test were used to identify significant differences in the consumption ($P < 0.05$).

The artificial feeding assay was performed with the methodology proposed by Hay et al. (1994). Different types of agar pellets were prepared in the same size (3.5 × 8.5 × 1.5 cm) containing elatol (0.05, 0.1 or 0.2 mg pro pellet); powdered algae (2 g *L. microcladia* or *U. fasciata* pro pellet) or ethanol (solvent control, 2 mL pro pellet), and one further control was prepared containing just pure agar. Five sea urchins and one of each type of pellets were placed into each of the six tanks (300 L) containing sea water under constant aeration and water parameters as pH (8.0–8.1), temperature (21–23 °C) and salinity (35–37) were verified every day. Pellets weight measurements were performed each 24 h for 7 days to obtain the daily weight variation and non-parametric Wilcoxon signed-ranks test was used to evaluate the consumption percentage rates of pellets. Differences were considered significant when $P < 0.05$. After the experiment, all sea urchins were sacrificed, their internal organs were extracted and the extracts were analyzed by TLC in the same ways as described before (item 2.2.2).

3. Results

3.1. Chemical experiments

By TLC analysis of extracts, a major metabolite (compound **1**) was visualised after spraying with sulphuric anisaldehyde as a blue spot at R_f 0.82 in the lanes corresponding to *Laurencia microcladia* and *Echinometra lucunter* extracts.

Compound **1** (Fig. 1) was obtained after successive chromatographic procedures as colourless oil (1.0 g), corresponding to a relative yield of ca. 10% (w/w) to the ethanolic extract of *L. microcladia*. MS and NMR data and comparison with literature

Table 2Comparison with previously published ^1H NMR data of elatol (numbering scheme according to Sims et al., 1974).

H-atoms	Sims et al. (1974), 100 MHz, CDCl_3	Kennedy et al. (1988), 250 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$	König and Wright (1997b), 300 MHz, CDCl_3	Our data, 500 MHz, CDCl_3
1	*	2.59 m 2.30 br d (12.5)	2.19 br d (17.5) 2.08 br d (17.5)	2.59 br d (17.0) 2.38 br d (17.0)
4	*	2.08 <i>dd br</i> (15, 12) 2.00 <i>dd br</i> (15, 5)	1.96 <i>m</i> 1.82 <i>m</i>	1.95 <i>m</i> 1.81 <i>m</i>
5	*	1.78 <i>d br</i> (17) 1.59 <i>ddd</i> (17, 12, 5)	1.80 <i>m</i> 1.62 <i>m</i>	1.82 <i>m</i> 1.63 <i>m</i>
8	*	2.72 dddd (6.5, 3, 15, 1.5×2) 2.38 dd (15, 3)	2.49 dd (2.8, 14.4) 2.19 dm (14.4)	2.63 d (17.0) 2.50 dd (14.6, 2.5)
9	4.16 <i>m</i>	4.13 <i>m</i> (6.5, 6, 3)	4.14 <i>m</i>	4.14 <i>br d</i> (3.4)
10	4.60 <i>d</i> (3)	4.71 <i>d</i> (3)	4.61 <i>d</i> (2.9)	4.61 <i>d</i> (2.6)
12	1.10 <i>s</i>	1.06 <i>s</i>	1.06 <i>s</i>	1.07 <i>s</i>
13	1.10 <i>s</i>	1.05 <i>s</i>	1.07 <i>s</i>	1.08 <i>s</i>
14	5.12 <i>s</i>	5.01 <i>t br</i>	5.12 <i>br s</i>	5.12 <i>br s</i>
	4.80 <i>s</i>	4.85 <i>s br</i>	4.79 <i>br s</i>	4.79 <i>br s</i>
15	1.70 <i>s</i>	1.66 <i>d br</i> (1.2)	1.70 <i>br s</i>	1.70 <i>br s</i>
OH		3.58 d (6)	2.19 <i>br s</i>	2.19 <i>br s</i>

Chemical shifts (δ) in ppm and coupling constants (Hz) are described as in the original works. Controversies among authors are represented in bold. Some values (*) are not reported by the authors.

Table 3Comparison of published ^{13}C NMR data (δ ppm) from elatol (numbering scheme according to Sims et al., 1974; just controversial chemical shifts are represented).

C-atoms	Vairappan et al. (2001), 100 MHz, CDCl_3	Kennedy et al. (1988), 62.9 MHz, $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$	König and Wright (1997b), 75.5 MHz, CDCl_3	Our data, 125 MHz, CDCl_3
2	124.86	128.61	128.0	124.2
3	128.76	124.81	124.1	128.1
6	43.85	49.98	49.1	49.2
11	49.88	44.01	43.1	43.1

By TLC analysis and co-chromatography the presence of elatol was identified in all extracts from sea urchins exposed to *Laurencia microcladia*, but not in the extracts of sea urchins from the control aquarium in the live algae feeding assay.

4. Discussion

Elatol was first isolated from *Laurencia elata* from Australia (Sims et al., 1974), and its occurrence in other species of *Laurencia* has been reported, frequently as the major metabolite from specimens collected between 33°S and 28°N (González et al., 1976; Brennan et al., 1987; Kennedy et al., 1988; König and Wright, 1997b; Juagdan et al., 1997; Vairappan et al., 2001). Despite of the many works on *L. microcladia* from the Mediterranean Sea (collected from latitudes 38 to 42°N), this is the first report of elatol in this species.

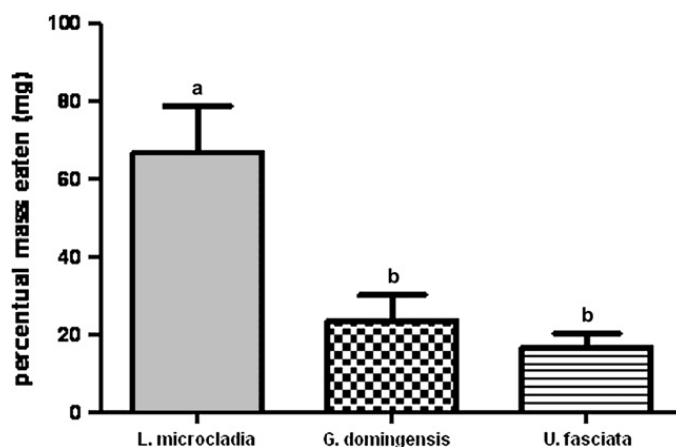


Fig. 2. Average percentage of total consumption of *L. microcladia*, *G. domingensis* and *U. fasciata* offered to the sea urchins *E. lucunter* in a live algal feeding assay. Different letters above bars denote significant statistical differences to $P < 0.05$ (one way ANOVA followed by Tukey HSD test); vertical bars = SD; $n = 9$.

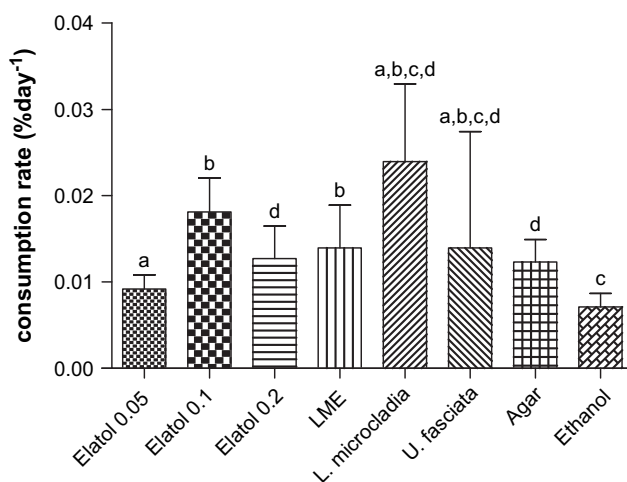


Fig. 3. Average consumption rate by sea urchins *E. lucunter* in artificial feeding assay. Elatol 0.05, 0.1 and 0.2: pellets containing elatol 0.05, 0.1 and 0.2 mg/pellet; LME: pellets with 4 mg crude algae extract of *L. microcladia*; *L. microcladia*: pellets with 2 g of powdered crude algae *L. microcladia*; *U. fasciata*: pellets with 2 g of powdered crude algae *U. fasciata*; agar: pellets with agar; ethanol: pellets with ethanol. Different letters above bars denote significant statistical differences to $P < 0.05$ (Wilcoxon signed-ranks test); vertical bars = SD; $n = 10$.

Concerning the NMR data, some assignments are not in complete agreement with data published before. Based on correlations in the HMBC experiment (Table 1 and Fig. 1) C-3 was attributed to the C-atom at 128.1 ppm, since the H-atoms at C-5 (1.63 and 1.82 ppm) correlate with this C-atom and show no correlation with the C-atom at 124.2 ppm, so this late C-atom should be C-2. The other correlations observed are consistent with these attributions.

The high concentration of elatol in *Laurencia* species of tropical and subtropical areas suggests this compound to play an important role for these species. Previous analysis of anti-herbivory proprieties of metabolites from *Laurencia* species (including elatol) have been conducted (Granado and Caballero, 1995; Hay et al., 1987; Paul et al., 1998; Pereira et al., 2003), but no investigation was reported for *Laurencia microcladia*. We also found no report involving *Laurencia* species and the sea urchin *Echinometra lucunter*, whose feeding behaviour concerning other algae has been described (Erickson et al., 2006; Hiratsuka and Uehara, 2007).

The sea urchins used in our experiments were collected in a region with high density of *L. microcladia* having elatol as the major compound. In the live algae feeding assay just the extracts of sea urchins exposed to *Laurencia microcladia* presented in TLC a spot corresponding to elatol. This suggests the presence of elatol in the internal organs of *Echinometra lucunter* is a consequence of the ingestion of *L. microcladia*. Since *E. lucunter* ate the crude algae *L. microcladia*, as well as pellets containing powdered algae, *L. microcladia* extract and elatol, it seems that this sea urchin species can tolerate this compound at least in the tested concentrations.

Even if elatol does not deter *Echinometra lucunter*, its high abundance in *Laurencia microcladia* from Southern Brazil suggests this metabolite is somehow important for this species, possibly deterring other predators since this algae is very abundant in its habitat. In this aspect, further experiments with other local animal species are being performed.

Acknowledgements

P.A.H. and E.P.S. are grateful to CNPq and C.L. to CAPES for their fellowships. This work was supported by a grant provided by CNPq (Programa PROSUL, Processo CNPq n° 490151/2007-8).

References

- Bittner, M.L., Silva, M., Paul, V.J., Fenical, W., 1985. A rearranged chamigrane derivative and its potential biogenetic precursor from a new species of the marine red algal genus *Laurencia* (Rhodomelaceae). *Phytochemistry* 24, 987–989.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M., 2004. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 21, 1–49.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M., 2005. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 22, 15–61.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Hu, W., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M., 2008. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 25, 35–94.
- Brennan, M.R., Erickson, K.L., Minott, D.A., Pascoe, K.O., 1987. Chamigrane metabolites from a Jamaican variety of *Laurencia obtusa*. *Phytochemistry* 26, 1053–1057.
- Erickson, A.A., Paul, V.J., Van Alstyne, K.L., Kwiatkowski, L.M., 2006. Palatability of macroalgae that use different types of chemical defenses. *J. Chem. Ecol.* 32, 1883–1895.
- González, A.G., Darias, J., Díaz, A., Fourneron, J.D., Martín, J.D., Pérez, C., 1976. Evidence for the biogenesis of halogenated chamigrenes from the red alga *Laurencia obtusa*. *Tetrahedron Lett.* 35, 3051–3054.
- Granado, I., Caballero, P., 1995. Chemical defense in the seaweed *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux. *Sci. Mar.* 59, 31–39.
- Guella, G., Skropeta, D., Breuils, S., Mancini, I., Pietra, F., 2001. Calenzanol, the first member of a new class of sesquiterpene with a novel skeleton, isolated from the red seaweed *Laurencia microcladia* from the Bay of Calenzana, Elba Island. *Tetrahedron Lett.* 42, 723–725.
- Guella, G., Skropeta, D., Mancini, I., Pietra, F., 2002. The first 6,8-cycloeuodesmane sesquiterpene from a marine organism: the red seaweed *Laurencia microcladia* from the Baia di Calenzana, Elba Island. *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.* 57b, 1147–1151.

- Hay, M.E., Fenical, W., Gustafson, K., 1987. Chemical defense against diverse coral-reef herbivores. *Ecology* 68, 1581–1591.
- Hay, M.E., Quaker, K., Fenical, W., 1994. Sinergisms in plant defenses against herbivores interactions of chemistry, calcification and plant quality. *Ecology* 75, 1714–1726.
- Hiratsuka, Y., Uehara, T., 2007. Feeding rates and absorption efficiencies of four species of sea urchins (genus *Echinometra*) fed a prepared diet. *Comp. Biochem. Physiol. A* 1, 223–229.
- Howard, B.M., Fenical, W., 1976. α - and β -snyderol; new bromo-monocyclic sesquiterpenes from the seaweed *Laurencia*. *Tetrahedron Lett.* 17, 41–44.
- Juagdan, E.G., Kalidindi, R., Scheuer, P., 1997. Two new chamigranes from an Hawaiian red alga, *Laurencia cartilaginea*. *Tetrahedron* 53, 521–528.
- Kennedy, D.J., Selby, I.A., Thomson, R.H., 1988. Chamigrane metabolites from *Laurencia obtusa* and *L. scoparia*. *Phytochemistry* 27, 1761–1766.
- Kladi, M., Vagias, C., Furnari, G., Moreau, D., Roussakis, C., Roussis, V., 2005. Cytotoxic cuparene sesquiterpenes from *Laurencia microcladia*. *Tetrahedron Lett.* 46, 5723–5726.
- Kladi, M., Xenaki, H., Vagias, C., Papazafiri, P., Roussis, V., 2006. New cytotoxic sesquiterpenes from the red algae *Laurencia obtusa* and *Laurencia microcladia*. *Tetrahedron* 62, 182–189.
- Kladi, M., Vagias, C., Papazafiri, P., Furnari, G., Serio, D., Roussis, V., 2007. New sesquiterpenes from the red alga *Laurencia microcladia*. *Tetrahedron* 63, 7606–7611.
- König, G.M., Wright, A.D., 1997a. Sesquiterpene content of the antibacterial dichloromethane extract of the marine red alga *Laurencia obtusa*. *Planta Med.* 63, 186–187.
- König, G.M., Wright, A.D., 1997b. *Laurencia rigida*: chemical investigations of its antifouling dichloromethane extract. *J. Nat. Prod.* 60, 967–970.
- Lyakhova, E.G., Kalinovsky, A.I., Kolesnikova, S.A., Vaskovsky, V.E., Stonik, V.A., 2004. Halogenated diterpenoids from the red alga *Laurencia nipponica*. *Phytochemistry* 65, 2527–2532.
- Nam, K.W., 2006. Phylogenetic re-evaluation of the *Laurencia* complex (Rhodophyta) with a description of *L. succulenta* sp. nov. from Korea. *J. Appl. Phycol.* 18, 679–697.
- Paul, V.J., Wylie, C.R., Sanger, H.R., 1998. Effects of algal chemical defenses toward different coral-reef herbivorous fishes: a preliminary study. *Proc. 6th Coral Reef Symp.* 3, 73–78.
- Pereira, R.C., Da Gama, B.A.P., Teixeira, V.L., Yoneshigue-Valentin, Y., 2003. Ecological roles of natural products of the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. *Braz. J. Biol.* 63, 665–672.
- Sims, J.J., Lin, G.H., Wing, R.M., 1974. Marine natural products. X. Elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga *Laurencia elata*. *Tetrahedron Lett.* 15, 3487–3490.
- Vairappan, C.S., Daitoh, M., Suzuki, M., Abe, T., Masuda, M., 2001. Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. *Phytochemistry* 58, 291–297.
- Wright, A.D., König, G.M., Sticher, O.J., 1991. New sesquiterpenes and C₁₅ acetogenins from the marine red alga *Laurencia implicata*. *J. Nat. Prod.* 54, 1025–1033.
- Wright, A.D., Goclick, E., König, G.M., 2003. Three new sesquiterpenes from the red alga *Laurencia perforata*. *J. Nat. Prod.* 66, 435–437.

CAPÍTULO 3: *Laurencia catarinensis*

1. INTRODUÇÃO

O estudo do complexo *Laurencia* no Brasil iniciou-se de forma sistemática a partir da década de 80 com o trabalho de Cordeiro-Marino *et al.* (1983). Em trabalho subsequente, Cordeiro-Marino & Fujii (1985) descreveram uma nova espécie para a ciência: *Laurencia catarinensis* Cordeiro-Marino et M.T. Fujii. Durante o estudo das macroalgas marinhas da região de Cabo Frio, RJ, Yoneshigue (1985) também descreveu uma espécie nova, *L. oliveirana* Yoneshigue. Posteriormente, vários trabalhos sobre as espécies desse complexo foram desenvolvidos por diferentes autores: Cordeiro-Marino *et al.* (1994), Fujii (1990, 1998), Fujii & Cordeiro-Marino (1996), Fujii & Villaça (2003), Yoneshigue *et al.* (2003), Fujii & Senties (2005), Fujii *et al.* (2005), Fujii *et al.* (2006), Cassano *et al.* (2006, 2009). Esses trabalhos levaram à descrição de novas espécies, citação de novas ocorrências para o Brasil e, sobretudo, revelaram detalhes da morfologia vegetativa e reprodutiva das espécies brasileiras.

Laurencia catarinensis foi descrita originalmente por Cordeiro-Marino & Fujii (1985) para a localidade de Florianópolis, Santa Catarina e também é encontrada nos estados do Espírito Santo (FUJII & SENTÍES, 2005; CASSANO, 2009) e Rio de Janeiro (PEDRINI *et al.*, 1994; SZÉCHY & PAULA, 1997; SZÉCHY & NASSAR, 2005; SZÉCHY *et al.*, 2005).

A espécie foi caracterizada por seu talo de coloração esverdeada, hábito fortemente entrelaçado formando densas almofadas com coralináceas articuladas, células corticais ligeiramente projetadas próximo ao ápice dos ramos e ausência de espessamentos lenticulares nas paredes das células medulares. Fujii (1990) e Fujii & Senties (2005) discutiram a proximidade dessa espécie com *L. caraibica*, *L. intricata* e *L. oliveirana* por compartilharem talo de tamanho reduzido e hábito intrincado formando densas almofadas. Morfologicamente, *Laurencia caraibica* e *L. oliveirana* são facilmente diferenciadas de *L. catarinensis*, entretanto a distinção entre essa espécie e *L. intricata* com base na coloração dos talos e no grau de projeção das células corticais é muito tênue, somente distinguida com avaliação da morfologia de espécies masculinas e femininas (CASSANO, 2009).

O presente capítulo tem como objetivo o isolamento e a elucidação estrutural de compostos presentes no extrato orgânico da espécie *Laurencia catarinensis*, espécie endêmica do litoral de Santa Catarina e que não possui investigação química até o presente momento. Ao todo foram isolados e purificados cerca de 40 compostos. Neste capítulo são apresentados os procedimentos de isolamento, purificação e análise de 21 compostos de estruturas relacionadas ao caespitol.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal:

O material utilizado nesta investigação de *Laurencia catarinensis* foi coletada na zona de meso e infralitoral (5 m) em Fevereiro de 2008 na ilha do Arvoredo (27°17'10"S e 48°21'58"O) com licença de coleta emitida pelo IBAMA nº 02026.004084/06-91, Santa Catarina, Brasil. Um exemplar da espécie é mantido no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR 4132).

2.2. Procedimentos Gerais:

A atividade ótica foi mensurada usando um polarímetro modelo Perkin-Elmer 341. Os espectros de ultravioleta foram determinados utilizando clorofórmio, grau espectroscópico em espectrofotômetro modelo Shimadzu UV-160A. Os espectros de infravermelho foram obtidos usando espectrômetro modelo Paragon 500 Perkin-Elmer. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos usando espectrômetros modelos Bruker AC 200 e Bruker DRX 400. Os deslocamentos químicos foram dados em δ usando TMS como padrão interno. Os experimentos de ressonância magnética nuclear 2D (¹H-¹H COSY, HSQC-DEPT, HMBC, NOESY) foram realizados usando software Bruker. Os espectros de massas por ionização química (CIMS) utilizando gás metano e ionização eletrônica (EIMS) foram obtidos utilizando detector massas seletivo do modelo 5973 Hewlett Packard. Os espectros de massas de alta resolução por eletrospray foram obtidos pela Universidade de Notre Dame, no Departamento de Química e Bioquímica, Notre Dame, Indiana, EUA. As colunas cromatográficas a vácuo (CCV), colunas cromatográficas hidrostáticas com sílica gel, colunas Sepack foram realizadas utilizando sílica gel 60H em duas faixas de granulometria (70-270 e 230- 400 mesh) (Merck); a coluna cromatográfica tipo flash com carvão ativado (Nuclear); as cromatografias em camada delgada foram realizadas com sílica gel 60 F₂₅₄ nm (Merck) e detecção de modo geral utilizando o reagente 15% de ácido sulfúrico em metanol. As separações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas utilizando aparelho modelo Pharmacia LKB 2252 equipado com detector de índice de refração RI-Shodex-102 e coluna de fase normal Supelcosil, 25 cm x 10 mm, 5 μ m, S10W.

2.3. Procedimentos de extração e isolamentos dos compostos de *L. catarinensis*

Os procedimentos descritos a seguir são apresentados de forma esquemática na figura 1. As frações foram escolhidas para o isolamento dos compostos de acordo com o perfil apresentado no espectro de hidrogênio.

Inicialmente, a alga foi seca sob refrigeração (400 g de peso seco) e extraída exaustivamente com metanol, diclorometano:metanol (2:1) e diclorometano a temperatura ambiente. Os extratos combinados foram concentrados utilizando evaporador rotatório até obter-se um resíduo oleoso verde escuro e uma fase aquosa marrom, este foi extraído com acetato de etila e separado utilizando um funil de separação resultando em uma fração orgânica e uma fração aquosa. A fração orgânica (4g) (**Figura 2**) foi submetida à coluna cromatográfica a vácuo (CCV) com sílica gel, usando n-hexano como fase móvel com aumento gradual de acetato de etila e finalizando com metanol, obtendo 11 frações.

As frações C até H (2,8 g) foram submetidas em uma coluna de carvão, utilizando metanol, metanol:acetoneitrila (1:1), n-hexano:acetato de etila (1:1) e tolueno como fase móvel, obtendo-se 5 frações. Todas as frações da coluna de carvão foram purificadas por coluna cromatográfica de gel de sílica com baixa pressão usando ciclohexano e aumentando o teor de acetato de etila gradativamente até acetato de etila:metanol (1:1) como fase móvel, obtendo-se 14 frações.

A fração 3 (24% de acetato de etila em ciclohexano) (127,4 mg) foi purificada utilizando coluna sepack de gel de sílica, usando ciclohexano:acetato de etila (90:10) até acetato de etila:metanol (1:1) como fase móvel, obtendo-se 3 frações. A fração 1 (10% de acetato de etila em ciclohexano) (99,8 mg) foi purificada usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando ciclohexano:acetato de etila (9:1) como fase móvel resultando nos compostos puros **12 (LC27)** (10,3 mg) e **13 (LC28)** (12,6 mg).

A fração 11 (92% de acetato de etila em ciclohexano) (29,3 mg) foi purificada por CLAE, usando metanol:água (80:20) como fase móvel resultando no composto puro **22 (LC1)** (17,1 mg).

A fração 3 (24% de acetato de etila em ciclohexano) (127,4 mg) foi purificada utilizando coluna sepack de gel de sílica, usando ciclohexano:acetato de etila (90:10) até acetato de etila:metanol (1:1) como fase móvel, obtendo-se 3 frações. A fração 1 (10% de acetato de etila em ciclohexano) (99,8 mg) foi purificada usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando ciclohexano:acetato de etila (9:1) como fase móvel resultando nos compostos puros **12 (LC27)** (10,3 mg) e **13 (LC28)** (12,6 mg).

A fração 11 (92% de acetato de etila em ciclohexano) (29,3 mg) foi purificada por CLAE, usando metanol:água (80:20) como fase móvel resultando no composto puro **22 (LC1)** (17,1 mg).

A fração 2 (16% de acetato de etila em ciclohexano) (1,05 g) e a fração B da CCV (10% de acetato de etila em n-hexano) (26,2 mg) foram purificadas por coluna cromatográfica em gel de sílica, usando ciclohexano:acetato de etila (98:2) com aumento gradual de acetato de etila até acetato de etila:metanol (1:1) como fase móvel, obtendo 26 frações e os compostos puros **1 (LC2)** (32,1 mg), **5 (LC5)** (17,5 mg), **4 (LC4)** (143,1 mg) e **14 (LC3)** (7,3 mg).

A fração D (18% de acetato de etila em ciclohexano) (60,6 mg) foi purificada por CLAE, usando n-hexano:acetato de etila (99:1) como fase móvel resultando os compostos puros **2 (LC18)** (9 mg), **3 (LC7)** (2,6 mg), **9 (LC19)** (6,8 mg) e **15 (LC6)** (1,5 mg). As frações H e I (30% e 34% de acetato de etila em ciclohexano) (5,8 mg) foi purificada por CLAE, usando n-hexano:acetato de etila (98:2) como fase móvel resultando o composto puro **6 (LC8)** (2,1 mg).

A fração N (54% de acetato de etila em ciclohexano) (13,0 mg) foi purificada por CLAE, usando ciclohexano:acetato de etila (93:7) como fase móvel resultando o composto puro **10 (LC10)** (2,0 mg). A fração P (62% de acetato de etila em ciclohexano) (210,9 mg) foi purificada por CLAE usando ciclohexano:acetato de etila (93:7) como fase móvel resultando o composto puro **23 (LC11)** (9,7 mg). A fração R (70% de acetato de etila em ciclohexano) (48,0 mg) foi purificada por CLAE usando ciclohexano:acetato de etila (93:7) como fase móvel resultando o composto puro **18 (LC12)** (8,0 mg).

A fração S (74% de acetato de etila em ciclohexano) (66,9 mg) foi purificada por CLAE, usando ciclohexano:acetato de etila (93:7) como fase móvel resultando o composto puro **16 (LC14)** (8,0 mg). A fração T (78% de acetato de etila em ciclohexano) (50,6 mg) foi purificada por CLAE, usando ciclohexano:acetato de etila (97:3) como fase móvel resultando os compostos puros **11 (LC20)** (8,8 mg) e **21 (LC21)** (12,5 mg).

A fração V (84% de acetato de etila em ciclohexano) (24,4 mg) foi purificada por CLAE, usando ciclohexano:acetato de etila (93:7) como fase móvel resultando os compostos puros **7 (LC22)** (1,3 mg), **20 (LC15)** (1,8 mg) e **24 (LC17)** (9,3 mg).

A fração Z (100% de acetato de etila e acetato de etila:metanol (1:1)) (119,7 mg) foi purificada utilizando coluna sepack de gel de sílica, usando ciclohexano:acetato de etila (90:10) até acetato de etila:metanol (1:1) como fase móvel, obtendo-se 3 frações. A fração 1 (10% de acetato de etila em ciclohexano) (60,3 mg) foi purificada usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando ciclohexano:acetato de etila (90:10) como fase móvel resultando os compostos puros **8 (LC26)** (3,0 mg), **17 (LC25)** (1,7 mg) e **19 (LC24)** (0,9 mg).

- **Caespitol (1)**: líquido incolor e inodoro; IV (filme fino) ν_{\max} 3408, 3136, 2938, 2976, 2178, 1379, 968, 823, 795, 730, 650 cm^{-1} ; dados de ^1H NMR e ^{13}C NMR ver quadro 1; CIMS (CH_4) ver figura 7.

- **Caespitano (2)**: líquido incolor e inodoro; dados de ^1H NMR e ^{13}C NMR ver quadro 2; EIMS (70eV) ver figura 14.

- **Isômero do caespitano (3)**: líquido incolor e inodoro; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +24,0 (*c* 0,10, CHCl_3); UV (CHCl_3) λ_{\max} ($\log \epsilon$) 243,0 (2,56) nm; IV (filme fino) ν_{\max} 2939, 2854, 1458, 1379, 1230, 1118, 1006, 978 cm^{-1} ; dados de ^1H NMR e ^{13}C NMR ver quadro 3; EIMS (70eV) ver figura 18.; HRESIMS m/z 414,9998 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calc para $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{Br}_2\text{ClO}$, 415,0039).

- **5- β -acetoxi caespitol (4)**: líquido incolor e inodoro; $[\alpha]_D^{20} +50,5$ (c 0,41, CHCl₃); UV (CHCl₃) λ_{\max} (log ϵ) 243,4 (2,08) nm; IV (filme fino) ν_{\max} 3502, 2986, 1734, 1458, 1384, 1239, 1071, 739 cm⁻¹; dados de ¹H NMR e ¹³C NMR ver quadro 4; CIMS (CH₄) ver figura 27; HRESIMS m/z 510,9838 [M + Na]⁺ (calc para C₁₇H₂₇Br₂ClNaO₄, 510,9862).
- **5- β -acetoxi caespitano (5)**: líquido incolor e inodoro; $[\alpha]_D^{20} +36,3$ (c 0,49, CHCl₃); UV (CHCl₃) λ_{\max} (log ϵ) 24,8 (2,30) nm; IV (filme fino) ν_{\max} 2967, 1739, 1449, 1379, 1239, 1015, 744 cm⁻¹; dados de ¹H NMR e ¹³C NMR ver quadro 5; CIMS (CH₄) ver figura 36.; HRESIMS m/z 470,9895 [M - H]⁺ (calc para C₁₇H₂₆Br₂ClO₃, 470,9937).
- **8-acetil caespitol (6)**: líquido incolor e inodoro; dados de ¹H NMR ver quadro 6.
- **5- β -acetoxi 8-acetil caespitol (7)**: líquido incolor e inodoro; $[\alpha]_D^{20} +25,0$ (c 0,02, CHCl₃); UV (CHCl₃) λ_{\max} (log ϵ) 242,6 (2,58) nm; IV (filme fino) ν_{\max} 2978, 1740, 1734, 1374, 1230, 1118 cm⁻¹; dados de ¹H NMR e ¹³C NMR ver quadro 7; CIMS (CH₄) ver figura 47; HRESIMS m/z 531,0124 [M + H]⁺ (calc para C₁₉H₃₀Br₂ClO₅, 531,0149).
- **5- β -hidroxi acetil caespitol (8)**: líquido incolor e inodoro; $[\alpha]_D^{20} +9,2$ (c 0,13, CHCl₃); UV (CHCl₃) λ_{\max} (log ϵ) 243,4 (2,51) nm; IV (filme fino) ν_{\max} 3502, 2939, 1734, 1444, 1374, 1239, 1122, 1034 cm⁻¹; dados de ¹H NMR e ¹³C NMR ver quadro 8; CIMS (CH₄) ver figura 54; HRESIMS m/z 489,0017 [M + H]⁺ (calc para C₁₇H₂₈Br₂ClO₄, 489,0043).
- **Laucapiranóide A (9)**: líquido incolor e inodoro; dados de ¹H NMR e ¹³C NMR ver quadro 9; EIMS (70eV) ver figura 63.
- **5- β -acetoxi laucapiranóide A (10)**: líquido incolor e inodoro; $[\alpha]_D^{20} +27,0$ (c 0,047, CHCl₃); UV (CHCl₃) λ_{\max} (log ϵ) 242,6 (2,73) nm; dados de ¹H NMR e ¹³C NMR ver quadro 10; EIMS (70eV) ver figura 69; HRESIMS m/z 472,9917 [M + H]⁺ (calc para C₁₇H₂₆Br₂ClO₃, 472,9917)
- **Caespitenona (11)**: líquido incolor e inodoro; IV (filme fino) ν_{\max} 2976, 2929, 2356, 1682, 1458, 1369, 1262, 814, 725 cm⁻¹; dados de ¹H NMR e ¹³C NMR ver quadro 11; EIMS (70eV) ver figura 86.
- **(7S*)-7-O-metil furocaespitanolactol (12)**: pó cristalino; $[\alpha]_D^{20} +14,4$ (c 0,09, CHCl₃); UV (CHCl₃) λ_{\max} (log ϵ) 242,8 (2,43) nm; IV (filme fino) ν_{\max} 1767, 1465, 1375, 1094 cm⁻¹; dados de ¹H NMR e ¹³C NMR data ver quadro 12; CIMS (CH₄) ver figura 87; HRESIMS m/z 337,0190 [M + H]⁺ (calc para C₁₃H₁₉BrClO₃, 337,0206).
- **(7R*)-7-O-metil furocaespitanolactol (13)**: pó cristalino; $[\alpha]_D^{20} +61,3$ (c 0,16, CHCl₃); UV (CHCl₃) λ_{\max} (log ϵ) 244,6 (2,52) nm; IV (filme fino) ν_{\max} 1762, 1463, 1374, 1103 cm⁻¹; dados de ¹H NMR e ¹³C NMR ver quadro 13; CIMS (CH₄) ver figura 99; HRESIMS m/z 337,0195 [M + H]⁺ (calc para C₁₃H₁₉BrClO₃, 337,0206).
- **Isocespitol (14)**: líquido incolor e inodoro; dados de ¹H NMR e ¹³C NMR ver quadro 14; CIMS (CH₄) ver figura 111.
- **Deoxiisocespitol (15)**: líquido incolor e inodoro; dados de ¹H NMR ver quadro 15.

- **Derivado do iocaespitol (16)**: líquido incolor e inodoro; $[\alpha]_D^{20}$ -46,0 (*c* 0,33, CHCl₃); UV (CHCl₃) λ_{\max} (log ϵ) 246,8 (2,34) nm; dados de ¹H NMR e ¹³C NMR ver quadro 16; CIMS (CH₄) ver figura 119; HRESIMS *m/z* 335,0747 [M + H]⁺ (calc para C₁₅H₂₅Br₂ClO₃, 335,0777).
- **Derivado do caespitol (17)**: líquido incolor e inodoro; ¹H NMR e ¹³C NMR ver quadro 17.
- **5-hidroxi laucapiranóide A (18)**: líquido incolor e inodoro; ¹H NMR e ¹³C NMR ver quadro 18; EIMS (70 eV) ver figura 135.
- **Derivado do caepitol (19)**: líquido incolor e inodoro; ¹H NMR e ¹³C NMR ver quadro 19; CIMS (CH₄) ver figura 143.
- **Aplisiadiol (20)**: líquido incolor e inodoro; ¹H NMR e ¹³C NMR ver quadro 20; EIMS (70 eV) ver figura 151.
- **Derivado do sniderol (21)**: líquido incolor e inodoro; ¹H NMR e ¹³C NMR ver quadro 21; EIMS (70 eV) ver figura 159.

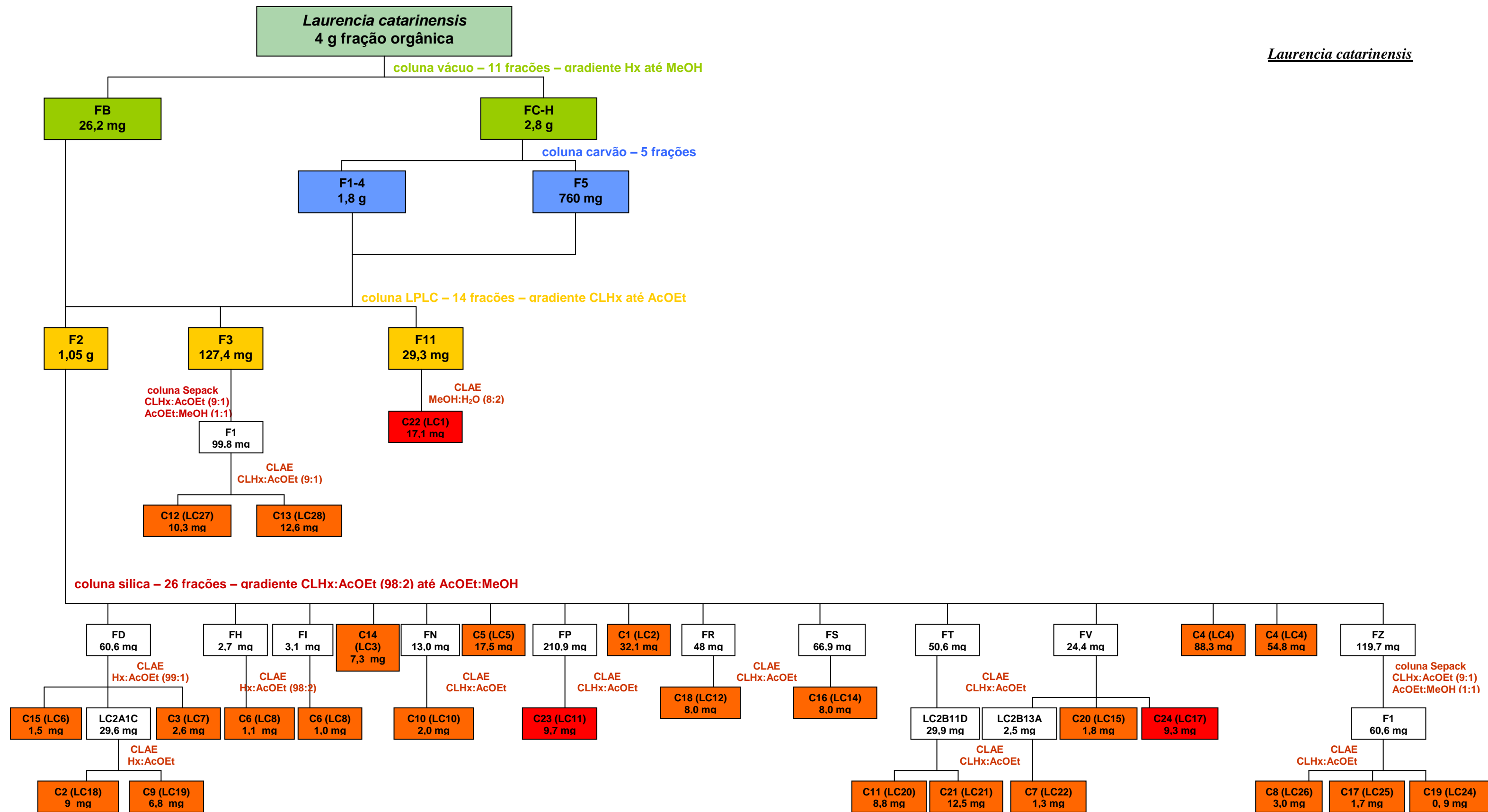


Figura 1: Organograma do isolamento dos compostos de *Laurencia catarinensis*.



Figura 2: CCD do extrato orgânico de *Laurencia catarinensis*, fase móvel: n-hexano:acetato de etila (9:1), revelador: anisaldeído-sulfúrico. A mancha em Rf 0,66 representa o composto caespitol.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após sucessivos procedimentos cromatográficos, utilizando gel de sílica e carvão ativado, seguido de purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando colunas de fase normal (gel de sílica), foram obtidas 41 substâncias em quantidades entre 1 mg – 200 mg. A seguir é apresentada a elucidação estrutural de 21 substâncias com estruturas relacionadas ao caespitol, bem como dados relativos de compostos como trans-nerolidol, tirsiferol e trans-fitol. Ao final deste capítulo são apresentados sumariamente os dados de atividades biológicas obtidos para os compostos **1**, **4** e **14**.

Para a interpretação dos espectros de RMN, UV e espectros de massas foram utilizados livros básicos: GÜNTHER, H., 1995, BUDZIKIEWICK, H., 1998, BREITMAIER, E. 2002, RÜCKER, G.; NEUGEBAUER, M.; WILLEMS, G.G., 2001, FRIEBOLIN, H., 2005 e SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J., 2005.

3.1. Compostos com estruturas relacionadas ao caespitol:

- Composto 1:

O composto **1** (**LC02**) (32 mg) foi isolado após purificação em coluna cromatográfica de gel de sílica de diferentes frações obtidas durante o processo de fracionamento (**Figura 1**) como um líquido incolor e inodoro. O espectro de infravermelho indica a presença de grupo hidroxila entre 3100 a 3150 cm^{-1} e ausência de outros grupos funcionais como carbonila. O espectro de ^{13}C RMN e experimento HSQC-DEPT mostraram 15 carbonos, três carbonos quaternários, quatro carbonos metínicos, quatro metilenos e quatro grupos metilas. O espectro ^1H RMN apresentou sinais em δ 4,35 (1H, dd, J = 4,4; 12,5 Hz) e 4,27 (1H, dd, J = 4,4; 13,2 Hz) com deslocamento químico característico de grupamento CH ligado a halogênio e a presença de hidrogênio carbinólico em δ 3,50 (1H, sl). O espectro de massas por ionização química mostra um pico molecular em m/z 431/433/435. O exame do padrão isotópico nos sinais com maior intensidade em 413/415/417/419 mostra uma proporção 3:7:5:1, indicando a presença de dois átomos de bromo e um cloro na molécula, pode se propor a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{ClBr}_2\text{O}_2$. A presença de dois equivalentes de dupla ligação sugere um álcool sesquiterpenico halogenado com dois anéis.

Análise detalhada do espectro de correlação ^1H - ^1H COSY mostra um sistema de spins $\text{CH}_{\text{ax}}\text{CH}_2\text{CH}_{\text{ax}}$ (**Figura 3**), considerando-se o valor alto da constante de acoplamento (J= 12.4 Hz) entre δ 4,35 (CH) e δ 1,60/2,28 (CH_2). Tendo em vista, os deslocamentos químicos do metino em δ 63,4, do carbono quaternário em δ 71,8 e dos hidrogênios da metila ressonando em δ 1,66, pode-se inferir que o sistema de spins em questão está inserido em um anel ciclohexano com bromo e cloro com relação diequatorial entre os halogênios (González et al., 1979). Para o

outro anel, oxigenado, o mapeamento das interações ^1H - ^1H COSY permite propor a estrutura parcial mostrada na figura 3.

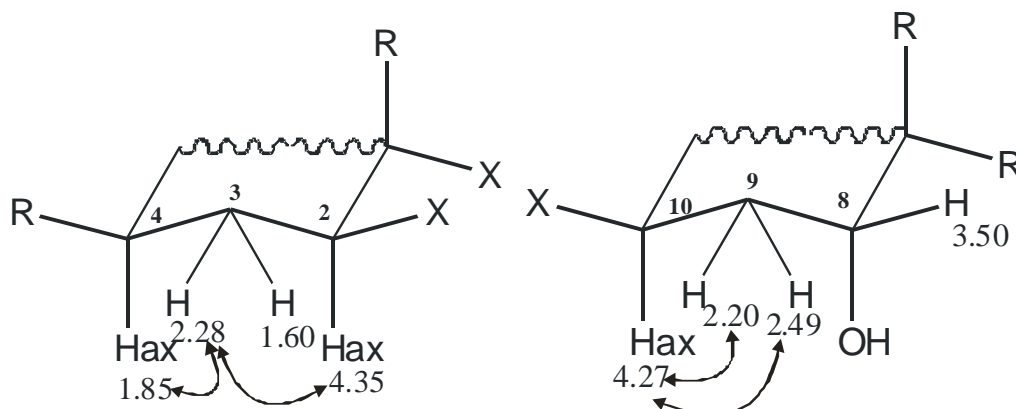


Figura 3: Sistema de spins $\text{CH}_{\text{ax}}\text{CH}_2\text{CH}_{\text{ax}}$ e estrutura parcial do anel oxigenado proposto para o composto **1**.

A análise detalhada dos espectros de HSQC e HMBC permite propor uma conectividade entre as estruturas propostas nas figuras 4 e 5.

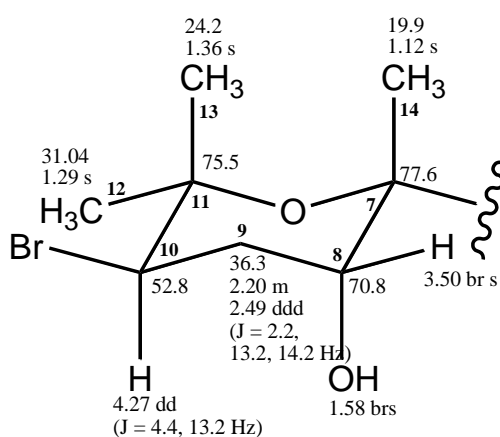


Figura 4: Anel A do composto **1**.

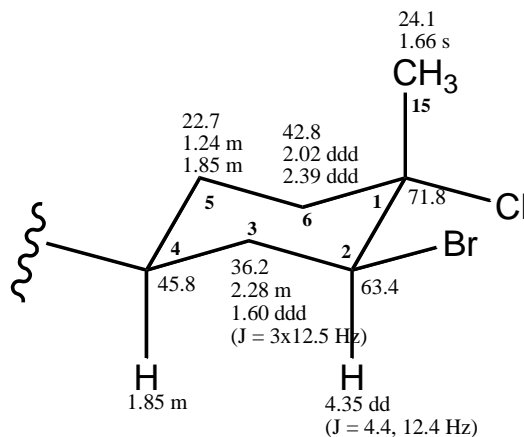


Figura 5: Anel B do composto **1**.

A ligação entre os anéis A e B foi proposta a partir dos dados fornecidos pelo espectro de HMBC, onde se observa a correlação entre os hidrogênios em δ 1,12 (CH₃) com os carbonos em δ 45,8 (CH) e 77,6 (Cq) e a correlação entre os hidrogênios em δ 1,85 (CH₂) com o carbono em δ 77,6 (Cq). A posição da metila em δ 24,1 foi proposta pela correlação dos hidrogênios em δ 1,66 (CH₃) com os carbonos em δ 63,4 (CH) e δ 71,8 (Cq) (**Figura 6**).

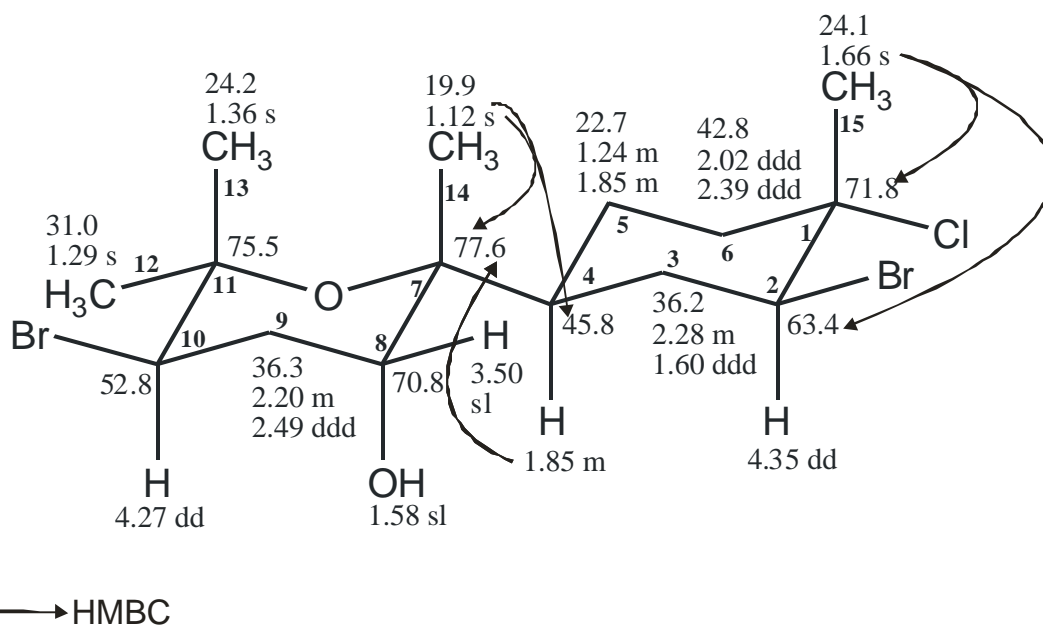


Figura 6: Correlações HMBC do composto 1.

A configuração relativa do outro centro assimétrico foi proposta baseada nas constantes de acoplamento. No anel A, observa-se uma constante de acoplamento alta do hidrogênio em δ 4,27 indicando a posição axial do mesmo e uma posição equatorial do bromo nesse anel tetraidropirano.

A fragmentação observada no espectro obtido por ionização química (CIMS) é coerente com a fórmula molecular $C_{15}H_{25}ClBr_2O_2$ como mostra a figura 7.

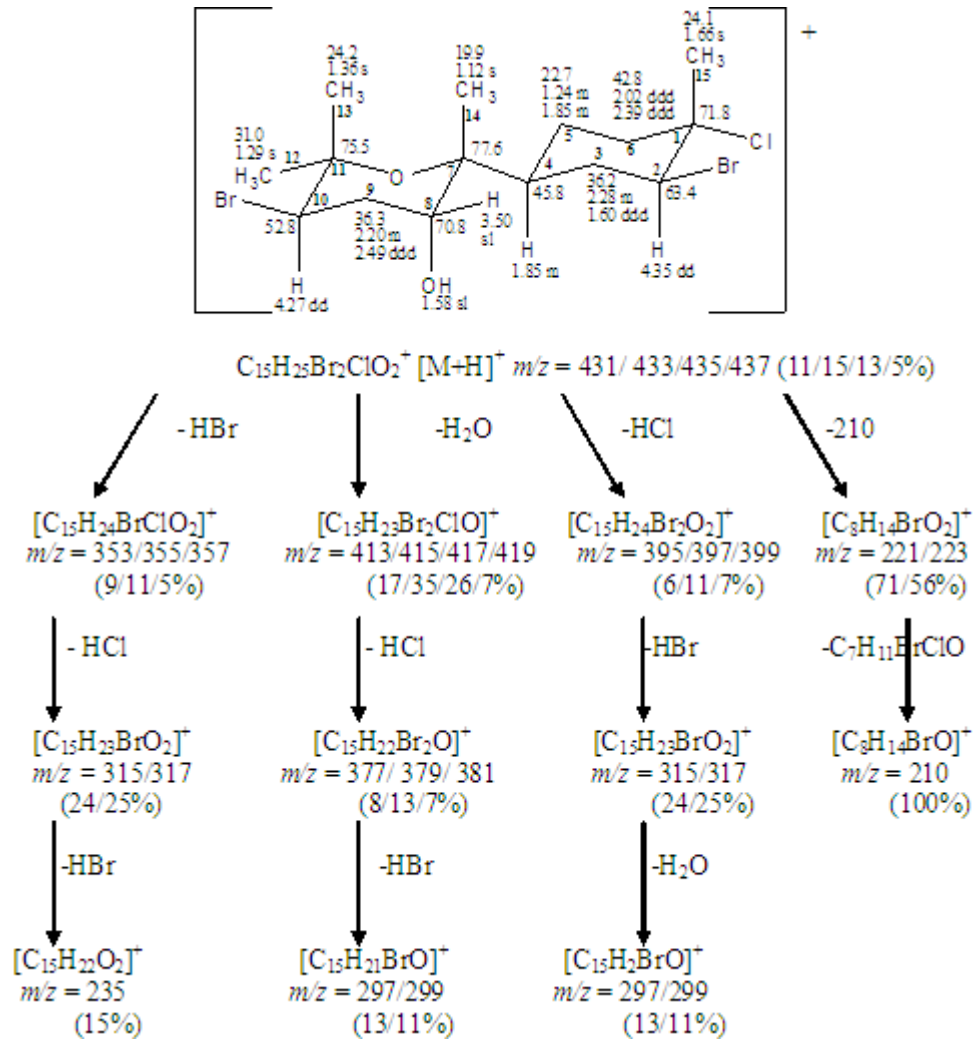


Figura 7: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização química do composto 1.

Com base nos dados de espectros de massas, infravermelho e ressonância magnética nuclear podemos concluir que o composto 1 trata-se do **caespitol**, previamente descrito para *Laurencia caespitosa* (González et al., 1973) e *Aplysia dactylomela* (Wessels et al., 2000).

Quadro 1: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 1 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0) com a literatura (Wessel et al. 2000, CDCl_3 ; González et al. 1979, CDCl_3).

C	$\delta^1\text{H}$ (J Hz)	δC	$\delta^1\text{H}$ (J Hz) Wessel et al., 2000	δC González et al., 1979
1	-	71,1	-	71,8
2	4,35 dd (4,4 ; 12,4)	63,4	4,37 dd (4,6; 12,7)	63,6
3	2,28 m 1,60 ddd (12,5; 12,5; 12,5)	36,2	2,28 m 1,63 ddd (12,6; 12,6; 12,6)	36,3
4	1,85 m	45,8	1,89 m	46,0
5	1,24 m 1,85 m	22,7	1,24 m 1,89 m	22,8
6	2,02 ddd (3,6; 3,6; 13,5) 2,39 ddd (3,3; 3,3; 13,5)	42,8	2,05 ddd (4,1; 4,1; 13,5) 2,41 ddd (3,3; 3,3; 13,5)	43,0
7	-	77,6	-	77,2
8	3,50 brs	70,8	3,57 brs	71,0
9	2,20 m 2,49 ddd (2,2; 13,2; 14,2)	36,3	2,23 m 2,52 ddd (2,0; 13,2; 14,2)	36,4
10	4,27 dd (4,4; 13,2)	52,8	4,29 dd (4,6; 13,2)	53,0
11	-	75,5	-	75,5
12	1,29 s	31,1	1,31 s	31,1
13	1,36 s	24,2		24,2
14	1,12 s	19,9		20,0
15	1,66 s	24,1		24,1
OH	1,58 s	-	1,59 s	

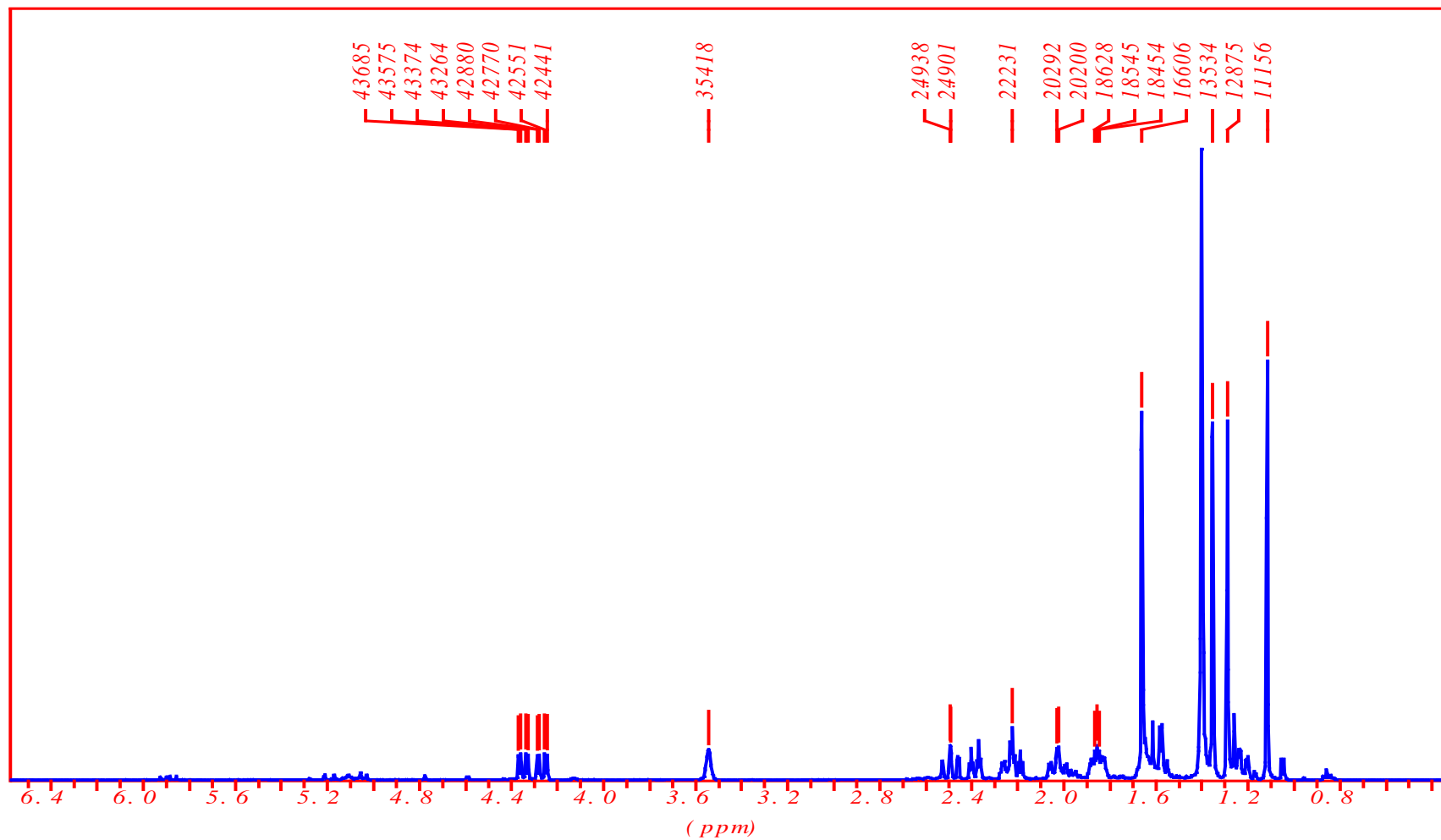


Figura 8: Espectro de ¹H RMN do composto 1 (LC2) em CDCl₃ (400 MHz).

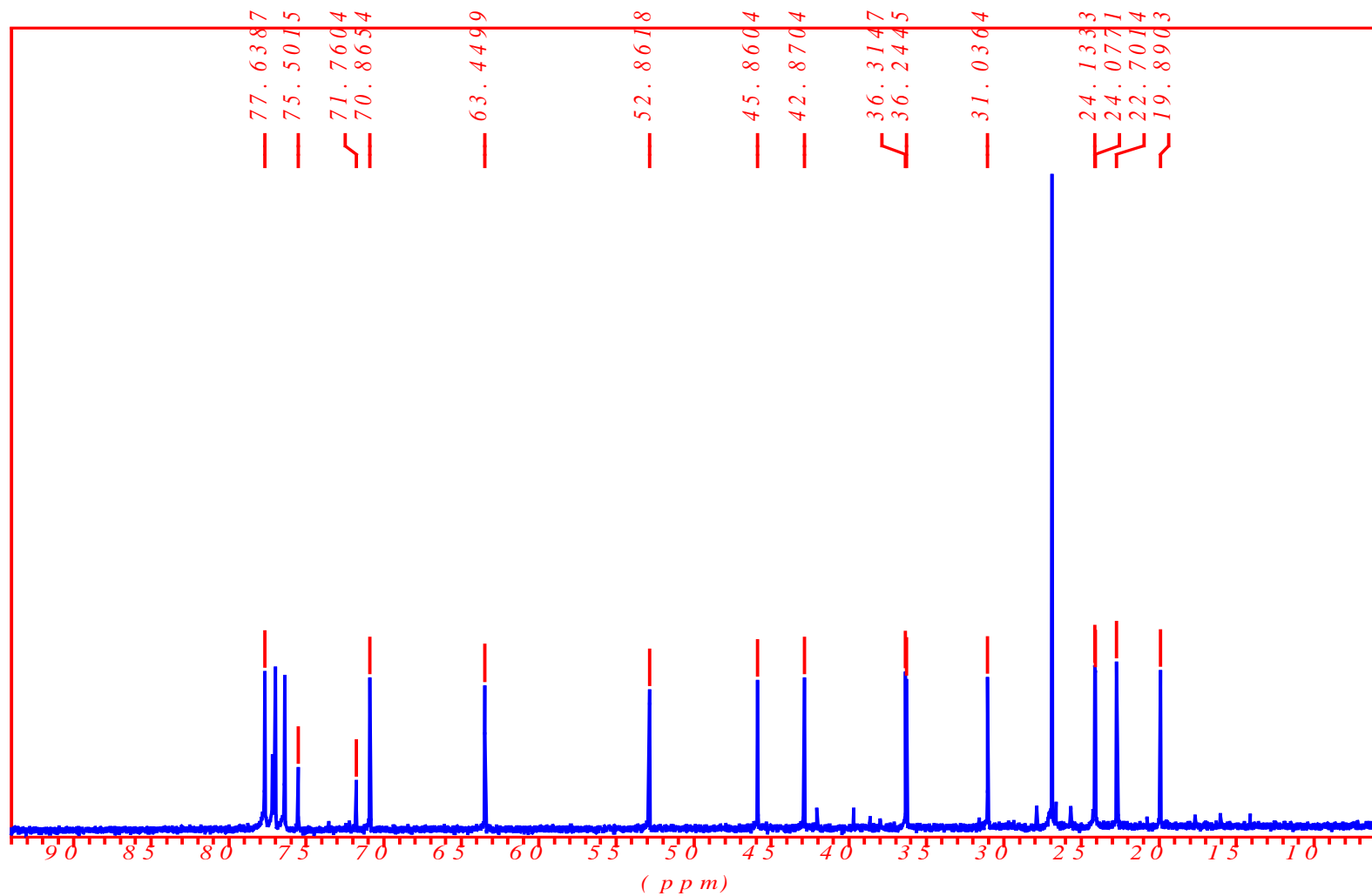


Figura 9: Espectro de ^{13}C RMN do composto 1 (LC2) em CDCl_3 (50 MHz).

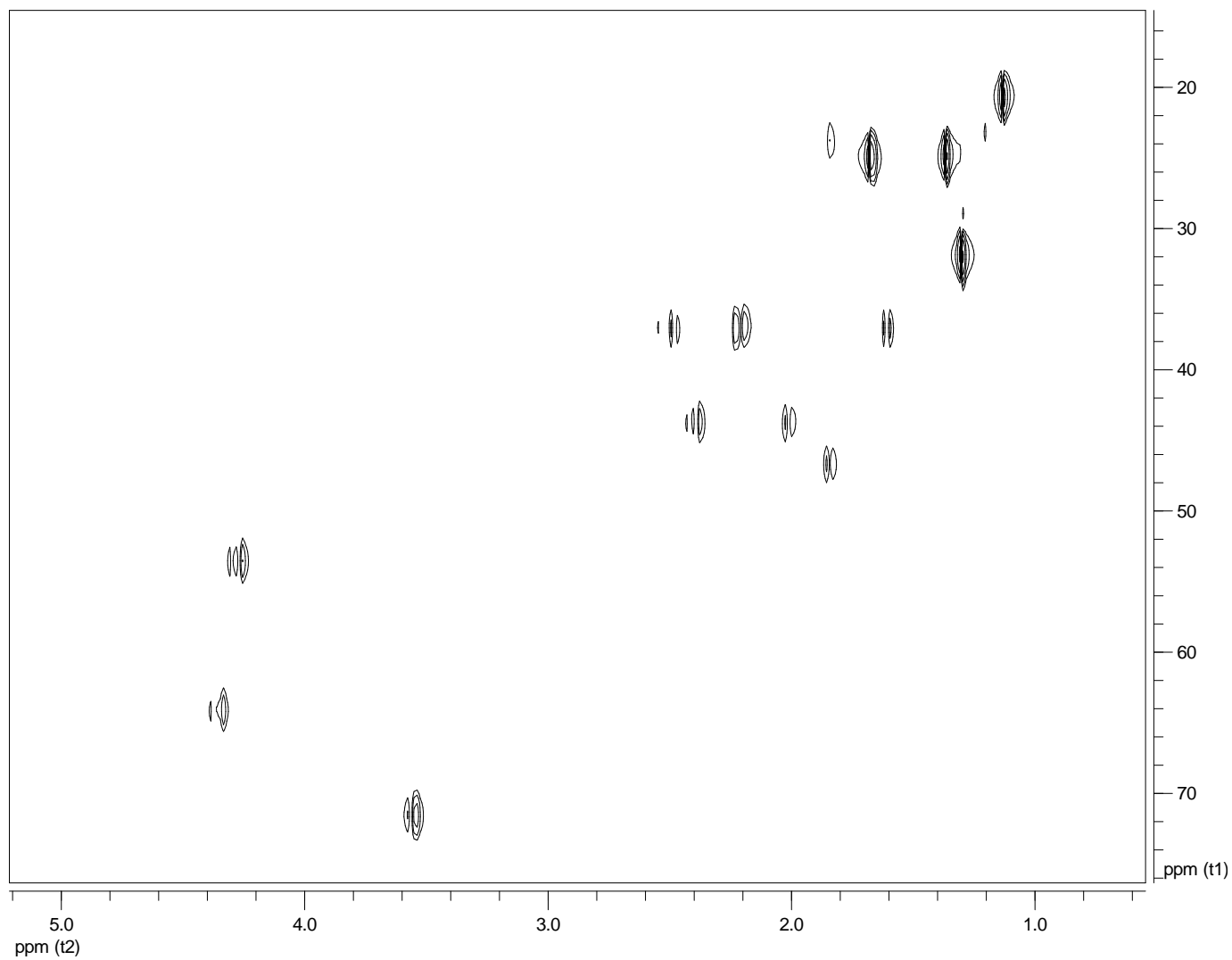


Figura 10: Espectro HSQC-HSQC-DEPT do composto 1 (LC2) em CDCl_3 (400 MHz).

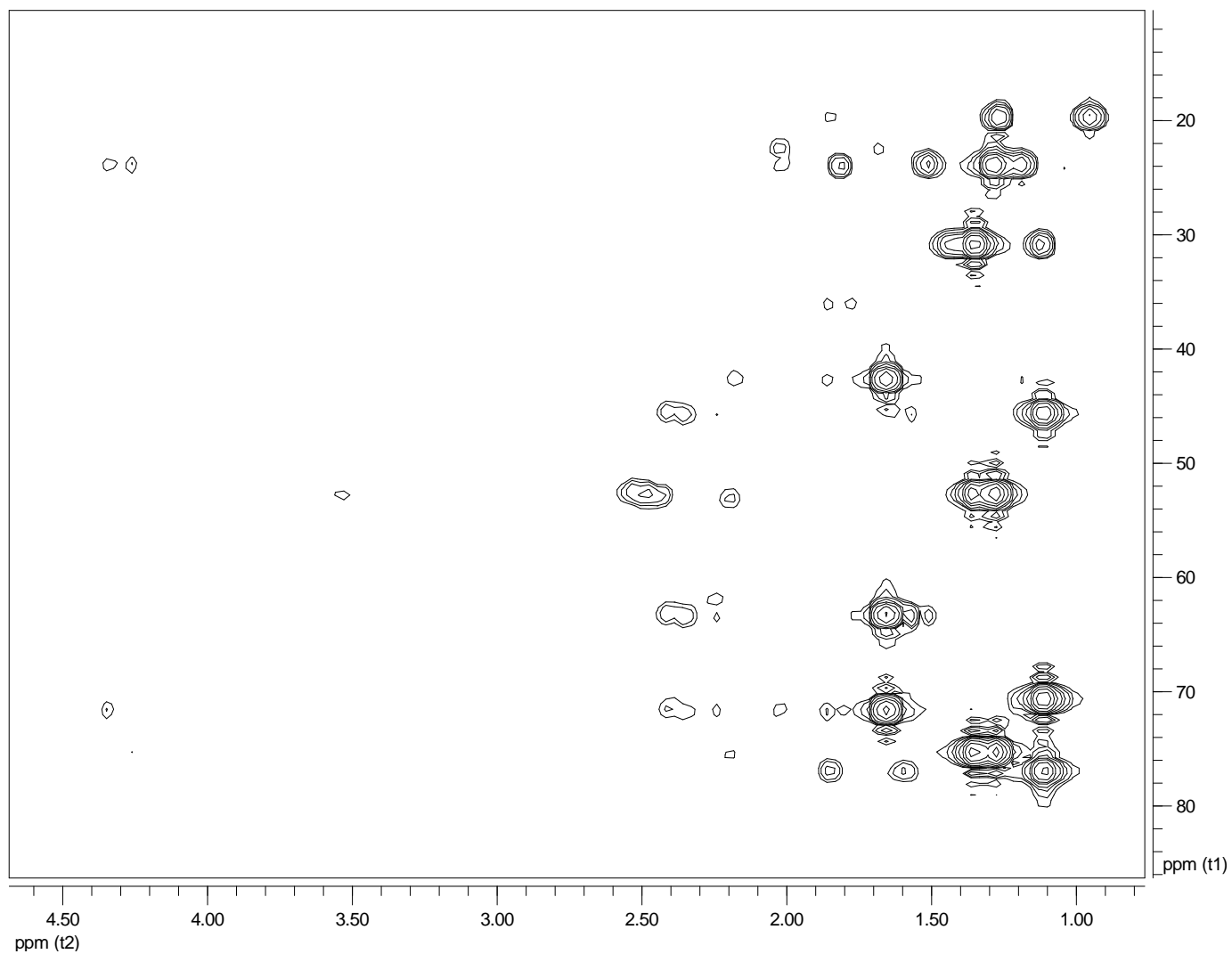


Figura 11: Espectro HMBC do composto 1 (LC2) em CDCl_3 (400 MHz).

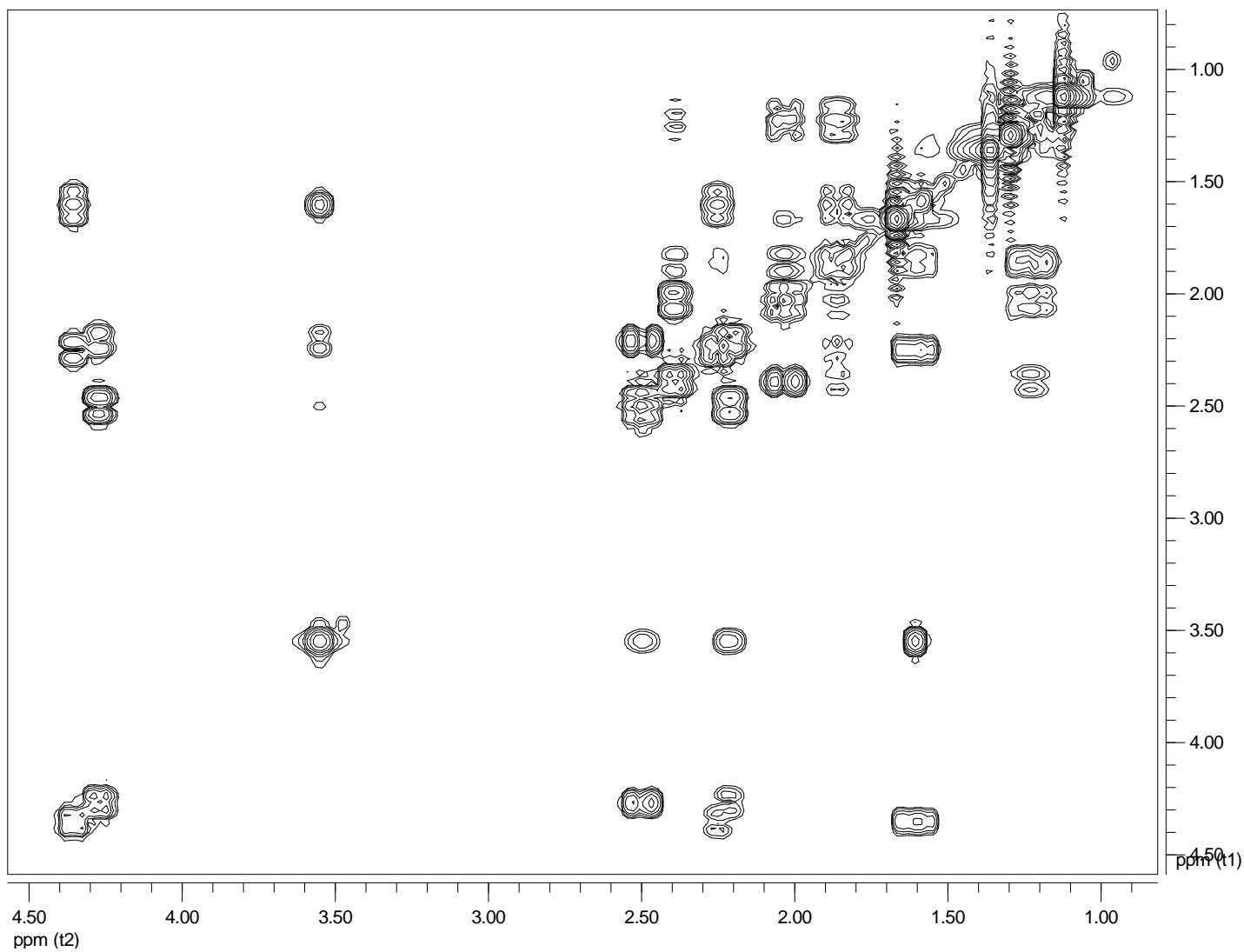


Figura 12: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 1 (LC2) em CDCl_3 (400 MHz).

LC02 #39 RT: 0.76 AV: 1 NL: 9.62E6
T: + c Full ms [50.00-600.00]

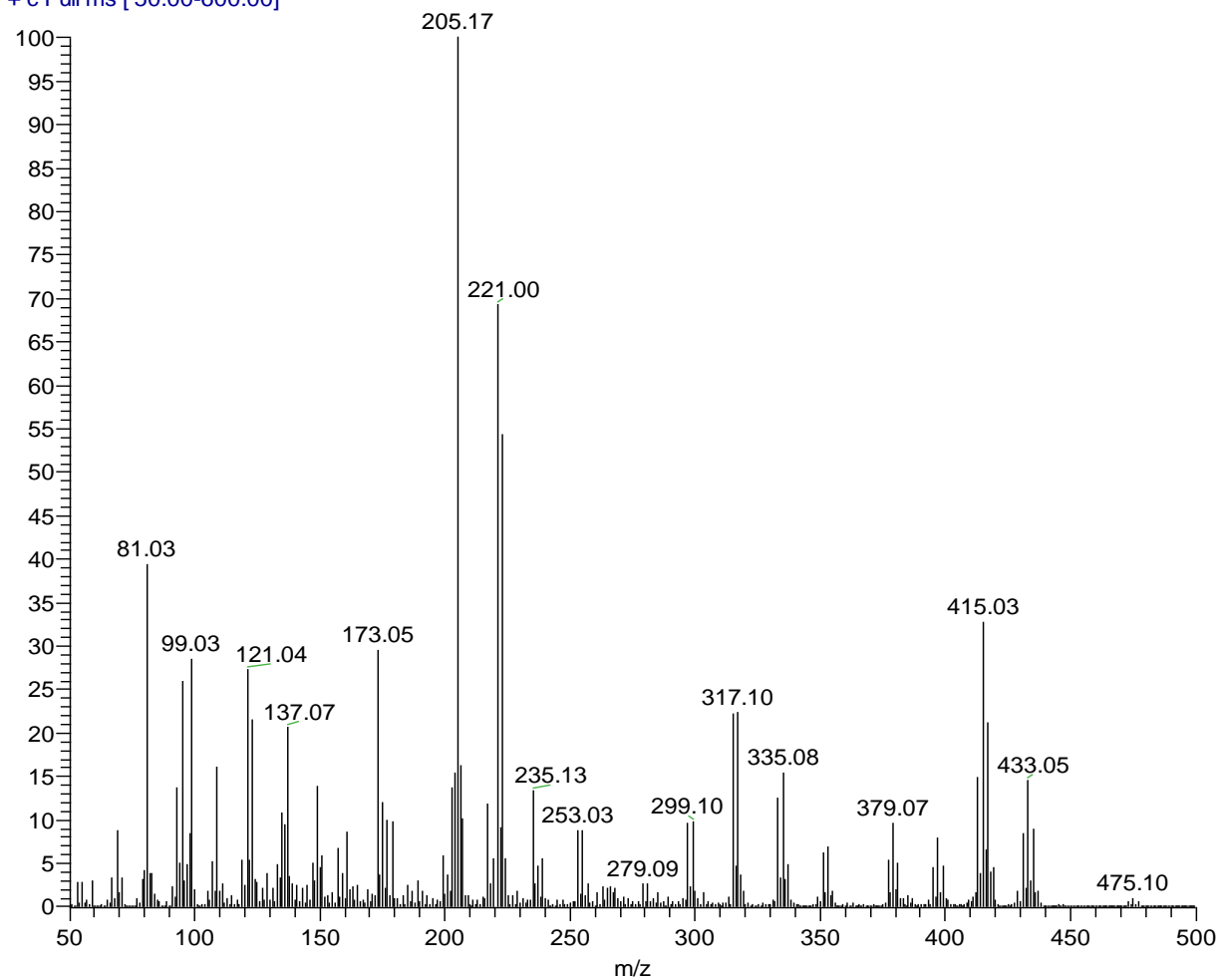


Figura 13: Espectro de massas por ionização química do composto 1 (LC2).

- **Composto 2**

O composto **2 (LC18)** (9 mg) foi isolado após purificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de uma fração obtida durante o processo de fracionamento (**Figura 1**) como um líquido incolor e inodoro. O espectro de infravermelho indicou a ausência de grupos funcionais como hidroxila e carbonila. O espectro de massas apresentou os picos de maior massas em m/z 356/358/360/362 com um padrão de intensidades relativas semelhante ao composto **1**, o que sugere a presença de dois grupos bromos e um cloro na molécula e picos de maior intensidade em m/z 205/207, sugerindo a perda do anel B com um átomo de bromo e um átomo de cloro (**Figura 14**). O espectro de hidrogênio apresentou semelhanças ao composto **1** com a presença de sinais em δ 4,30 (1H, dd, $J = 4,4; 12,6$ Hz) e 3,80 (1H, dd, $J = 4,0; 12,6$ Hz) correspondentes aos hidrogênios ligados a carbonos halogenados, mas com ausência do hidrogênio carbinólico, sugerindo a fórmula molecular $C_{15}H_{25}Br_2ClO$, em que o íon molecular esperado em m/z 414/416/418/420 não foi detectado. A comparação dos dados apresentados com dados da literatura confirma a identificação do composto **2** como o **caespitano** (**Figura 15**), isolado previamente para *Laurencia caespitosa* (Chang et al., 1989) e *Aplysia dactylomela* (Wessels et al., 2000).

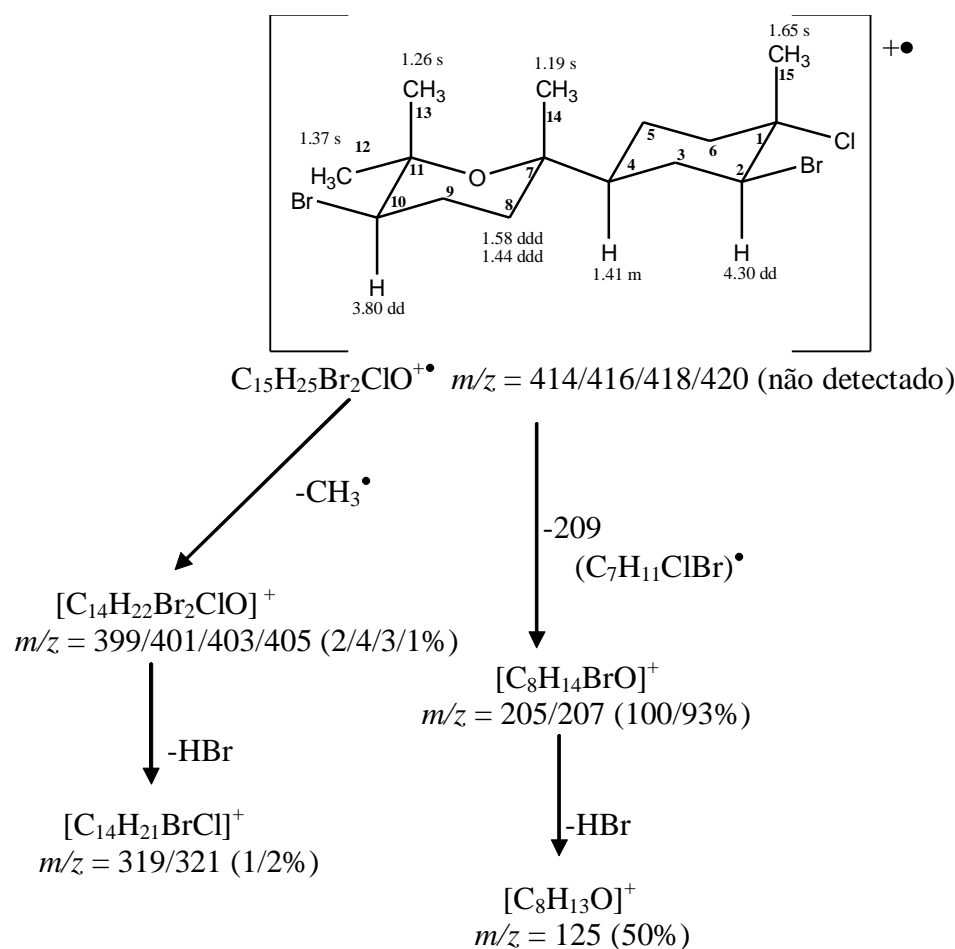


Figura 14: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização eletrônica do composto **2**.

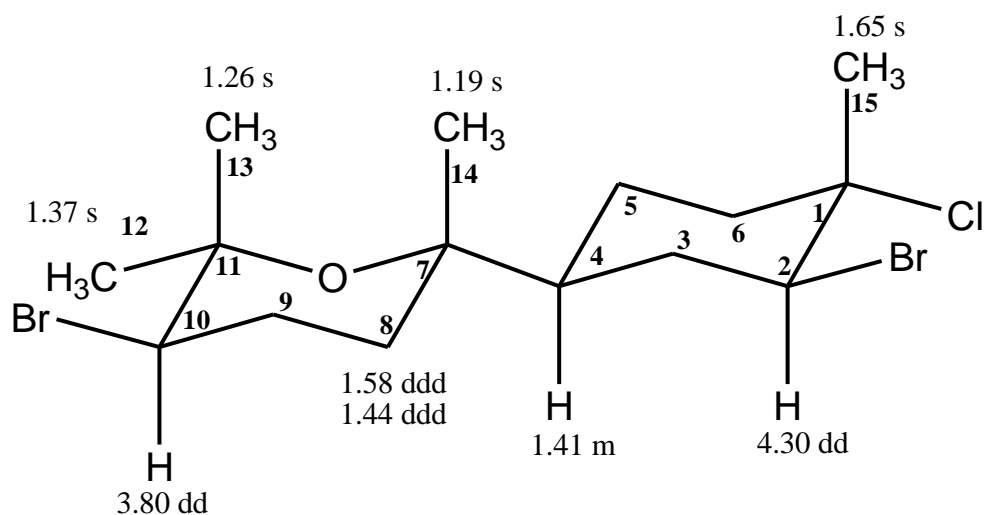


Figura 15: Estrutura do composto **2** com dados observados no espectro de hidrogênio.

Quadro 2: Dados de ^1H e ^{13}C do composto **2** (400 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0) com a literatura (Wessel et al., 2000, CDCl_3).

C	δH (J Hz)	δH (J Hz) Wessel et al., 2000	δC Wessel et al., 2000
1	-	-	71,7
2	4,30 dd (4,4; 12,6)	4,33 dd (4,3; 12,4)	63,9
3	1,72 m 2,27 m	1,74 m 2,30 m	36,0
4	1,41 m	1,42 m	51,1
5	1,23 m 1,80 m	1,25 m 1,81 m	23,3
6	2,0 ddd (3,5; 13,5; 13,5) 2,37 ddd (3,5; 3,5; 13,5)	2,01 ddd (3,2; 13,5; 13,5) 2,40 ddd (3,2; 3,2; 13,5)	42,7
7	-	-	74,3
8	1,44 ddd (3,4; 3,4; 13,3) 1,58 ddd (4,0; 13,3; 13,3)	1,45 ddd (3,8; 3,8; 13,5) 1,61 ddd (4,3; 13,5; 13,5)	35,2
9	2,10 m 2,20 m	2,11 m 2,26 m	28,2
10	3,80 dd (4,0; 12,6)	3,83 dd (4,3; 12,4)	58,2
11	-	-	75,1
12	1,26 s	1,28 s	31,1
13	1,37 s	1,40 s	23,6
14	1,17 s	1,19 s	22,7
15	1,65 s	1,68 s	24,0

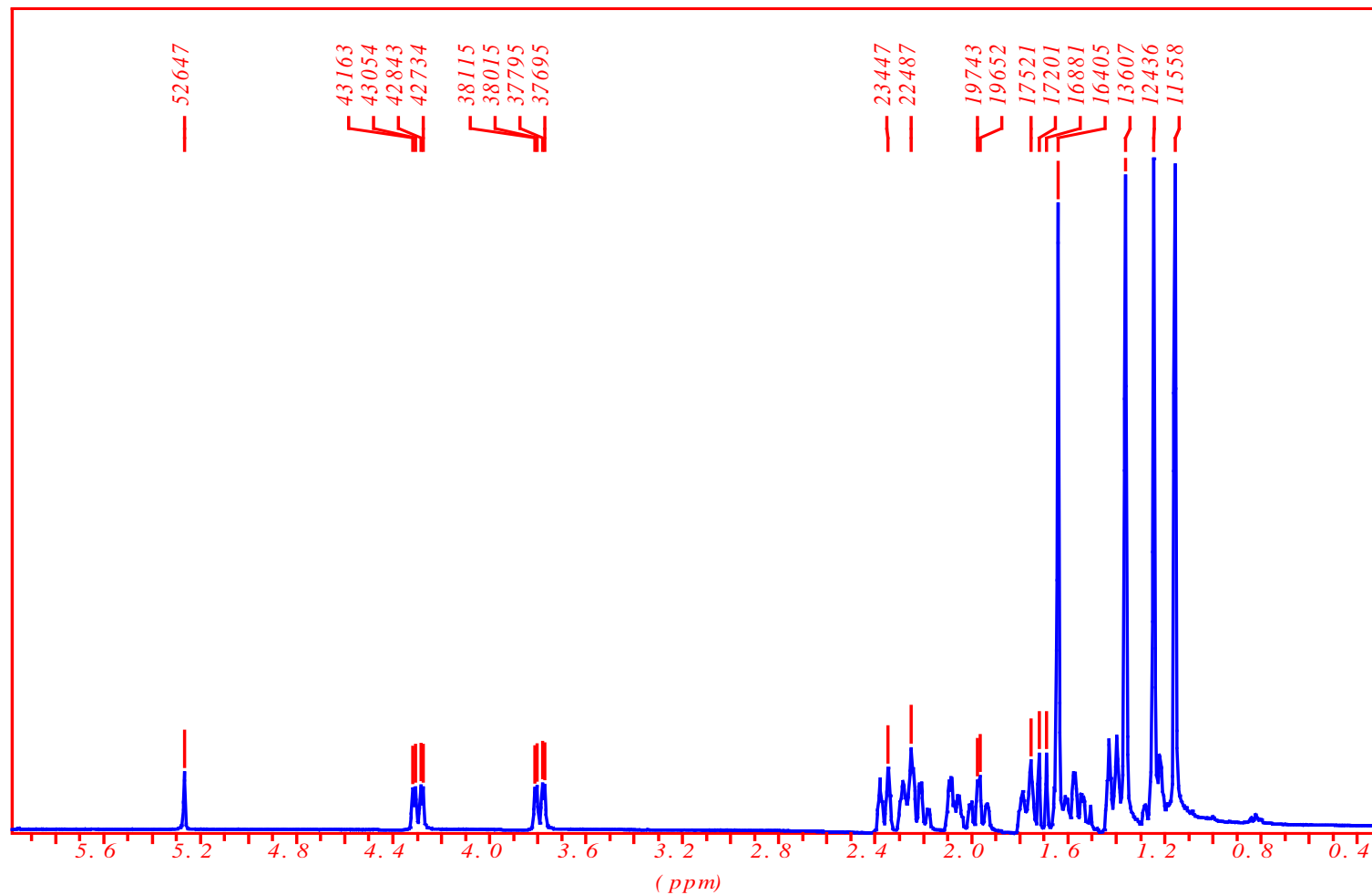


Figura 16: Espectro de ^1H RMN do composto 2 (LC18) em CDCl_3 (400 MHz).

LC18 #27 RT: 0.62 AV: 1 NL: 4.83E7
T: + c Full ms [40.00-700.00]

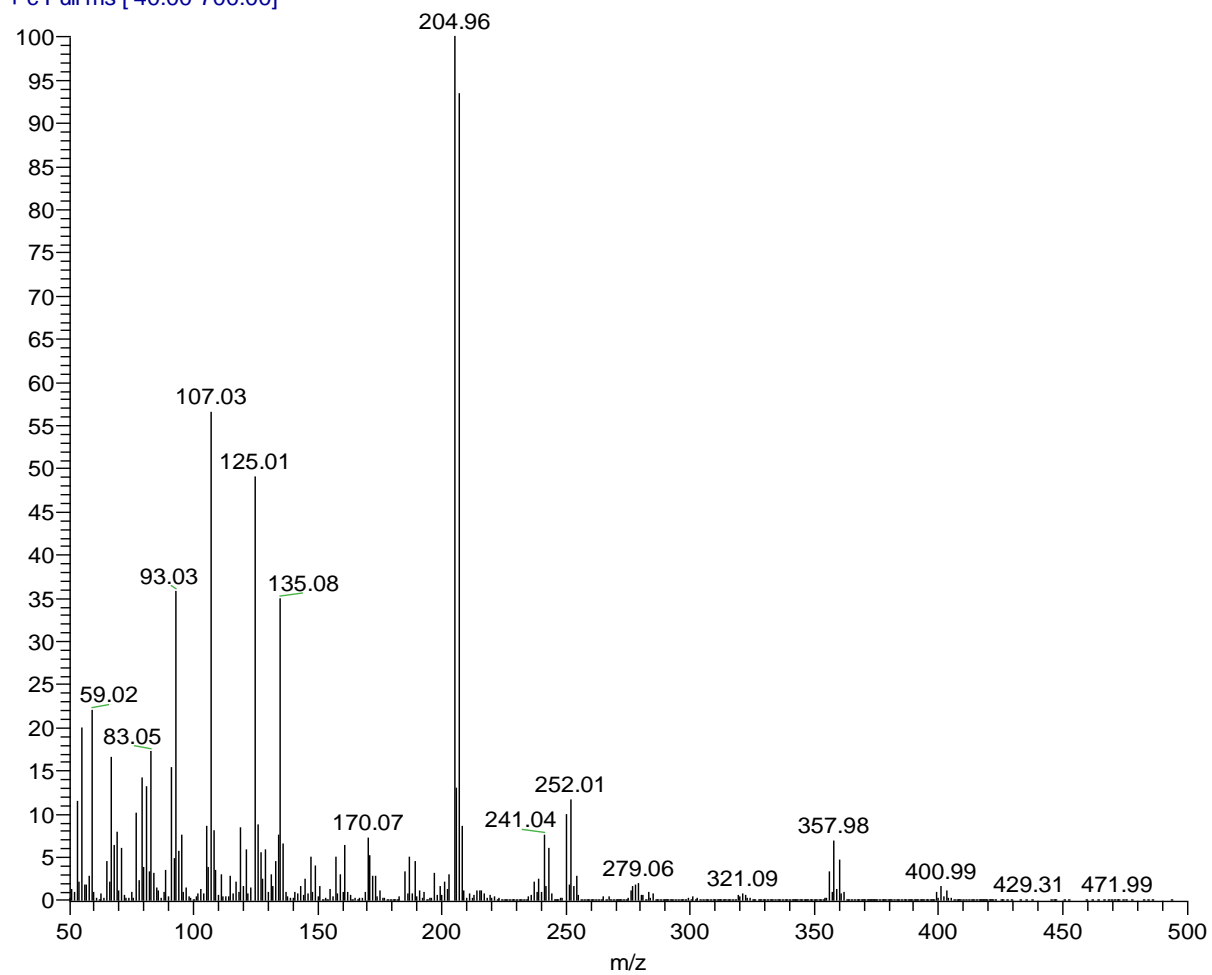


Figura 17: Espectro de massas por ionização eletrônica do composto 2 (LC18).

- Composto 3

O composto **3 (LC07)** (2,6 mg) foi isolado como um líquido incolor e inodoro após purificação em CLAE de uma fração obtida durante o processo de fracionamento (**Figura 1**). O espectro de infravermelho indicou a ausência de grupos funcionais como hidroxila e carbonila. Os experimentos HSQC-DEPT e HMBC indicaram a presença de três carbonos quaternários, três carbonos metínicos, cinco grupos metilenos e quatro grupos metilas. Em relação aos carbonos, cinco são provavelmente ligados a oxigênio ou halogênio, ressonando em δ 74,0 (Cq), 75,5 (Cq), 71,9 (Cq), 64,1 (CH) e 59,8 (CH). O espectro de massas apresentou similaridade marcante com o espectro de massas do composto **2**, sugerindo tratar-se de um isômero (**Figura 18**). O espectro de massas de alta resolução (calculado e observado) confirmou a fórmula molecular proposta.

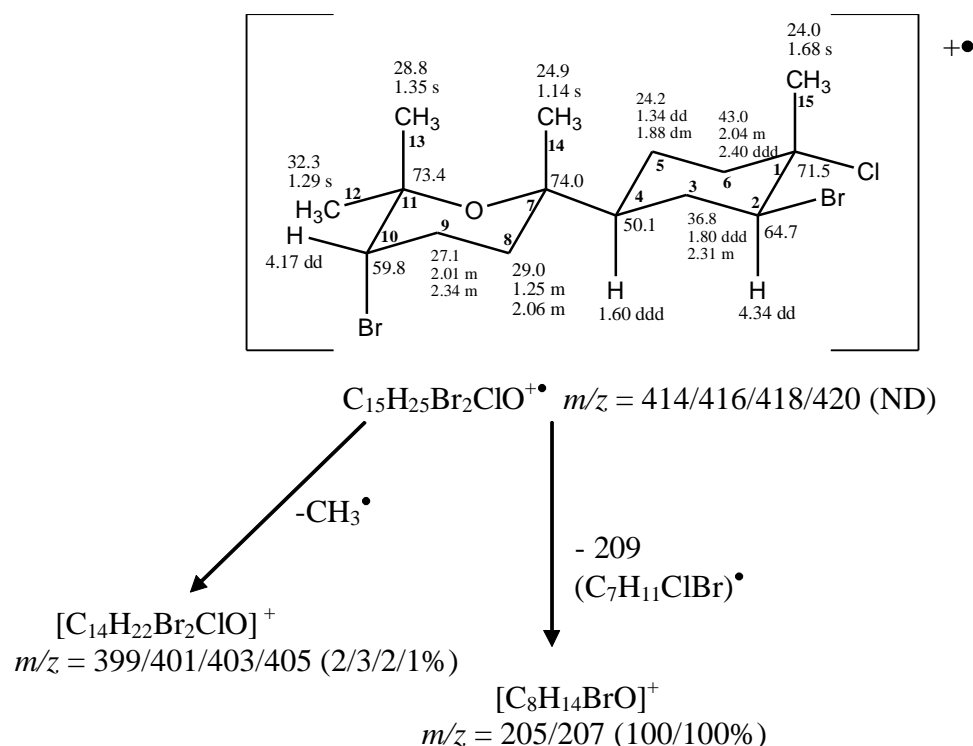


Figura 18: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização eletrônica do composto **3**.

O espectro de 1H RMN apresentou sinais em δ 4,34 (1H, dd, $J = 4,4; 12,6$ Hz) e δ 4,17 (1H, dd, $J = 4,4; 3,3$ Hz), correspondentes aos hidrogênios ligados a CH-halogênios e quatro metilas quaternárias em δ 1,14, 1,29, 1,35 e 1,68, mas com ausência do hidrogênio carbinólico. Análise detalhada do espectro de correlação 1H - 1H COSY mostra um sistema de spins $CH_{ax}CH_2CH_{ax}$, semelhante aquele observado para os compostos **1** e **2**. Os deslocamentos químicos do metino em δ 64,1, do carbono quaternário em δ 71,9 e dos hidrogênios da metila ressonando em δ 1,68, permitem inferir que o sistema de spins em questão está inserido em um anel ciclohexano com bromo e cloro, com relação diequatorial entre os halogênios, tal como o caespito.

A configuração relativa dos centros assimétricos foi proposta baseada nas constantes de acoplamento e experimento NOE. No anel A observa-se a posição axial do bromo no anel tetraidropirano, indicada pelas constantes de acoplamento baixas do hidrogênio ligado a um carbono halogenado em δ 4,17 (1H, dd, $J = 4,4, 3,3$ Hz), o que pode ser confirmado pela irradiação das metilas em δ 1,29 e 1,35, observando-se correlações NOE com este hidrogênio. No anel A, a alocação das metilas geminais foi feita com base em experimentos NOE diferencial (dados não apresentados), em que a irradiação da metila ressonando em δ 1,14 confirmou que o sinal em δ 1,35 corresponde ao grupo metílico em posição axial (Figura 19).

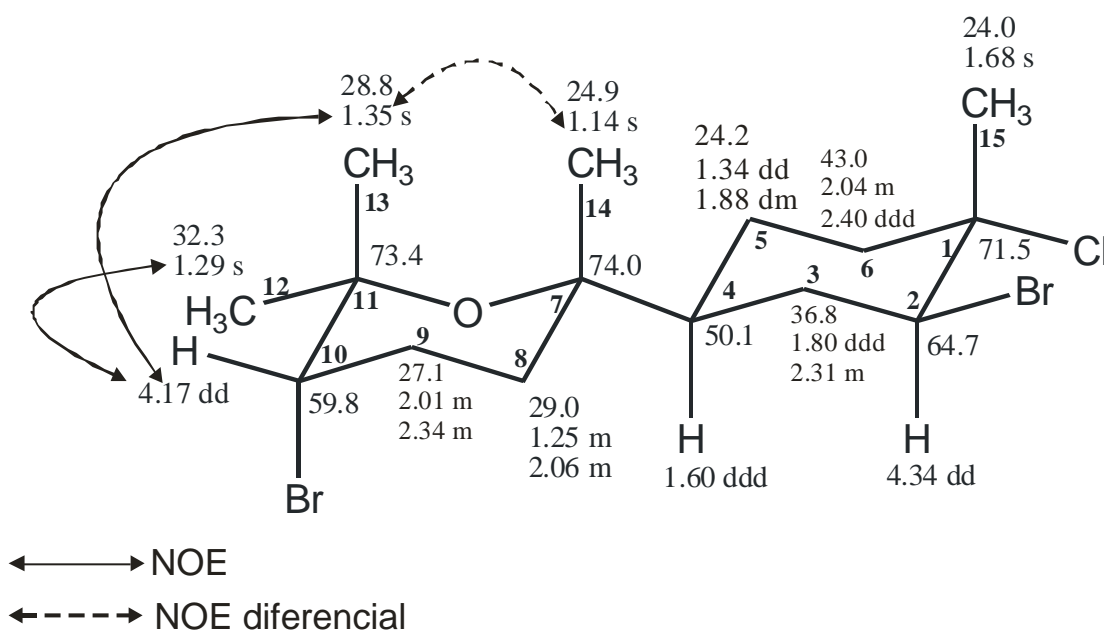


Figura 19: Estrutura do composto **3** com correlações NOE e NOE diferencial.

Com base nos dados de espectros de massas, infravermelho e ressonância magnética nuclear, composto **3** apresenta a estrutura correspondente a um isômero do **caespitano**, diferindo deste pela posição axial do bromo do carbono 10 no anel A, trata-se de um composto novo. O valor observado de atividade ótica foi de $[\alpha]_D = +24^\circ$ (0,10, CHCl₃),

Quadro 3: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 3 (400 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0).

C	δ C (HSQC/HMBC)	δ H (J Hz)
1 C	71,5	-
2 CH	64,7	4,34 dd (4,6; 12,6)
3 CH ₂	36,8	1,80 ddd (3x 12,6) 2,31 m
4 CH	50,1	1,60 ddd
5 CH	24,2	1,34 dd 1,88 dm
6 CH ₂	43,0	2,04 m 2,40 ddd (10,2; 2x 3,3)
7 C	74,0	-
8 CH ₂	29,0	1,25 m 2,06 m
9 CH ₂	27,1	2,01 m 2,34 m
10 CH	59,8	4,17 dd (4,4, 3,3)
11 C	73,4	-
12 CH ₃	32,3	1,29 s
13 CH ₃	28,8	1,35 s
14 CH ₃	24,9	1,14 s
15 CH ₃	24,0	1,68 s

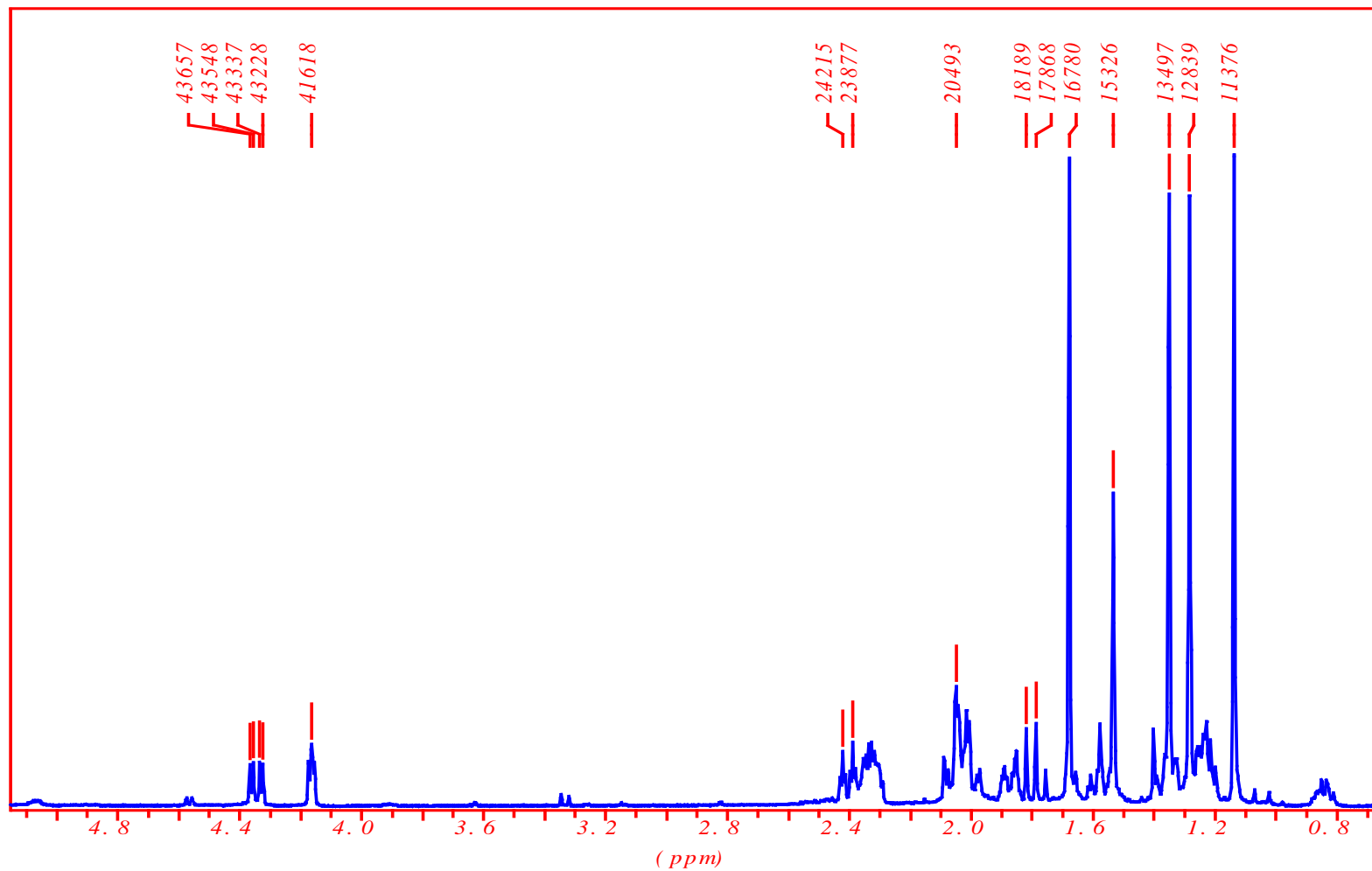


Figura 20: Espectro de ¹H RMN do composto 3 (LC7) em CDCl₃ (400 MHz).

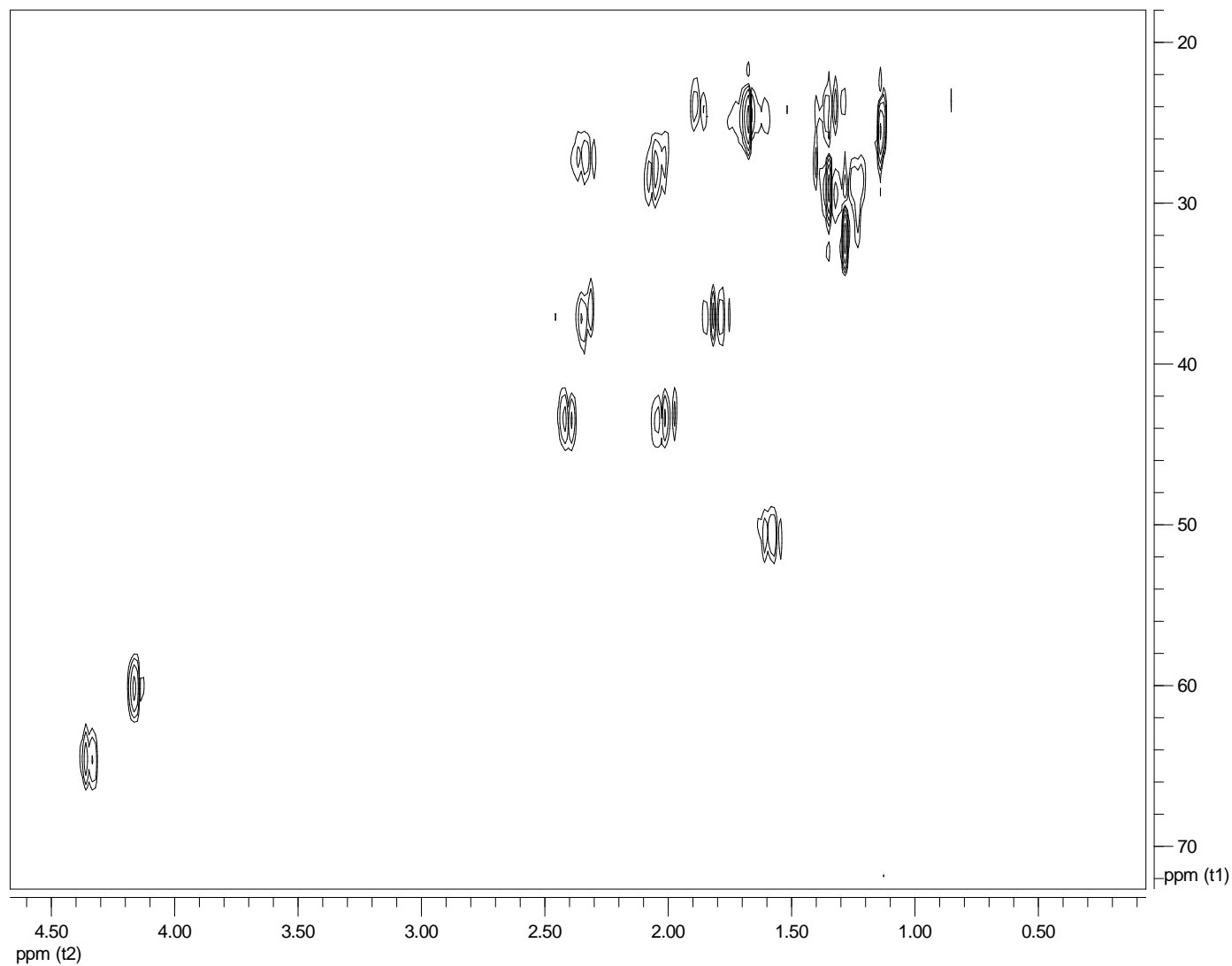


Figura 21: Espectro HSQC-HSQC-DEPT do composto 3 (LC7) em CDCl₃ (400 MHz).

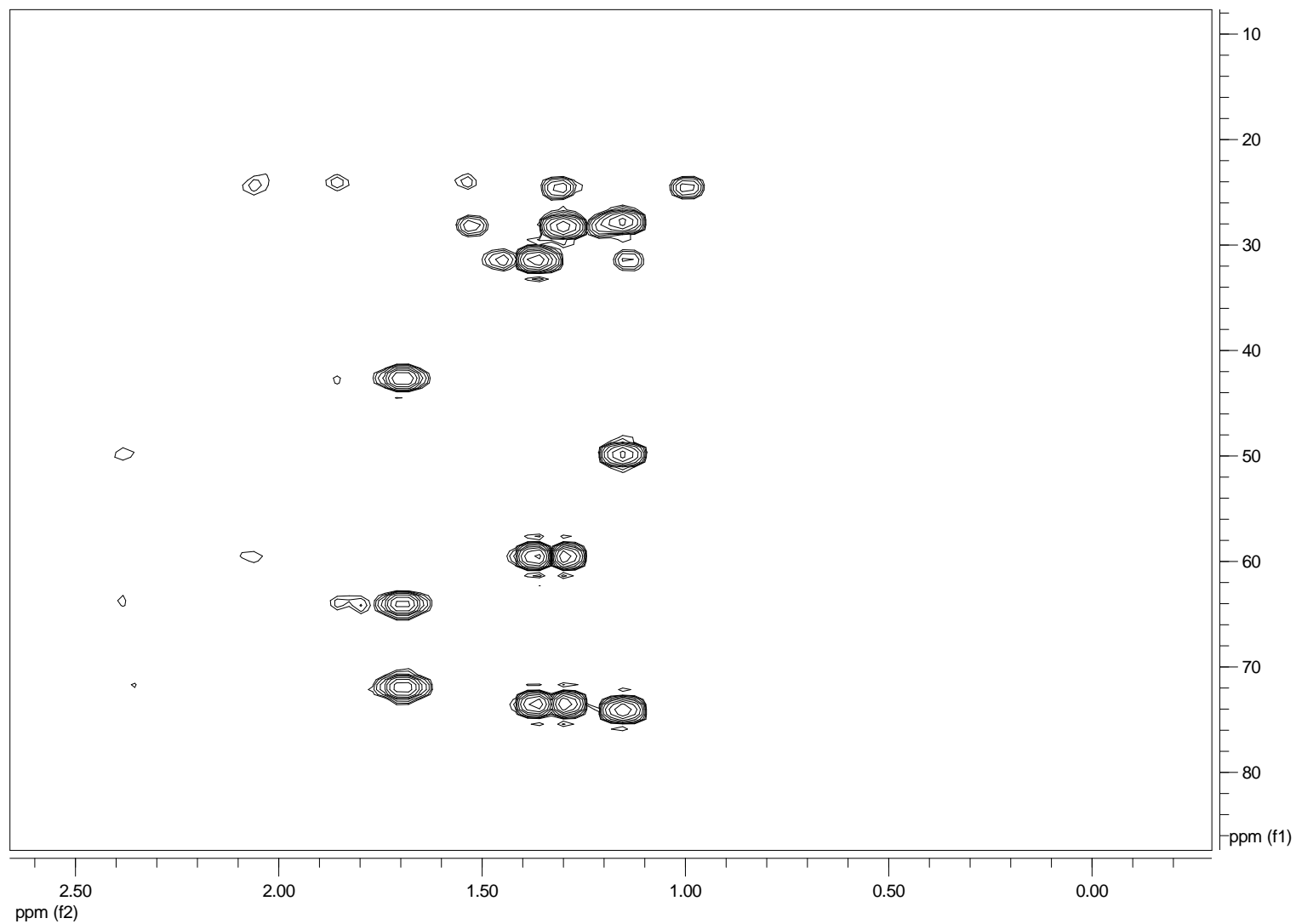


Figura 22: Espectro HMBC do composto 3 (LC7) em CDCl_3 (400 MHz).

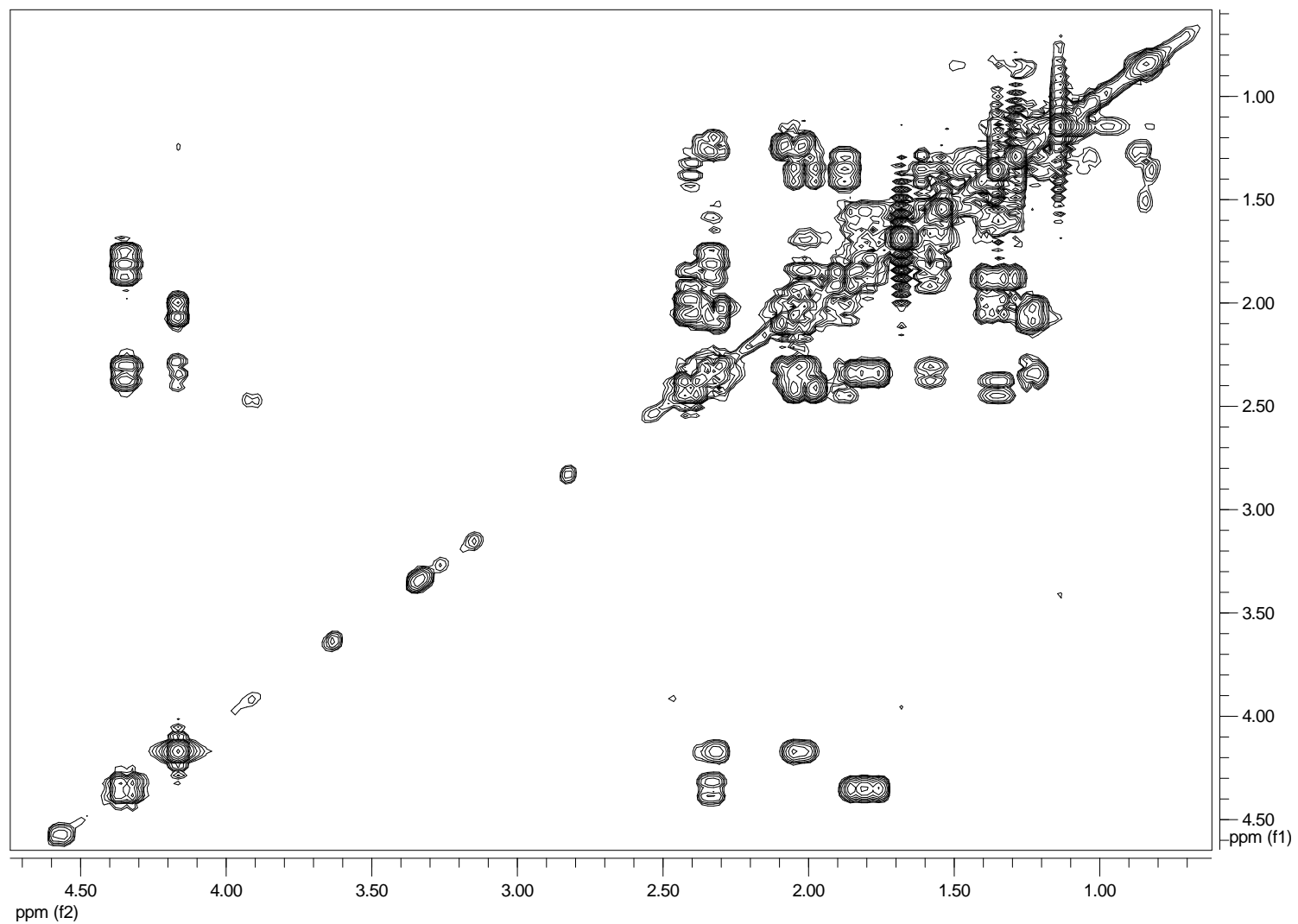


Figura 23: Espectro ¹H-¹H COSY do composto 3 (LC7) em CDCl₃ (400 MHz).

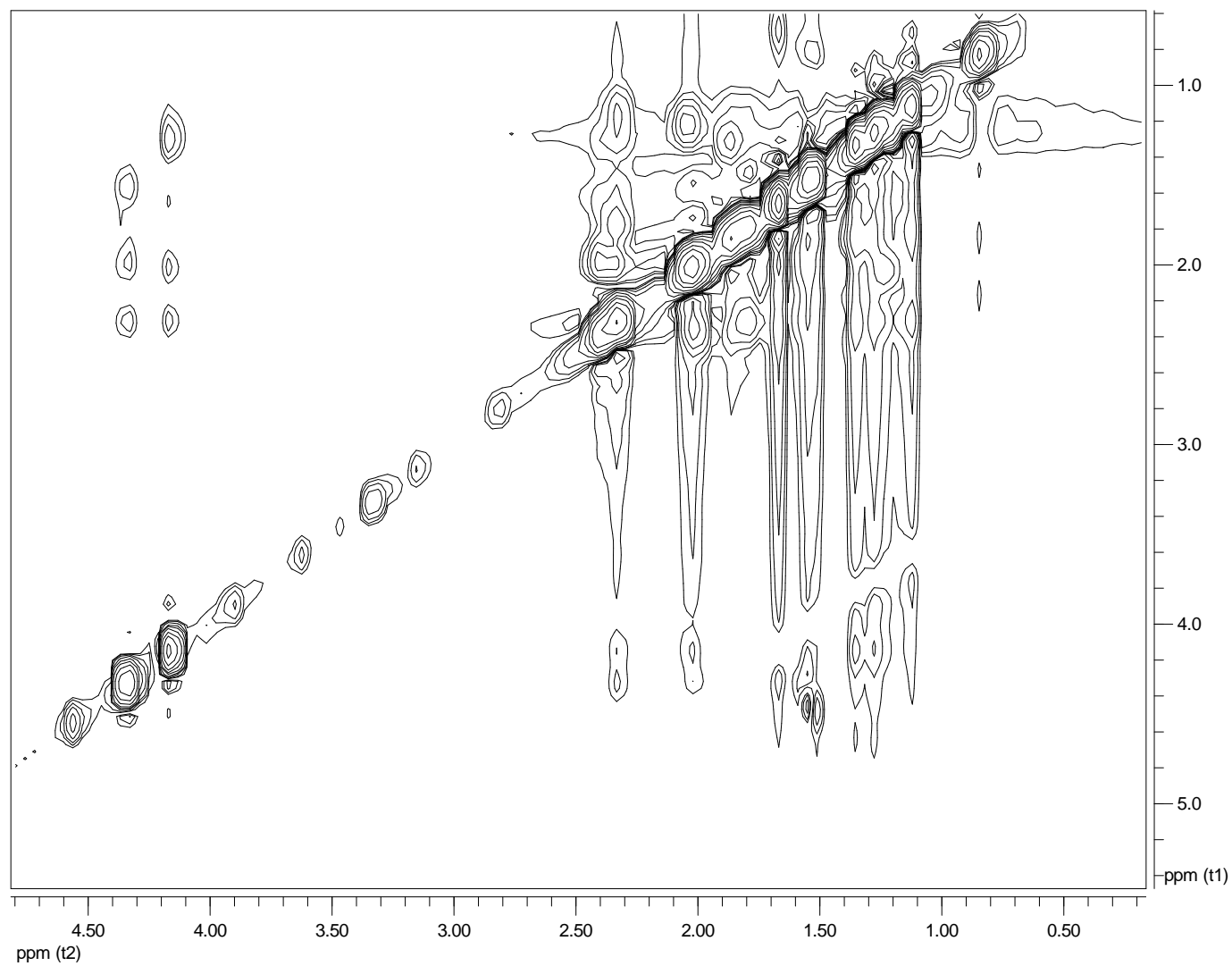


Figura 24: Espectro NOE do composto 3 (LC7) em CDCl₃ (400 MHz).

LC07 #28 RT: 0.65 AV: 1 NL: 4.48E7
T: + c Full ms [40.00-700.00]

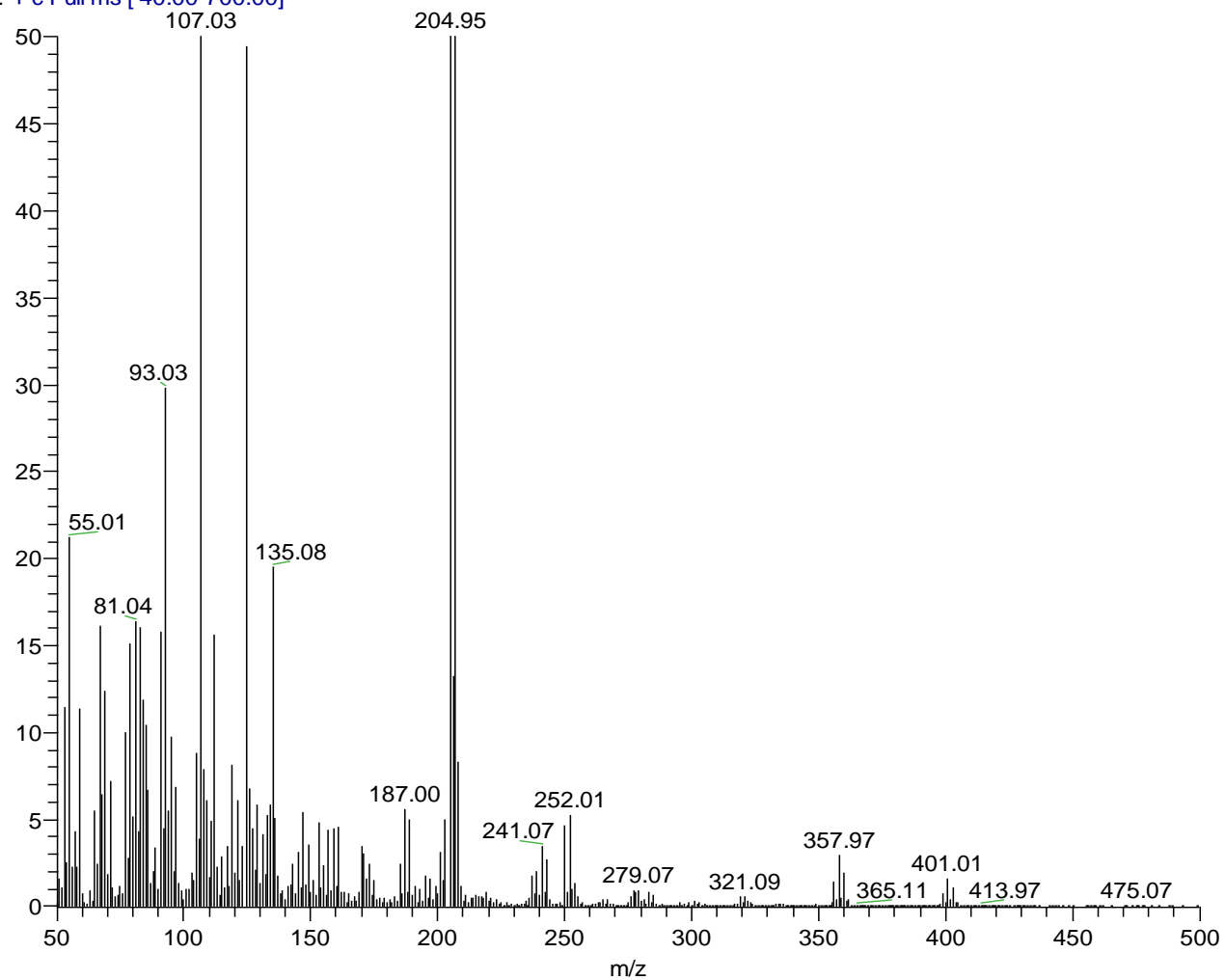


Figura 25: Espectro de massas por ionização eletrônica do composto 3 (LC7).

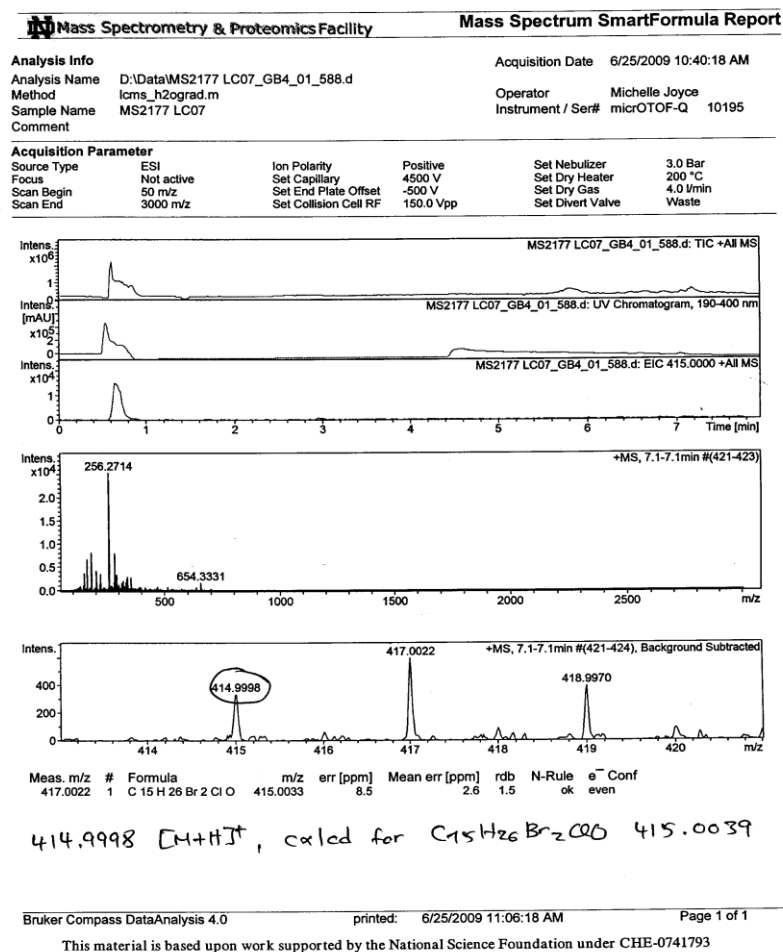


Figura 26: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 3 (LC7).

- Composto 4

O composto **4 (LC04)** (143,1 mg) foi isolado como um líquido incolor após purificação em coluna cromatográfica gel de sílica, de diferentes frações obtidas durante o processo de fracionamento (**Figura 1**). O espectro de infravermelho indicou a presença de grupamento hidroxila entre 3100 a 3400 cm^{-1} e de um éster, provavelmente acetato em 1730 e 1239 cm^{-1} . No espectro de massas por ionização química, observa-se o pico molecular em m/z 489/491/493/495 com um padrão de intensidades relativas semelhante ao composto **1**, sugerindo a presença de dois bromos e um cloro na molécula. A fragmentação observada no espectro obtido por ionização química (**Figura 27**) é coerente com a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{Br}_2\text{ClO}_4$. Os espectros de massas de alta resolução (observado e calculado) confirmaram a fórmula molecular proposta.

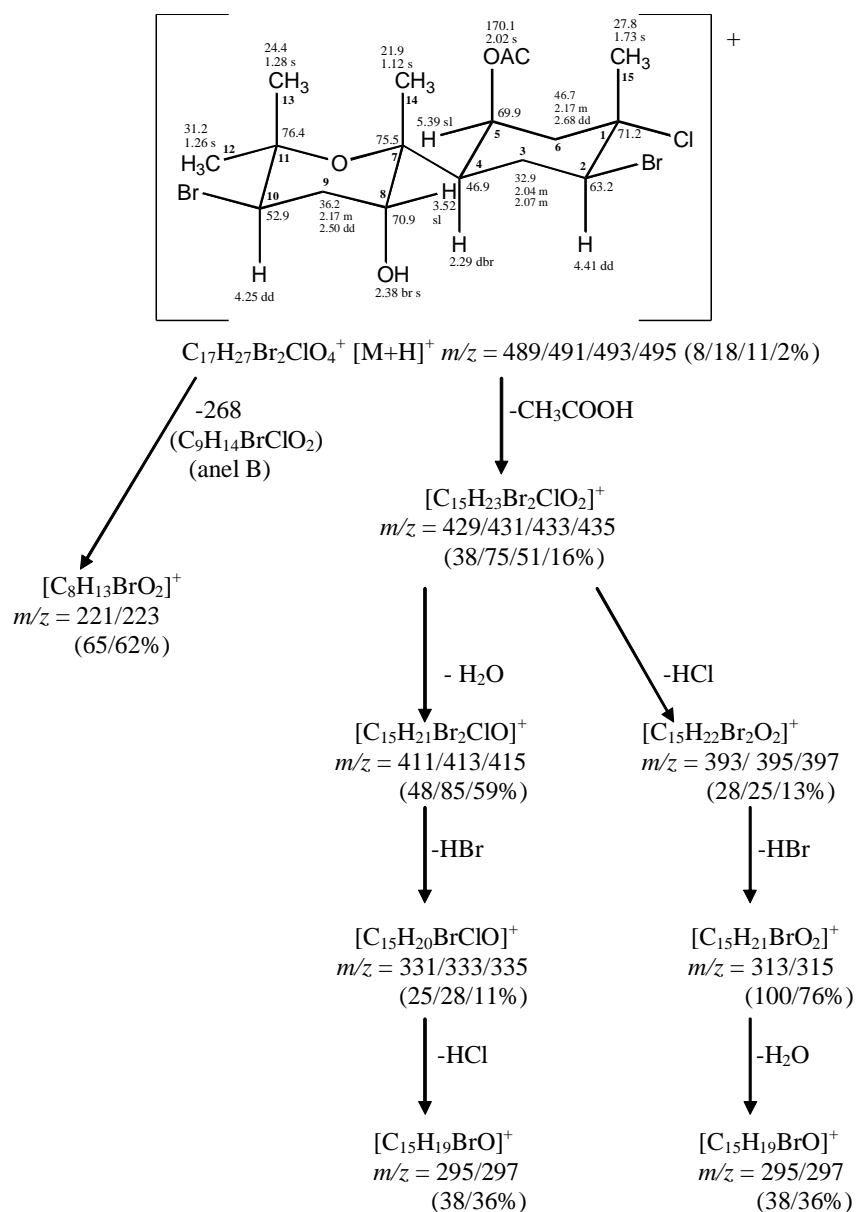


Figura 27: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização química do composto **4**.

O espectro de ^{13}C RMN e experimento HSQC-DEPT indicaram a presença de 17 carbonos sendo quatro quaternários, cinco metínicos, três metilenos e cinco metilas. Em relação a esses carbonos, sete podem ser alocados a CH-O ou CH-halogênio em δ 52,4 (CH), 63,2 (CH), 69,4 (CH), 70,7 (CH), 71,2 (Cq), 75,5 (Cq) e 76,4 (Cq) e um é carbonílico em δ 170,1 (Cq).

O espectro de ^1H RMN apresentou dois sinais de hidrogênios ligados a carbonos provavelmente halogenados em δ 4,25 (1H, dd, $J = 4,0; 13,2$ Hz) e 4,41 (1H, dd, $J = 5,1; 11,3$ Hz), um hidrogênio carbinólico em δ 3,52 (1H, sl) e cinco metilas em δ 1,12, 1,26, 1,28, 1,73 e 2,02, esta última pertencente a acetila. Dessa forma, o composto **4** é semelhante ao caespitol, diferindo no anel B, pela presença do grupamento acetoxi adicional, ligado ao carbono em δ 69,9.

A estereoquímica relativa no carbono em δ 69,9 pode ser deduzida a partir da presença do hidrogênio em δ 5,39, o qual apresenta correlação ^1H - ^1H COSY com os hidrogênios em δ 2,17 e 2,68 ligados ao carbono em δ 46,7. A baixa constante de acoplamento do hidrogênio em δ 5,39, sugere a posição equatorial para este hidrogênio, indicando, portanto a posição β para o substituinte acetoxi do carbono 5 (**Figura 28**). Já para o anel A, experimentos NOE diferencial (dados não apresentados), onde foi irradiada a metila em δ 1,12, confirmou que o sinal em δ 1,28 corresponde ao grupo metílico em posição axial, sendo assim a metila ressonando em δ 1,26 está na posição equatorial.

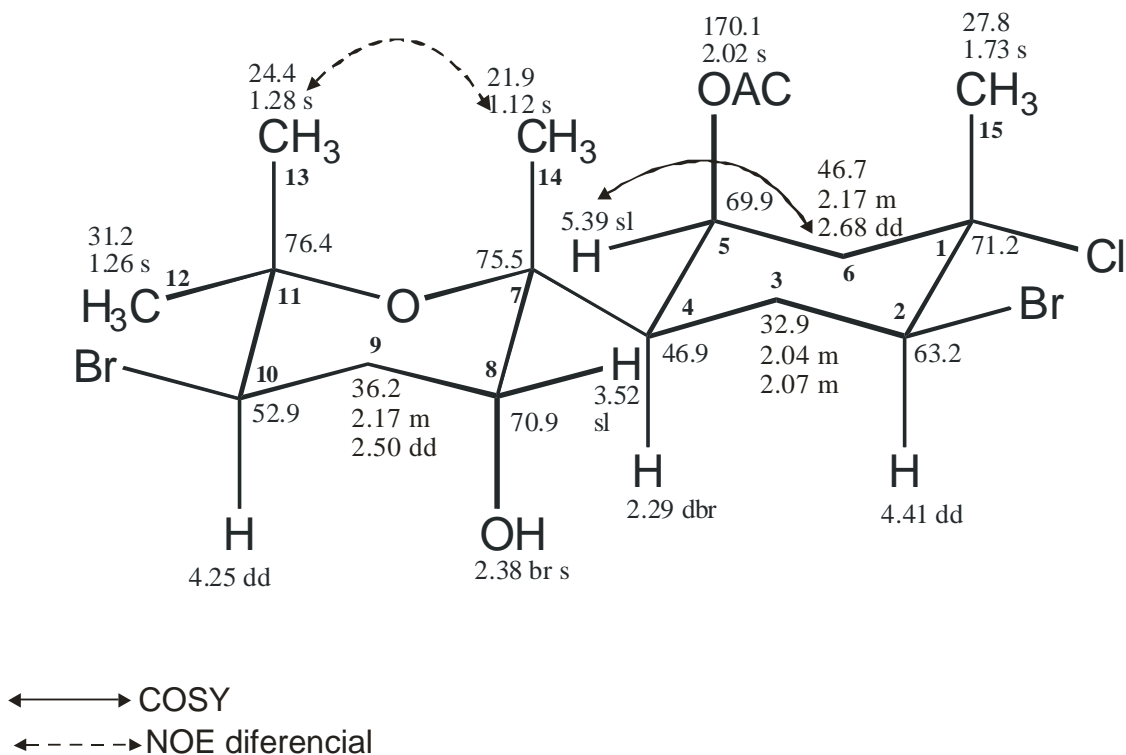


Figura 28: Estrutura do composto **4** com correlações ^1H - ^1H COSY e NOE diferencial.

Os resultados apresentados, indicam que o composto **4** é o derivado 5-β-acetoxi do caespitol, composto ainda não descrito na literatura. Para este composto a atividade ótica calculada é $[\alpha]_D = + 50,0^\circ$ (0,41, CHCl₃).

Quadro 4: Dados de ¹H e ¹³C do composto 4 (400 e 50MHz; CDCl₃ H= 7,24 e C=77,0).

C	δ C (HSQC)	δ H (J Hz)
1 C	71,2	-
2 CH	63,2	4,41 dd (5,1; 11,3)
3 CH ₂	32,9	2,04:m 2,07m
4 CH	46,9	2,29 d br
5 CH	69,9	5,39 br s
6 CH ₂	46,7	2,17 m 2,68 dd (2,9; 15,0)
7 C	77,8	
8 CH ₂	70,9	3,52 br s
9 CH ₂	36,2	2,17 m 2,50 dd (13,2; 13,9)
10 CH	52,9	4,25 dd (4,0; 13,2)
11 C	76,0	-
12 CH ₃	31,2	1,26 s
13 CH ₃	24,4	1,28 s
14 CH ₃	21,9	1,12 s
15 CH ₃	27,8	1,73 s
CH ₃ AC	170,1	2,02 s
OH		2,38 br s

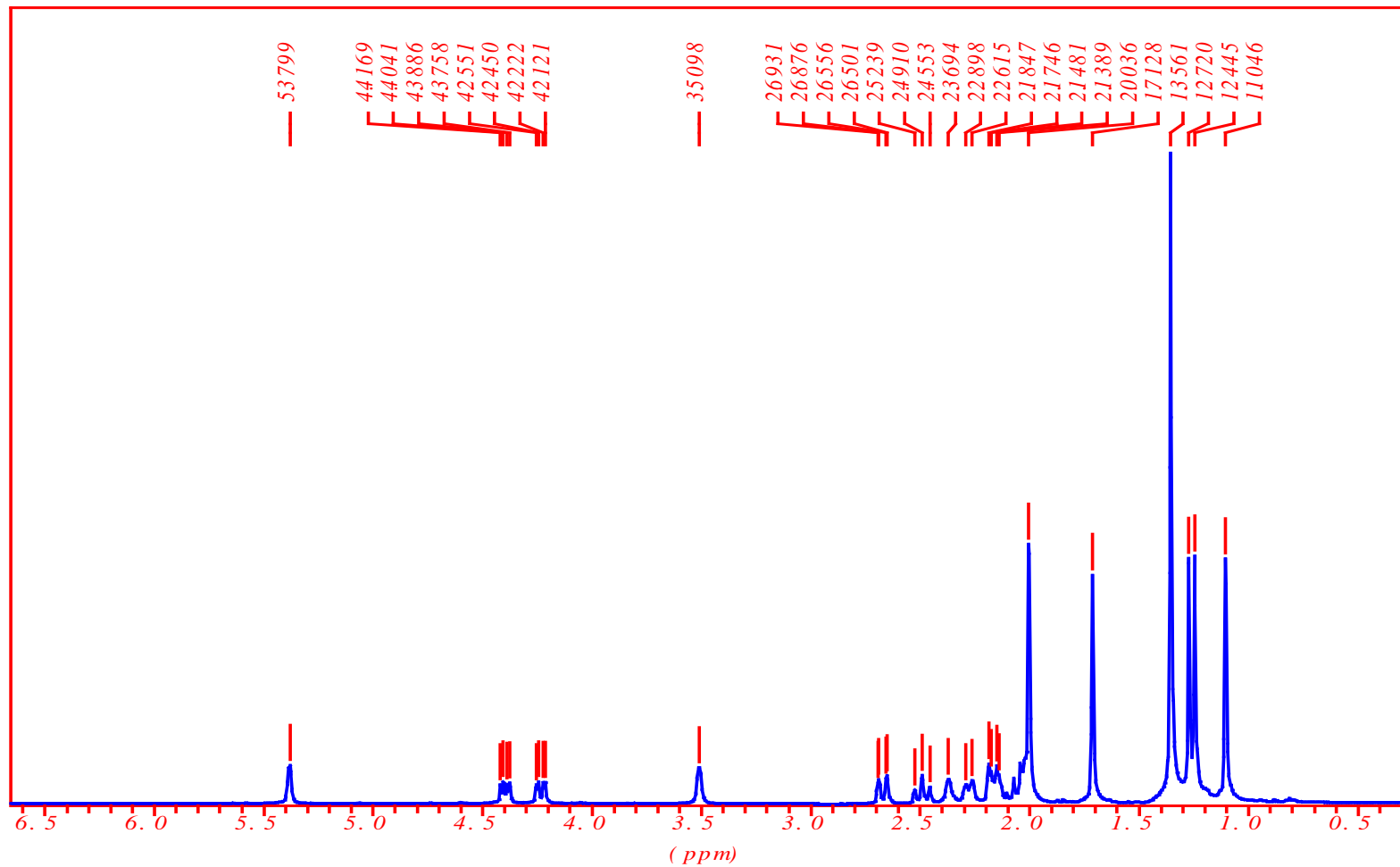


Figura 29: Espectro de ¹H RMN do composto 4 (LC4) em CDCl₃ (400 MHz).

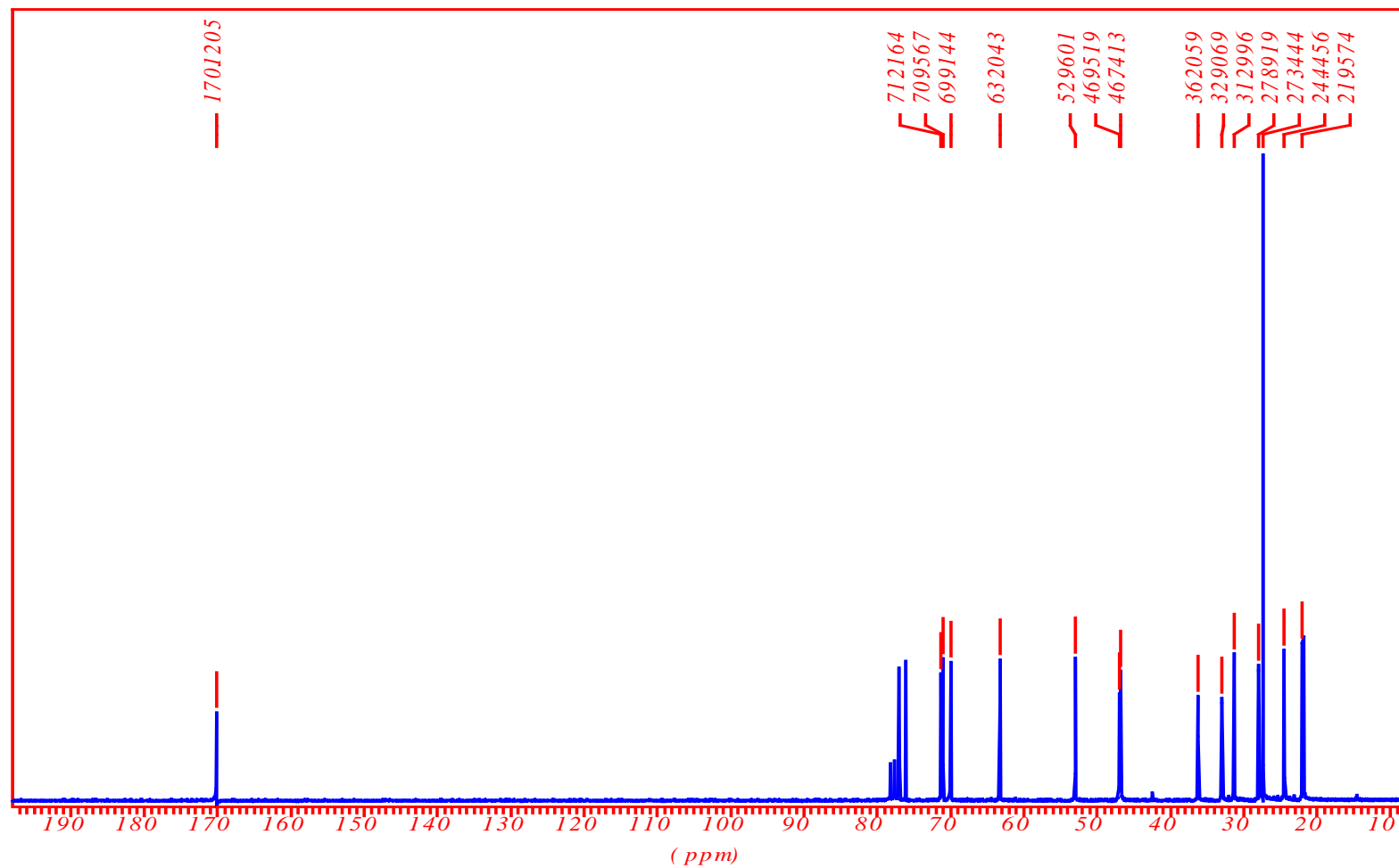


Figura 30: Espectro de ^{13}C RMN do composto 4 (LC4) em CDCl_3 (50 MHz).

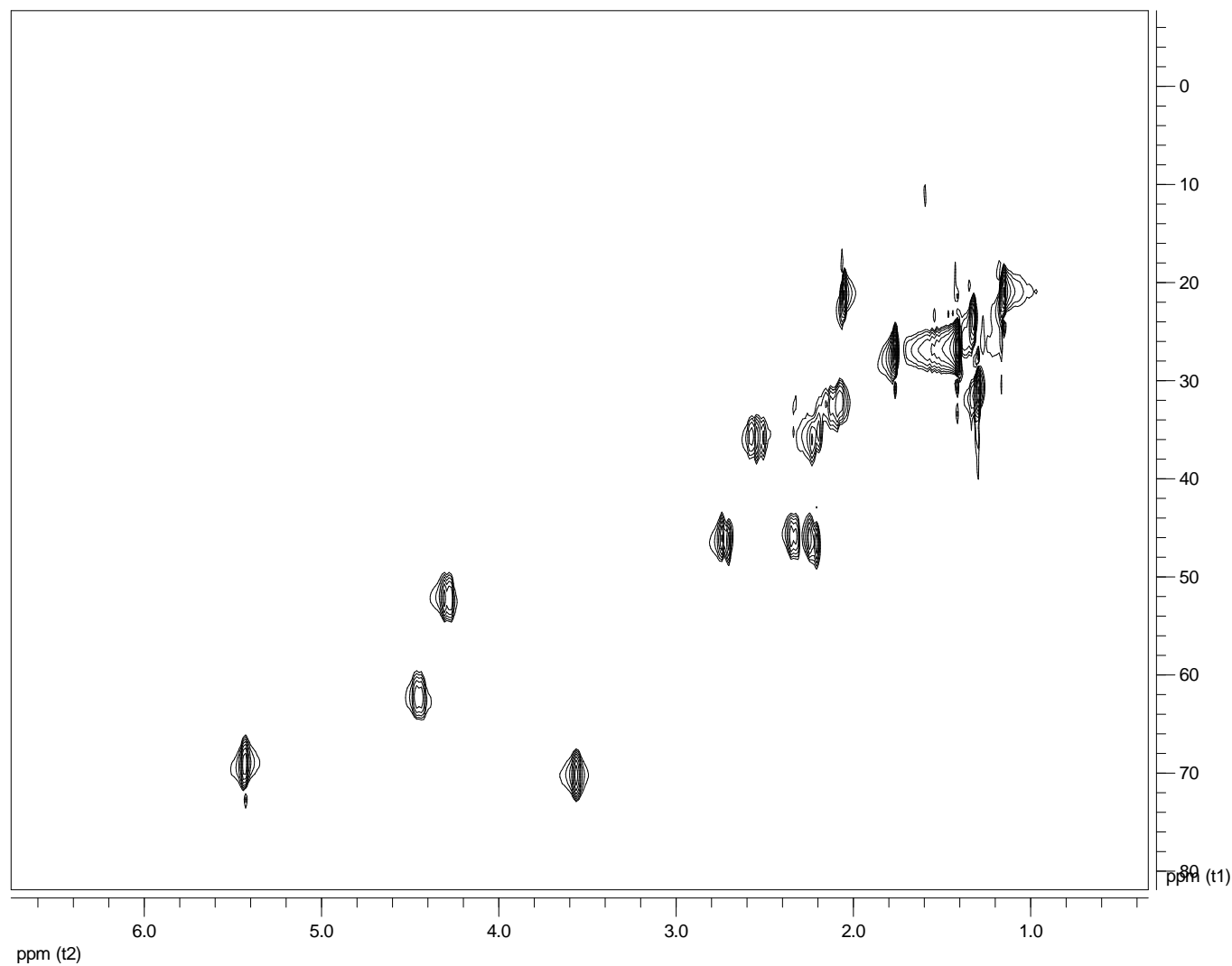


Figura 31: Espectro HSQC-HSQC-DEPT do composto 4 (LC4) em CDCl_3 (400 MHz).

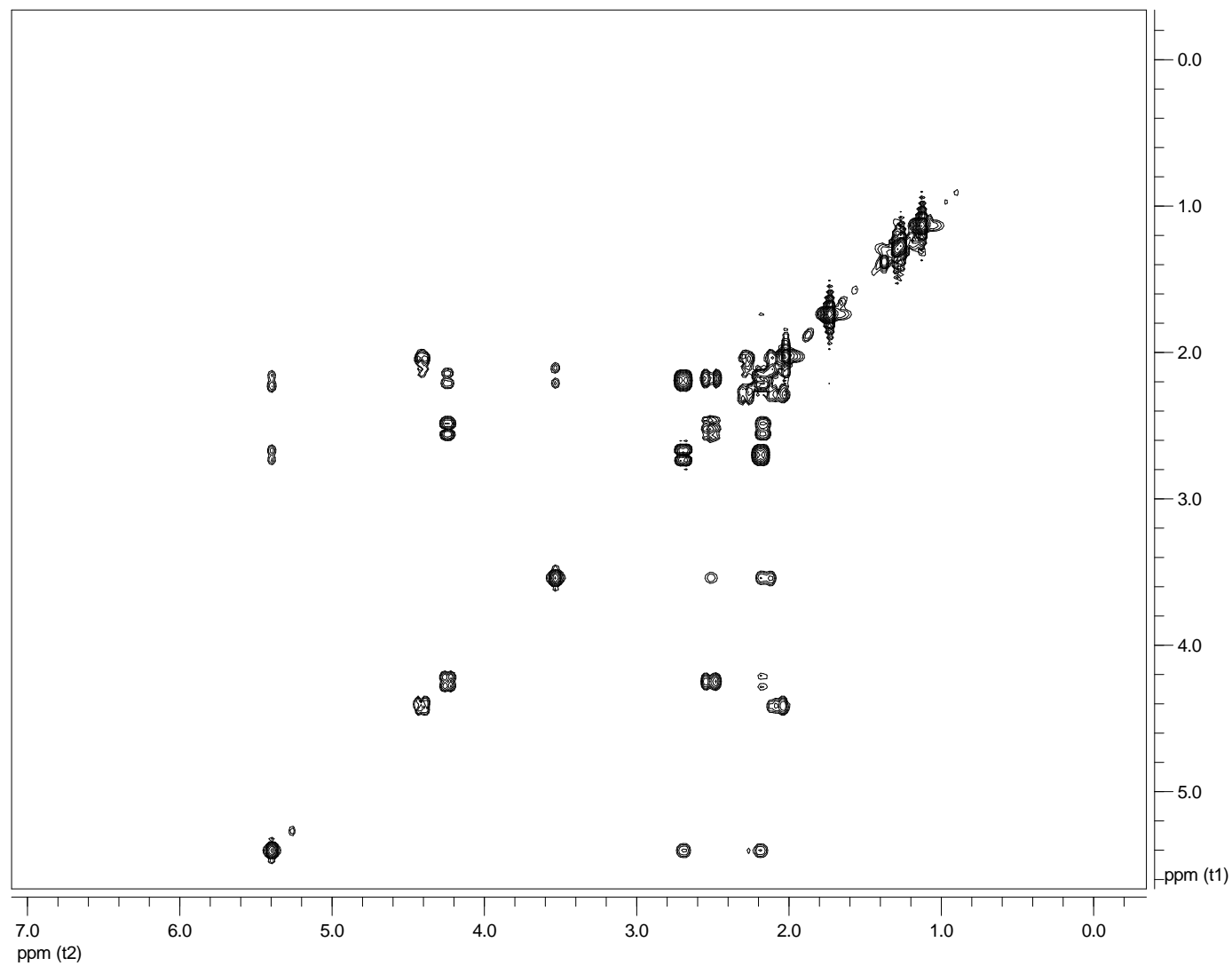


Figura 32: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 4 (LC4) em CDCl_3 (400 MHz).

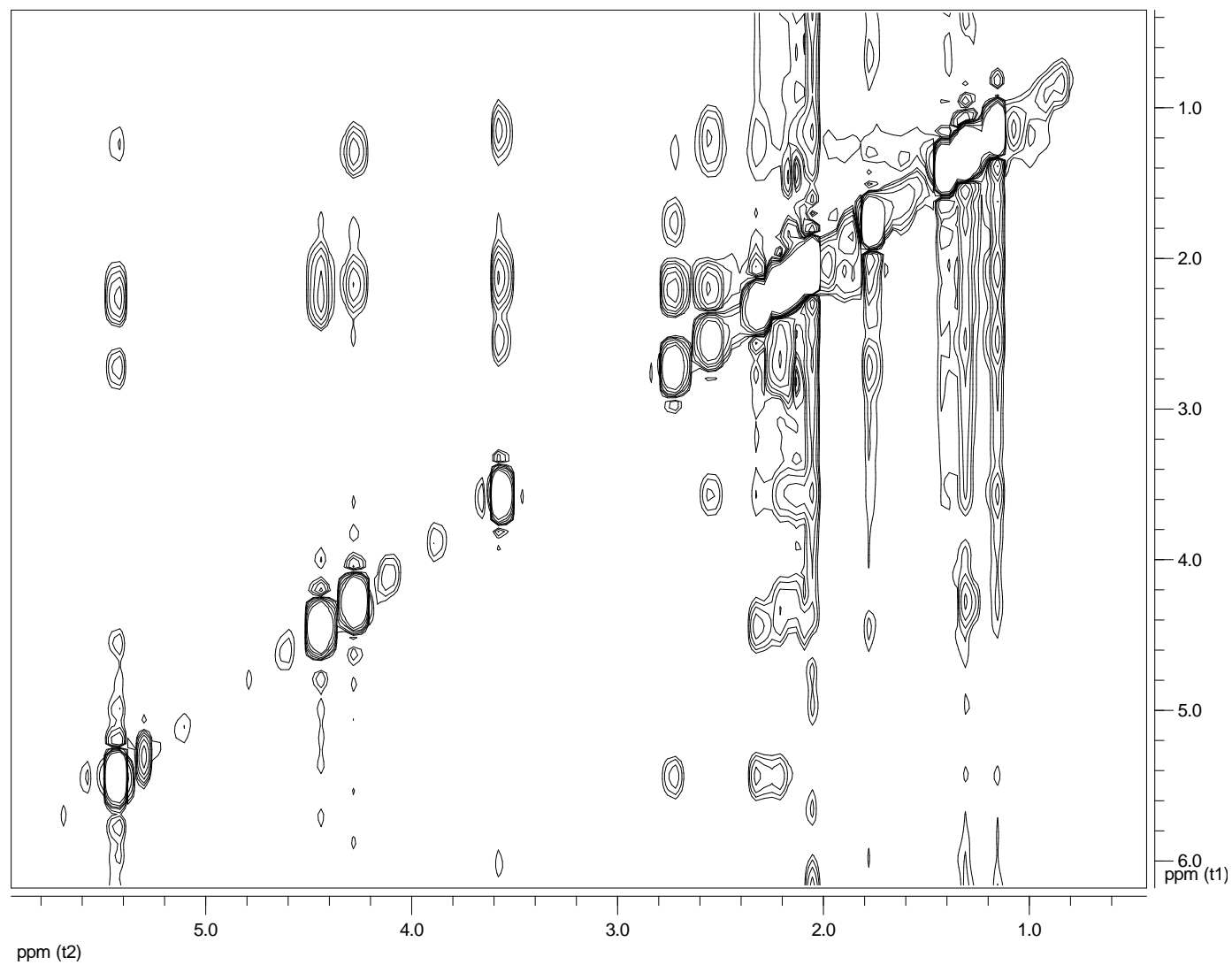


Figura 33: Espectro NOE do composto 4 (LC4) em CDCl₃ (400 MHz).

LC04 #24 RT: 0.63 AV: 1 NL: 4.46E6
T: + c Full ms [50.00-800.00]

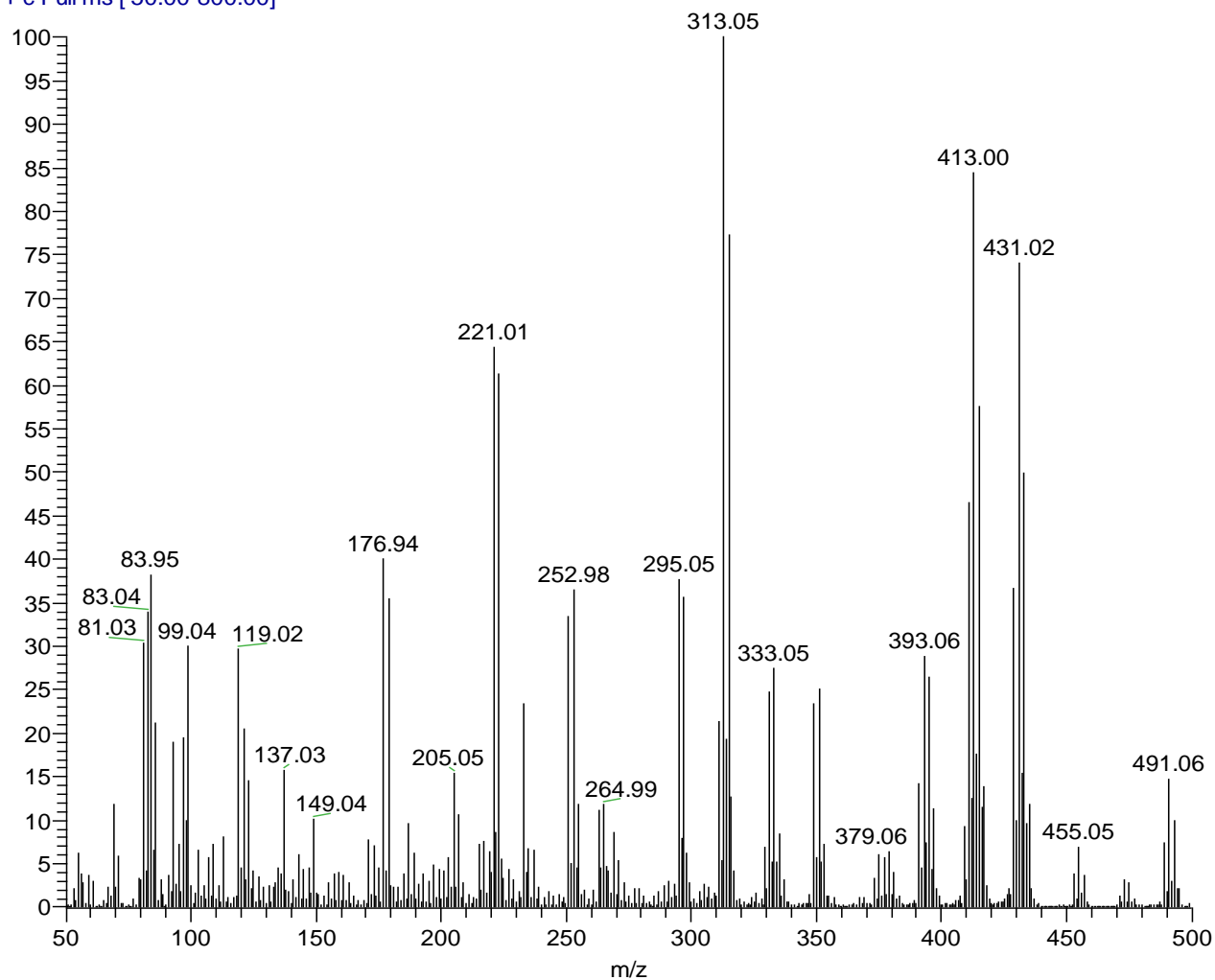
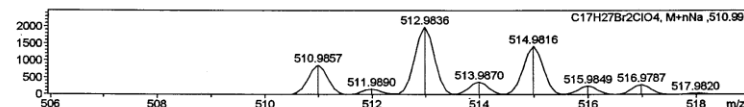
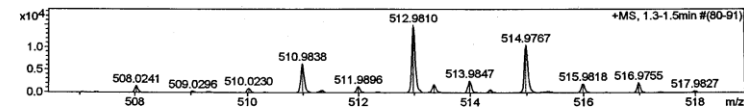
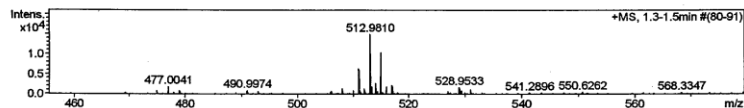
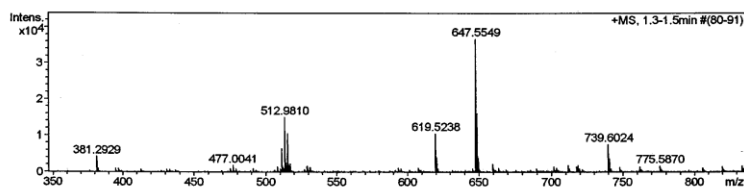


Figura 34: Espectro de massas por ionização química do composto 4 (LC4).

Mass Spectrometry & Proteomics Facility **Mass Spectrum SmartFormula Report**

Analysis Info
 Analysis Name: D:\Data\061909\ms2175 -ESI-1.d Acquisition Date: 6/19/2009 10:14:54 AM
 Method: cal 500-3000.m Operator: Nonka Sevova
 Sample Name: LC-04 Instrument / Ser#: micrOTOF 10314
 Comment: in CH3CN

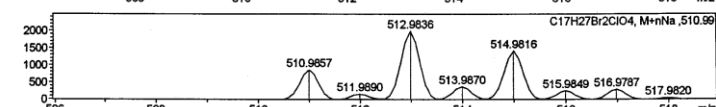
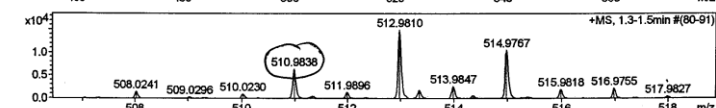
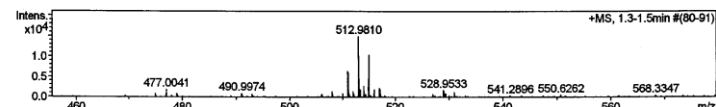
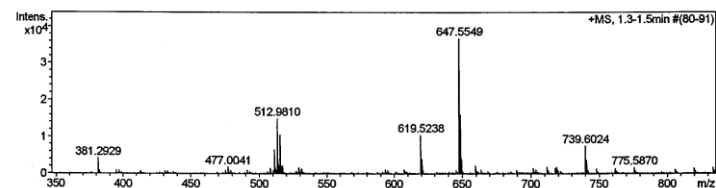
Acquisition Parameter
 Source Type: ESI Ion Polarity: Positive Set Nebulizer: 0.3 Bar
 Focus: Not active Set Capillary: 4500 V Set Dry Heater: 180 °C
 Scan Begin: 50 m/z Set End Plate Offset: -500 V Set Dry Gas: 4.0 l/min
 Scan End: 3000 m/z n/a Set Divert Valve: Source



Meas. m/z	#	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻	Conf
510.9838	1	C ₁₇ H ₂₇ Br ₂ ClO ₄ , M+nNa	510.9857	3.7	5.8	2.5	ok	even	

This material is based upon work supported by the National Science Foundation under CHE-0741793

Mass Spectrometry & Proteomics Facility **Mass Spectrum SmartFormula Report**



Meas. m/z	#	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻	Conf
510.9838	1	C ₁₇ H ₂₇ Br ₂ ClO ₄ , M+nNa	510.9857	3.7	5.8	2.5	ok	even	

510.9838 [M+Na]⁺, calcd for C₁₇H₂₇Br₂ClO₄NaO₄ 510.9862

This material is based upon work supported by the National Science Foundation under CHE-0741793

Figura 35: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 4 (LC4).

- Composto 5:

O composto **5 (LC05)** (17,5 mg) foi isolado após purificação em coluna cromatográfica sob gel de sílica de diferentes frações obtidas durante o processo de fracionamento como um líquido incolor e inodoro (**Figura 1**). O espectro de infravermelho apresentou presença de um éster, provavelmente acetato em 1738 e 1239 cm^{-1} e ausência de grupamento hidroxila. O espectro de massas apresentou os picos de maior massas em m/z 473/475/477/479 com um padrão de intensidades relativas semelhante ao composto **1**, com este dado, deduz-se a presença de dois átomos de bromo e um cloro ou dois cloro e um bromo na molécula. A fragmentação observada no CIMS (**Figura 36**) é coerente com a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{Br}_2\text{ClO}_3$. O espectro de massas de alta resolução (observado e calculado) confirmou a fórmula molecular proposta.

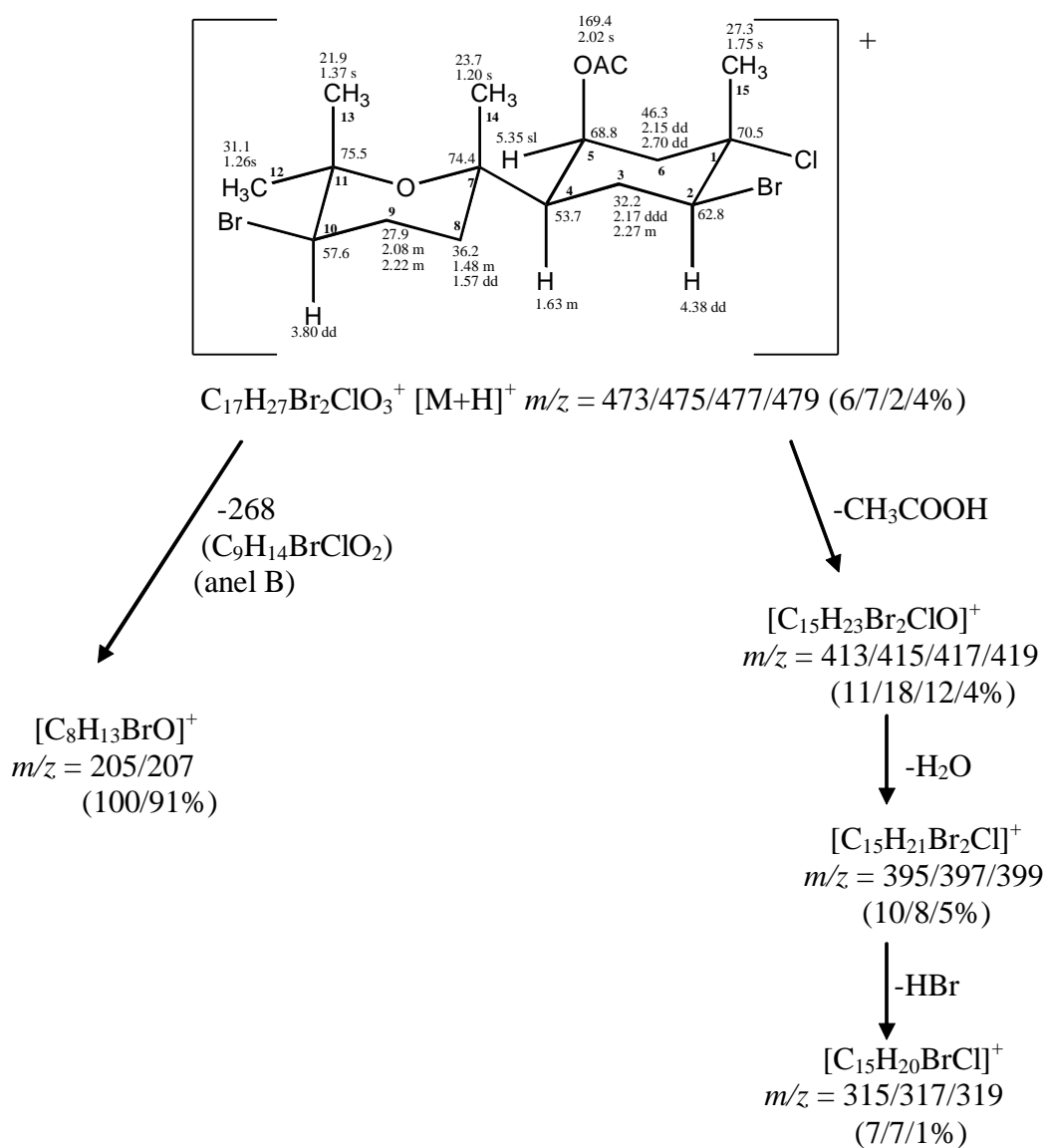


Figura 36: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização química do composto **5**.

O espectro de ^{13}C RMN e experimento HSQC-DEPT indicaram a presença de 17 carbonos, sendo quatro quaternários, quatro metínicos, quatro metílenos e cinco metilas. Em relação a estes carbonos, seis apresentaram deslocamento químico compatível com ligação a oxigênio ou halogênio em δ 57,6 (CH), 62,9 (CH), 68,8 (CH), 70,5 (Cq), 74,5 (Cq) e 75,6 (Cq) e um é carbonílico em δ 169,4 (Cq).

O espectro de ^1H RMN apresentou três sinais de hidrogênios desprotegidos, dois sinais de hidrogênios ligados a carbonos provavelmente halogenados em δ 3,80 (1H, dd, $J = 4,0; 12,8$ Hz) e 4,38 (1H, dd, $J = 4,4; 12,4$ Hz), dessa forma com deslocamentos e constantes de acoplamentos similares aos observados no composto **2** (caespitano). Adicionalmente observou-se um sinal em δ 5,35 (sl) e a presença de cinco metilas ligadas a carbonos quaternários em δ 1,20, 1,26, 1,37, 1,75 e 2,02, esta última pertencente a uma acetila. A estrutura do anel A é semelhante ao composto **2**, com o bromo na posição equatorial, devido à alta constante de acoplamento do hidrogênio em δ 3,80 ppm enquanto que o anel B possui uma estrutura semelhante ao composto **4**, com o grupo acetoxi na posição 5 axial e H-5 em posição equatorial.

Com base nos resultados apresentados, deduz-se que o composto **5** é o derivado 5- β -acetoxi do caespitano (**Figura 37**), um composto novo. Para este composto a atividade ótica calculada é $[\alpha]_D = +36,3^\circ$ (0,49, CHCl_3),

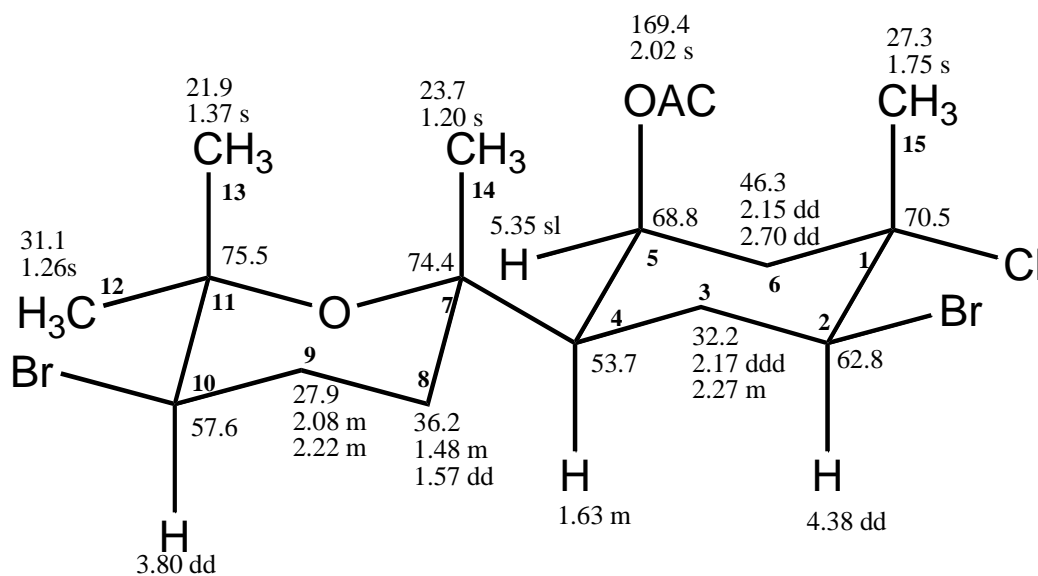


Figura 37: Estrutura do composto **5**.

Quadro 5: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 5 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0).

C	δ C (HSQC)	δ H (J Hz)
1 C	70,5	-
2 CH	62,8	4,38 dd (4,4; 12,4)
3 CH ₂	32,2	2,17 ddd (12,4; 13,2; 13,5) 2,27 m
4 CH	53,7	1,63 m
5 CH	68,8	5,35 br s
6 CH ₂	46,3	2,15 dd (13,2; 3,3) 2,70 dd (3,3; 15,0)
7 C	74,4	
8 CH ₂	36,2	1,48 m 1,57 dd (13,0;4,2)
9 CH ₂	27,9	2,08 m 2,22 m
10 CH	57,6	3,80 dd (4,0; 12,8)
11 C	75,5	-
12 CH ₃	31,1	1,26 s
13 CH ₃	21,9	1,37 s
14 CH ₃	23,7	1,20 s
15 CH ₃	27,3	1,75 s
CH ₃ AC	169,4	2,02 s

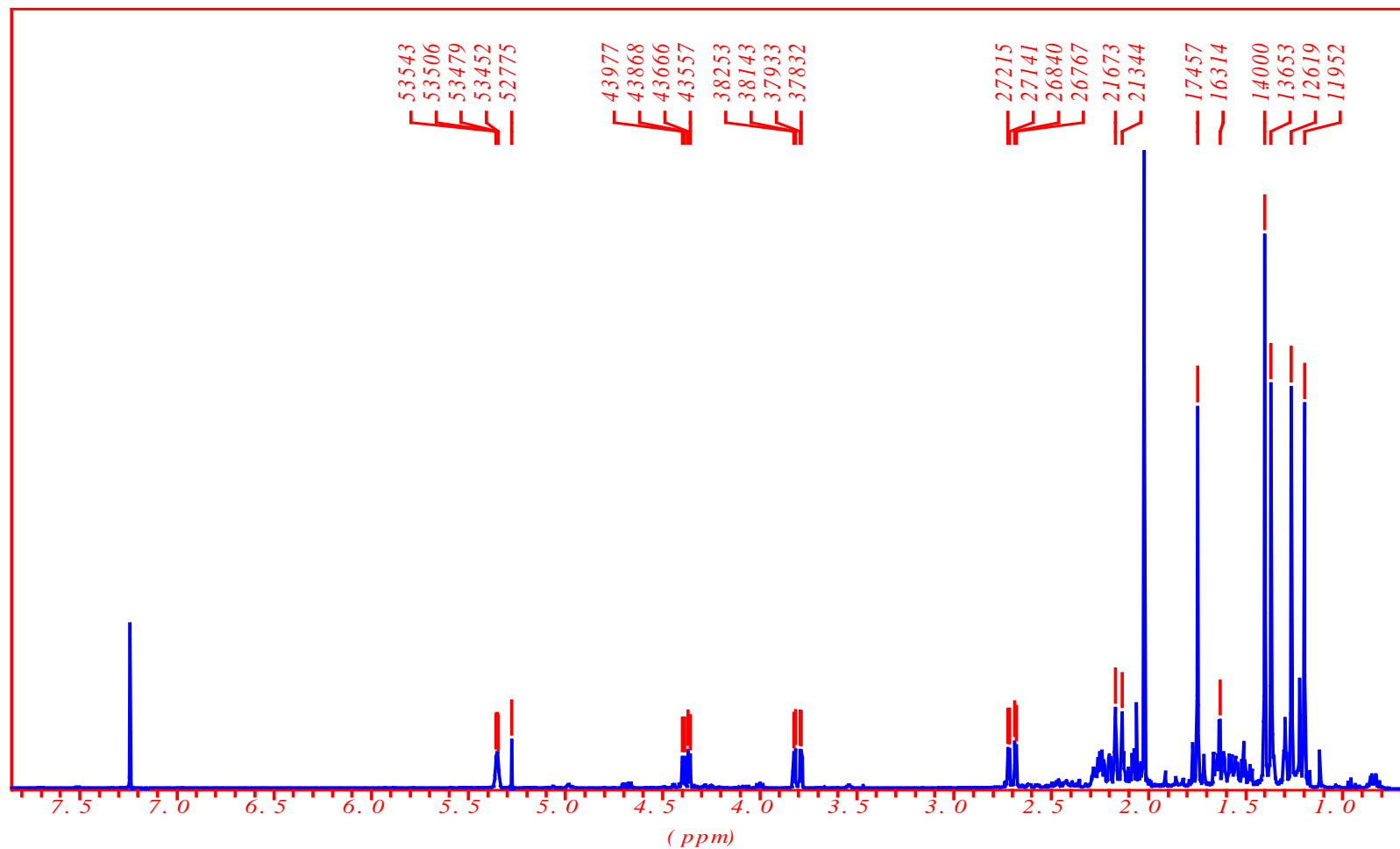


Figura 38: Espectro de ^1H RMN do composto 5 (LC5) em CDCl_3 (400 MHz).

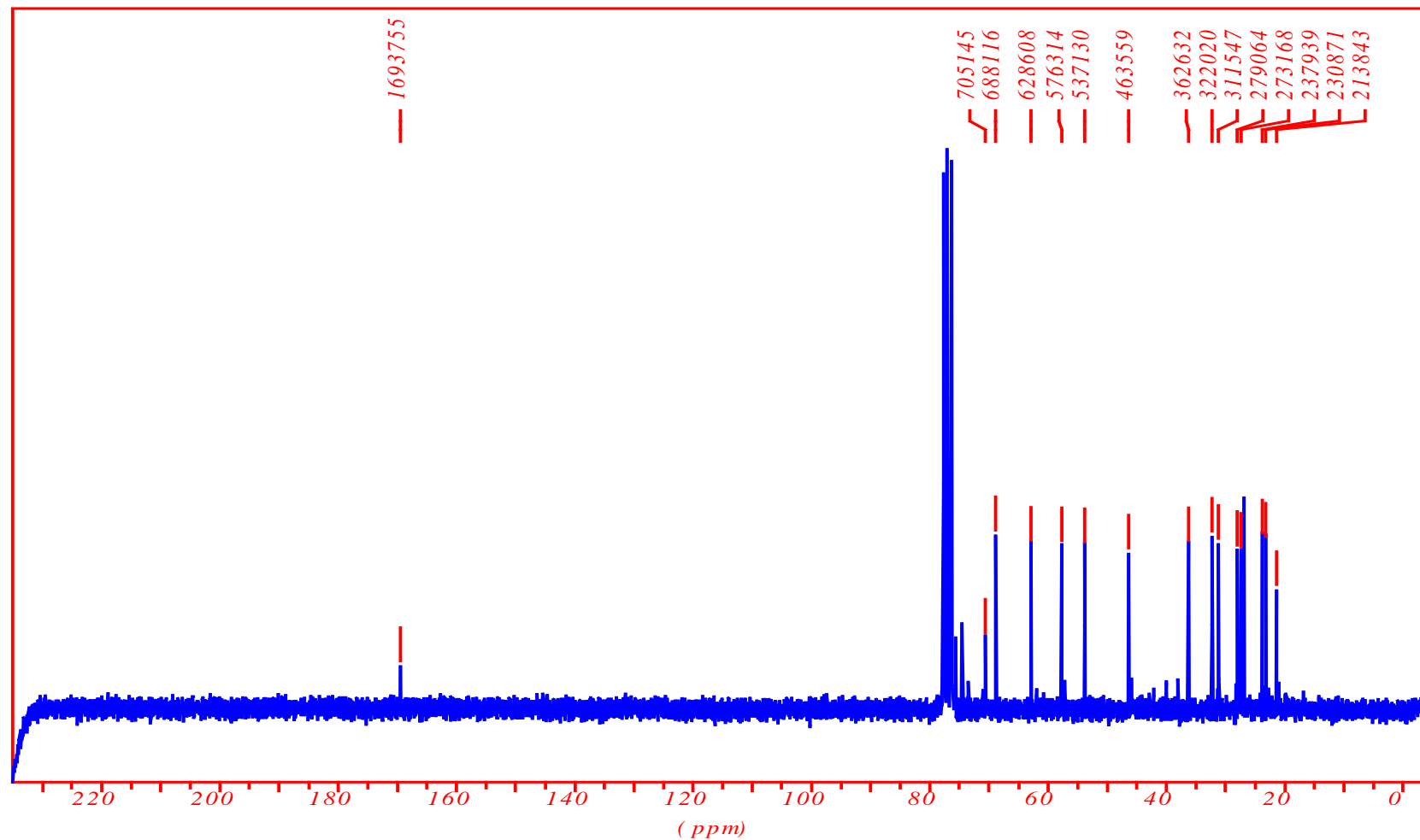


Figura 39: Espectro de ^{13}C RMN do composto 5 (LC5) em CDCl_3 (50 MHz).

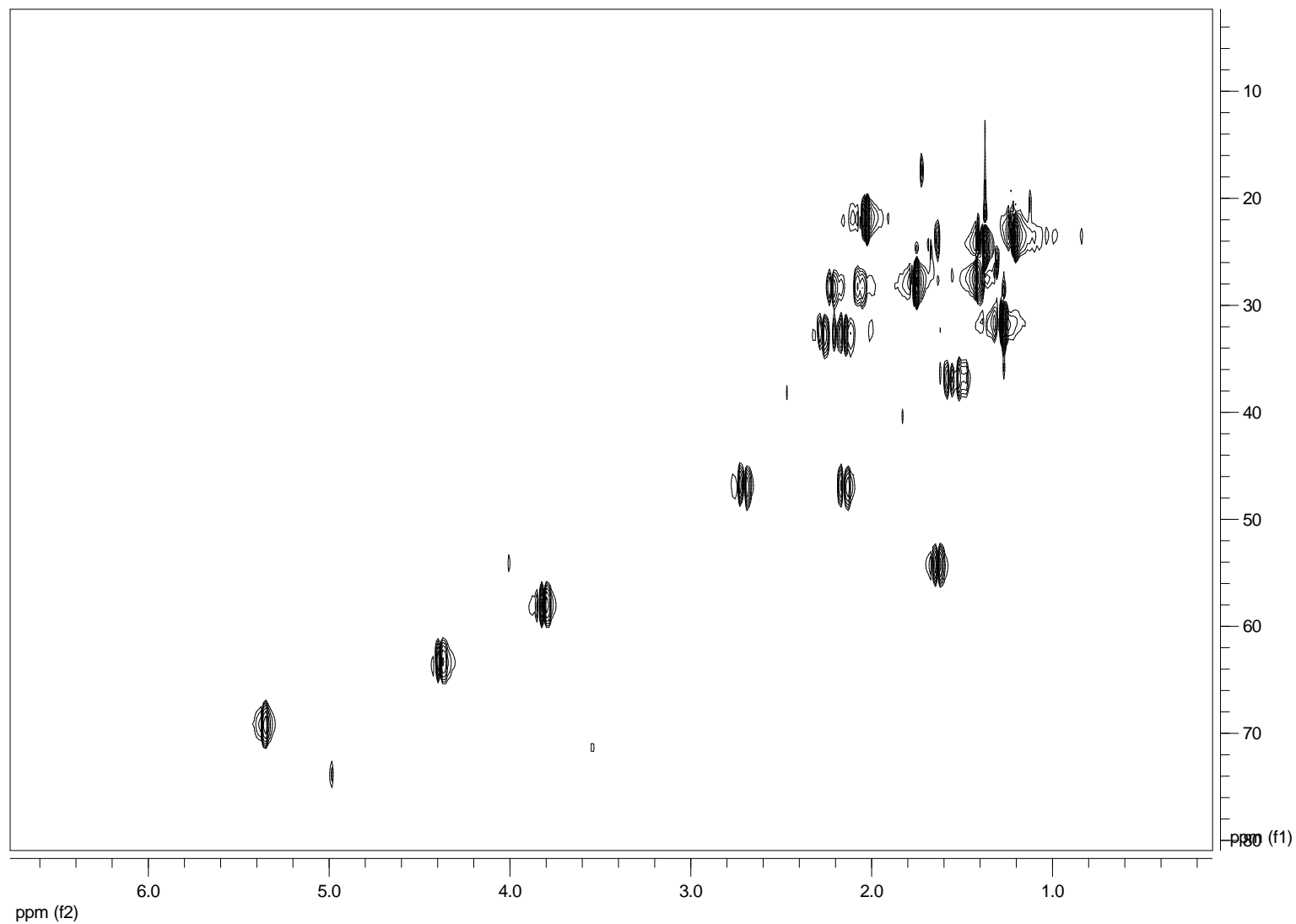


Figura 40: Espectro HSQC-HSQC-DEPT do composto 5 (LC5) em CDCl₃ (400 MHz).

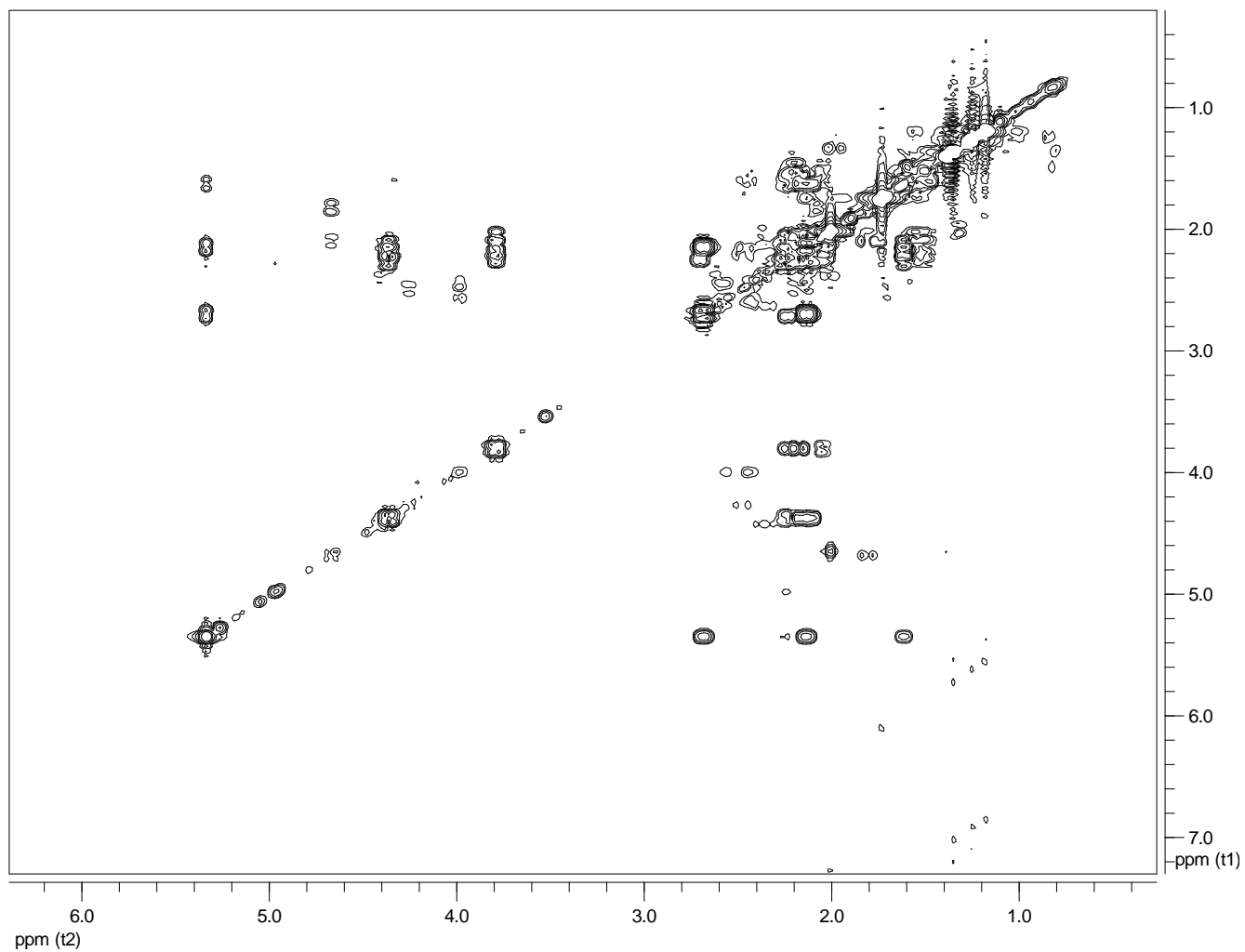


Figura 41: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 5 (LC5) em CDCl_3 (400 MHz).

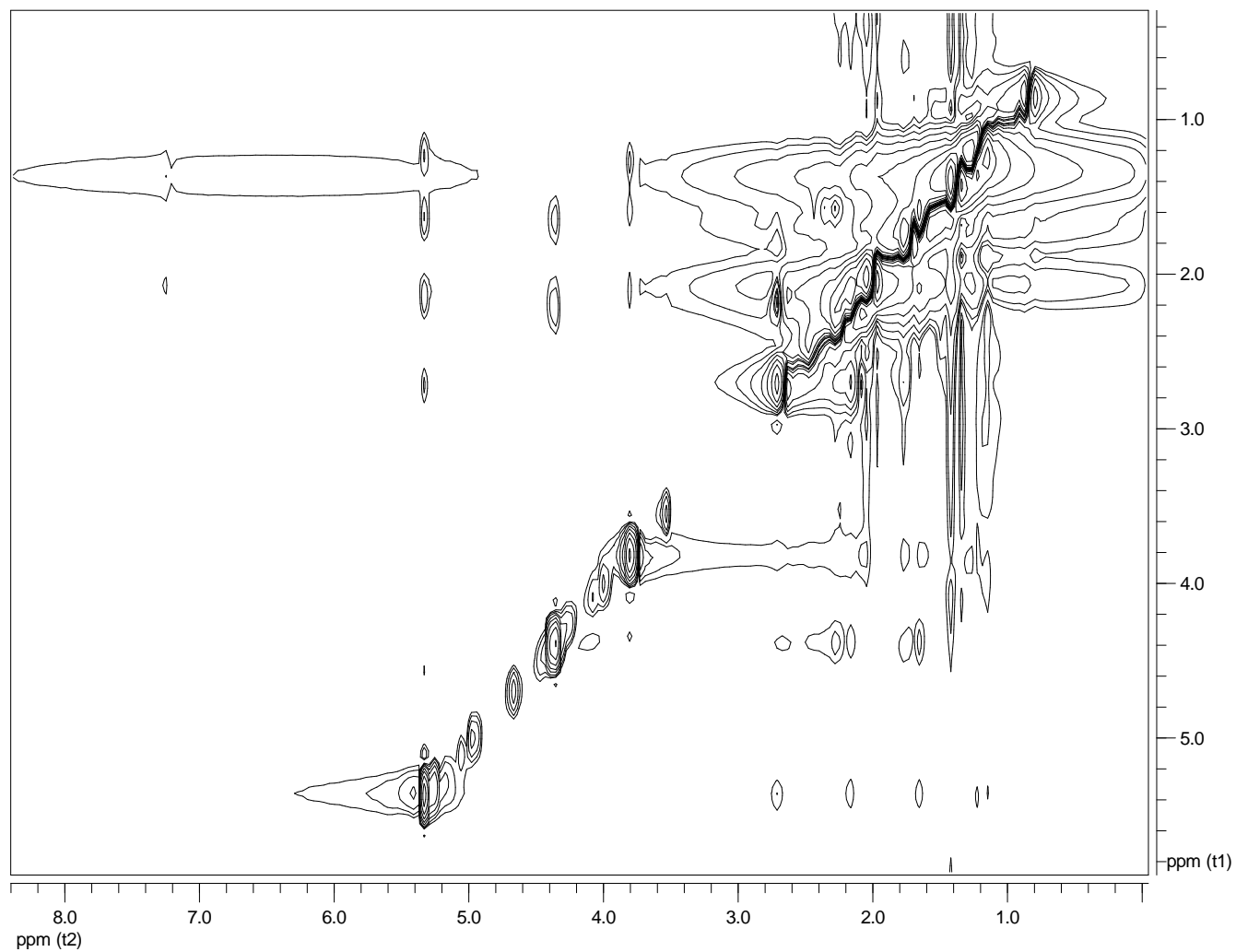


Figura 42: Espectro NOE do composto 5 (LC5) em CDCl₃ (400 MHz).

LC05 #38 RT: 0.74 AV: 1 NL: 1.00E7
T: + c Full ms [50.00-600.00]

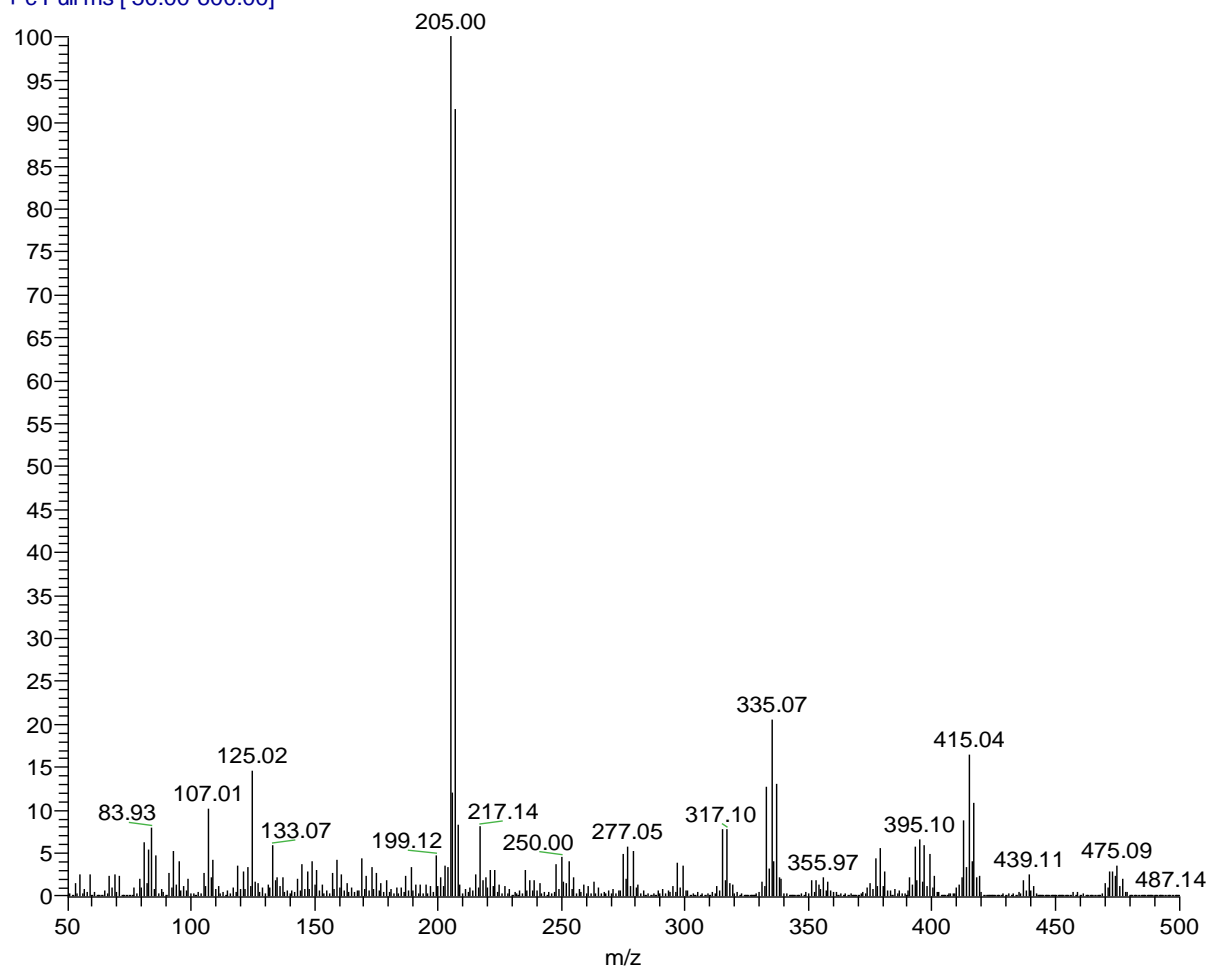


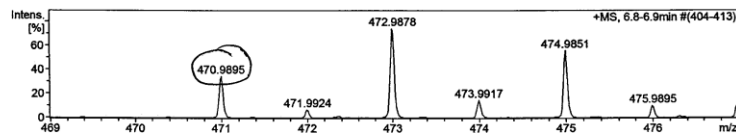
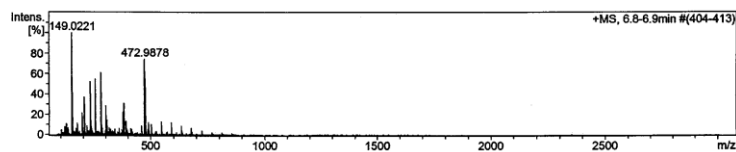
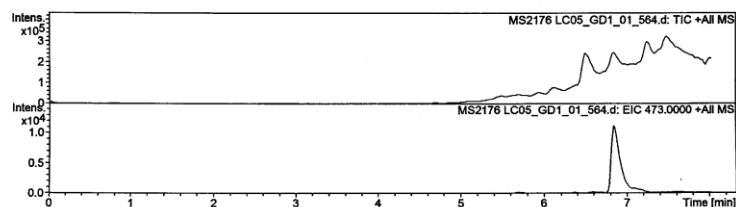
Figura 43: Espectro de massas por ionização química do composto 5 (LC5).

Mass Spectrometry & Proteomics Facility Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info
 Analysis Name: D:\Data\061809\MS2176 LC05_GD1_01_564.d Acquisition Date: 6/19/2009 2:10:48 PM
 Method: lcms_h2ograd.m Operator: Nonka Sevova
 Sample Name: MS2176 LC05 Instrument / Ser#: microTOF-Q 10195
 Comment:

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	3.0 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set Collision Cell RF	150.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



Meas. m/z	#	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf
472.9878	1	C 17 H 26 Br 2 Cl O 3	470.9932	6.9	7.1	3.5	ok	even

470.9895 [M-H]⁺, calcd for C₁₇H₂₆Br₂ClO₃ 470.9937

Figura 44: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 5 (LC5).

- Composto 6:

O composto **6** (**LC08**) (2,1 mg) foi isolado após purificação em CLAE de diferentes frações obtidas durante o processo de fracionamento (**Figura 1**) como um líquido incolor e inodoro de forma impura. O espectro de ^1H RMN apresentou três sinais de hidrogênios desprotegidos, dois sinais de hidrogênios ligados a carbonos provavelmente halogenados em δ 4,21 (1H, dd, $J = 4,2; 12,4$ Hz) e 4,10 (1H, dd, $J = 4,2; 13,1$ Hz), um sinal adicional em δ 4,62 (1H, dd, $J = 2,7; 3,2$ Hz) e cinco metilas em δ 1,16, 1,30, 1,37, 1,64 e 2,13. O sinal em 2,13 sugere da mesma forma que o composto **5**, a presença de um composto acetilado. No entanto, observa-se a presença de uma impureza, vista a presença de sinal em δ 2,18 com integração 1:0,7 em relação ao sinal em δ 2,13.

No anel A, observamos constantes de acoplamento baixas no hidrogênio em δ 4,62 (1H, dd, $J = 2,7, 3,7$ Hz) sugerindo a posição equatorial deste hidrogênio e a posição axial da acetila. Em relação ao bromo no anel tetraidropirano, a constante de acoplamento alta no hidrogênio em δ 4,10 é similar à observada no caespitol. A constante de acoplamento alta no hidrogênio em δ 4,21 indica que a estrutura do anel B é semelhante ao caespitol. Com bases nos dados apresentados e comparação com dados da literatura, deduz-se que o composto **6** é o **8-acetil caespitol** (**Figura 45**), isolado previamente para *Laurencia caespitosa* (González et al., 1973) e *Aplysia dactylomela* (Wessels et al., 2000).

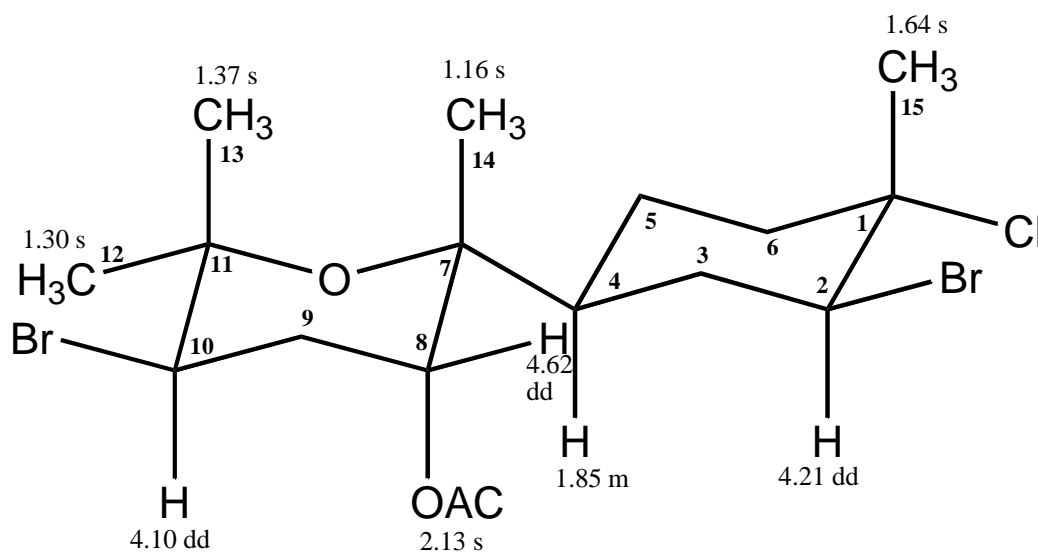


Figura 45: Estrutura do composto **6**.

Quadro 6: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 6 (400 MHz; CDCl_3 $H=7,24$) comparados com a literatura (Wessel et al., 2000, CDCl_3 ; González et al., 1979, CDCl_3).

C	δH (J Hz)	δH (J Hz) Wessel et al., 2000	δC González et al., 1979
1	-	-	71,5
2	4,21 dd (4,2; 12,4)	4,23 dd (4,1; 12,2)	62,8
3	1,60 m 1,87 m	1,61 m 1,87 m	36,3
4	1,85 m	1,86 m	46,2
5	1,25 m 1,90 m	1,26 m 1,89 m	22,9
6	2,05 ddd (3,7; 3,7; 13,5) 2,41 ddd (3,7; 3,7; 13,5)	2,05 ddd (3,6; 3,6; 13,7) 2,42 ddd (3,1; 3,1; 13,1)	43,0
7	-	-	76,1
8	4,62 dd (2,7; 3,7)	4,65 dd (2,5; 3,6)	73,0
9	2,30 ddd (3,7; 4,0; 14,8) 2,49 ddd (2,4; 13,1; 14,8)	2,31 ddd (3,6; 4,1; 14,8) 2,47 ddd (2,5; 13,2; 14,8)	32,9
10	4,10 dd (4,2; 13,1)	4,12 dd (4,1; 13,2)	52,5
11	-	-	75,6
12	1,30 s	1,33 s	31,0
13	1,37 s	1,40 s	24,0
14	1,16 s	1,19 s	20,1
15	1,64 s	1,67 s	24,1
OAc	2,13 s	2,15 s	

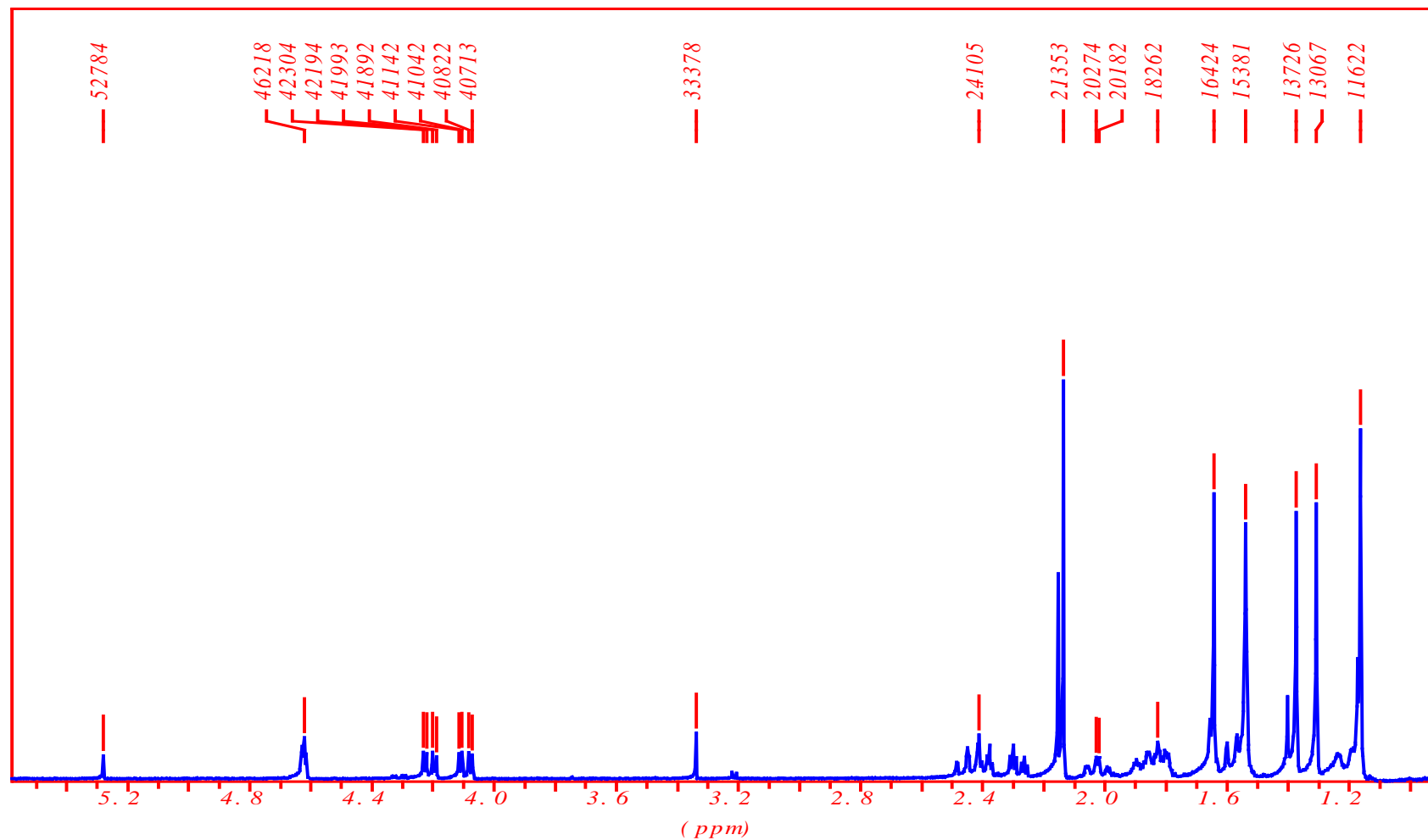


Figura 46: Espectro de ¹H RMN do composto 6 (LC8) em CDCl₃ (400 MHz).

- Composto 7:

O composto **7 (LC22)** (1,3 mg) foi isolado como um líquido incolor e inodoro após purificação em CLAE de uma fração obtida durante o processo de fracionamento (**Figura 1**). O espectro de infravermelho indicou a presença de grupos carbonílicos, provavelmente ésteres em 1733e 1229 cm^{-1} e ausência de grupamento hidroxila. O espectro de massas apresentou picos de baixa intensidade acima de 400, no entanto em m/z 351/353/355/357 observa-se um padrão isotópico de íons que sugere a presença de dois bromos e um cloro na molécula.

O espectro de ^{13}C RMN e experimento HSQC-DEPT indicaram a presença de 19 carbonos, sendo cinco quaternários, cinco metínicos, três metílenos e seis metilas. Em relação a esses carbonos, sete estão ligados a oxigênio ou halogênios em δ 51,9 (CH), 61,9 (CH), 68,9 (CH), 70,5 (Cq), 72,5 (CH), 73,3 (Cq) e 77,6 (Cq), e dois carbonílicos em δ 172,2 e 170,2 (Cq). Dessa forma, a fórmula molecular proposta é $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{Br}_2\text{ClO}_5$ em que o íon molecular esperado em m/z 530/532/534/536 não foi detectado (**Figura 47**). O espectro de massas de alta resolução (observado e calculado) confirmou a fórmula molecular proposta.

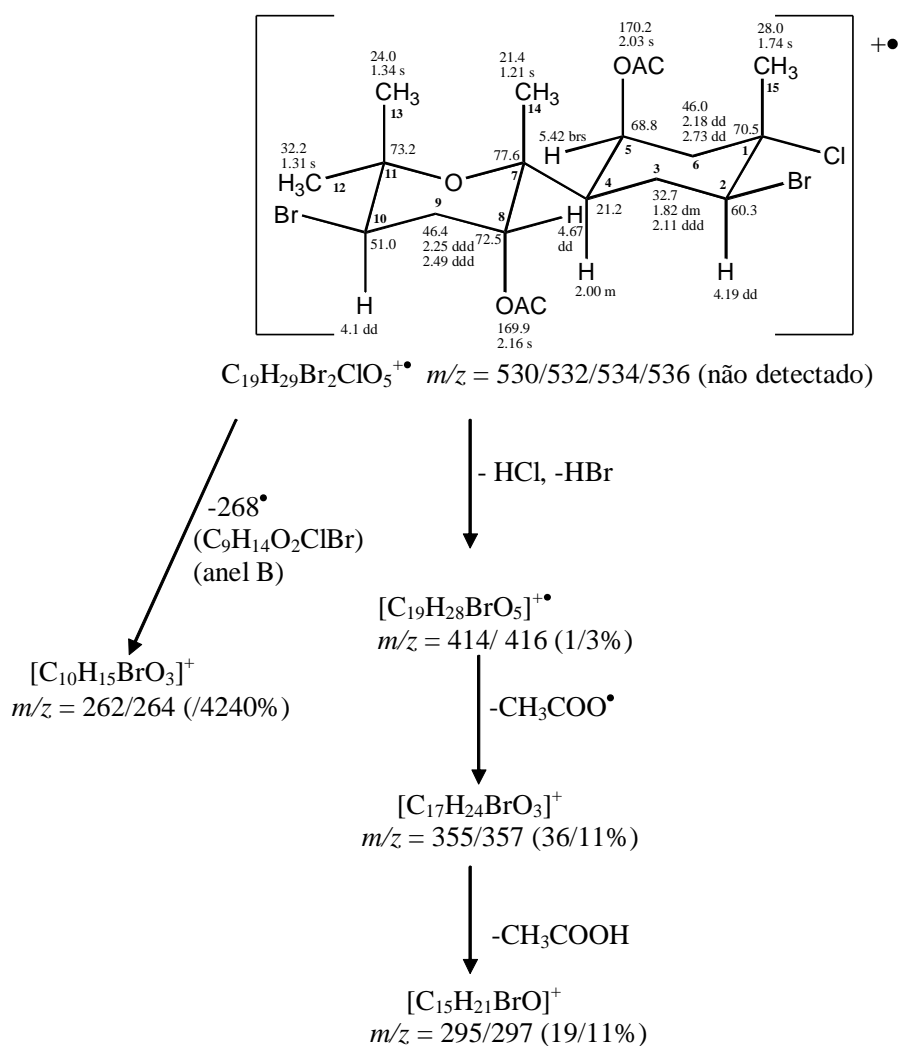


Figura 47: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização eletrônica do composto **7**.

O espectro de ^1H RMN apresentou quatro sinais de hidrogênios desprotegidos, dois sinais de hidrogênios ligados a carbonos provavelmente halogenados em δ 4,19 (1H, dd, $J = 4,2; 12,3$ Hz) e 4,10 (1H, dd, $J = 4,0; 13,2$ Hz), dois sinais adicionais em δ 4,67 e 5,42 e seis metilas em δ 1,21, 1,31, 1,34, 1,74, 2,03 e 2,16, as duas últimas pertencentes as acetilas.

A substituição do anel A é semelhante ao do 8-acetil caespitol, com o bromo na posição equatorial devido à alta constante de acoplamento do hidrogênio em δ 4,1 e baixas constantes de acoplamento no hidrogênio em δ 4,67 (1H, dd, $J = 3,3; 2,9$), sugerindo posição equatorial deste último hidrogênio e axial para a acetila. A irradiação da metila ressonando em δ 1,21, através de experimentos NOE diferencial (dados não apresentados), confirmou que o sinal em δ 1,34 corresponde ao grupo metílico em posição axial. Por outro lado, anel B possui uma estrutura semelhante ao composto **4**, com o grupo acetoxi no carbono 5 em posição axial e o hidrogênio na posição equatorial (Figura 48).

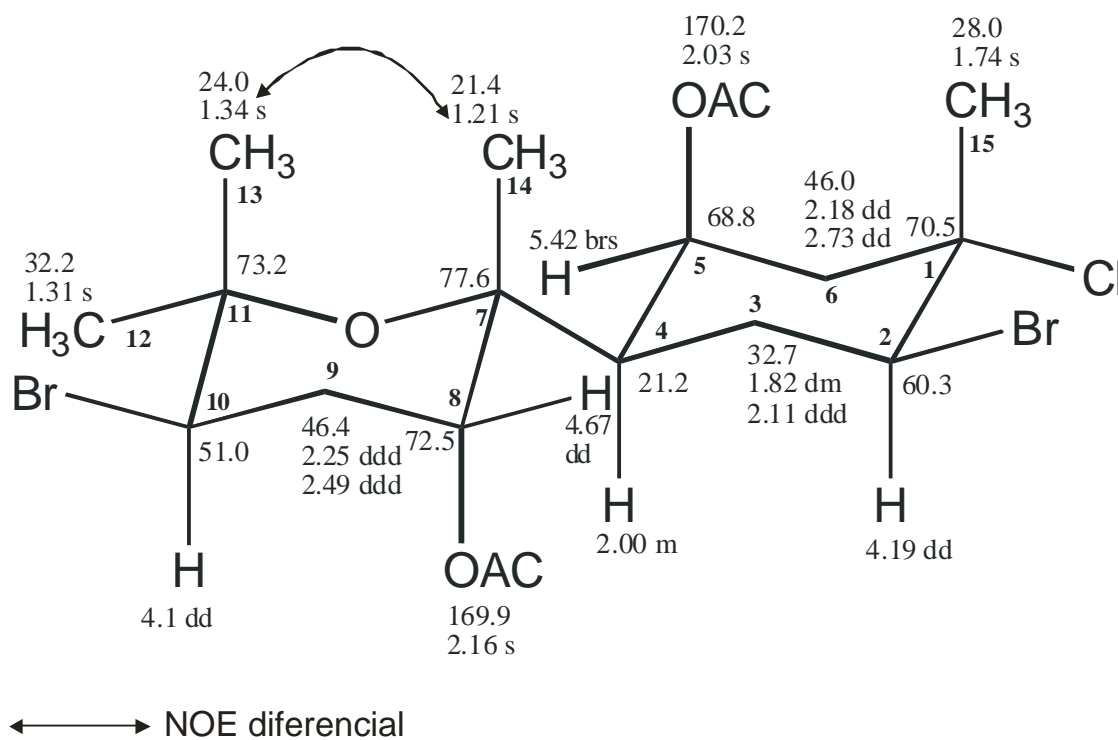


Figura 48: Estrutura do composto **7** com correlações NOE diferencial.

Com base nos resultados apresentados, deduz-se que o composto **7** é o derivado 5- β -acetoxi do 8-acetil caespitol, é um composto novo. Para este composto a atividade ótica observada é $[\alpha]_{\text{D}} = +25,0^\circ$ (0,02, CHCl_3).

Quadro 7: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 7 (400 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0).

C	δ C (HSQC)	δ H (J Hz)
1 C	70,5	-
2 CH	60,3	4,19 dd (4,2; 12,3)
3 CH ₂	32,7	1,82 dm 2,11 ddd (11,3;12,8; 13,2)
4 CH	21,2	2,00 m
5 CH	68,8	5,42 br s
6 CH ₂	46,0	2,18 dd (3,1; 15,2) 2,73 dd (15,2; 3,1)
7 C	77,6	-
8 CH	72,5	4,67 dd (3,3; 2,9)
9 CH ₂	46,4	2,25 ddd (14,6; 4,0; 3,7) 2,49 ddd (13,2; 14,6; 2,6)
10 CH	51,0	4,1dd (4,0; 13,2)
11 C	73,2	-
12 CH ₃	32,2	1,31 s
13 CH ₃	24,0	1,34 s
14 CH ₃	21,4	1,21 s
15 CH ₃	28,0	1,74 s
CH ₃ AC	169,9	2,03 s
CH ₃ AC	169,9	2,16 s

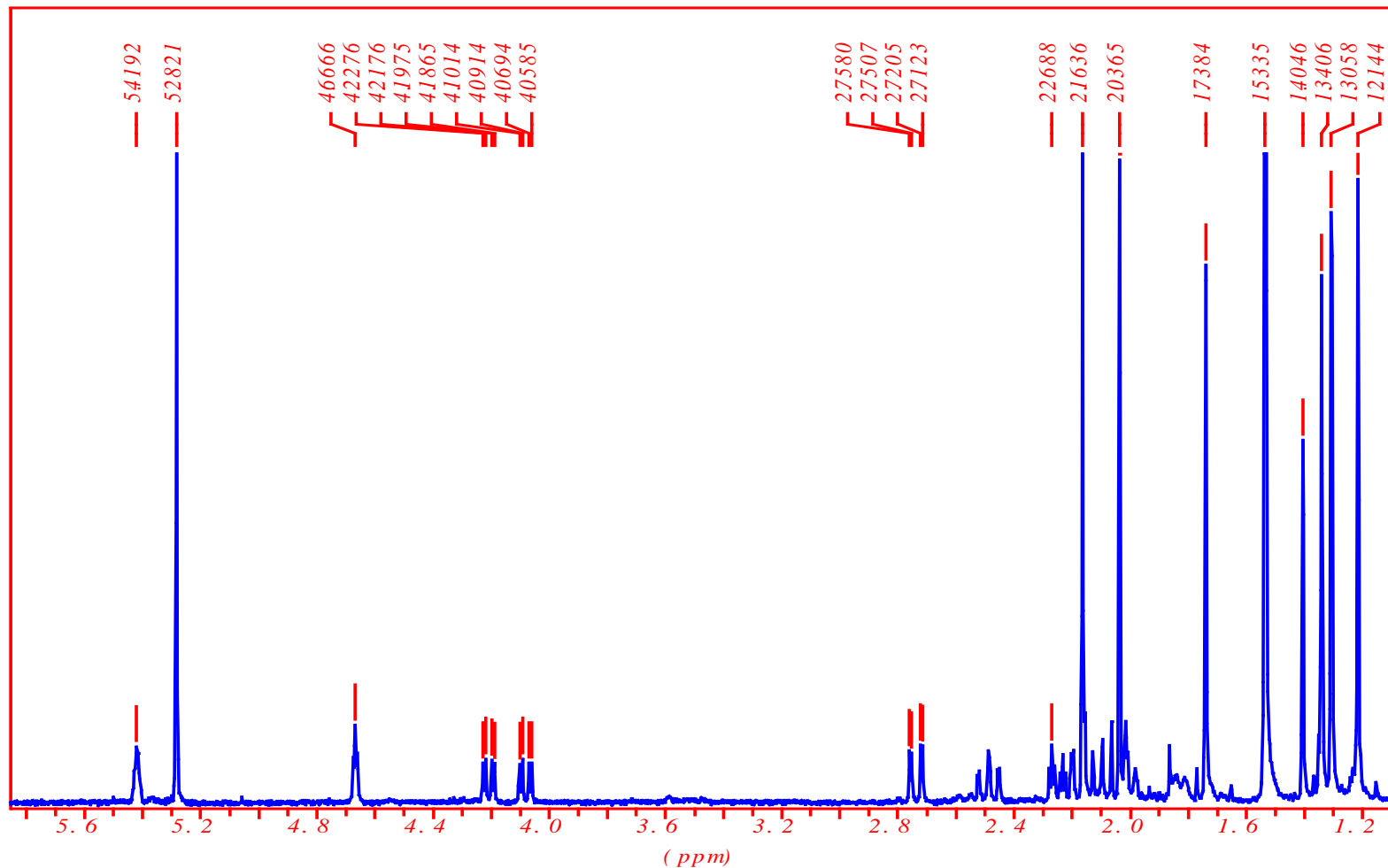


Figura 49: Espectro de ¹H RMN do composto 7 (LC22) em CDCl₃ (400 MHz).

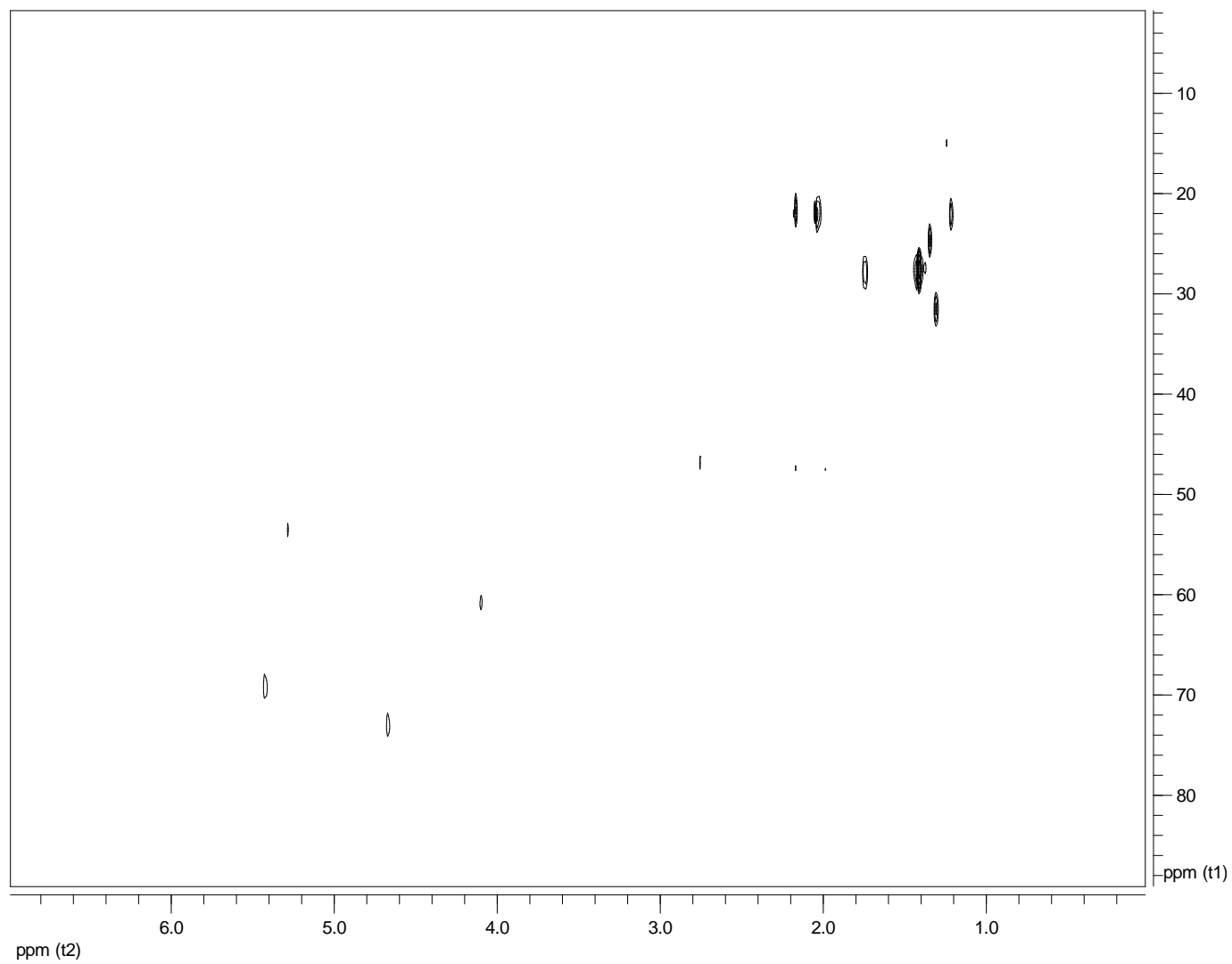


Figura 50: Espectro HSQC-HSQC-DEPT do composto 7 (LC22) em CDCl₃ (400 MHz).

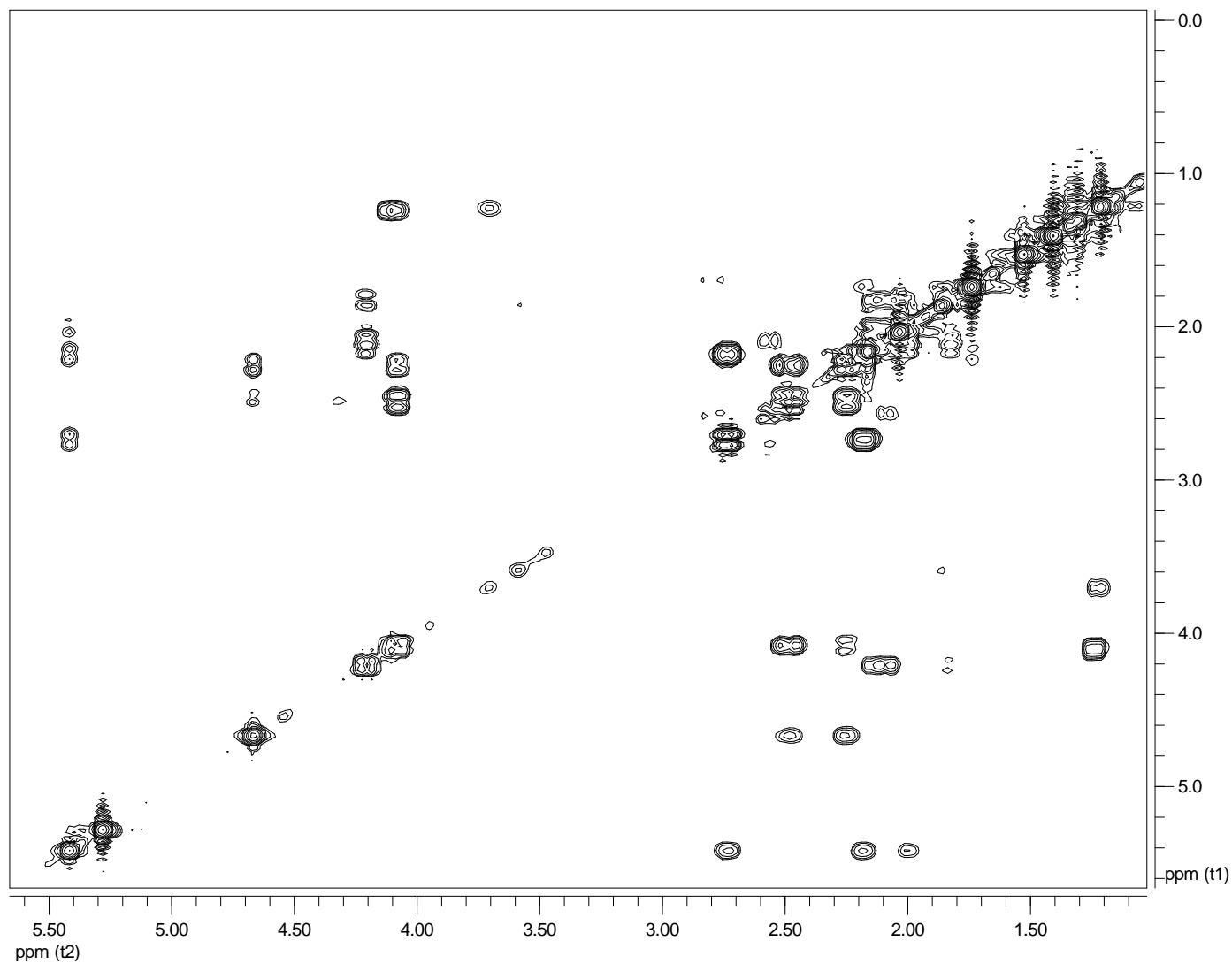


Figura 51: Espectro ¹H-¹H COSY do composto 7 (LC22) em CDCl₃ (400 MHz).

LC22 #22 RT: 0.72 AV: 1 NL: 1.41E7
T: + c Full ms [50.00-1000.00]

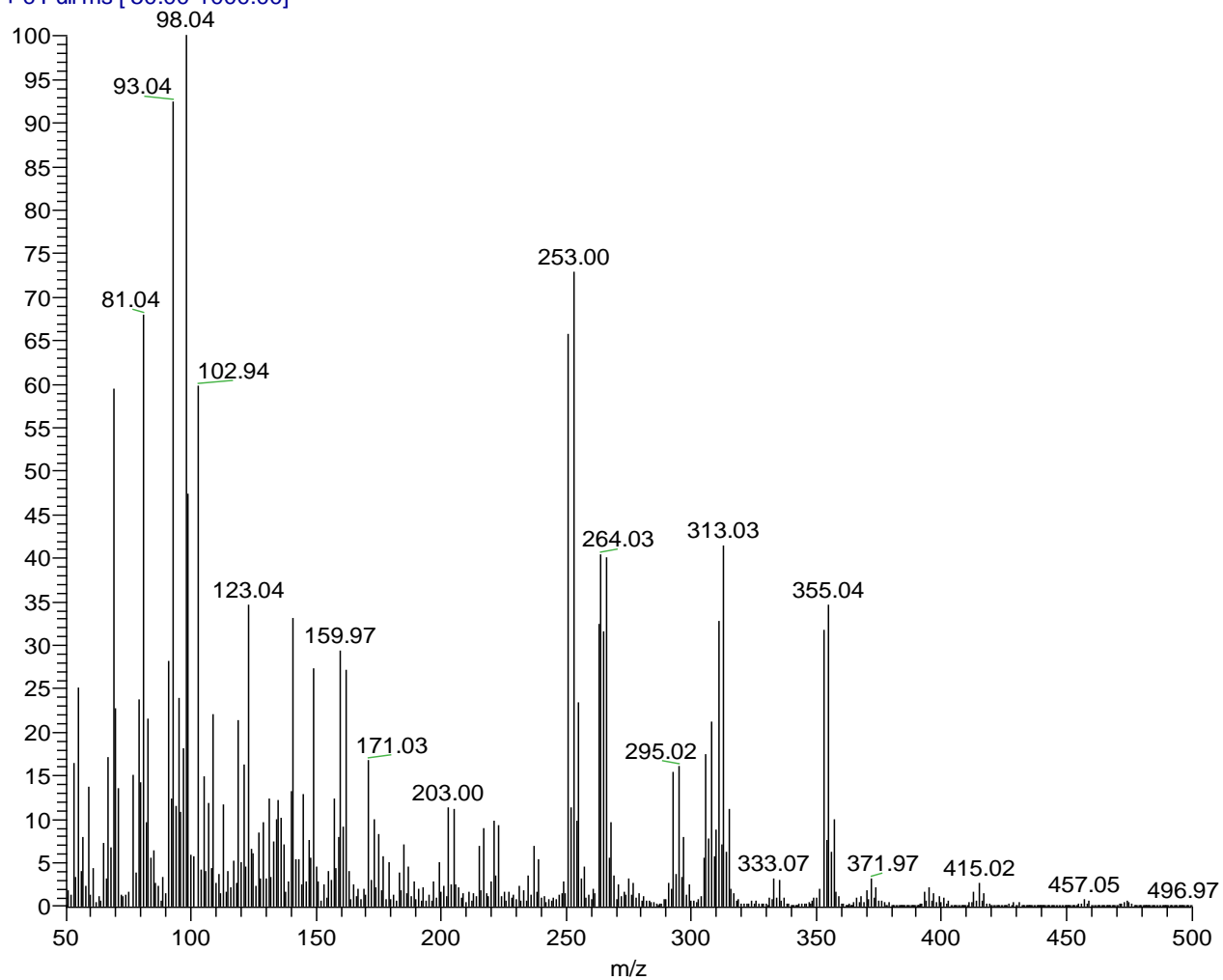
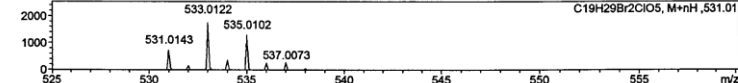
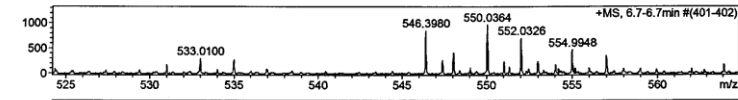
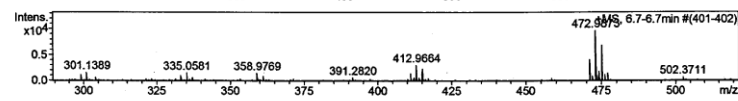
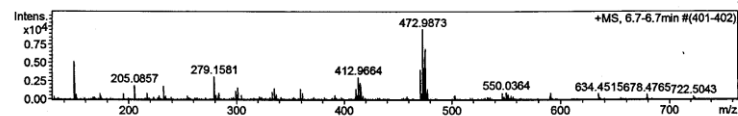
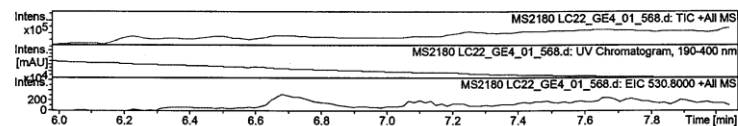


Figura 52: Espectro de massas por ionização eletrônica do composto 7 (LC22).

Mass Spectrometry & Proteomics Facility **Mass Spectrum SmartFormula Report**

Analysis Info
 Analysis Name D:\Data\061909\MS2180 LC22_GE4_01_568.d Acquisition Date 6/19/2009 3:47:02 PM
 Method lcms_h2ograd.m Operator Nonka Sevova
 Sample Name MS2180 LC22 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 10195
 Comment

Acquisition Parameter
 Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 3.0 Bar
 Focus Not active Set Capillary 4500 V Set Dry Heater 200 °C
 Scan Begin 50 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Dry Gas 4.0 l/min
 Scan End 3000 m/z Set Collision Cell RF 150.0 Vpp Set Divert Valve Source



Meas. m/z	#	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf
470.9898	1	C 17 H 25 Br 2 Cl O 3	469.9853	-2.2	-5.1	4.0	ok	odd
531.0124	1	C 19 H 29 Br 2 Cl O 5	530.0065	-4.7	-2.9	4.0	ok	odd

531.0124 [M+H]⁺, calcd for C₁₉H₂₉Br₂ClO₅ 531.0149

Figura 53: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 7 (LC22).

- Composto 8:

O composto **8 (LC26)** (3,0 mg) foi isolado como um líquido incolor e inodoro após purificação em CLAE de uma fração obtida durante o processo de fracionamento (**Figura 1**). O espectro de infravermelho indicou a presença de grupamento hidroxila em cerca de 3100 cm^{-1} e de um éster, provavelmente acetato, em 1733 e 1239 cm^{-1} . O espectro de massas apresentou os picos de maior massa em m/z 435/437/439 com baixa intensidade com razão 3:4:1, o que sugere a presença de um grupo bromo e um cloro na molécula.

Os experimentos HSQC-DEPT e HMBC indicaram a presença de 17 carbonos, sendo quatro quaternários, cinco metínicos, três metílenos e cinco metilas. Em relação a estes carbonos, sete estão ligados a oxigênio ou halogênio em δ 52,2 (CH), 64,1 (CH), 68,0 (CH), 71,5 (Cq), 73,5 (Cq), 74,5 (CH), e 77,6 (Cq) e um é carbonílico em δ 169,5 (Cq), sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{Br}_2\text{ClO}_4$, onde o íon molecular em m/z 489/491/493/495 não é observado, (**Figura 54**). O espectro de massas de alta resolução (observado e calculado) confirmou a fórmula molecular proposta.

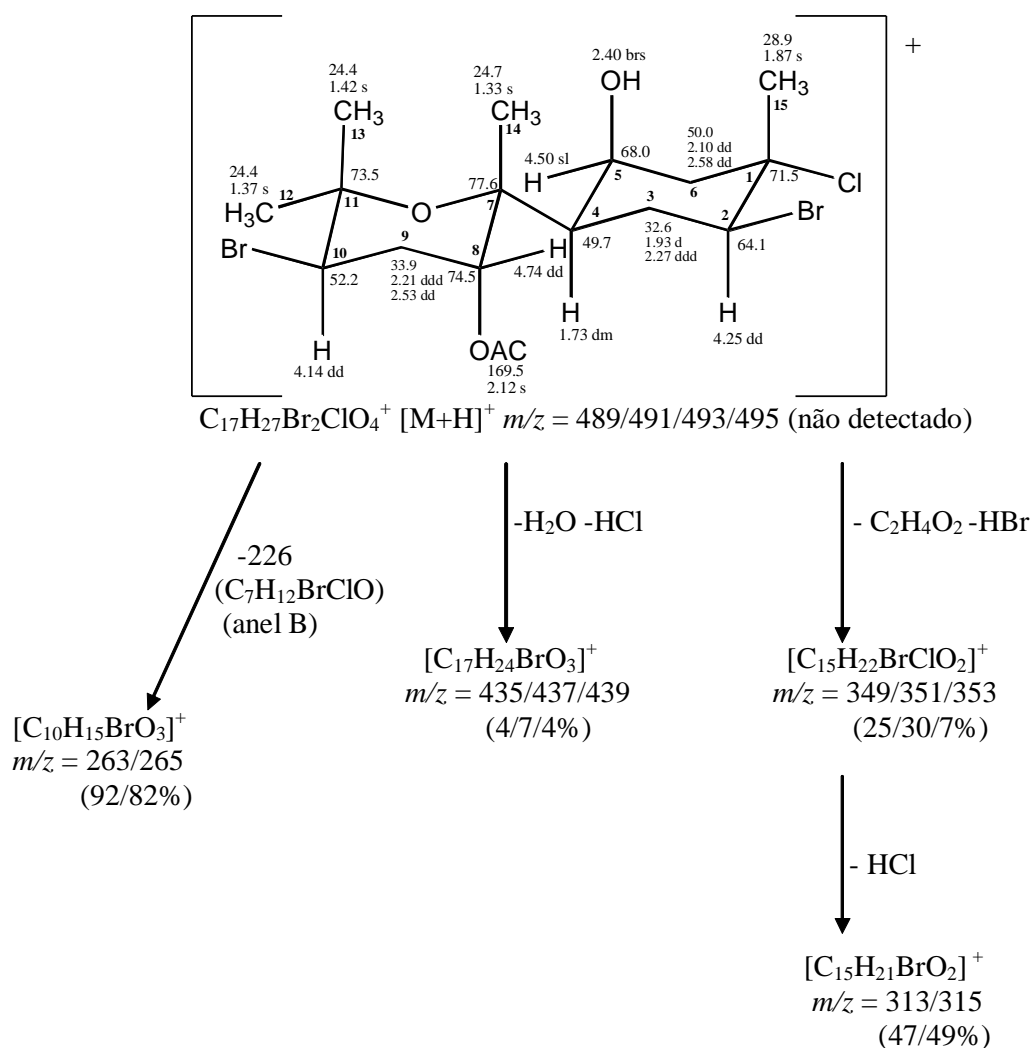


Figura 54: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização química do composto **8**.

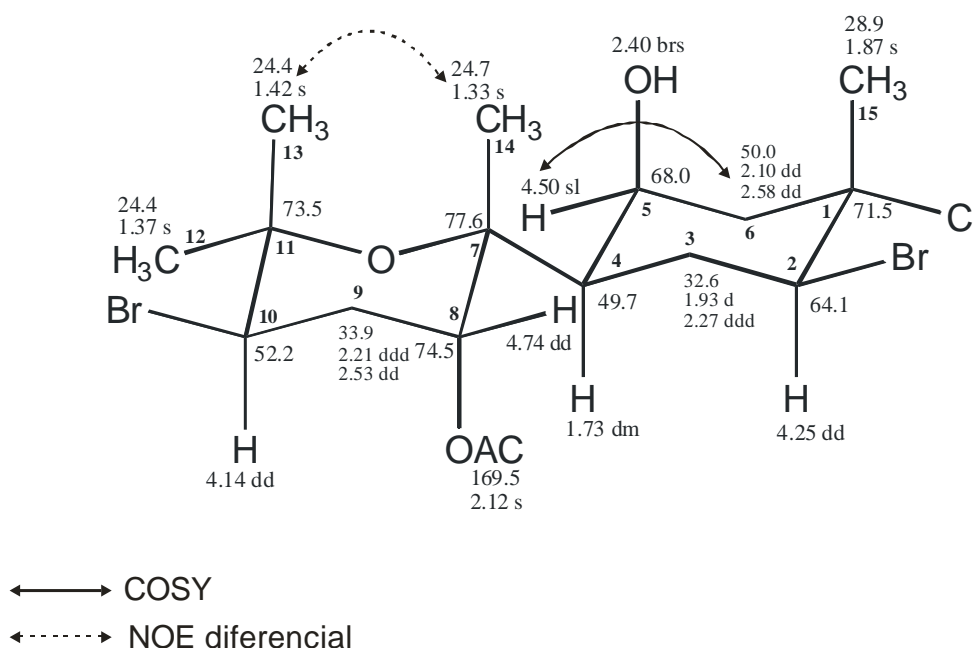
O espectro de ^1H RMN apresentou quatro sinais de hidrogênios desprotegidos, dois sinais de hidrogênios tipicamente ligados a carbonos halogenados cíclicos em δ 4,25 (1H, dd, $J = 4,0$; 12,4 Hz) e 4,14 (1H, dd, $J = 4,0$; 13,2 Hz), e dois adicionalmente em δ 4,50 (1H, sl) e 4,74 (1H, t, $J = 2,9$; 2,9) e cinco metilas em δ 1,33, 1,37, 1,42, 1,87 e 2,12. Dessa forma, o composto **8** é semelhante ao composto **4**, diferindo nas posições da acetila e hidroxila nos anéis A e B.

A substituição no carbono em δ 68,0 pode ser deduzida a partir da presença do hidrogênio em δ 4,50, o qual apresenta correlação ^1H - ^1H COSY com os hidrogênios em δ 2,10 e 2,58 pertencentes ao carbono em δ 50,0; a baixa constante de acoplamento do mesmo sugere a posição equatorial deste hidrogênio (**Figura 55**).

Já a substituição do anel A é semelhante ao do composto 8-acetil caespitol, com o grupamento bromo na posição equatorial devido à alta constante de acoplamento do hidrogênio em 4,14 ppm, e baixas constantes de acoplamento no hidrogênio em δ 4,74 indicando a posição equatorial deste hidrogênio e axial para a acetila. A irradiação da metila em δ 1,33, através de experimento NOE diferencial (dados não apresentados), confirmou ainda que o sinal em δ 1,42 corresponde ao grupo metílico do anel A em posição axial, sendo assim o sinal em δ 1,37 é atribuído a metila em posição equatorial (**Figura 55**).

Figura 55: Estrutura do composto **8** com correlações COSY e NOE diferencial.

O conjunto de resultados apresentados, indica que o composto **8** é um derivado 5- β -hidroxi do 8-acetil caespitol, um composto novo. Para esse composto a atividade ótica calculada é $[\alpha]_D = +9,2^\circ$ (0,13, CHCl_3).



Quadro 8: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 8 (400 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0).

C	δ C (HSQC/HMBC)	δ H (J Hz)
1 C	71,5	-
2 CH	64,1	4,25 dd (4,0;12,4)
3 CH ₂	32,6	1,93 d (13,9) 2,27 ddd (2x 12,8; 13,9)
4 CH	49,7	1,73 dm
5 CH	68,0	4,5 br s
6 CH ₂	50,0	2,10 dd (1,8; 14,3) 2,58 dd (3,3; 14,3)
7 C	77,6	-
8 CH	74,5	4,74 t (2,9)
9 CH ₂	33,9	2,21 ddd (14,6; 4,0; 3,7) 2,53 dd (12,4; 12,5)
10 CH	52,2	4,14 dd (4,0; 12,4)
11 C	73,5	-
12 CH ₃	24,4	1,37 s
13 CH ₃	24,4	1,42 s
14 CH ₃	24,7	1,33 s
15 CH ₃	28,9	1,87 s
CH ₃ AC	169,5	2,12 s
OH		2,40 br s

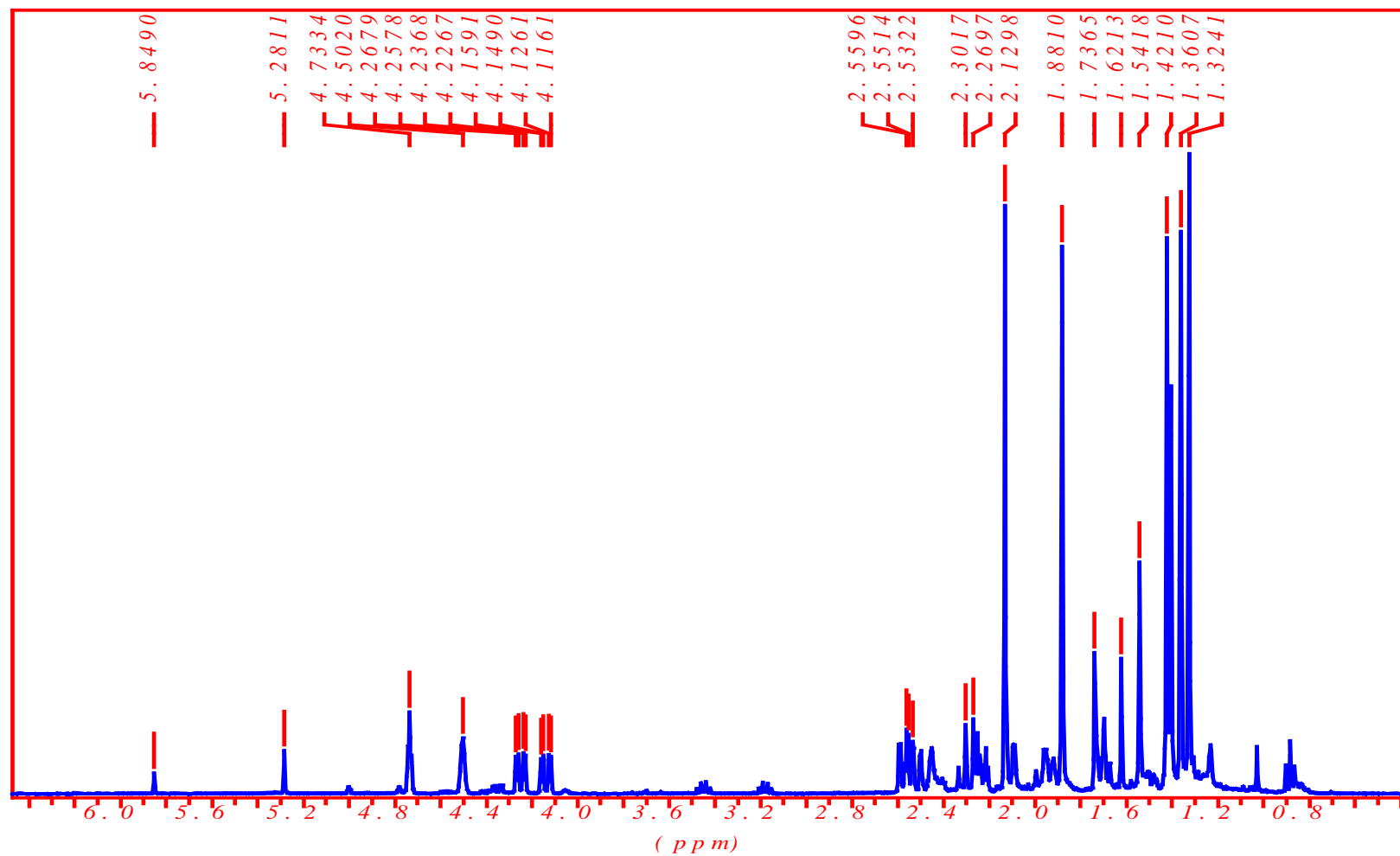


Figura 56: Espectro de ^1H RMN do composto 8 (LC26) em CDCl_3 (400 MHz).

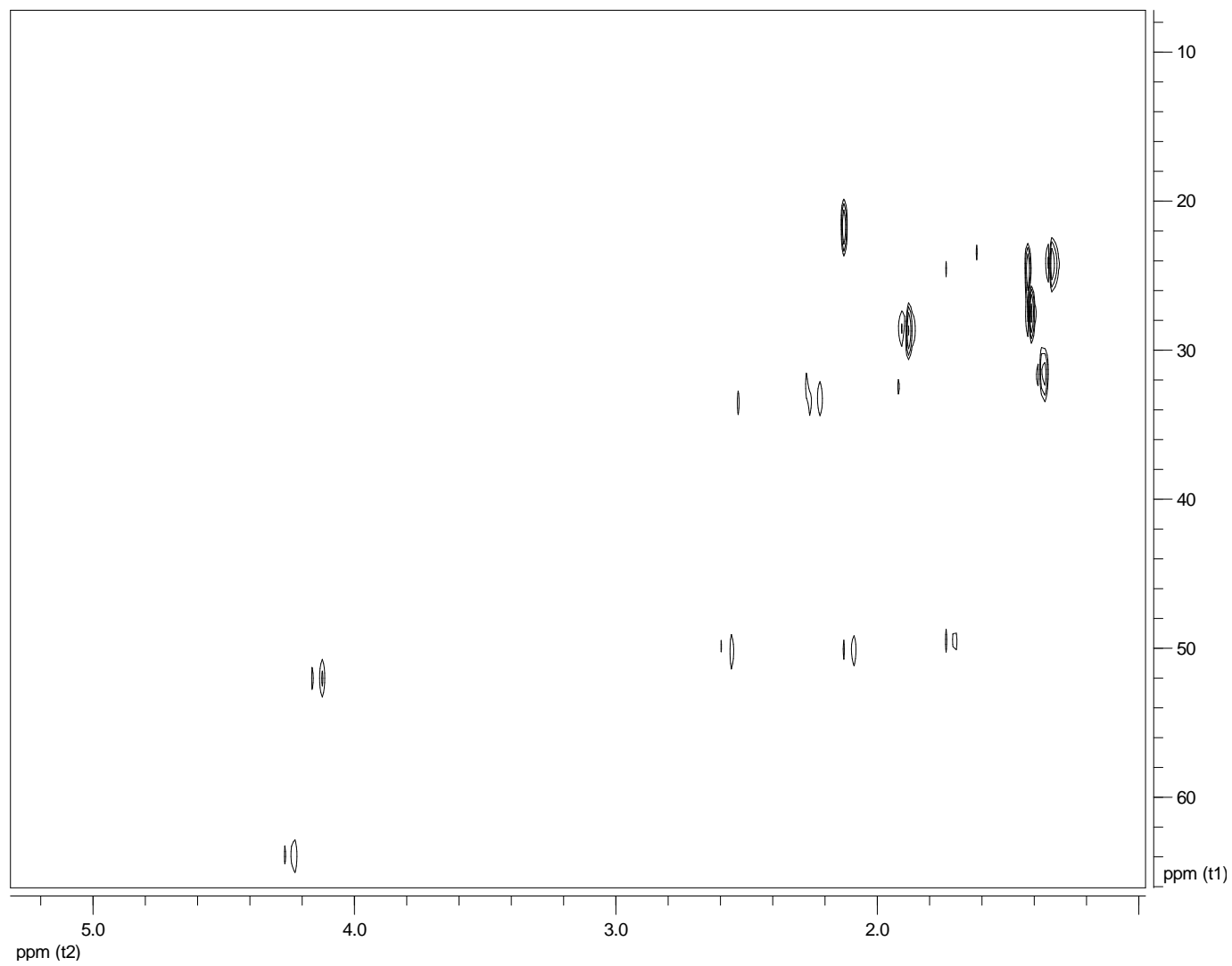


Figura 57: Espectro de HSQC-HSQC-DEPT do composto 8 (LC26) em CDCl_3 (400 MHz).

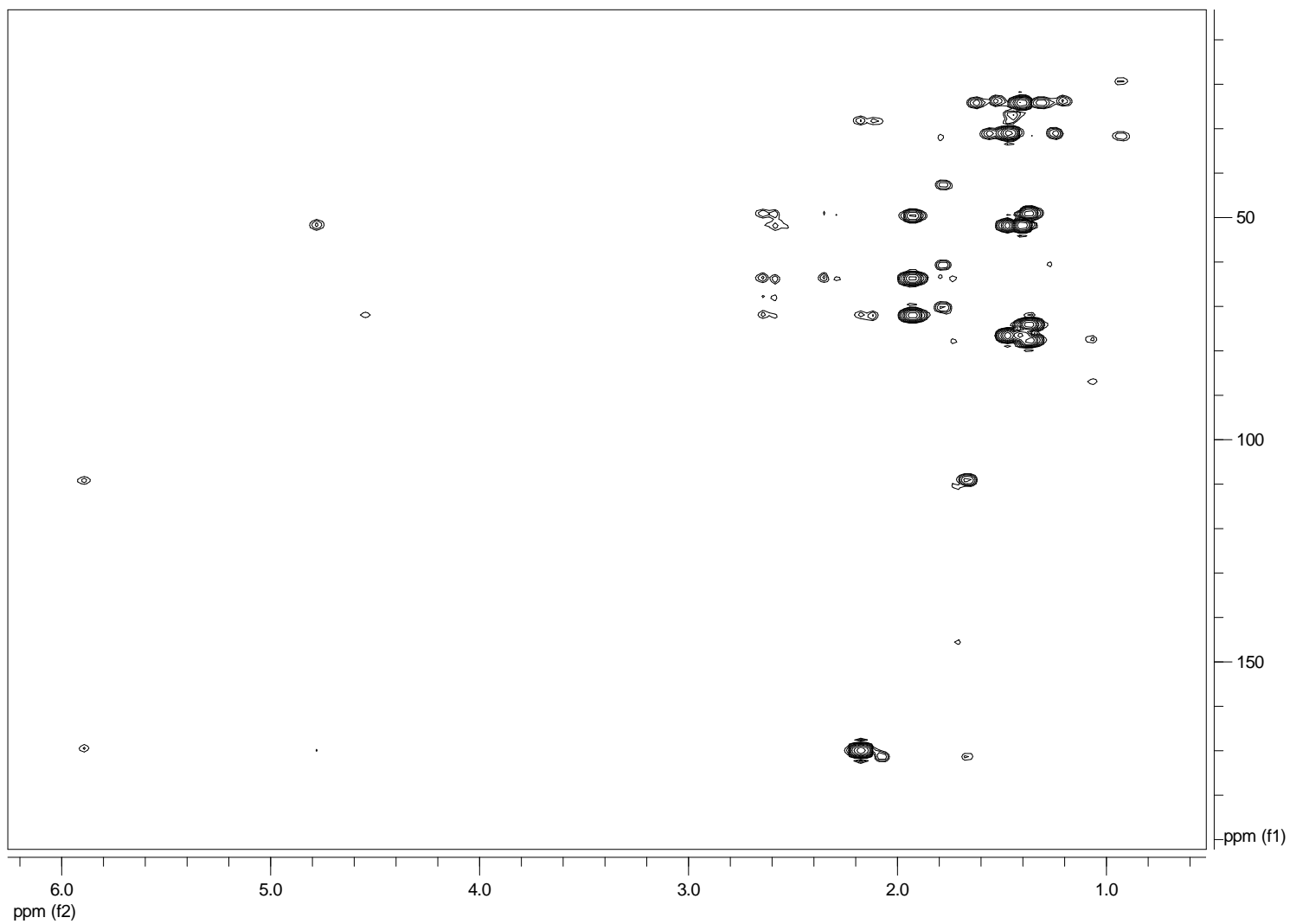


Figura 58: Espectro de HMBC do composto 8 (LC26) em CDCl_3 (400 MHz).

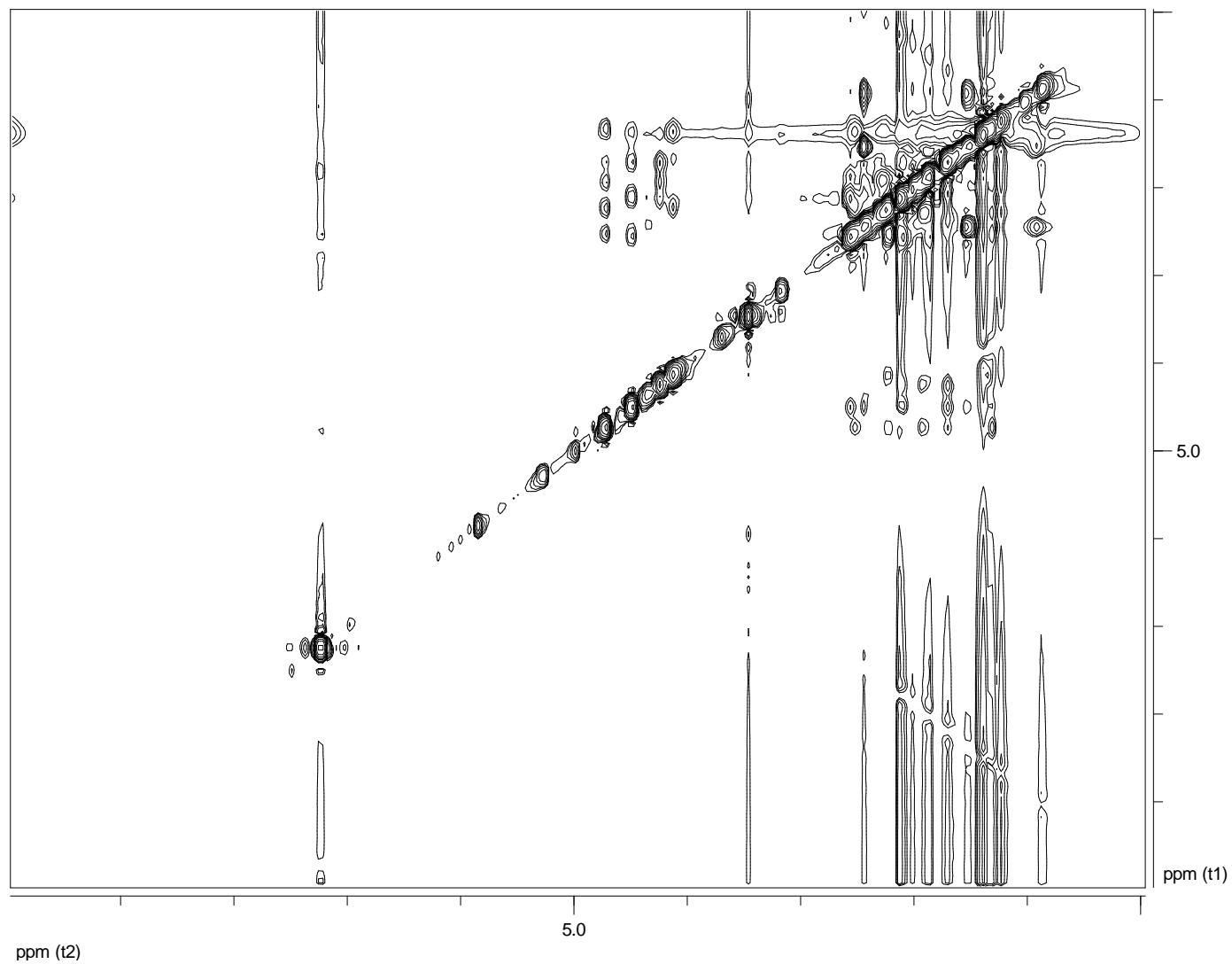


Figura 60: Espectro NOE do composto 8 (LC26) em CDCl_3 (400 MHz).

LC26 #28 RT: 0.73 AV: 1 NL: 4.72E5
T: + c Full ms [50.00-800.00]

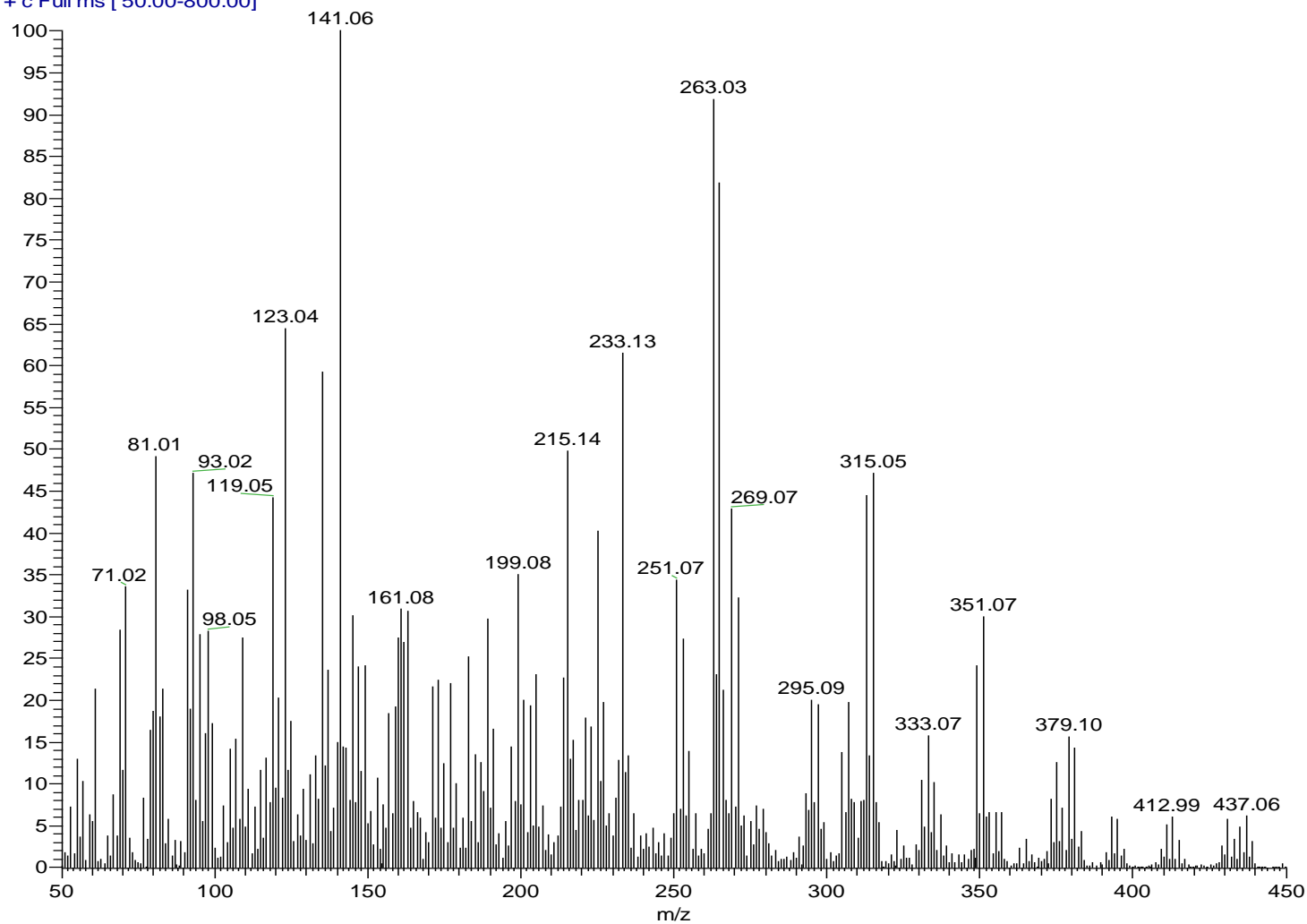


Figura 61: Espectro de massas por ionização química do composto 8 (LC26).

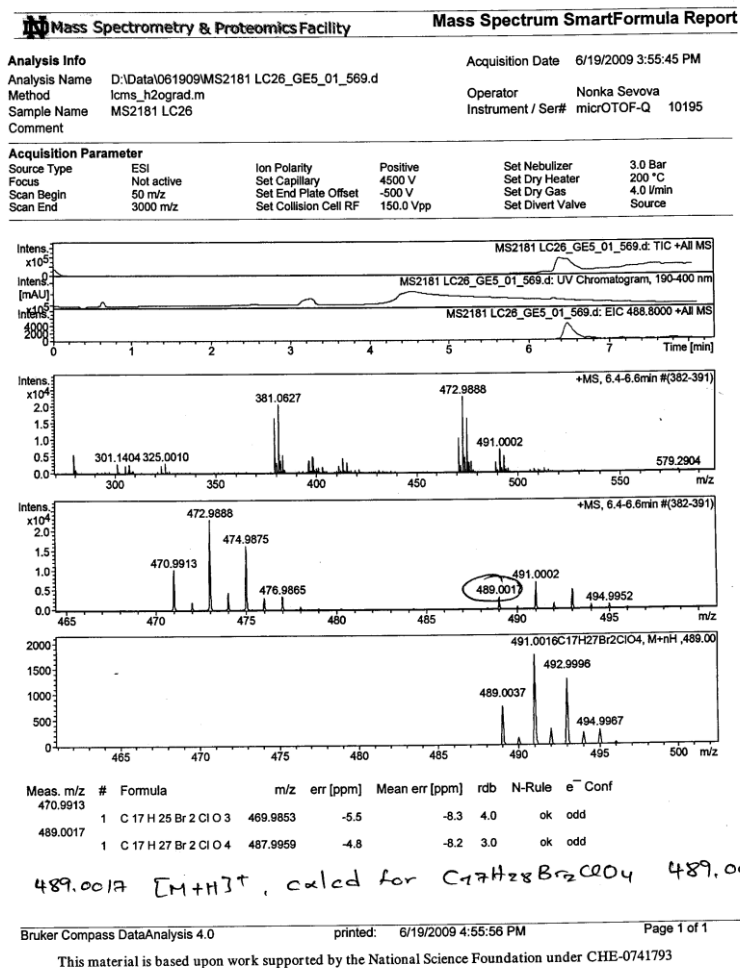


Figura 62: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 8 (LC26).

- Composto 9:

O composto **9 (LC19)** (6,8 mg) foi isolado como um líquido incolor e inodoro após purificação em CLAE de uma fração obtida durante o processo de fracionamento (**Figura 1**). O espectro de infravermelho indicou a ausência de grupos funcionais como acetila ou hidroxila. O espectro de massas apresentou pico de maior massas em m/z 412/414/416/418 com razão 3:7:5:1, sugerindo a presença dois grupos bromos e um cloro na molécula. O espectro de ^{13}C RMN e experimento HSQC-DEPT indicaram a presença de 15 carbonos, sendo quatro quaternários, três metínicos, quatro metilenos e quatro metilas. Em relação a estes carbonos, quatro apresentam deslocamentos semelhantes aos de carbonos ligados a oxigênio ou halogênio em δ 54,1 (CH), 62,5 (CH), 71,1 (Cq) e 76,3 (Cq) e dois são olefínicos em 104,6 (Cq) e 143,8 (Cq), Dessa forma, pode se propor a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{Br}_2\text{ClO}$ (**Figura 63**).

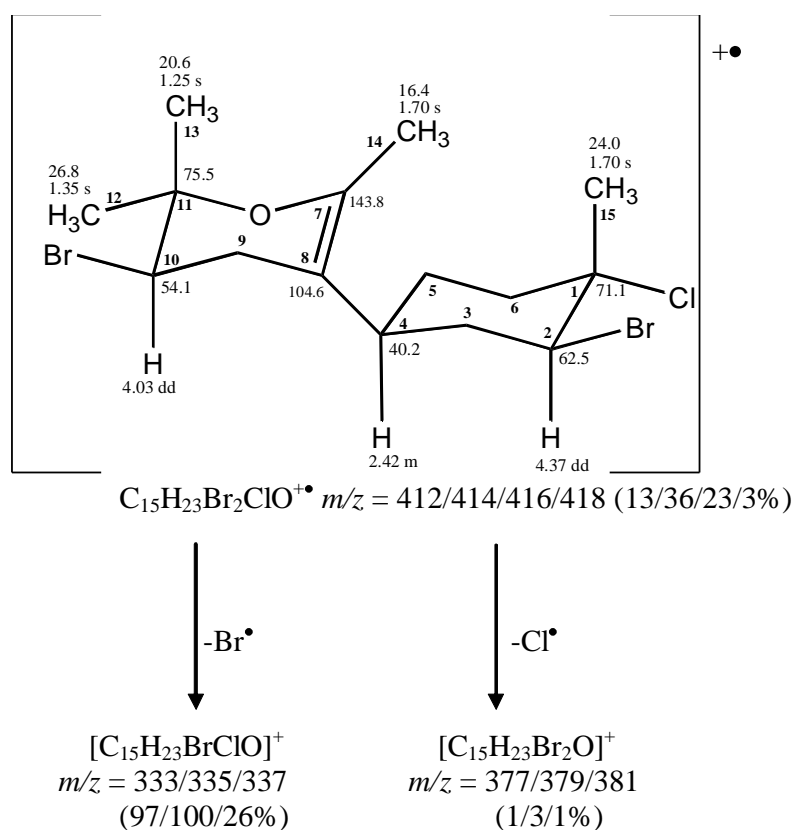


Figura 63: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização eletrônica do composto **9**.

O espectro de ^1H RMN apresentou dois sinais de hidrogênios ligados a carbonos possivelmente halogenados em δ 4,37 (1H, dd, $J = 4,4; 12,4$ Hz) e 4,03 (1H, dd, $J = 5,9; 8,8$ Hz), ausência de hidrogênio carbinólico e quatro metilas em δ 1,25, 1,35, 1,70 e 1,70. Análise detalhada do espectro de correlação ^1H - ^1H COSY mostra um sistema de spins $\text{CH}_{\text{ax}}\text{CH}_2\text{CH}_{\text{ax}}$. Esse dado junto com a constante de acoplamento alta entre o hidrogênio em δ 4,37 e δ 1,92 ($J = 12,4$ Hz), bem como os deslocamentos químicos do metino em δ 62,5, do carbono quaternário em δ 71,1 e dos hidrogênios da metila em δ 1,70, pode-se inferir que o sistema de spins em questão está inserido em um anel ciclohexano com bromo e cloro, semelhante ao composto **1**.

A configuração relativa dos centros assimétricos foi proposta baseada nas constantes de acoplamento. No anel A, observa-se uma constante de acoplamento alta do hidrogênio em δ 4,03, indicando a posição axial do mesmo e uma posição equatorial do bromo. No anel B observa-se uma relação diequatorial entre os grupos cloro e bromo de acordo com a constante de acoplamento alta do hidrogênio ligado ao halogênio em 4,37 ppm, semelhante ao caespitol.

Com bases nos dados apresentados e comparação com dados da literatura, deduz-se que o composto **9** é o **laucapiranóide A** (Figura 64), isolado previamente para *Laurencia caespitosa* (Chang et al., 1989) e *Aplysia dactylomela* (Wessels et al., 2000).

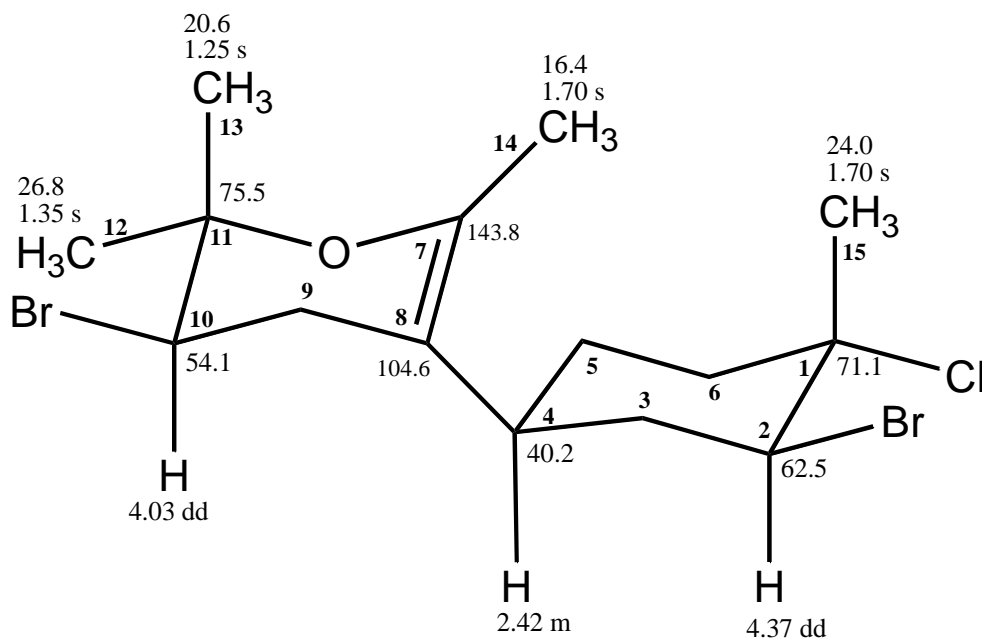


Figura 64: Estrutura do composto **9**.

Quadro 9: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 9 (400 e 50 MHz; CDCl_3 , H= 7,24 e C=77,0) comparados com a literatura (Chang et al., 1989, CDCl_3).

C	δH (J Hz)	δC	δH (J Hz) Chang et al., 1989	δC Chang et al., 1989
1	-	71,1	-	71,1
2	4,37 dd (4,4; 12,4)	62,5	4,38 dd (4,8; 12,2)	62,6
3	2,07 m 1,92 dd (12,4; 13,2)	39,9	1,72 m 2,47 m	40,0
4	2,42 m	40,2	1,63 m	40,3
5	1,51 m 1,51 m	27,3	1,56 m 2,75 m	27,4
6	2,42 m 2,09 m	42,7	2,39 m 2,03 m	42,8
7	-	143,8	-	143,9
8	-	104,6	-	104,7
9	2,46 dd (5,8; 16,5) 2,31 dd (8,8; 16,5)	30,5	2,52 dd (5,8; 14,5) 1,95 dd (8,7; 14,5)	30,5
10	4,03 dd (5,8; 8,8)	54,1	4,05 dd (5,8; 8,7)	54,1
11	-	76,3	-	75,3
12	1,35 s	26,8	1,37 s	26,9
13	1,25 s	20,6	1,27 s	20,6
14	1,70 s	16,4	1,72 s	16,5
15	1,70 s	24,0	1,73 s	24,0

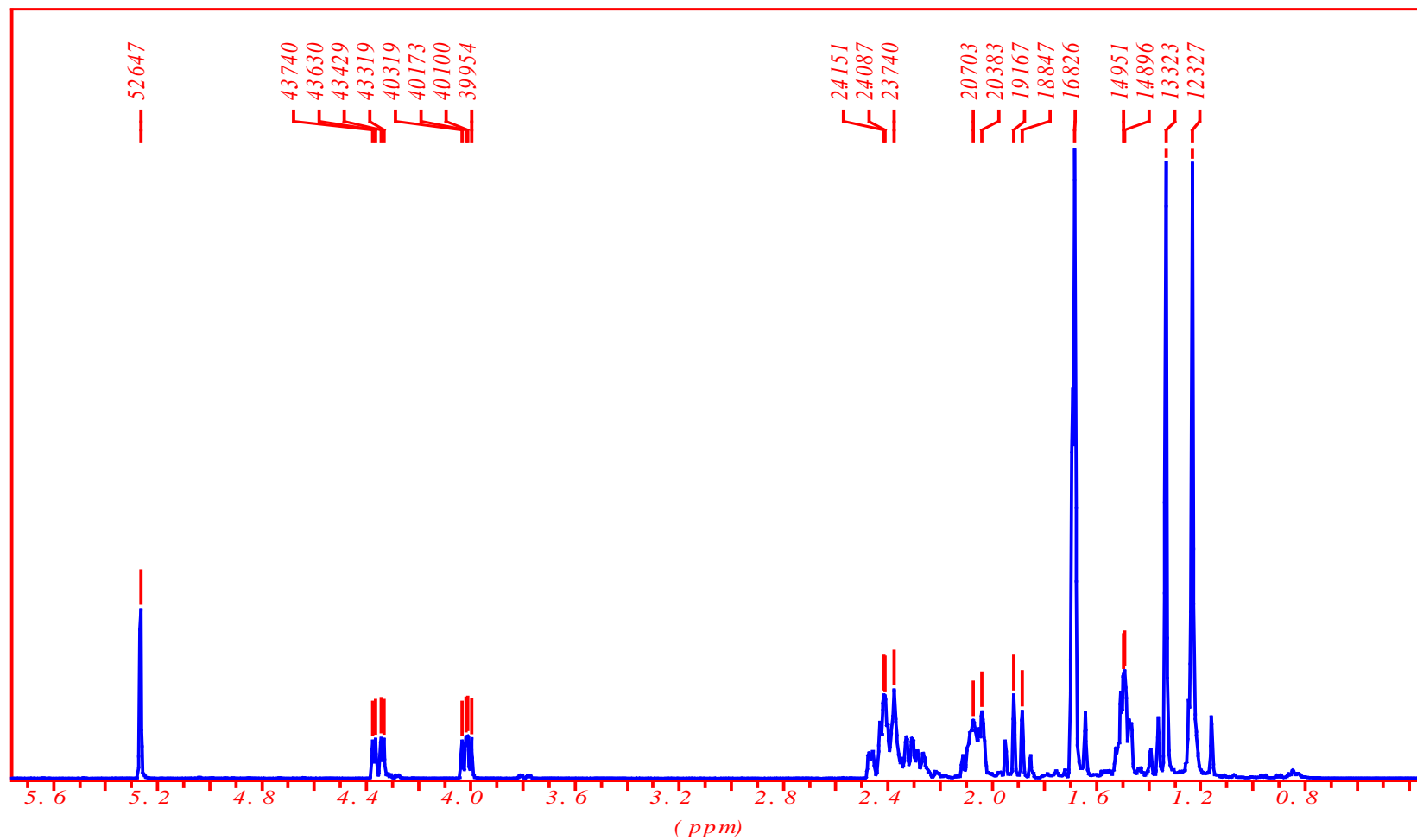


Figura 65: Espectro de ^1H RMN do composto 9 (LC19) em CDCl_3 (400 MHz).

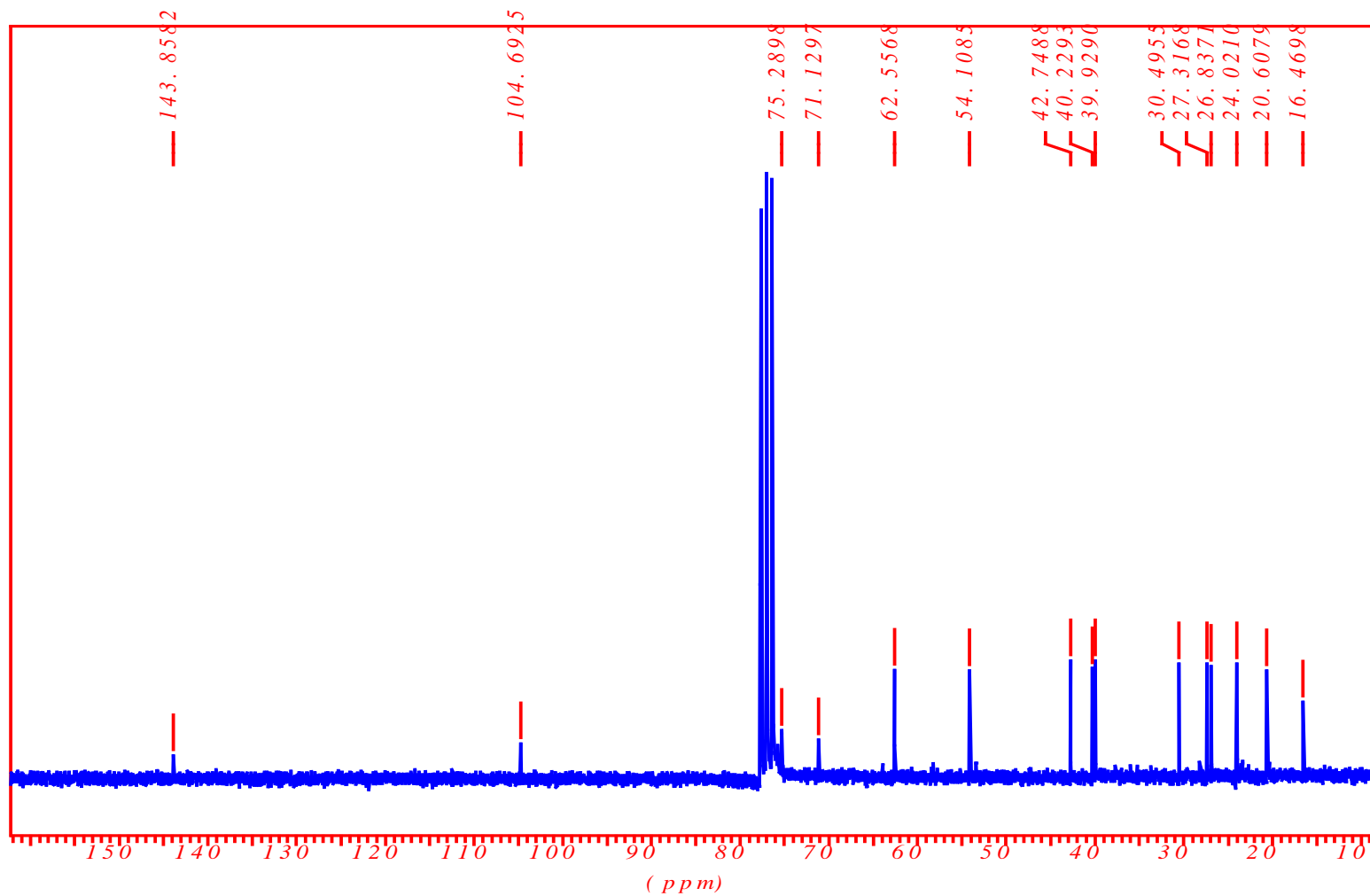


Figura 66: Espectro de ^{13}C RMN do composto 9 (LC19) em CDCl_3 (50 MHz).

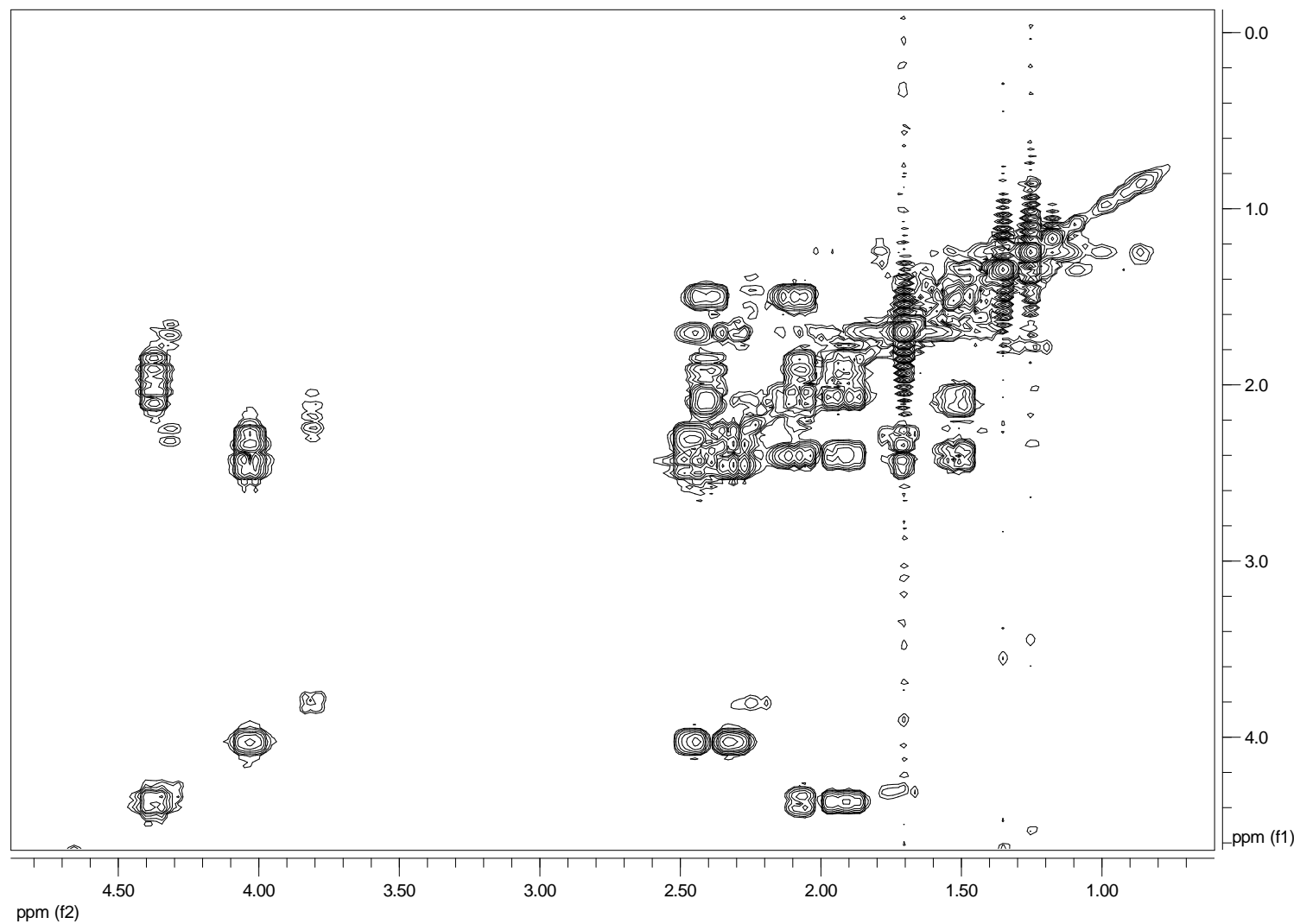


Figura 67: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 9 (LC19) em CDCl_3 (400 MHz).

LC19 #32 RT: 0.74 AV: 1 NL: 2.57E7
T: + c Full ms [40.00-700.00]

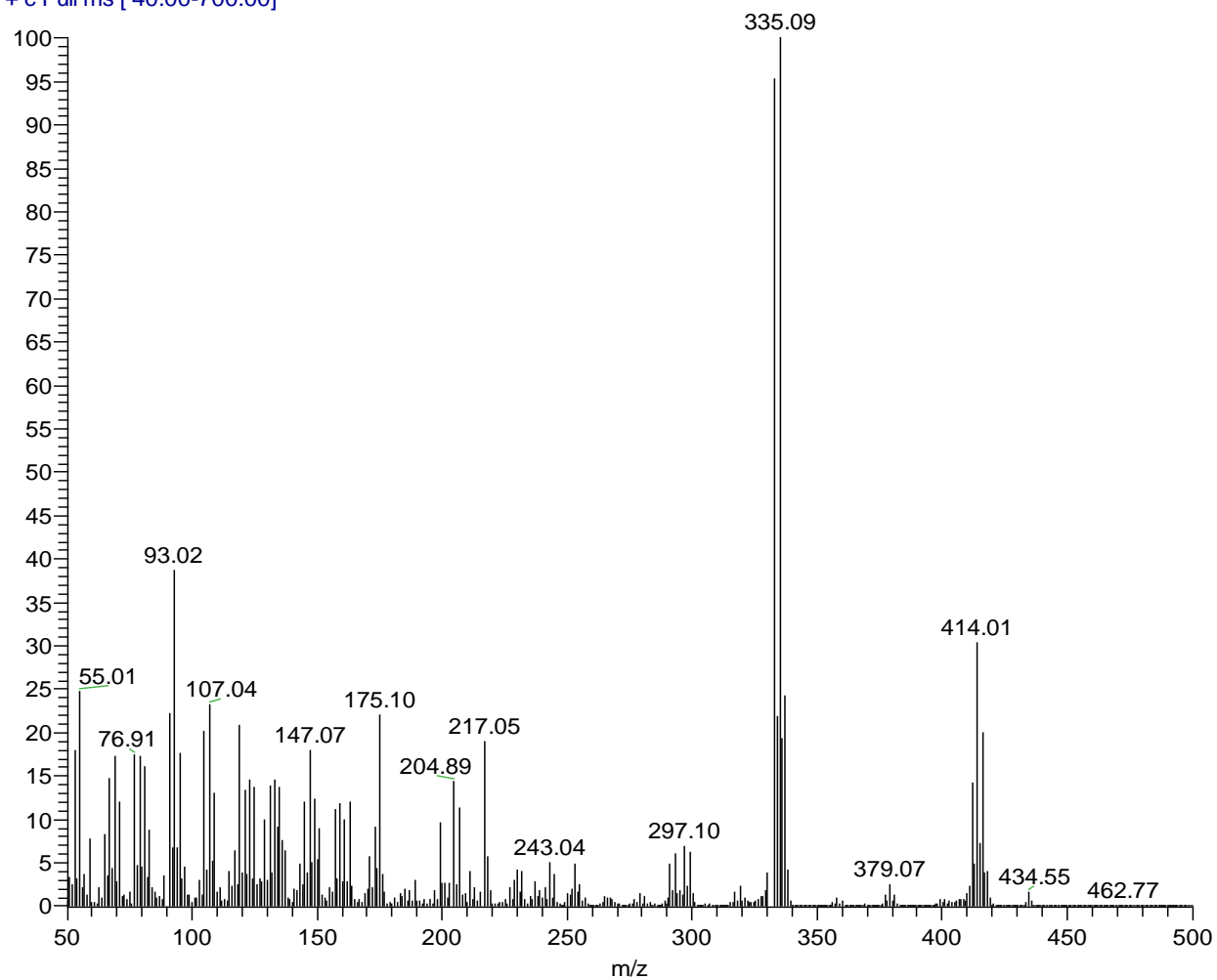


Figura 68: Espectro de massas por ionização eletrônica do composto 9 (LC19).

- Composto 10:

O composto **10 (LC10)** (2,0 mg) foi isolado como um líquido incolor e inodoro após purificação em CLAE de uma fração obtida durante o processo de fracionamento (**Figura 1**). O espectro de massas apresentou os picos de maior massas em m/z 470/472/474/476 com um padrão de intensidades relativas semelhante ao composto **1**, sugerindo a presença de dois grupos bromos e um cloro na molécula. Observa-se fragmento correspondente em m/z 410/412/414/416 caracterizando a perda de acetila. O espectro de ^{13}C RMN e experimento HSQC-DEPT indicaram a presença de 17 carbonos sendo cinco quaternários, quatro metínicos, três metílenos e cinco metilas. Em relação a estes carbonos, cinco estão ligados a oxigênio ou halogênio em δ 53,7 (CH), 62,0 (CH), 69,9 (Cq), 73,9 (CH) e 75,5 (Cq), um é carbonílico em δ 169,8 (Cq) e dois são olefínicos em δ 102,4 (Cq) e 145,6 (Cq). Dessa forma, a fórmula molecular proposta é $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{Br}_2\text{ClO}_3$ (**Figura 69**). O espectro de massas de alta resolução (observado, calculado) confirmou a fórmula molecular proposta.

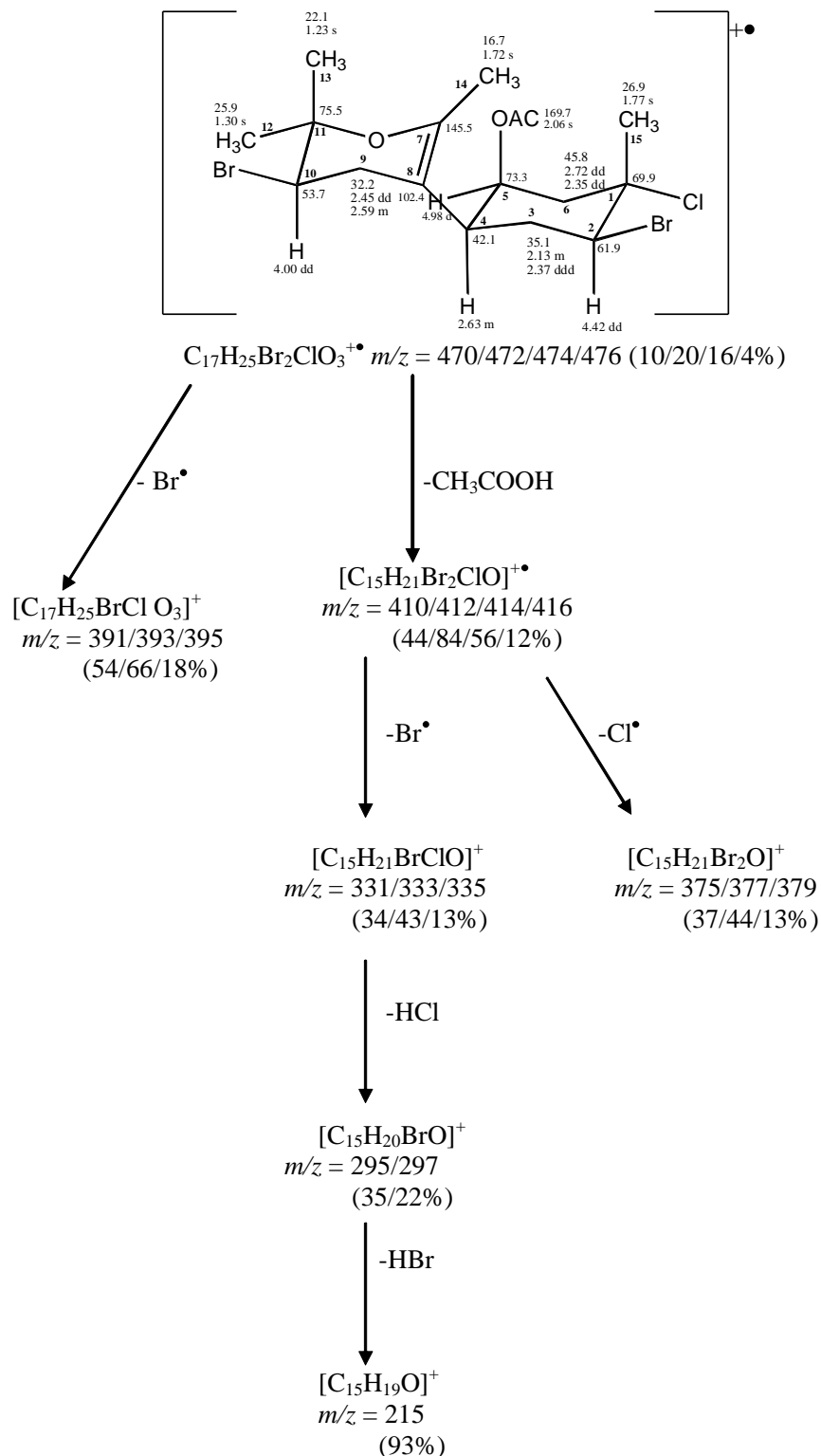


Figura 69: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização eletrônica do composto **10**.

O espectro de 1H RMN apresentou três sinais de hidrogênios desprotegidos, dois sinais de hidrogênios tipicamente ligados a carbonos halogenados em δ 4,42 (1H, dd, $J = 4,0; 12,8$ Hz) e 4,00 (1H, dd, $J = 5,9; 7,3$ Hz), adicionalmente um em δ 4,98 (1H, sl) e cinco metilas em δ 1,23, 1,30, 1,72, 1,77 e 2,06, esta última pertencente a acetila.

No anel B, a substituição no carbono em δ 73,4 pode ser deduzida a partir da presença do hidrogênio em δ 4,98 ressonando como singlete largo, o qual apresenta correlação COSY com os hidrogênios em δ 2,25 e 2,72 pertencentes ao carbono em δ 45,8 (**Figura 70**). A baixa constante de acoplamento do hidrogênio em δ 4,98, indica a posição equatorial para este hidrogênio, de forma semelhante ao composto **4**. Experimento de NOE diferencial mostrou que quando a metila em δ 1,72 há o aumento de intensidade para os hidrogênios em δ 2,63 e 4,98.

Já para o anel A, a posição do bromo é semelhante ao laucapiranóide A, ou seja, em posição equatorial com o hidrogênio em posição axial. A posição dos carbonos olefínicos foi atribuída de acordo com os dados fornecidos pelo experimento de HMBC, onde se observa correlações entre o carbono em δ 102,1 com os hidrogênios em δ 1,72 e entre o carbono em δ 145,6 com os hidrogênios em δ 1,72 e 2,45 (**Figura 70**). Experimentos de NOE diferencial mostraram que a irradiação do hidrogênio em δ 4,00 observa-se o aumento de intensidade para os hidrogênios em δ 2,59 e 2,48 e com a metila em δ 1,23.

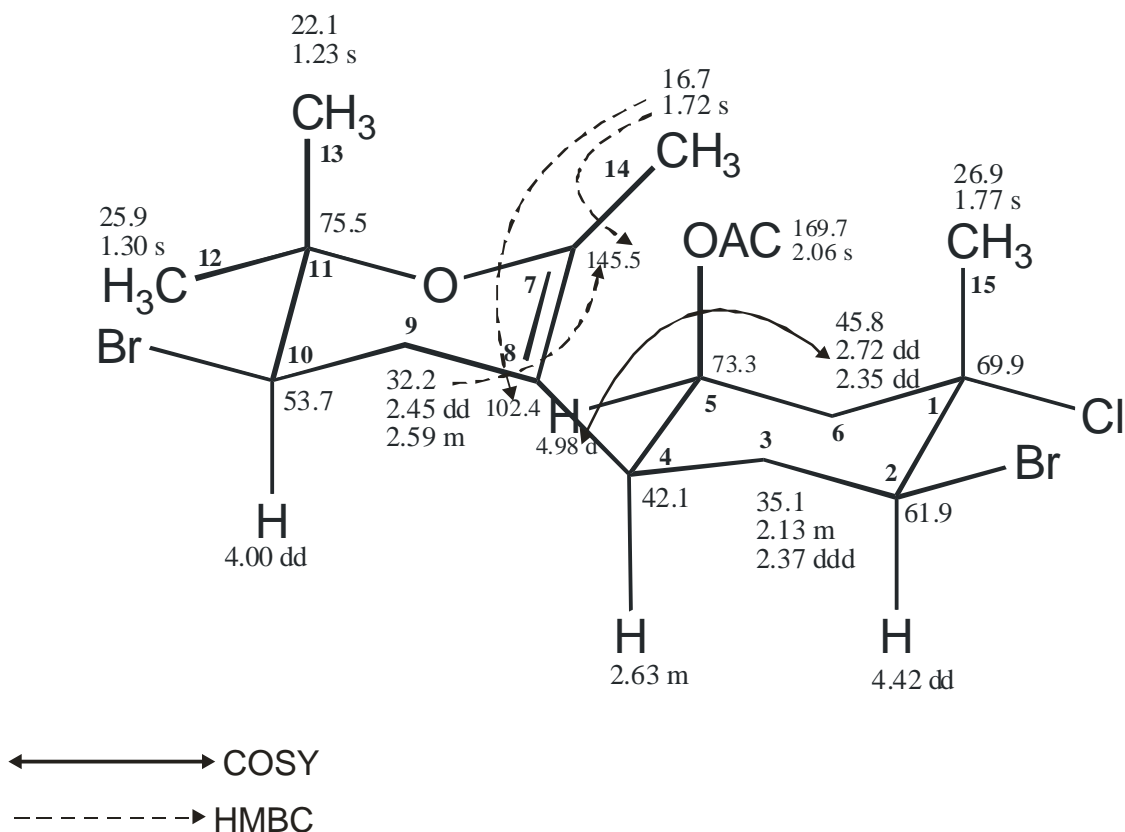


Figura 70: Estrutura do composto **10** com correlações ¹H-¹H COSY e HMBC.

Com base nos dados apresentados deduz-se se o composto **10** é o derivado 5- β -acetoxi do laucapiranóide A, descrito primeiramente para *Laurencia catarinensis*. A atividade ótica observada para este composto é $[\alpha]_D = + 27,0^\circ$ (0,047, CHCl₃).

Quadro 10: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 10 (400 e 50 MHz; CDCl_3 , H= 7,24 e C=77,0).

C	δ C (HSQC/HMBC)	δ H (J Hz)
1 C	69,9	-
2 CH	61,9	4,42 dd (12,8; 4,0)
3 CH ₂	35,1	2,37 ddd (12,8; 12,8;13,2) 2,13 m
4 CH	42,1	2,63 ddd (3,3; 3,3; 13,2)
5 CH	73,3	4,99 d (3,3)
6 CH ₂	45,8	2,72 dd (15,0; 2,9) 2,25 dd (15,0; 2,9)
7 C	145,5	-
8 C	102,4	-
9 CH ₂	32,2	2,59 m 2,45 dd (16,1; 7,3)
10 CH	53,7	4,00 dd (7,3; 5,9)
11 C	76,3	-
12 CH ₃	22,0	1,23 s
13 CH ₃	25,9	1,30 s
14 CH ₃	16,7	1,72 s
15 CH ₃	26,9	1,77 s
CO (OAc)	-	-
Me (OAc)	169,7	2,06 s

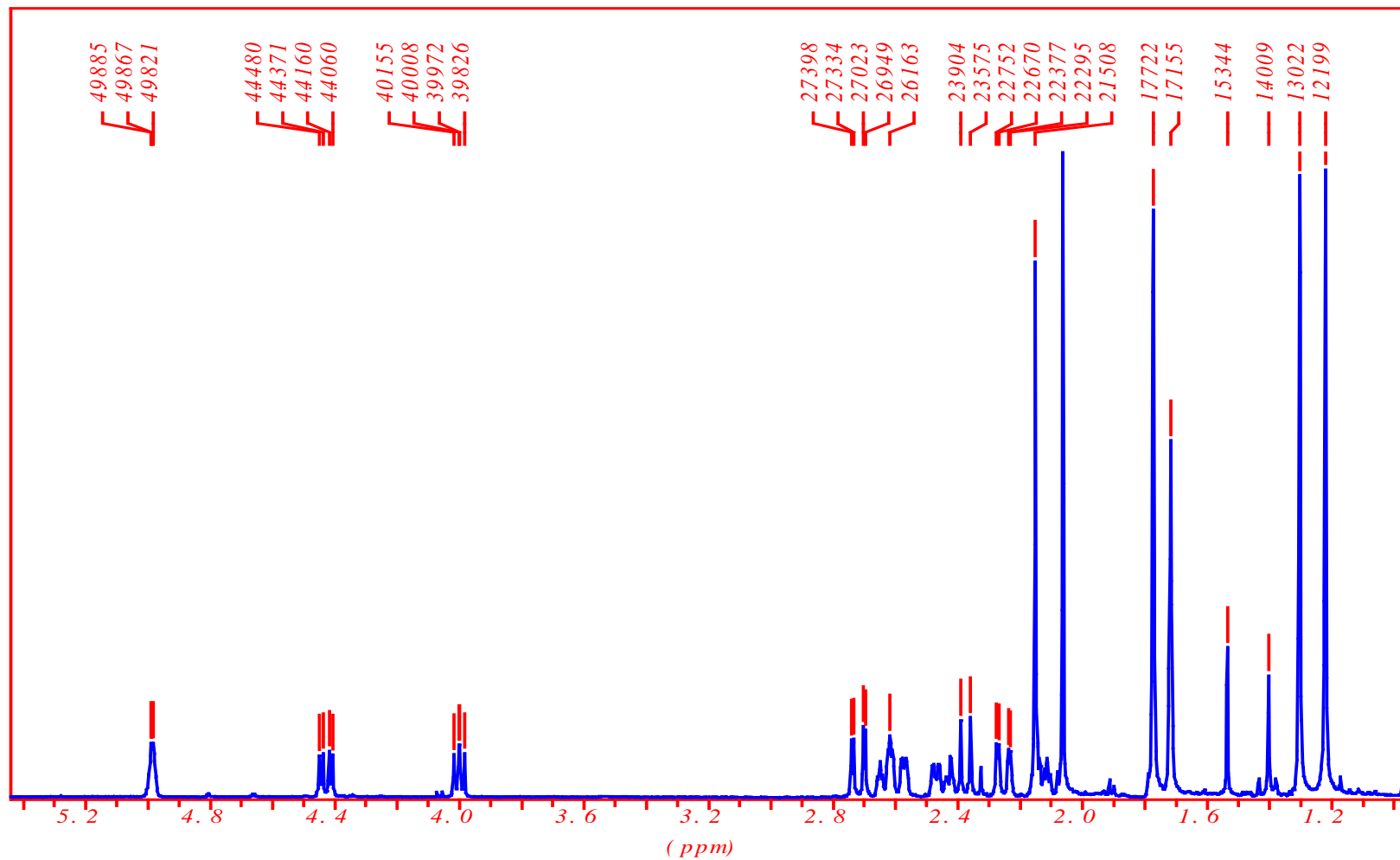


Figura 71: Espectro de ¹H RMN do composto 10 (LC10) em CDCl₃ (400 MHz).

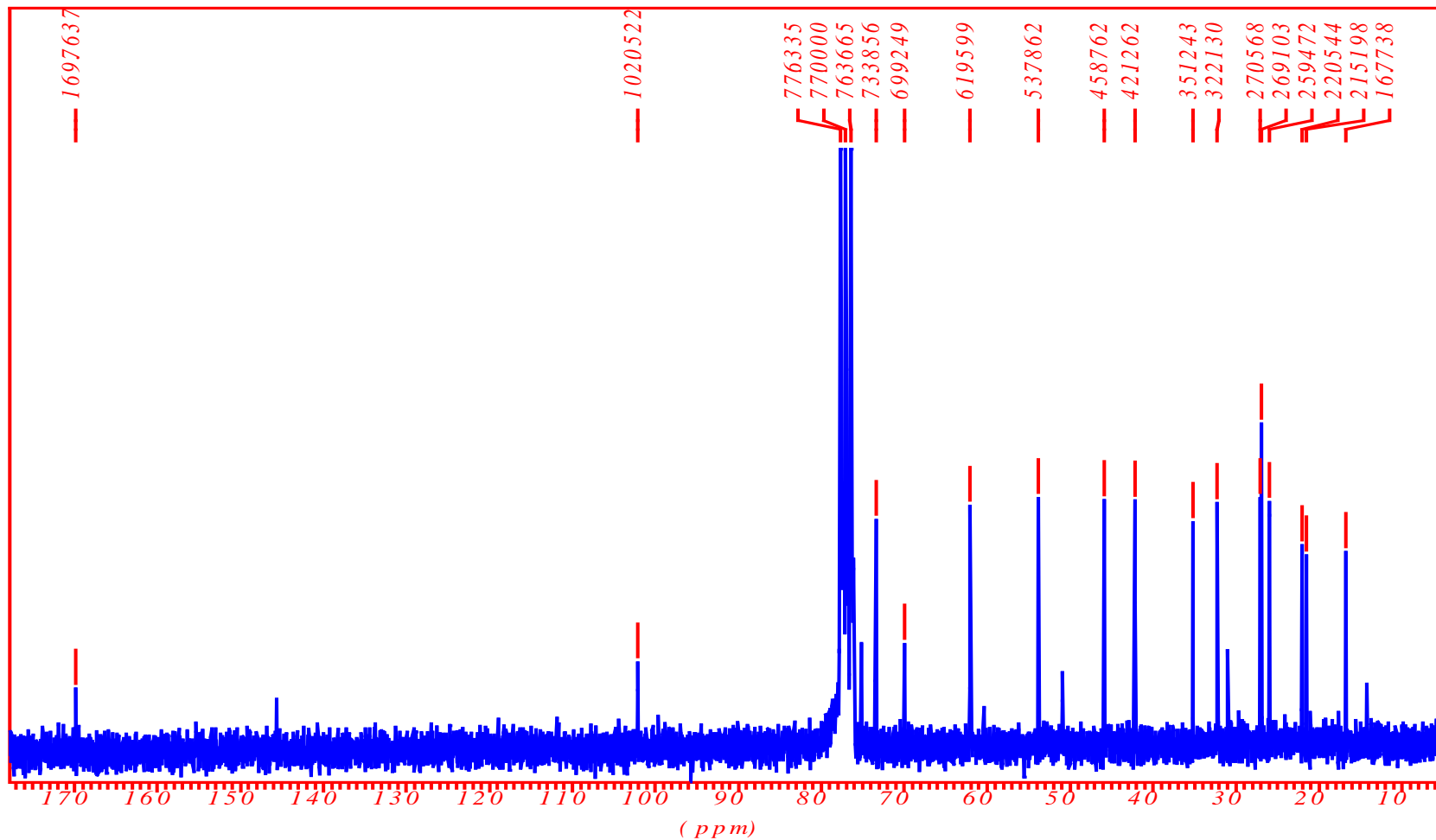


Figura 72: Espectro de ^{13}C RMN do composto 10 (LC10) em CDCl_3 (50 MHz).

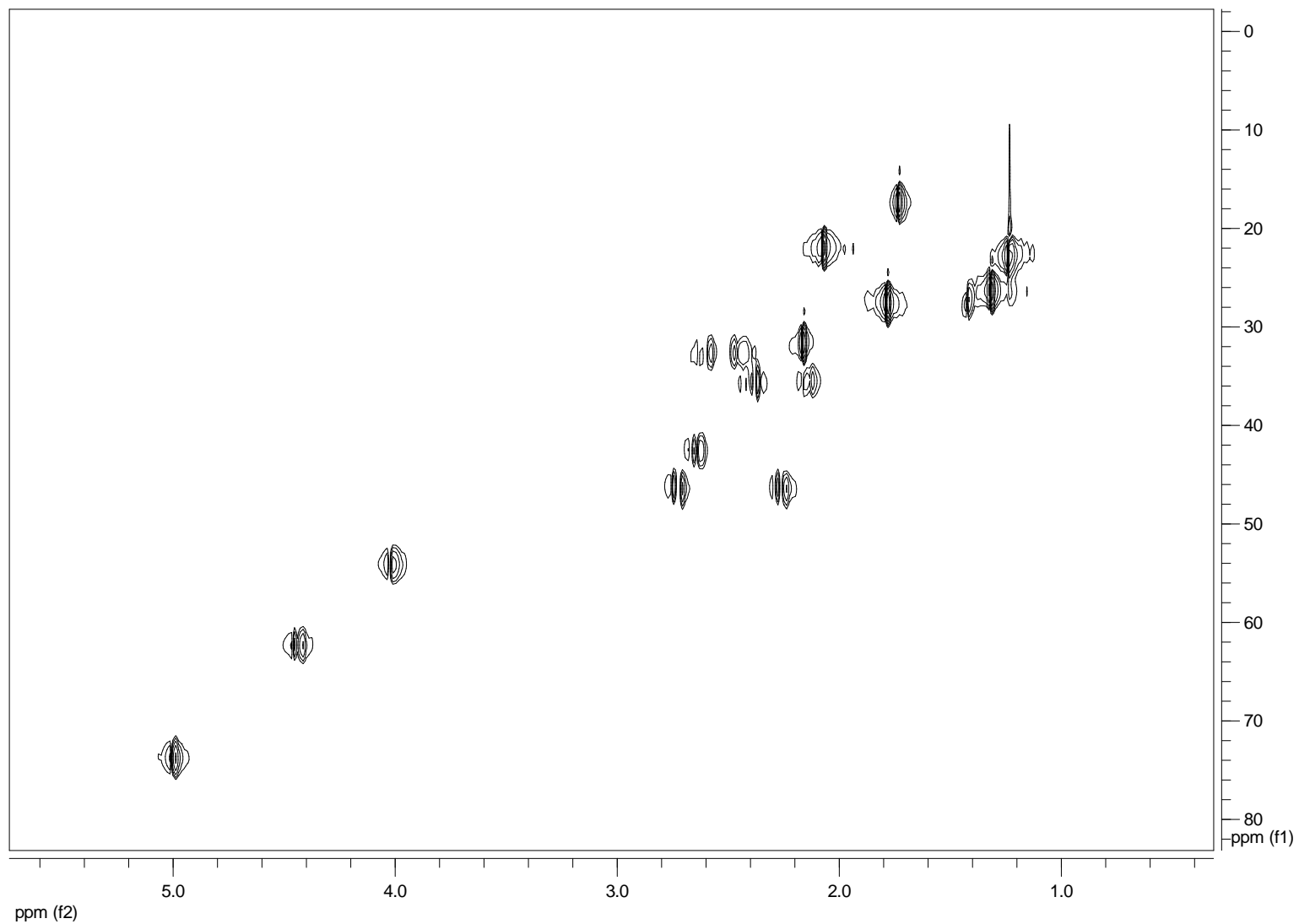


Figura 73: Espectro HSQC-HSQC-DEPT do composto 10 (LC10) em CDCl₃ (400 MHz).

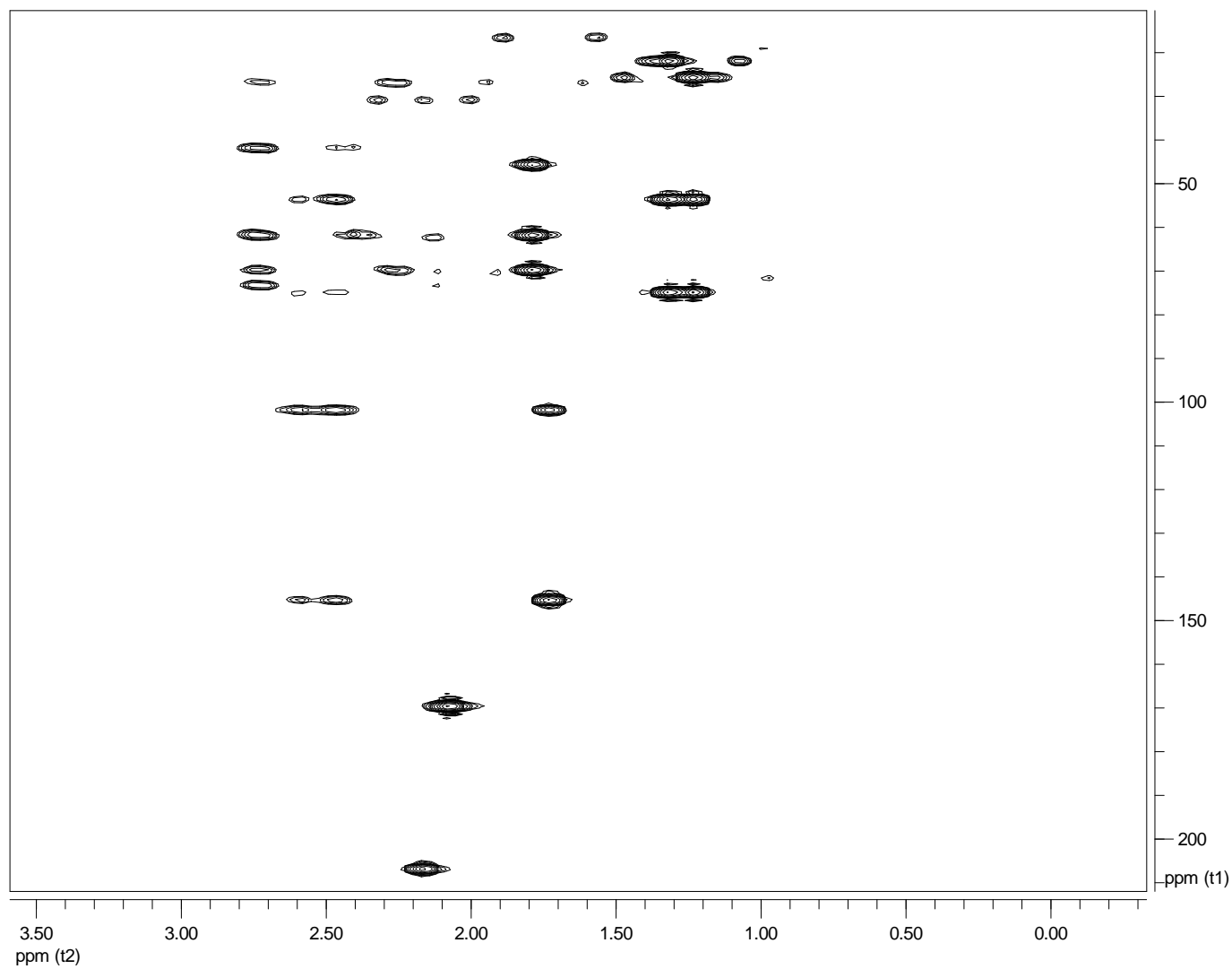


Figura 74: Espectro HMBC do composto 10 (LC10) em CDCl₃ (400 MHz).

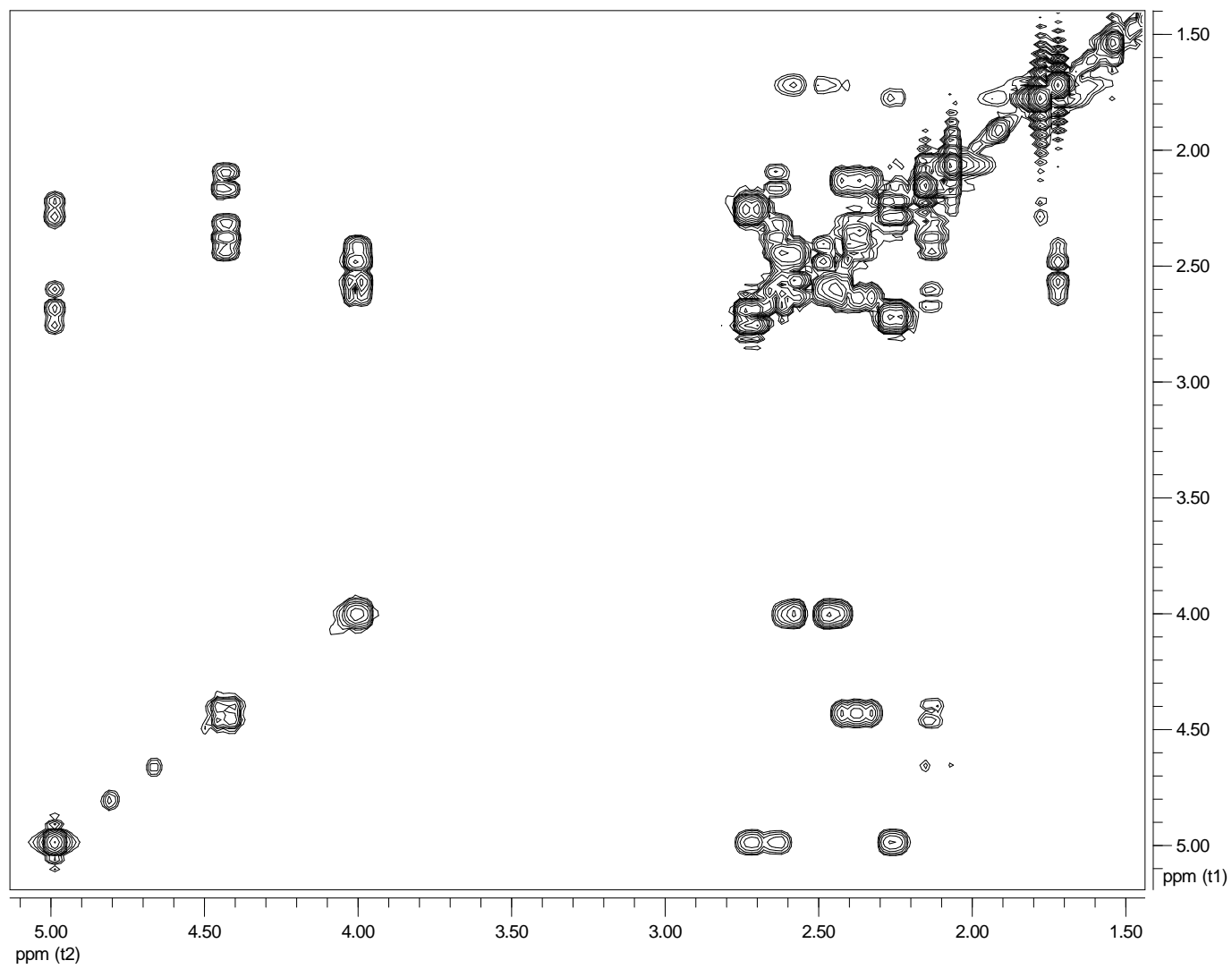


Figura 75: Espectro H-H COSY do composto 10 (LC10) em CDCl_3 (400 MHz).

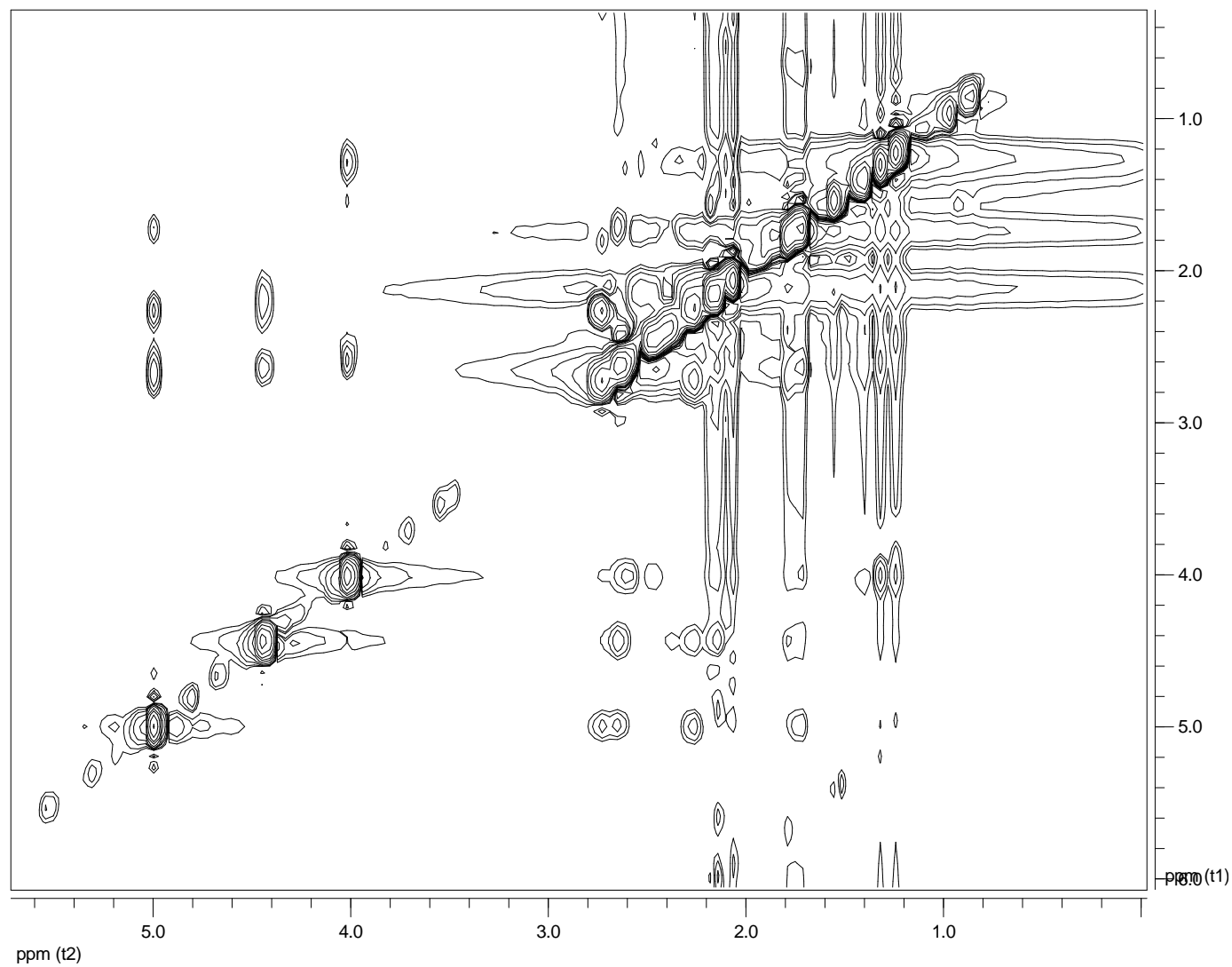


Figura 76: Espectro NOE do composto 10 (LC10) em CDCl_3 (400 MHz).

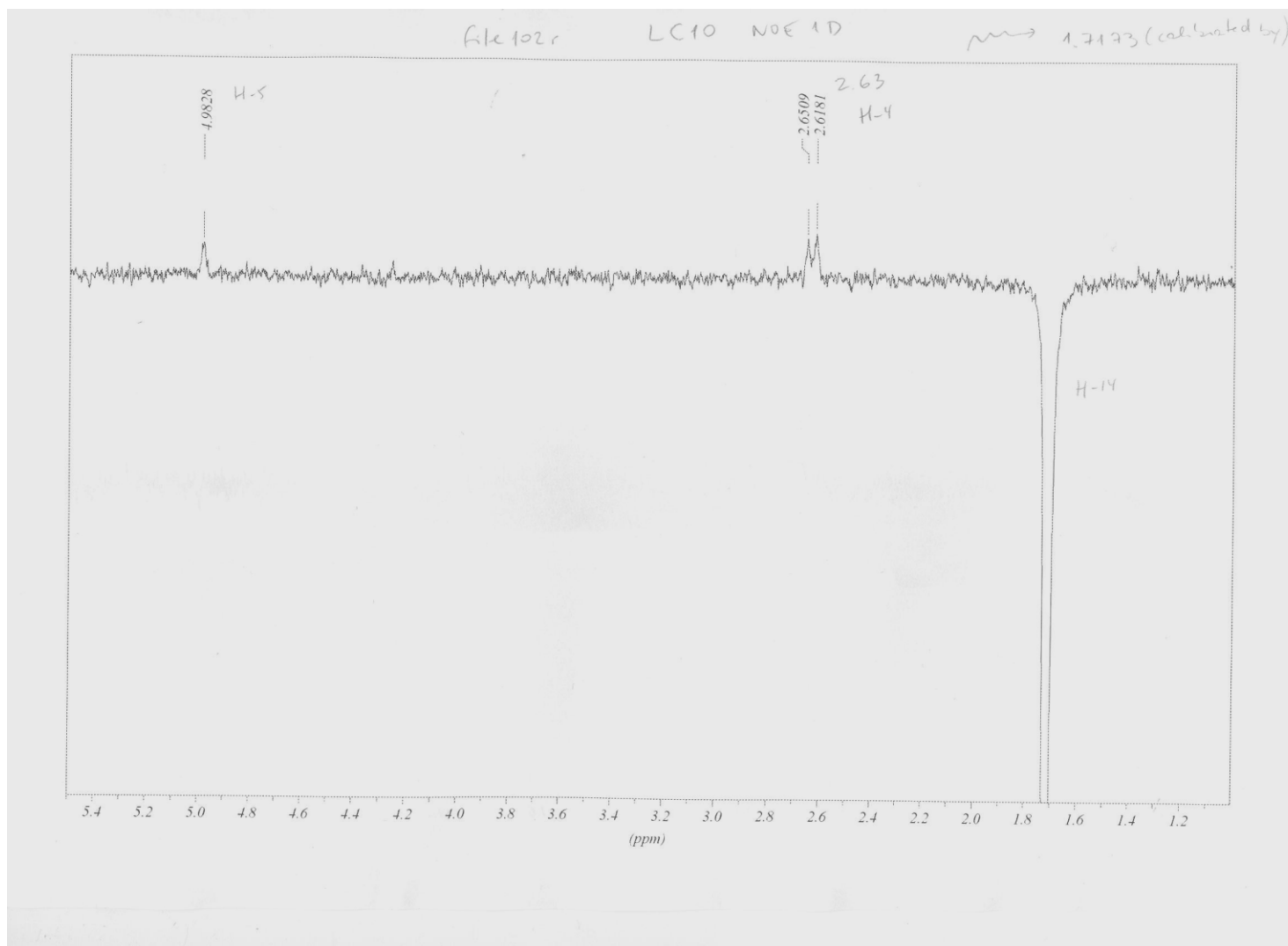


Figura 77: Espectro NOE diferencial do composto 10 (LC10) em CDCl_3 (400 MHz).

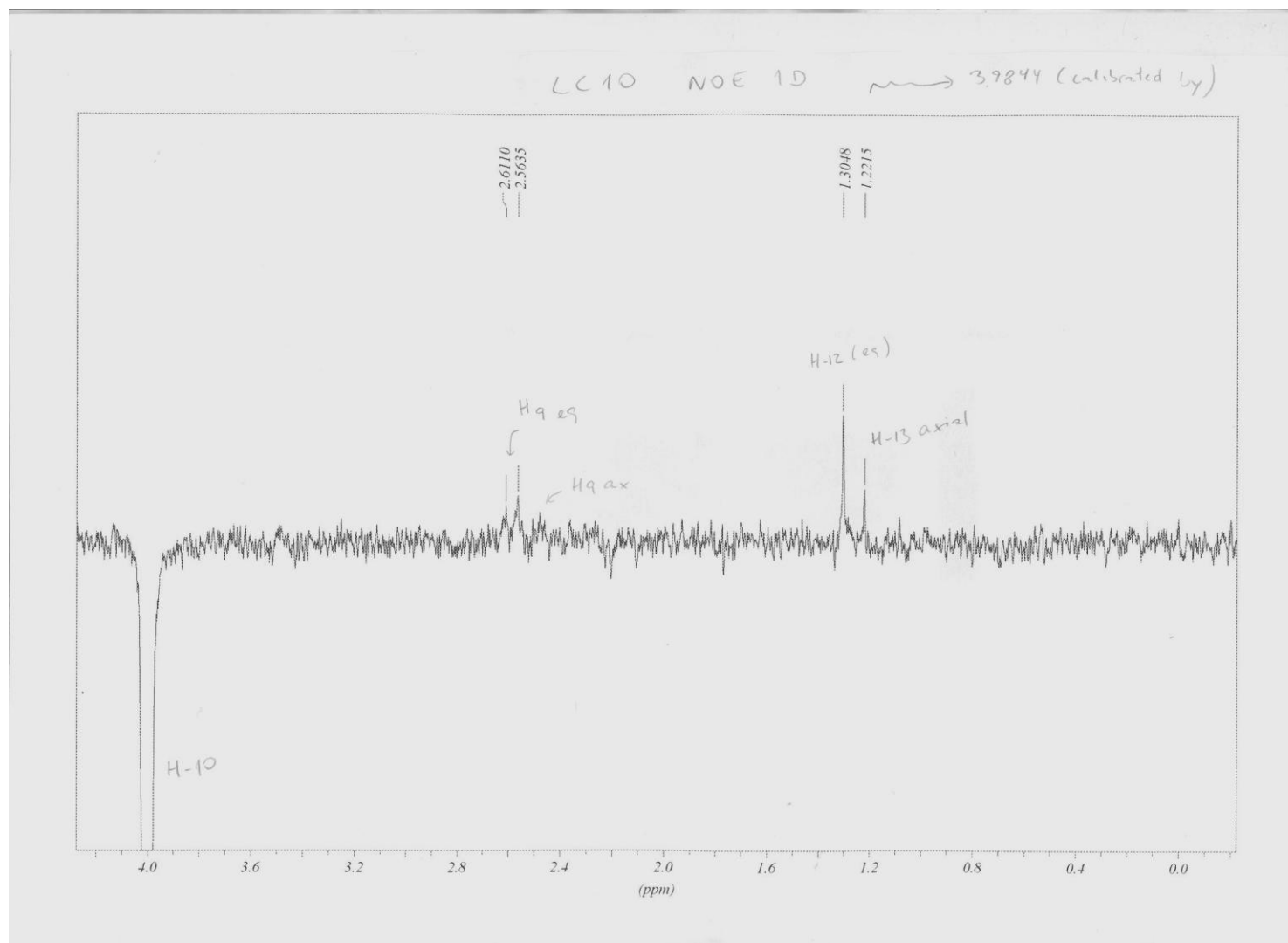


Figura 78: Espectro NOE diferencial do composto 10 (LC10) em CDCl_3 (400 MHz).

LC10 #32 RT: 0.74 AV: 1 NL: 1.10E7
T: + c Full ms [40.00-700.00]

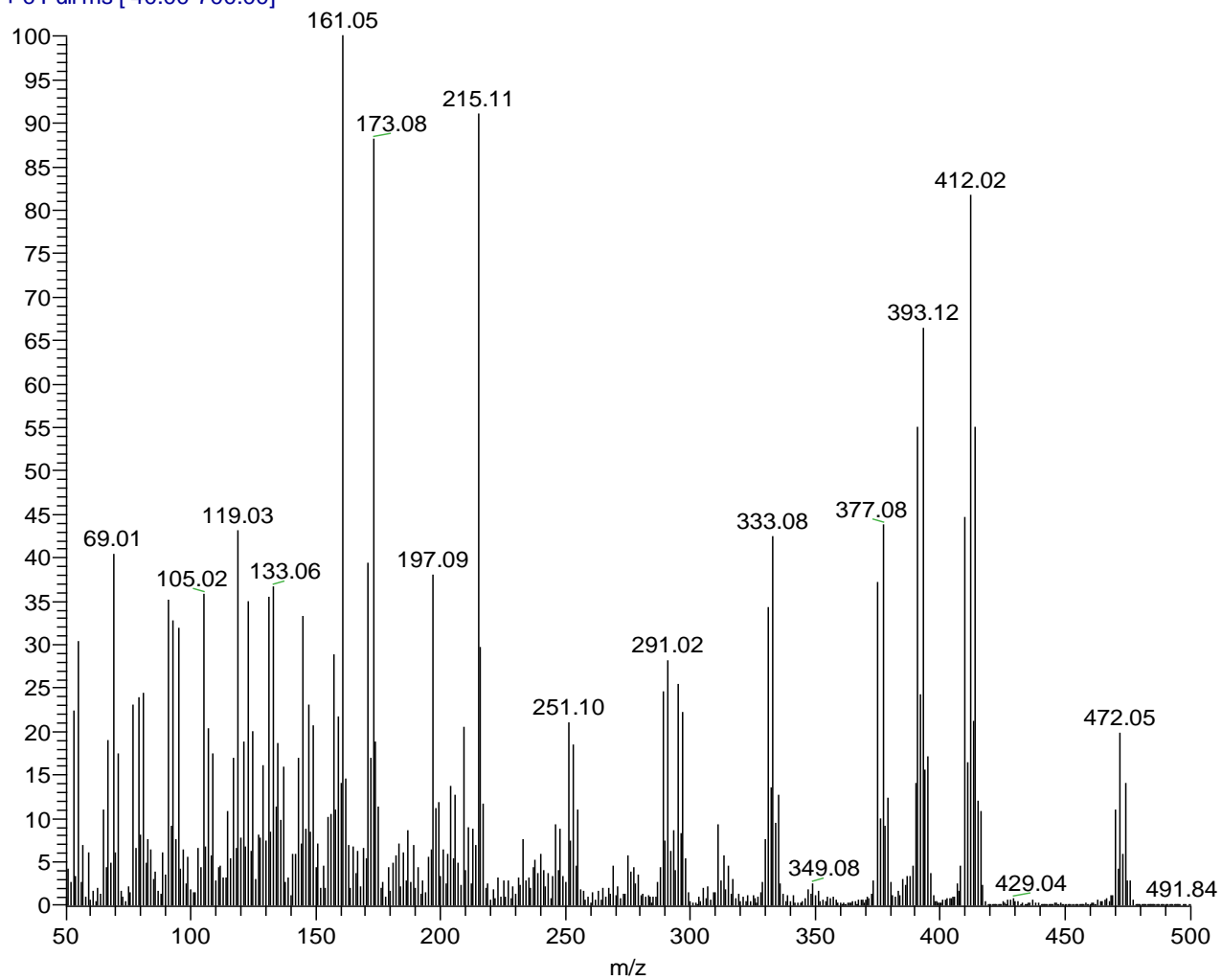
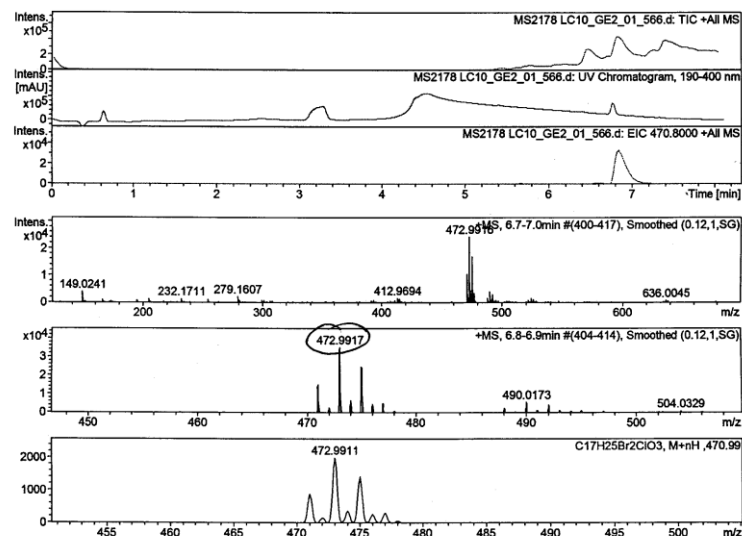


Figura 79: Espectro de massas por ionização eletrônica do composto 10 (LC10).

Mass Spectrometry & Proteomics Facility **Mass Spectrum SmartFormula Report**

Analysis Info
 Analysis Name D:\Data\061909\MS2178 LC10_GE2_01_566.d Acquisition Date 6/19/2009 3:29:34 PM
 Method lcms_h2ograd.m Operator Nonka Sevova
 Sample Name MS2178 LC10 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 10195
 Comment

Acquisition Parameter
 Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 3.0 Bar
 Focus Not active Set Capillary 4500 V Set Dry Heater 200 °C
 Scan Begin 50 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Dry Gas 4.0 l/min
 Scan End 3000 m/z Set Collision Cell RF 150.0 Vpp Set Divert Valve Source



Meas. m/z	#	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf
472.9917	1	C 17 H 26 Br 2 Cl O 3	470.9932	-1.4	-0.7	3.5	ok	even

472.9917 [M+H]⁺, calcd for C₁₇H₂₆⁷⁹Br⁸¹BrCl₂O₃ 472.9917

Figura 80: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 10 (LC10).

- Composto 11:

O composto **11** (**LC20**) (8,8 mg) foi isolado como um líquido incolor e inodoro após purificação em CLAE de uma fração obtida durante o processo de fracionamento (**Figura 1**). O espectro de infravermelho u a presença de uma carbonila em 1682 cm^{-1} , sugerindo tratar-se de uma carbonila α,β -insaturada. Os experimentos HSQC-DEPT e HMBC indicaram a presença de 15 carbonos, sendo quatro quaternários, quatro metínicos, três metilenos e quatro metilas. Em relação a estes carbonos, quatro estão ligados a oxigênio ou halogênio em δ 64,6 (CH), 71,5 (Cq), 71,7 (Cq) e 80,6 (Cq), um é carbonílico em δ 198,3 (Cq) e dois são olefínicos em δ 122,8 (CH) e 155,5 (CH). Dessa forma, a fórmula molecular proposta é $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{BrClO}_2$, em que o íon molecular esperado em m/z 346/348/350 não foi detectado.

O espectro de ^1H RMN apresentou um sinal de hidrogênio ligado a carbono halogenado em δ 4,33 (1H, dd, $J = 4,4; 12,4$ Hz), ausência de hidrogênio carbinólico e quatro metilas quaternárias em δ 1,32, 1,37, 1,40 e 1,65. No anel B, a estrutura é semelhante ao caespitol, em vista das constantes de acoplamento mostradas no quadro **11**. Já para o anel A, a posição dos carbonos olefínicos foi atribuída de acordo com os dados fornecidos pelo experimento de HMBC, onde se observam correlações entre o carbono em δ 71,5 com os hidrogênios em δ 5,89 e 6,82; e a carbonila foi alocada com base nas correlações do carbono δ 198,3 com os hidrogênios em δ 6,82 e 1,32 (**Figura 81**).

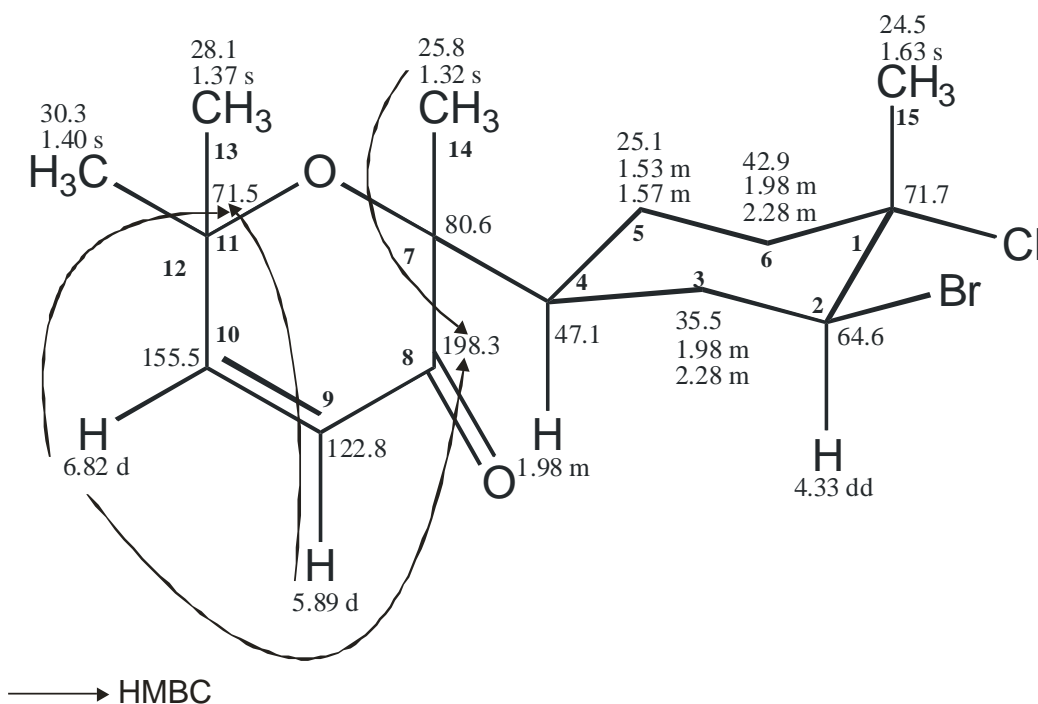


Figura 81: Estrutura do composto **11** com correlações HMBC.

Com base nos dados apresentados deduz-se se o composto **11** é um derivado do caespitol com uma acetona α,β insaturada, a **caespitenona**. Este composto foi primeiramente descrito para *Aplysia dactylomela* (Wessels et al., 2000).

Quadro 11: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 11 (400 MHz; CDCl_3 , H= 7,24 e C=77,0) em comparação com a literatura (Wessel et al., 2000, CDCl_3).

C	δH (J Hz)	δC (HSQC/HMBC)	δH (J Hz) Wessel et al., 2000	δC Wessel et al., 2000
1	-	71,7	-	71,6
2	4,33 dd (4,4; 12,4)	64,6	4,36 dd (4,6; 12,2)	63,6
3	2,28 m 1,98 m	35,5	2,30 m 2,02 m	34,6
4	1,98 m	47,1	2,02 m	46,3
5	1,57 m 1,53 m	25,1	1,58 m 1,40 m	24,0
6	1,98 m 2,28 m	42,9	2,30 m 2,02 m	42,2
7	-	80,6	-	80,7
8	-	198,3	-	198,5
9	5,8 d (10,6)	122,8	5,91 d (10,2)	122,6
10	6,82 d (10,6)	155,5	6,84 d (10,2)	155,1
11	-	71,5	-	71,5
12	1,40 s	30,3	1,43 s	30,5
13	1,37 s	28,1	1,37 s	28,8
14	1,32 s	25,8	1,34 s	24,9
15	1,65 s	24,5	1,68 s	23,8

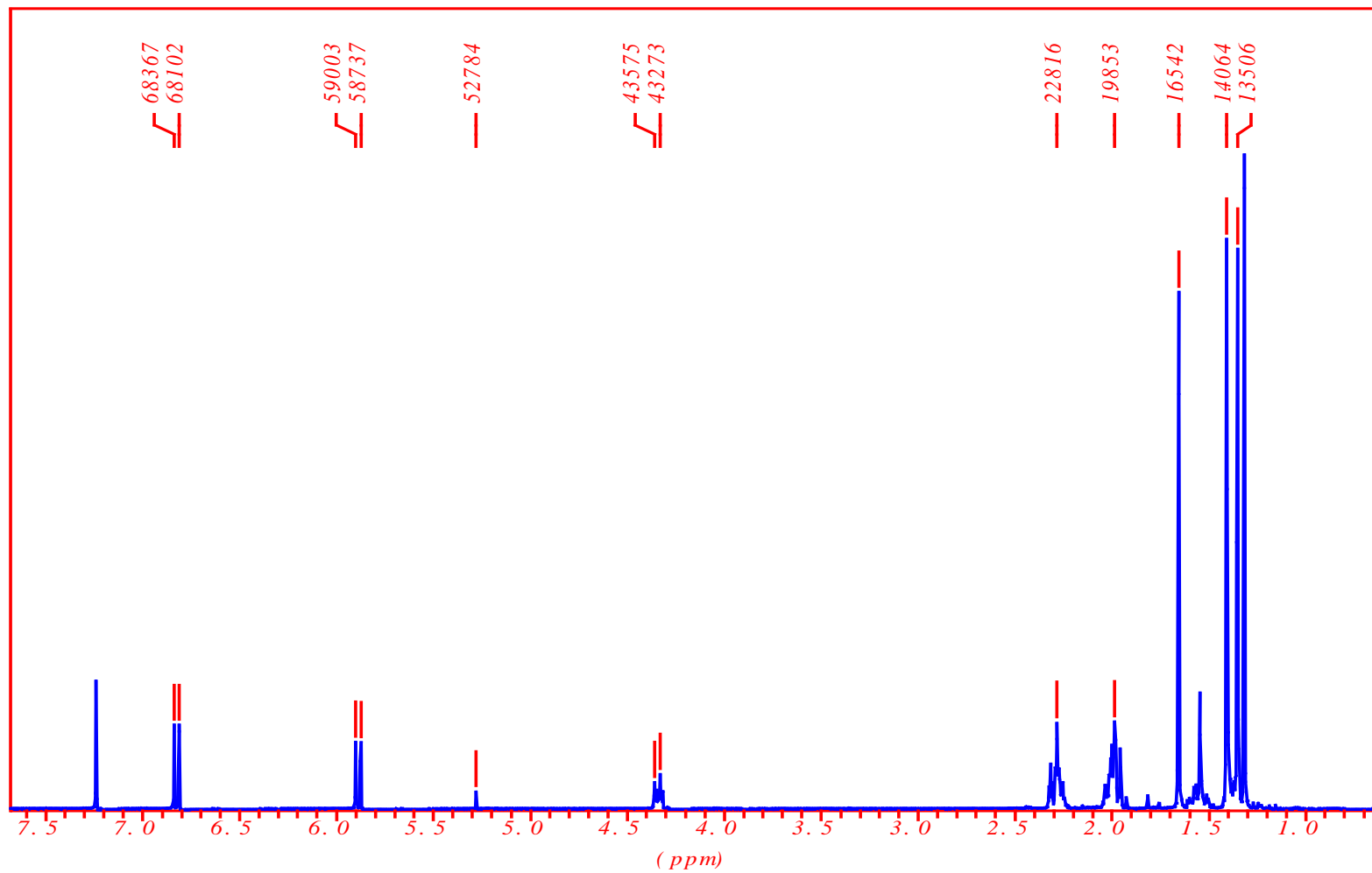


Figura 82: Espectro de ¹H RMN do composto11 (LC20) em CDCl₃ (400 MHz).

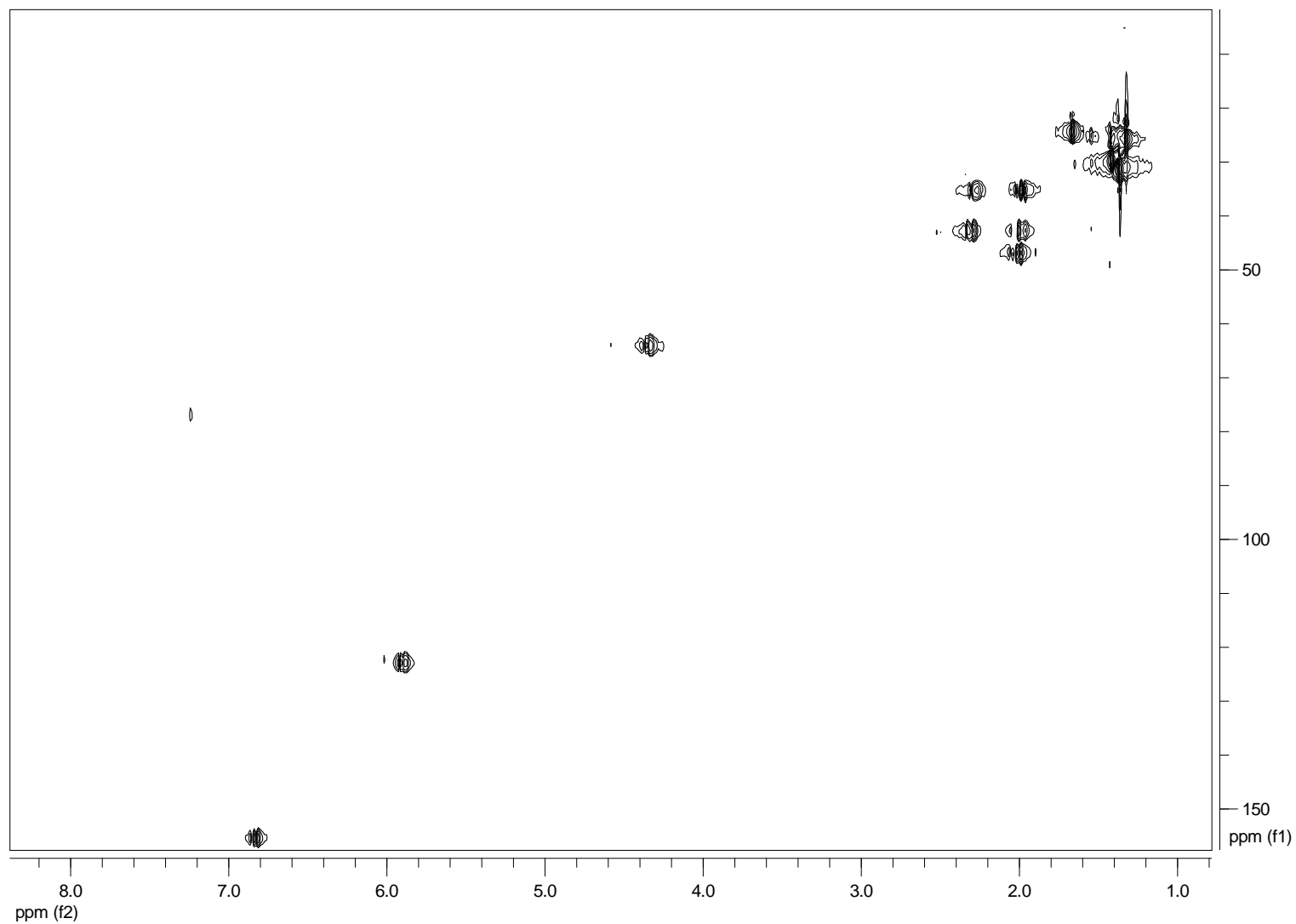


Figura 83: Espectro HSQC-DEPT do composto 11 (LC20) em CDCl₃ (400 MHz).

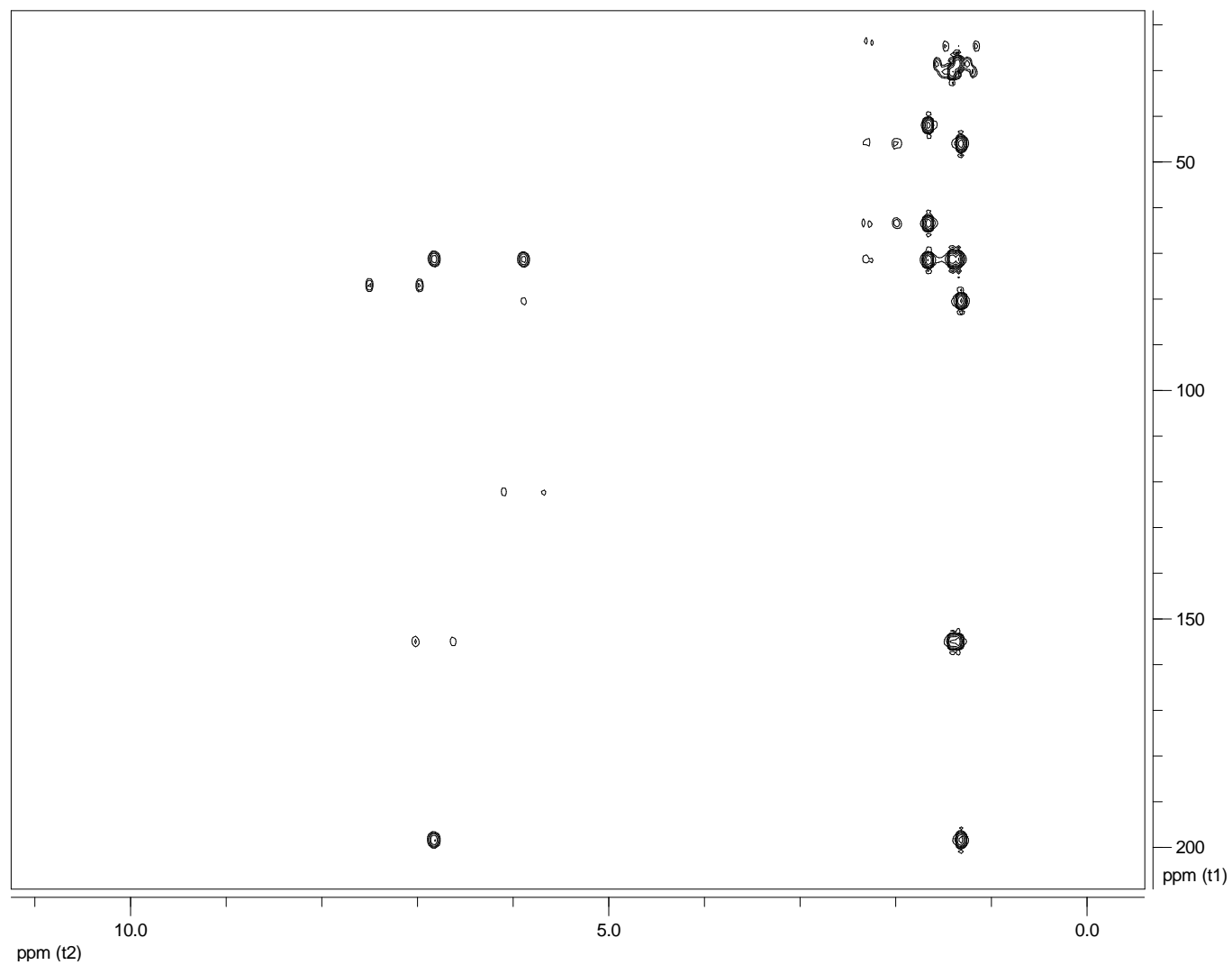


Figura 84: Espectro HMBC do composto11 (LC20) em CDCl_3 (400 MHz).

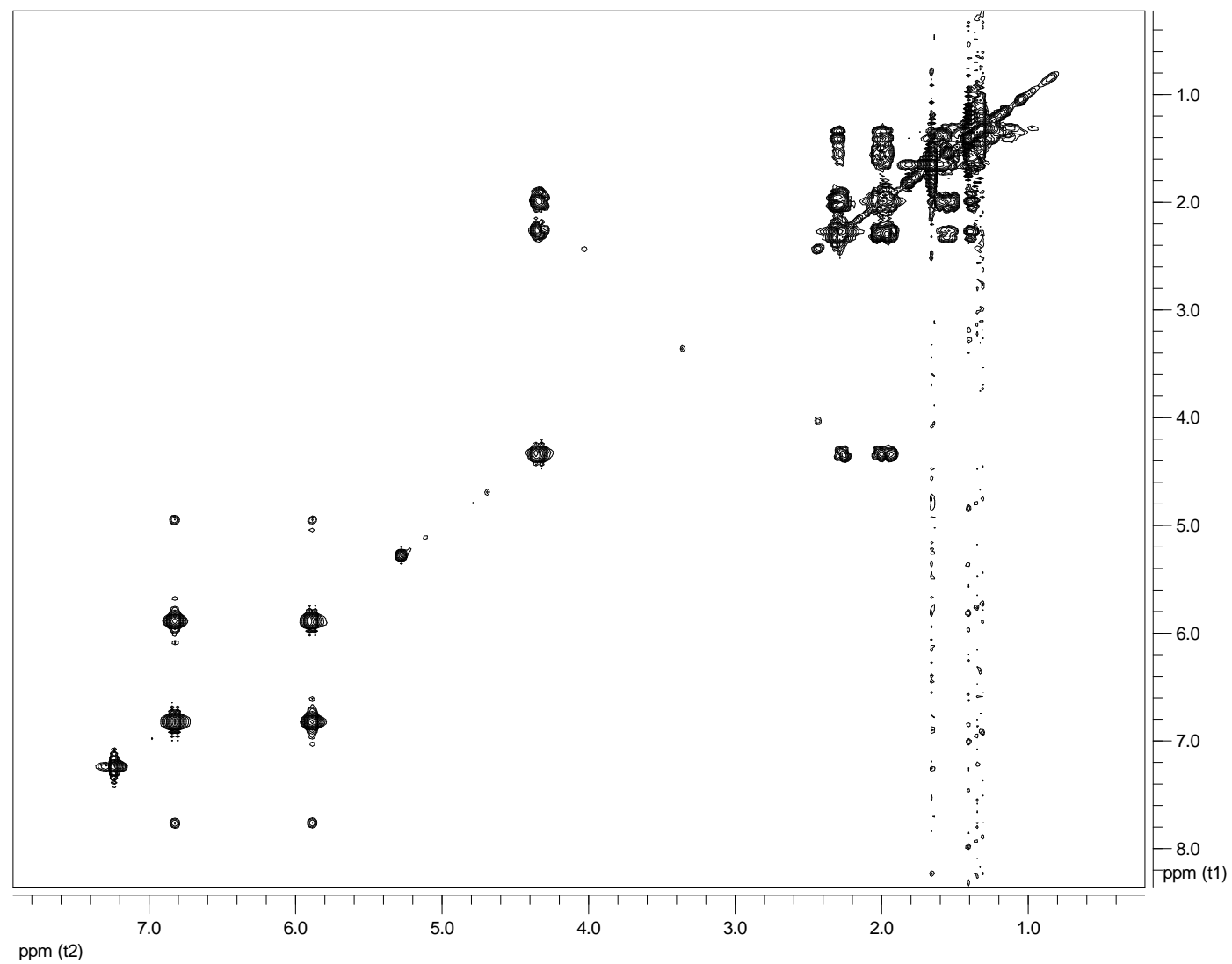


Figura 85: Espectro ¹H-¹H COSY do composto 11 (LC20) em CDCl₃ (400 MHz).

LC20 #22 RT: 0.72 AV: 1 NL: 1.66E8
T: + c Full ms [50.00-1000.00]

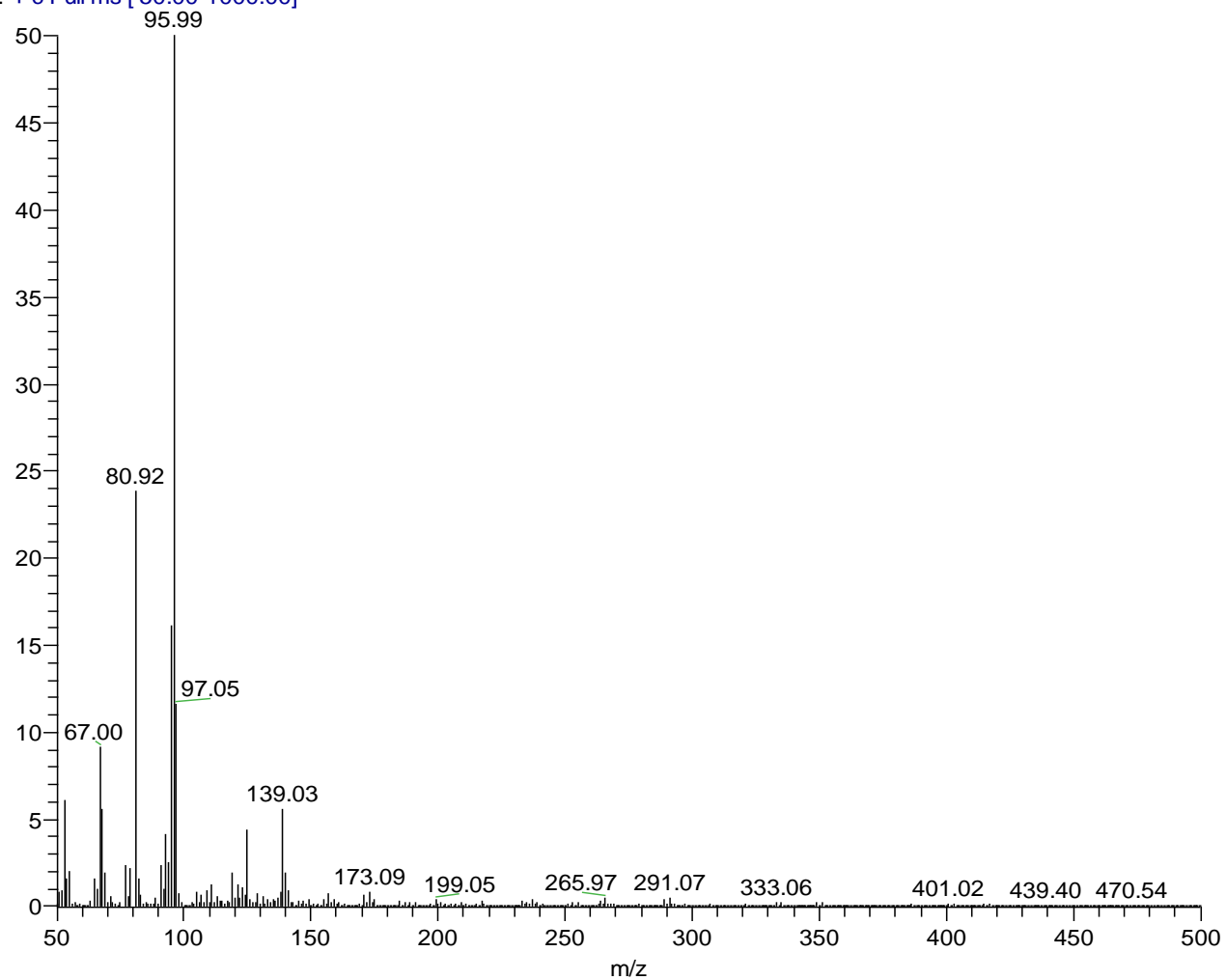


Figura 86: Espectro de massas por ionização eletrônica do composto 11 (LC20).

- Composto 12:

O composto **12 (LC27)** (10,3 mg) foi isolado como um pó cristalino após purificação em CLAE de uma fração obtida durante o processo de fracionamento (**Figura 1**). O espectro de infravermelho indicou a presença de um grupo lactona em 1766 cm^{-1} . O espectro de massas apresentou os picos de maiores massas em m/z 337/339/341, com padrão 3:4:1, sugerindo diferente dos compostos anteriores, a presença de um bromo e um cloro na molécula.

O espectro de ^{13}C RMN e experimento HSQC-DEPT indicaram a presença de 13 carbonos, sendo quatro quaternários, três metínicos, três metílenos e três metilas. Em relação a estes carbonos, um é carbonílico em δ 170,6 (Cq), quatro estão ligados a halogênio ou oxigênio em δ 51,0 (Cq), 60,5 (CH), 70,0 (Cq) e 109,0 (Cq), destacando-se o último como um carbono possivelmente acetálico. Dois são olefínicos em δ 169,0 (Cq) e 118,0 (Cq). Dessa forma, a fórmula molecular proposta é $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{BrClO}_3$ (**Figura 87**). O espectro de massas de alta resolução (observado e calculado) confirmou a fórmula molecular proposta.

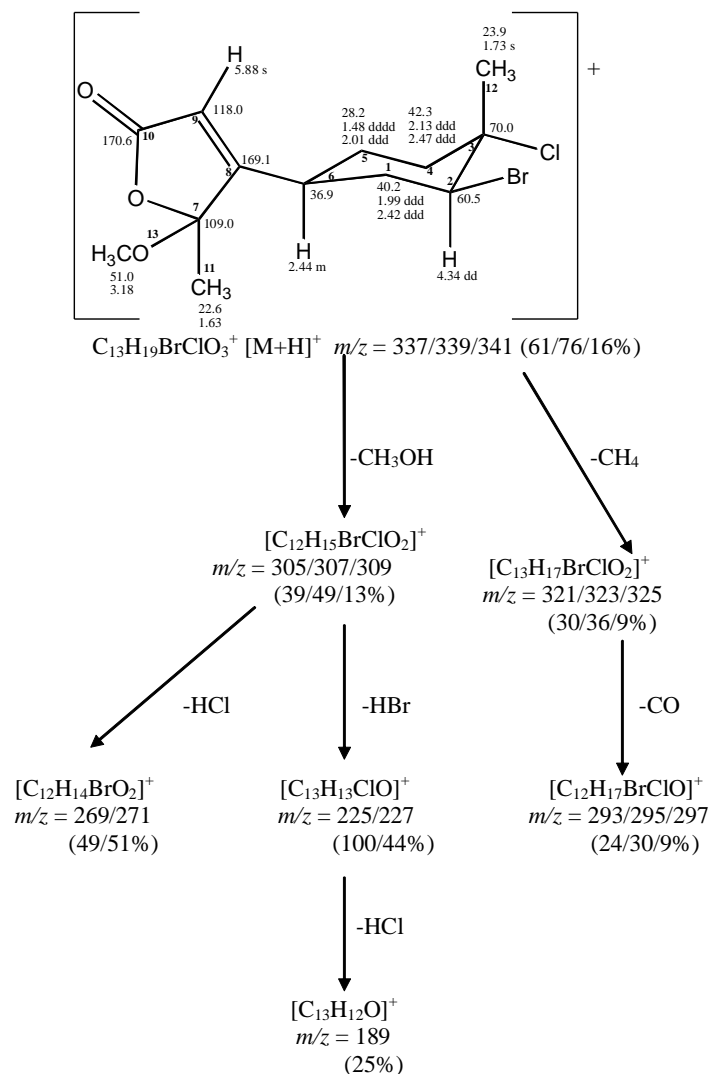


Figura 87: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização química do composto **12**.

O espectro de ^1H RMN apresentou um sinal de hidrogênio tipicamente ligado a carbono halogenado em δ 4,34 (1H, dd, $J = 3,8; 12,6$ Hz), um grupo metoxila em δ 3,18 (3H, s) e duas metilas em δ 1,63 e 1,73. Para o anel B, considerando-se os sinais do espectro de ^1H RMN em δ 4,34 e no espectro ^{13}C RMN em δ 60,5 e 70,0, podem-se propor os mesmos substituintes observados no caespitol.

Já para o anel A, a posição dos carbonos olefínicos foi atribuída de acordo com os dados fornecidos pelo experimento de HMBC onde se observam correlações entre os carbonos em δ 118,0 e 169,0 com o hidrogênio em δ 5,89; a posição da carbonila é atribuída com base nas correlações do carbono δ 170,6 com os hidrogênios em δ 3,18 e 1,63. A partir dos dados do experimento NOE diferencial, onde se observa um efeito NOE quando a metoxila em δ 3,18 é irradiada com a metila em δ 1,73, sugerindo a configuração relativa S^* para este carbono (Figura 88).

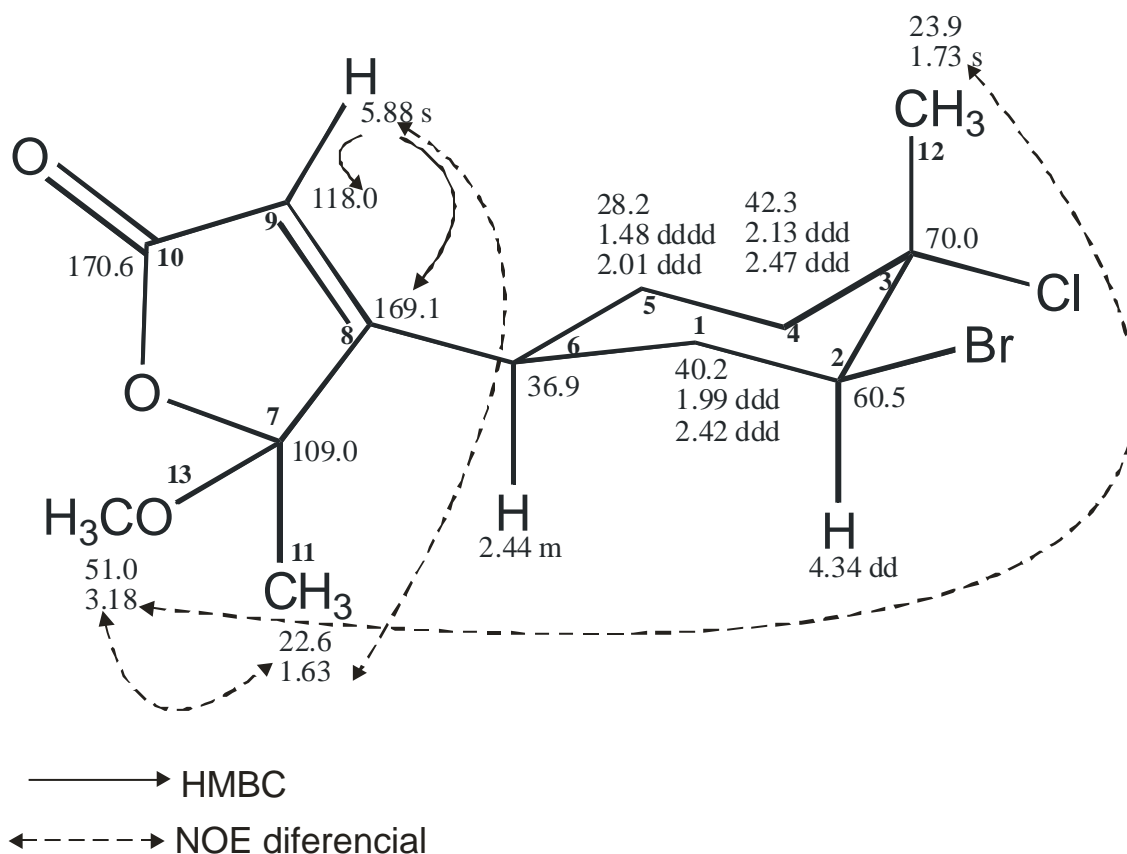


Figura 88: Estrutura do composto **12** com correlações HMBC e NOE diferencial.

Um composto de estrutura semelhante foi descrito para *Aplysia dactylomela*, tendo observado a epimerização no carbono 7. A diferenciação entre esses epímeros foi realizada com base nos espectros NOEs (Britto et al., 2006).

Com base nos dados apresentados e comparação com a literatura para o composto furocaespitanolactol (Britto et al. 2006) deduz-se que o composto **12** é (7*S**) O-

metilfurocaespitanolactol, descrito primeiramente para *Laurencia catarinensis*. A atividade ótica calculada é de $[\alpha]_D = +14,4^\circ (0,090, \text{CHCl}_3)$.

Quadro 12: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 12 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0).

C	δ C (HSQC/HMBC)	δ H (J Hz)
1 CH ₂	40,2	1,99 ddd (13,2; 12,8; 12,8) 2,42 ddd (14,3; 3,7; 7,0)
2 CH	60,5	4,34 dd (3,7; 12,6)
3 C	70,0	-
4 CH ₂	42,3	2,13 ddd (13,9; 3,7; 3,7) 2,47 ddd (13,9; 3,7; 3,7)
5 CH ₂	28,2	1,48 axial dddd (13,7; 13,6; 12,6; 3,3) 2,01 ddd (13,7; 2,9; 2,9)
6 CH	36,9	2,44 m
7 C	109,0	-
8 C	169,1	-
9 CH	118,0	5,88 s
10 C	170,6	-
11 CH ₃	22,6	1,63 s
12 CH ₃	23,9	1,73 s
13 OCH ₃	51,0	3,18 s

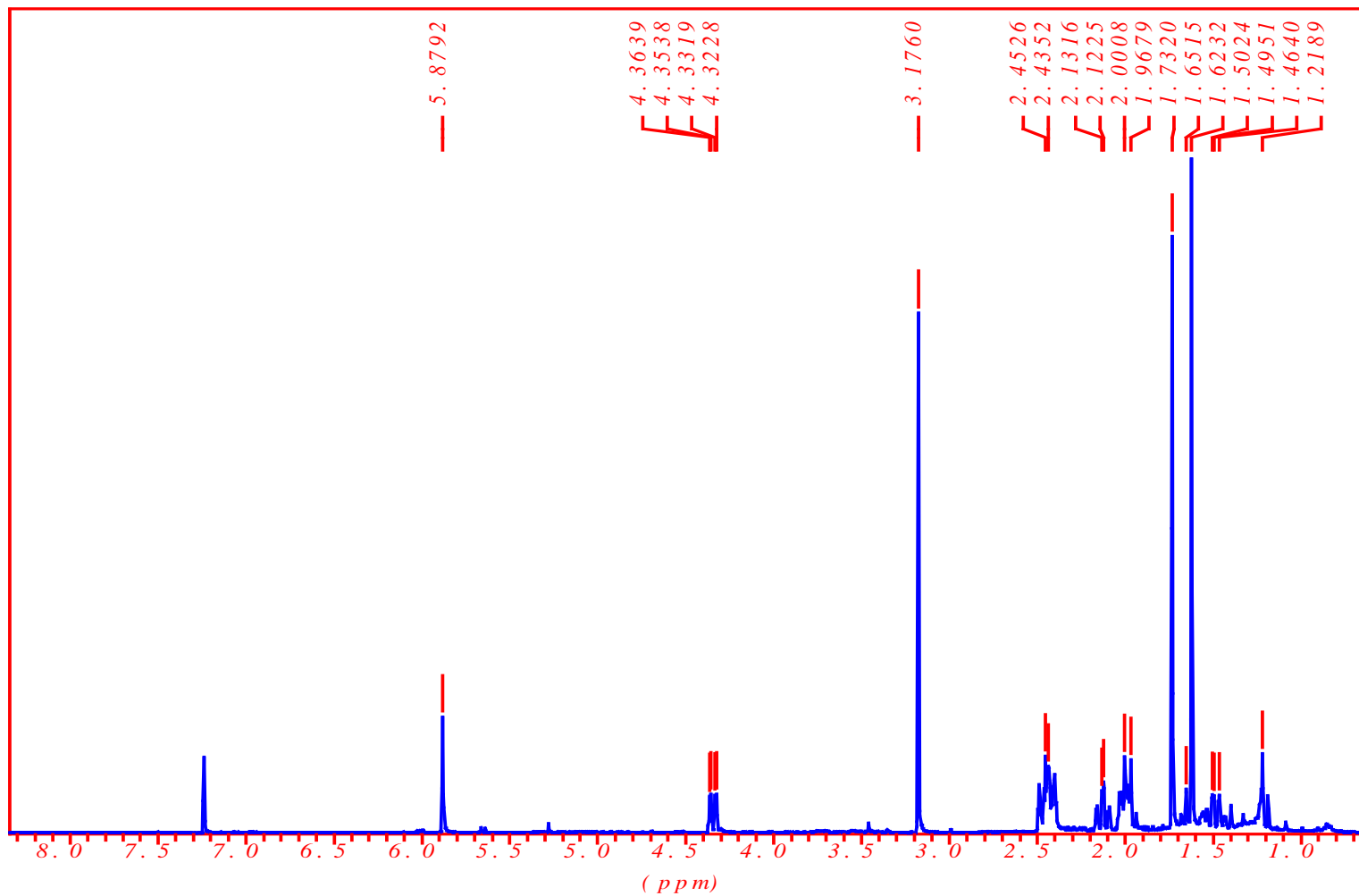


Figura 89: Espectro de ¹H RMN do composto 12 (LC27) em CDCl₃ (400 MHz).

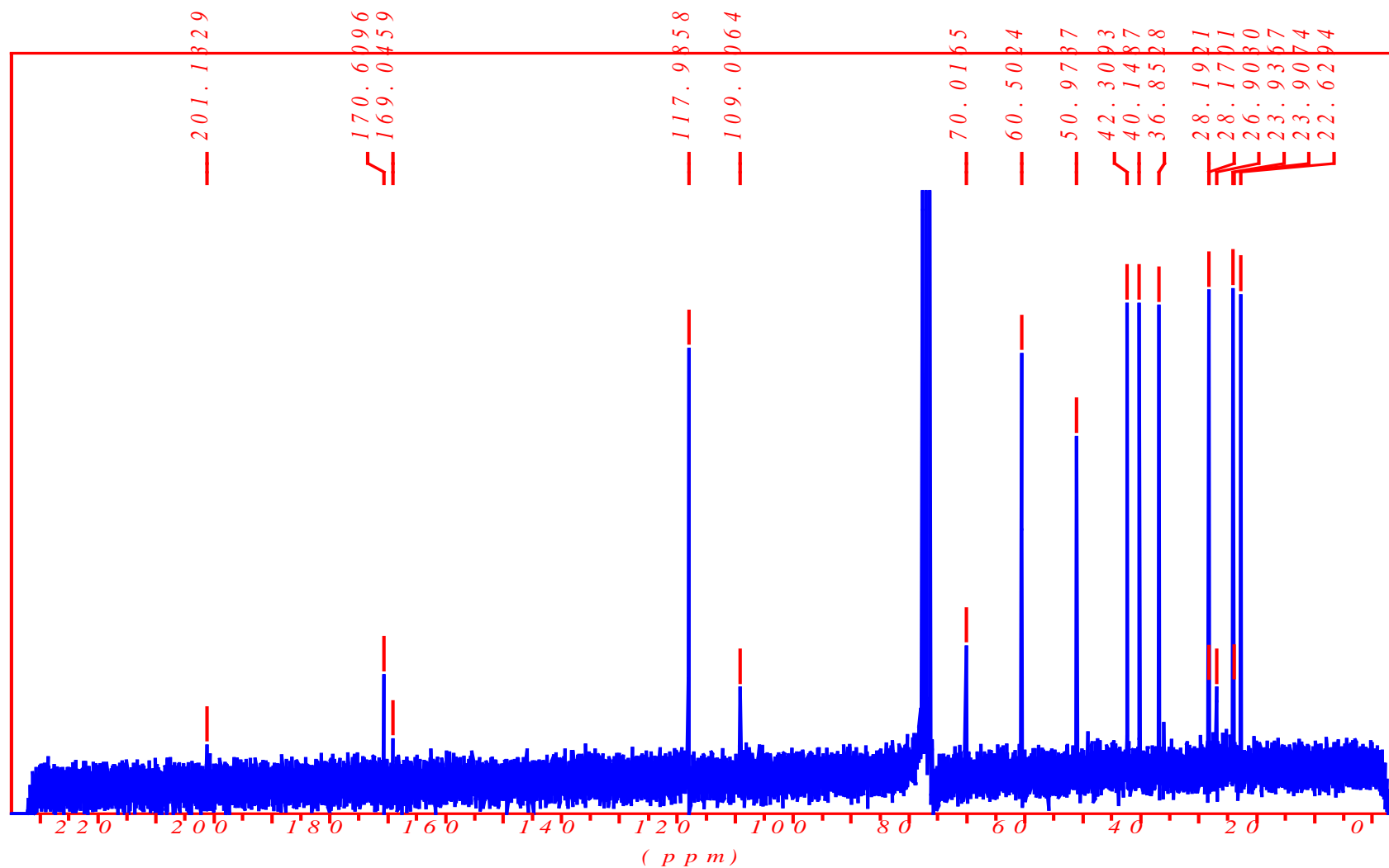


Figura 90: Espectro de ^{13}C RMN do composto 12 (LC27) em CDCl_3 (50 MHz).

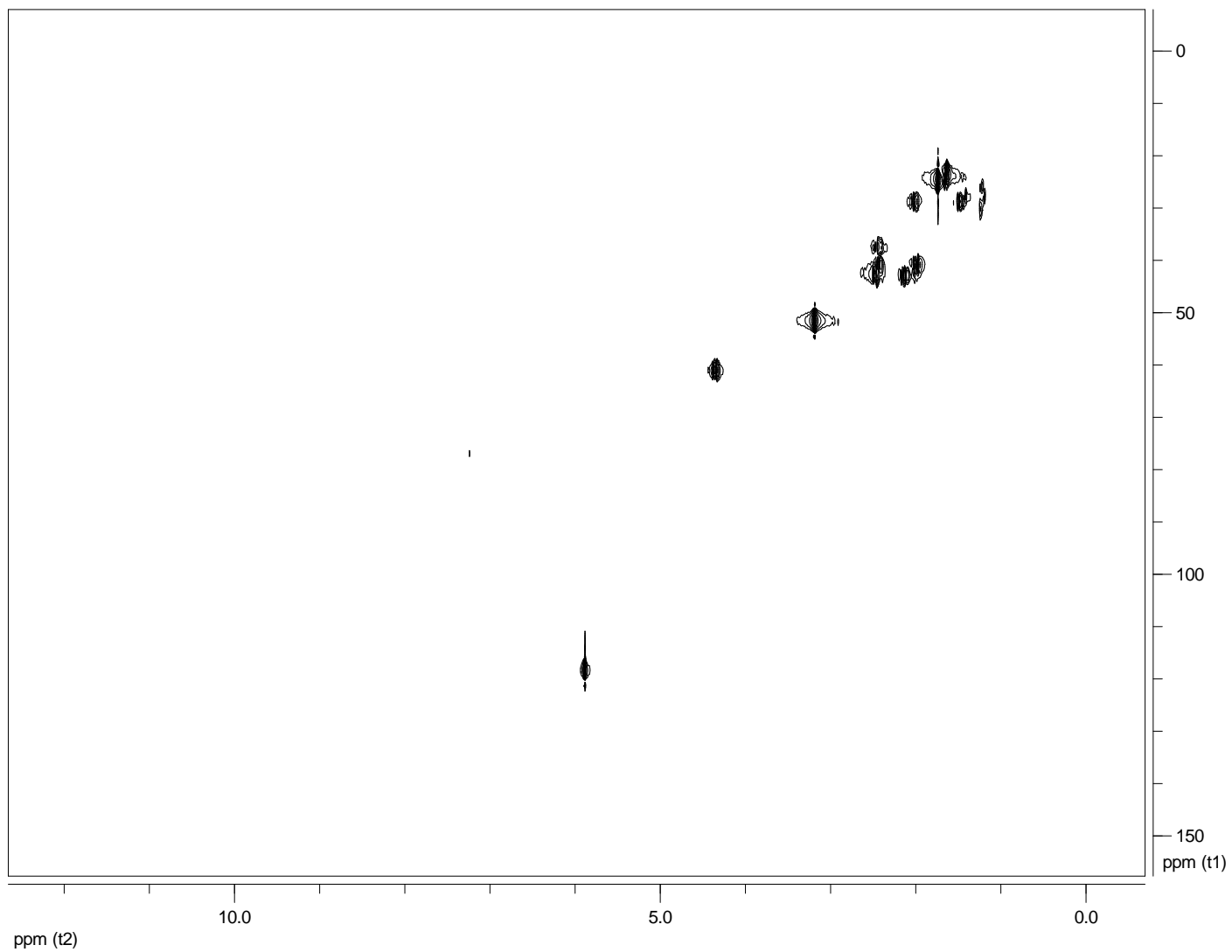


Figura 91: Espectro HSQC-HSQC-DEPT do composto 12 (LC27) em CDCl_3 (400 MHz).

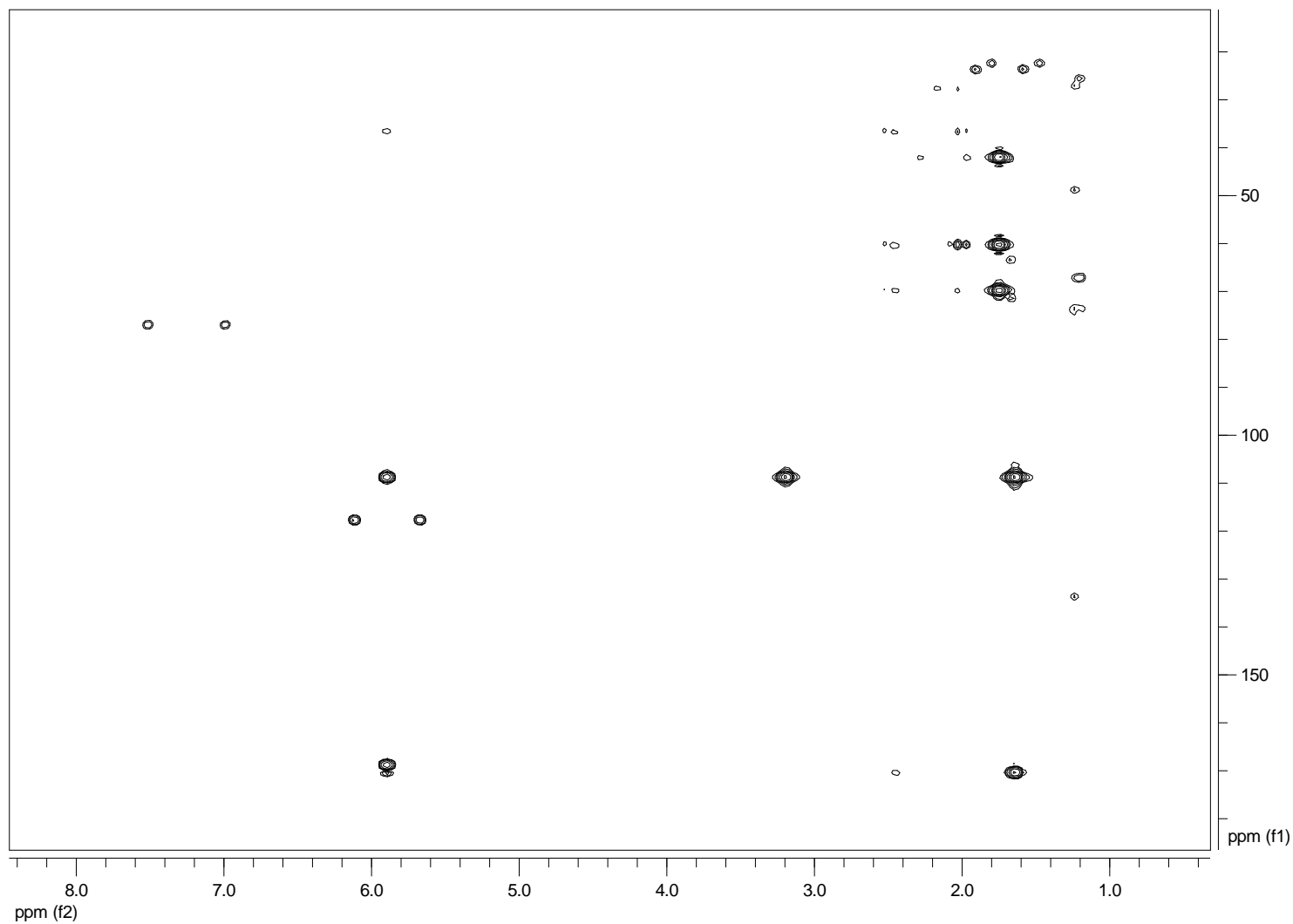


Figura 92: Espectro HMBC do composto 12 (LC27) em CDCl₃ (400 MHz).

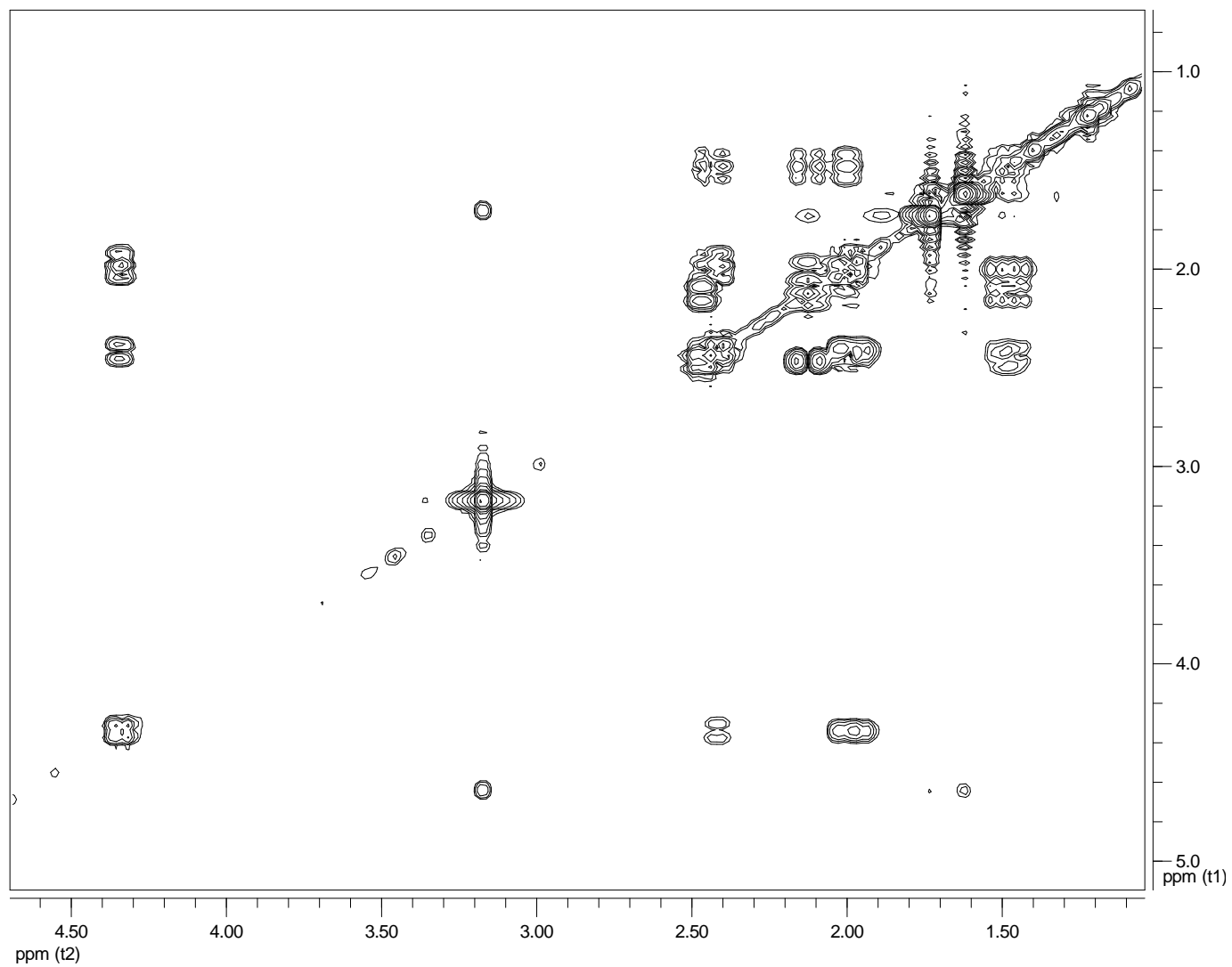


Figura 93: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 12 (LC27) em CDCl_3 (400 MHz).

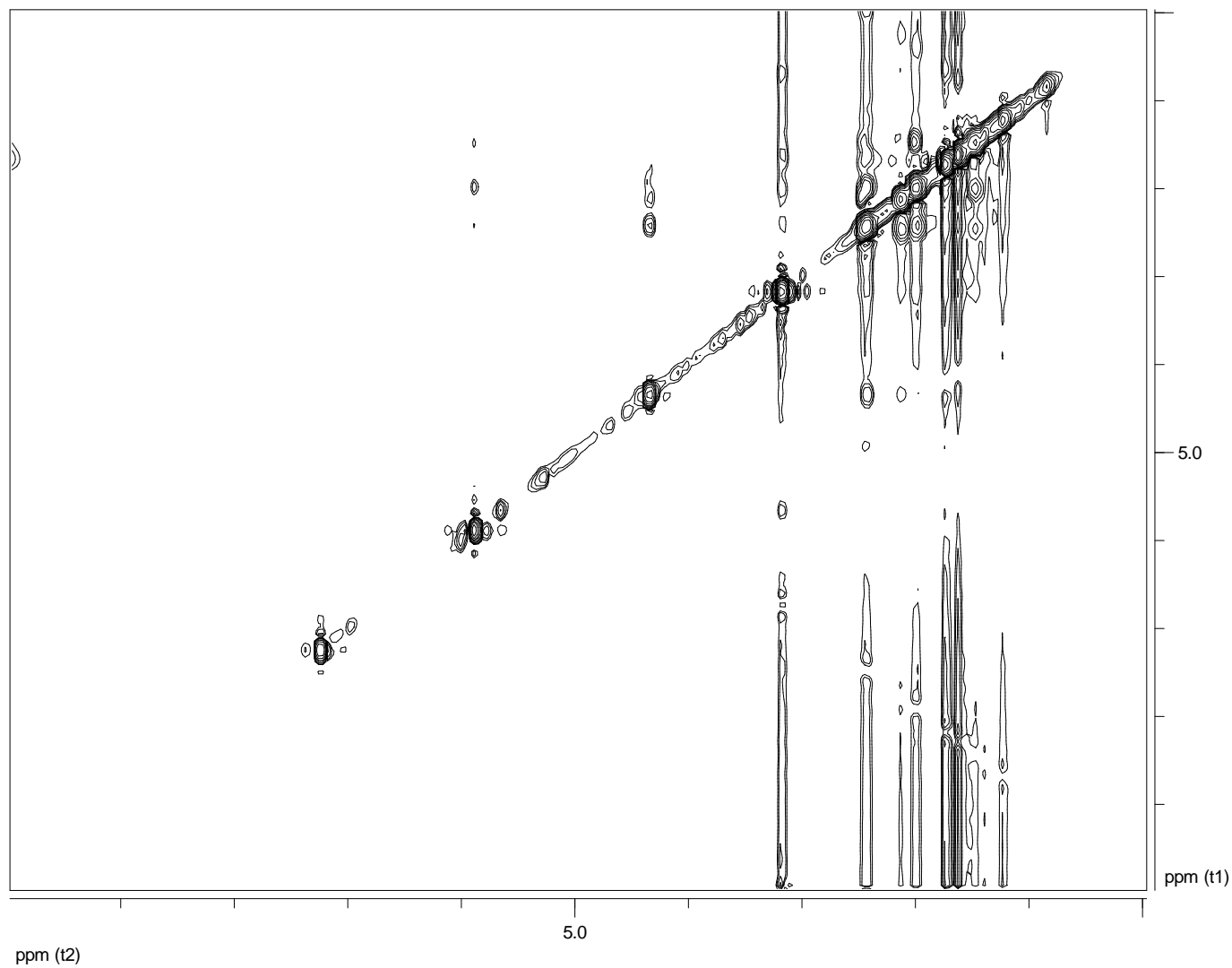


Figura 94: Espectro NOE do composto 12 (LC27) em CDCl₃ (400 MHz).

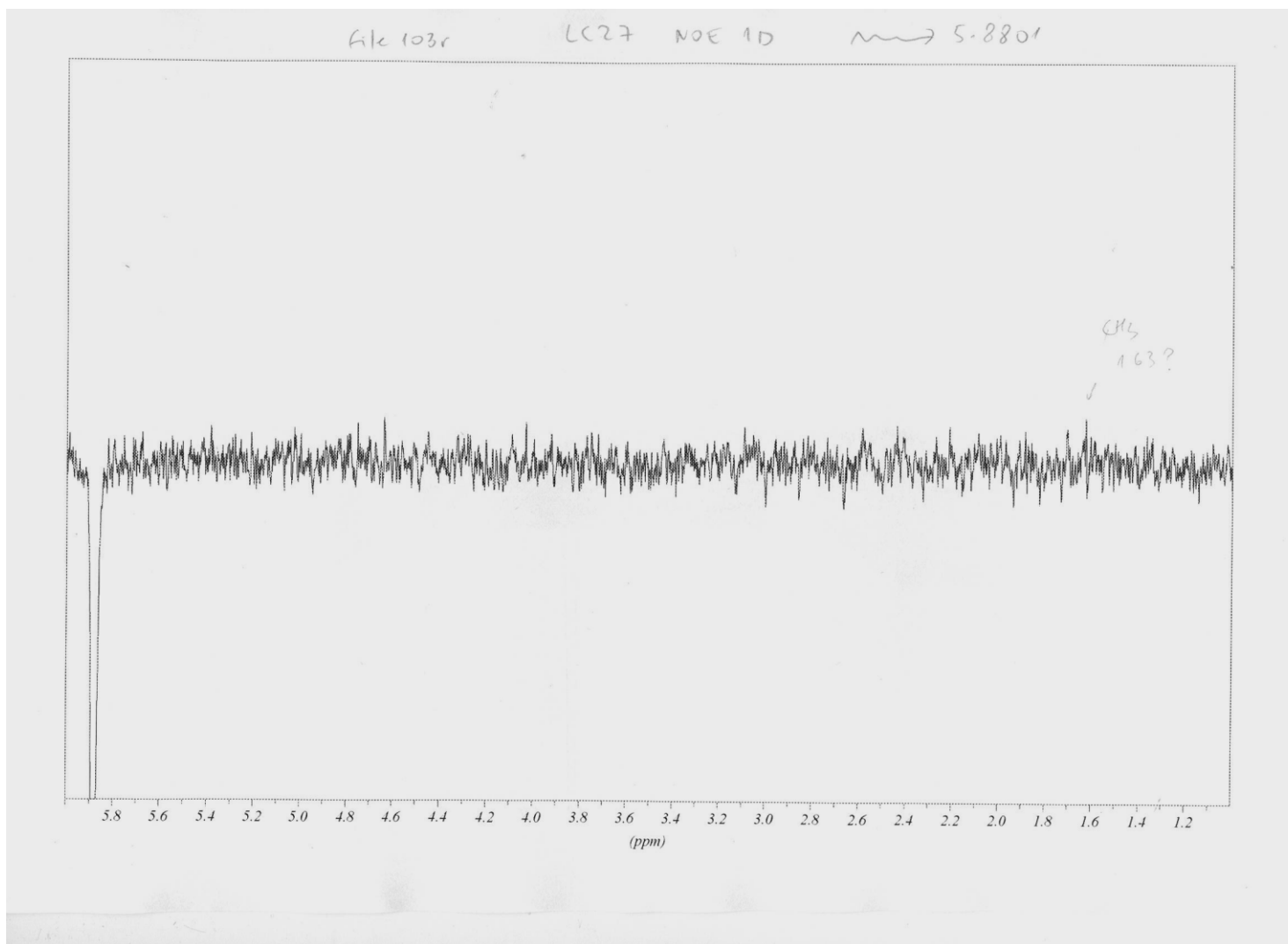


Figura 95: Espectro NOE diferencial do composto 12 (LC27) em CDCl₃ (400 MHz).

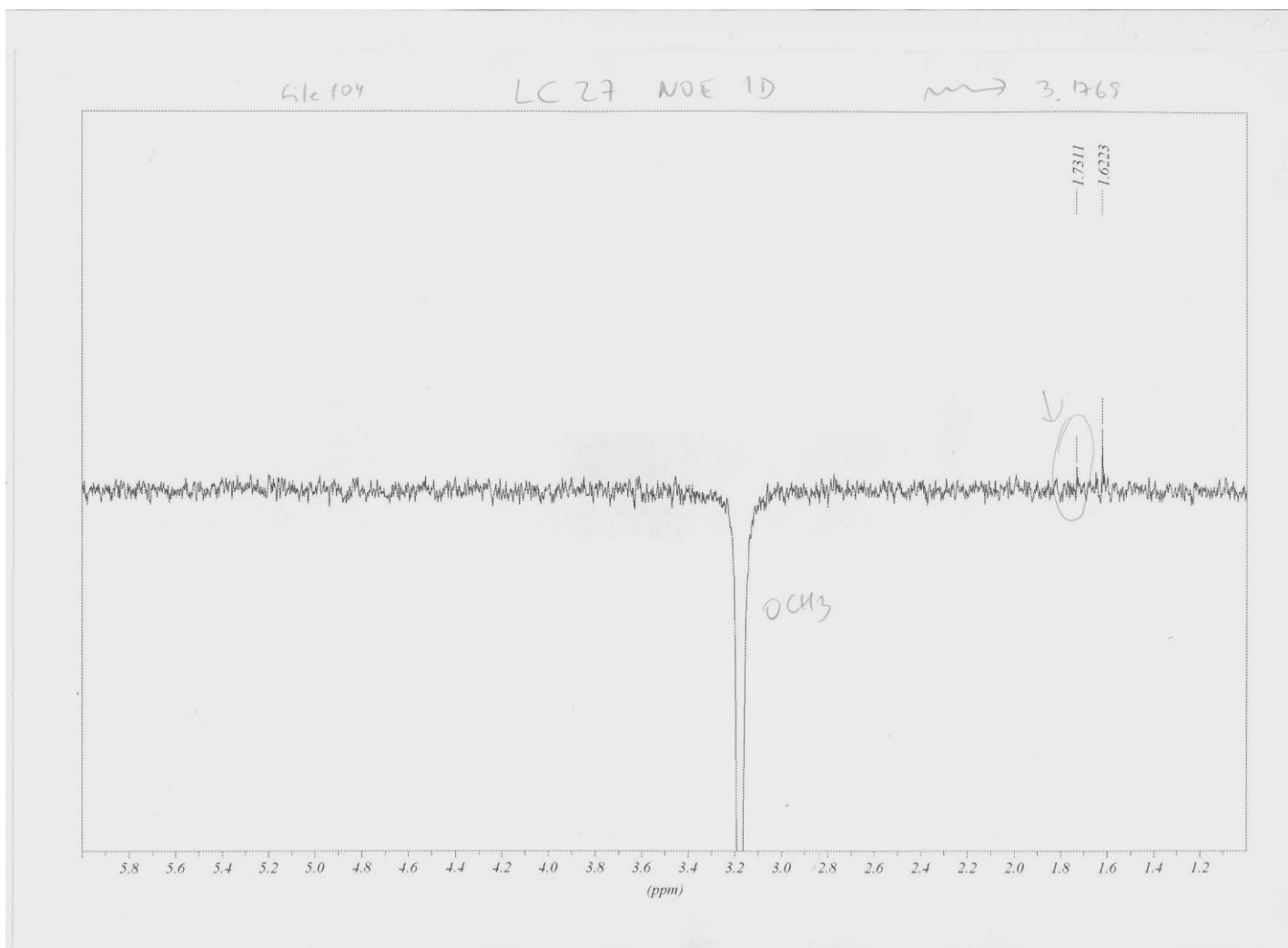


Figura 96: Espectro NOE diferencial do composto 12 (LC27) em CDCl₃ (400 MHz).

LC27 #25 RT: 0.65 AV: 1 NL: 1.18E6
T: +c Full ms [50.00-800.00]

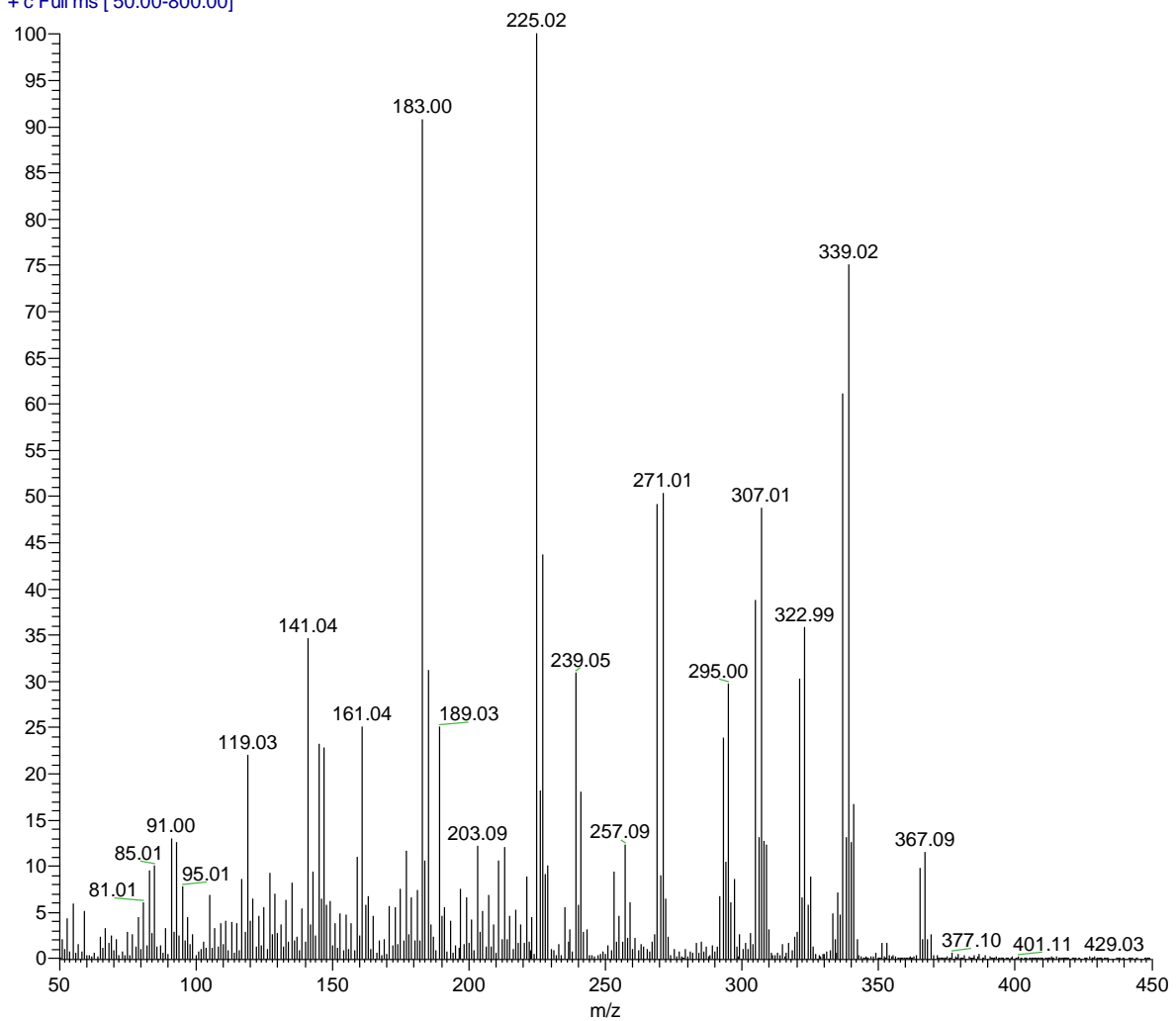
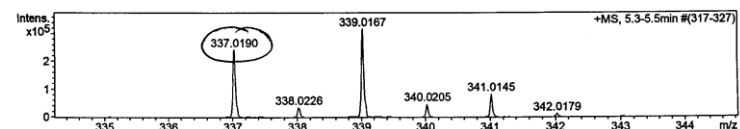
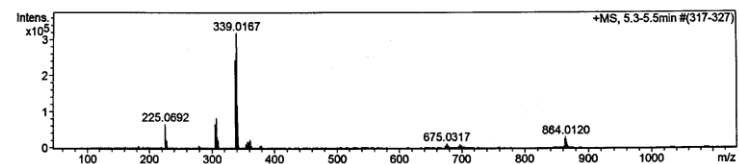
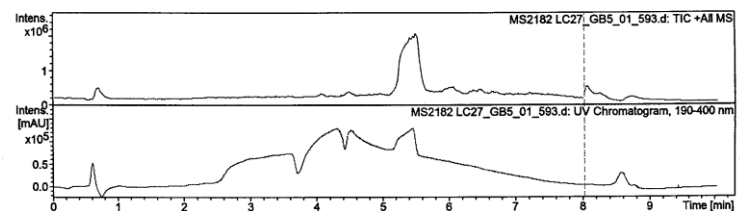


Figura 97: Espectro de massas por ionização química do composto 12 (LC27).

Mass Spectrometry & Proteomics Facility **Mass Spectrum SmartFormula Report**

Analysis Info
 Analysis Name D:\Data\MS2182 LC27_GB5_01_593.d Acquisition Date 6/25/2009 12:12:00 PM
 Method lcms_h2ograd.m Operator Michelle Joyce
 Sample Name MS2182 LC27 Instrument / Ser# micrOTOF-Q 10195
 Comment

Acquisition Parameter
 Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 3.0 Bar
 Focus Not active Set Capillary 4500 V Set Dry Heater 200 °C
 Scan Begin 50 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Dry Gas 4.0 l/min
 Scan End 3000 m/z Set Collision Cell RF 150.0 Vpp Set Divert Valve Waste



Meas. m/z	#	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf
339.0167	1	C 9 H 21 Br Cl O 6	339.0205	11.2	11.0	-1.5	ok	even
	2	C 16 H 17 Br Cl O	339.0146	-8.1	-8.3	7.5	ok	even
	3	C 8 H 15 Br Cl N 7 O	339.0204	11.2	10.9	4.0	ok	odd
	4	C 14 H 15 Br Cl N 3	339.0132	-10.1	-10.3	8.0	ok	odd
	5	C 13 H 20 Br Cl 2 N	339.0151	-4.7	-4.9	3.0	ok	odd

337.0190 [M+H]⁺, calcd for C₁₃H₁₉BrClO₃ 337.0206

Figura 98: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 12 (LC27).

- Composto 13

O composto **13 (LC28)** (12,6 mg) foi isolado como um pó cristalino após purificação em CLAE de uma fração obtida durante o processo de fracionamento (**Figura 1**). O espectro de infravermelho indicou a presença de um grupo lactona em, 1761 cm^{-1} . O espectro de massas apresentou os picos de maiores massas de forma similar ao composto **12 (Figura 99)**. O espectro de massas de alta resolução (observado e calculado) confirmou a fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{BrClO}_3$. Os espectros de ^{13}C RMN e ^1H RMN possuem semelhanças com o composto **12**, Apesar dos espectros serem semelhantes, os compostos foram isolados em tempo de retenção diferentes em CLAE.

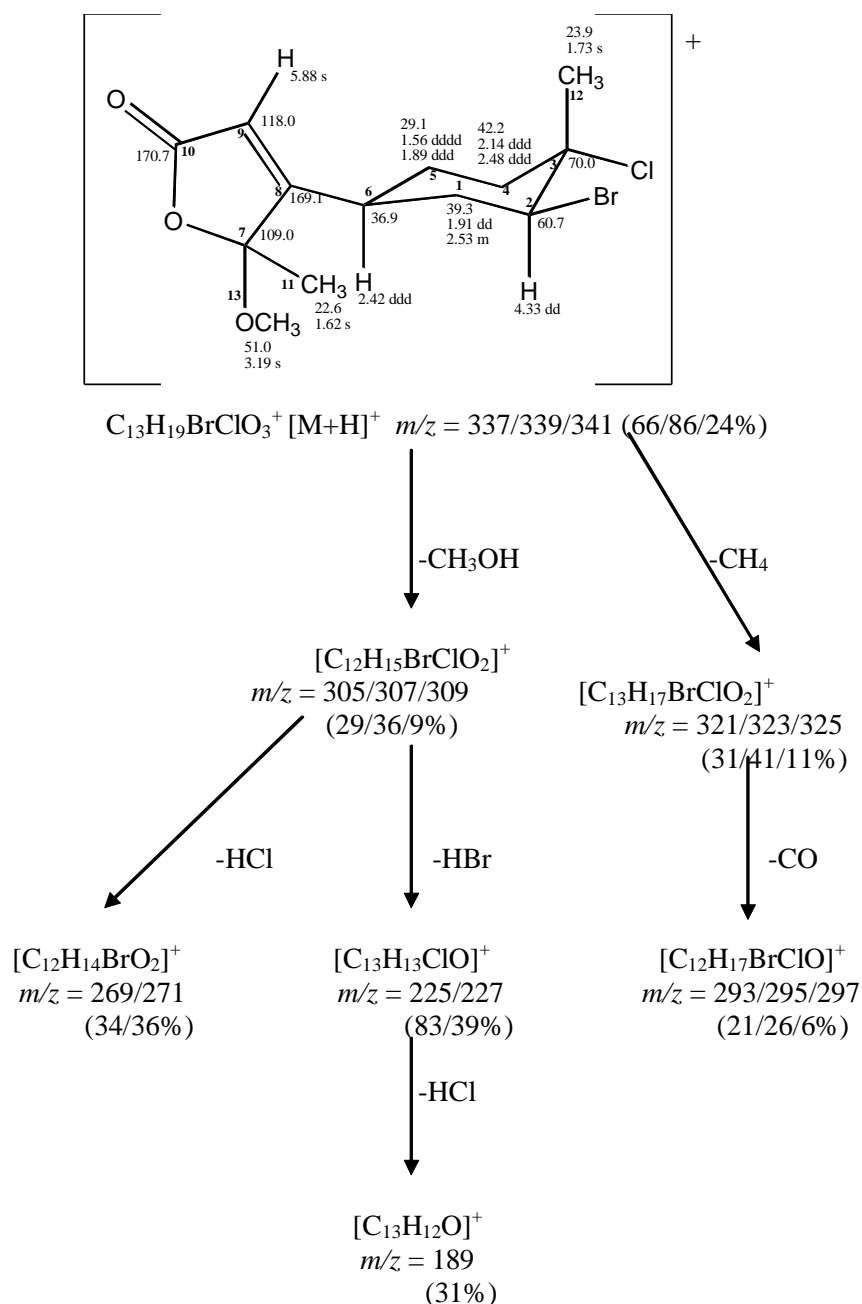


Figura 99: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização química do composto **13**.

Dados de experimentos NOE diferencial mostraram que quando irradiada a metoxila em δ 3,19 apresenta efeito NOE com a metila em δ 1,62 e o hidrogênios em δ 5,88 e quando irradiado o hidrogênio em δ 4,33 apresenta efeito NOE com a metila em δ 1,62 e com o hidrogênio em δ 2,53; sugerindo uma estereoquímica diferente para o carbono 7 do composto **12** (Figura 100). Análises por difração de raio X estão sendo realizadas para confirmação da estereoquímica dos compostos 12 e 13. A atividade ótica calculada é $[\alpha]_D = +61,3^\circ (0,16, \text{CHCl}_3)$.

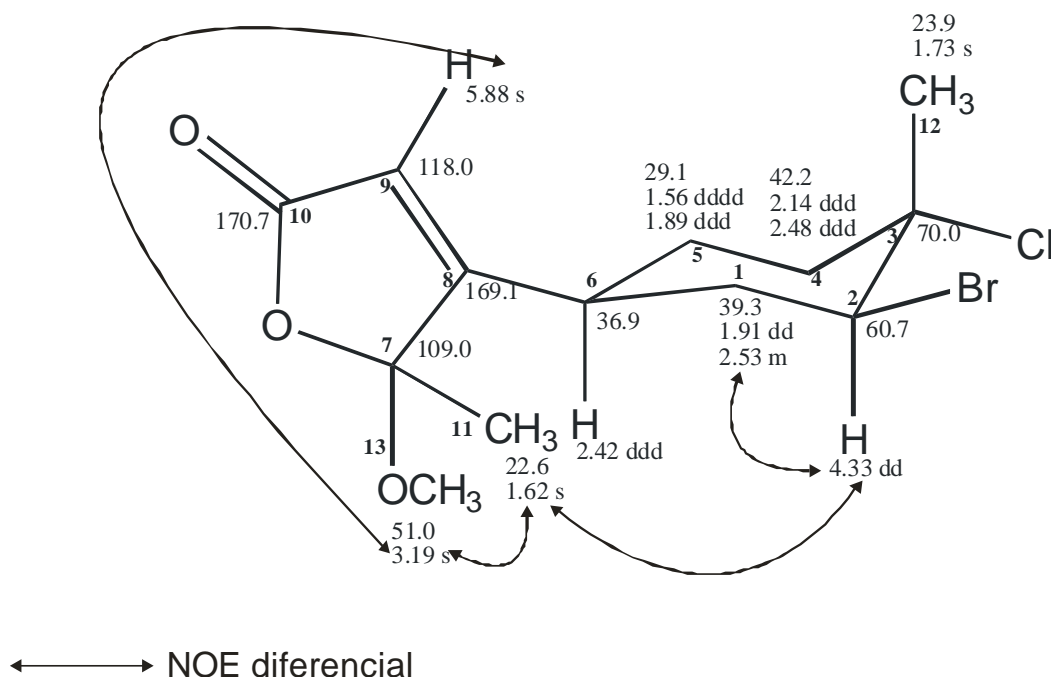


Figura 100: Estrutura do composto **13** com base em experimentos NOE diferencial.

Quadro 13: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 13 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0).

C	δ C (HSQC/HMBC)	δ H (J Hz)
1 CH ₂	39,3	1,91 ddd (12,0; 12,0; 12,0) 2,53 m
2 CH	60,7	4,33 dd (4,1; 12,0)
3 C	70,0	
4 CH ₂	42,2	2,14 ddd (4,0; 13,0; 13,0) 2,48 ddd (3,3; 3,3; 13,9)
5 CH ₂	29,1	1,56 axial dddd (13,9; 13,2; 12,4; 3,3) 1,89 ddd (13,9; 3,3; 3,3)
6 CH	36,9	2,42 ddd (12,4; 3,7; 3,3)
7 C	109,0	
8 C	169,1	
9 CH	118,0	5,88 s
10 C	170,7	
11 CH ₃	22,6	1,62 s
12 CH ₃	23,9	1,73 s
13 OCH ₃	51,0	3,19 s

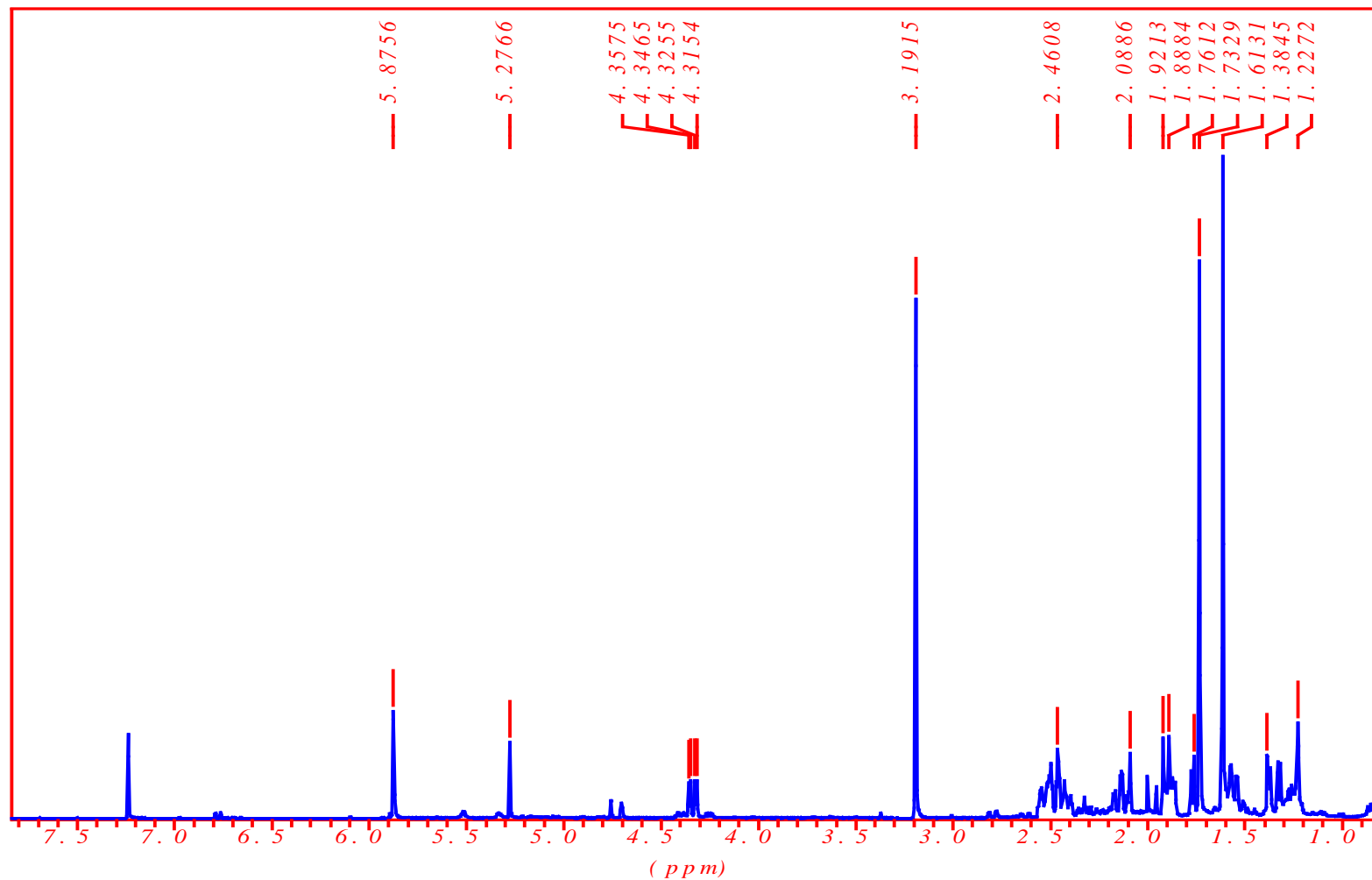


Figura 101: Espectro de ¹H RMN do composto 13 (LC28) em CDCl₃ (400 MHz).

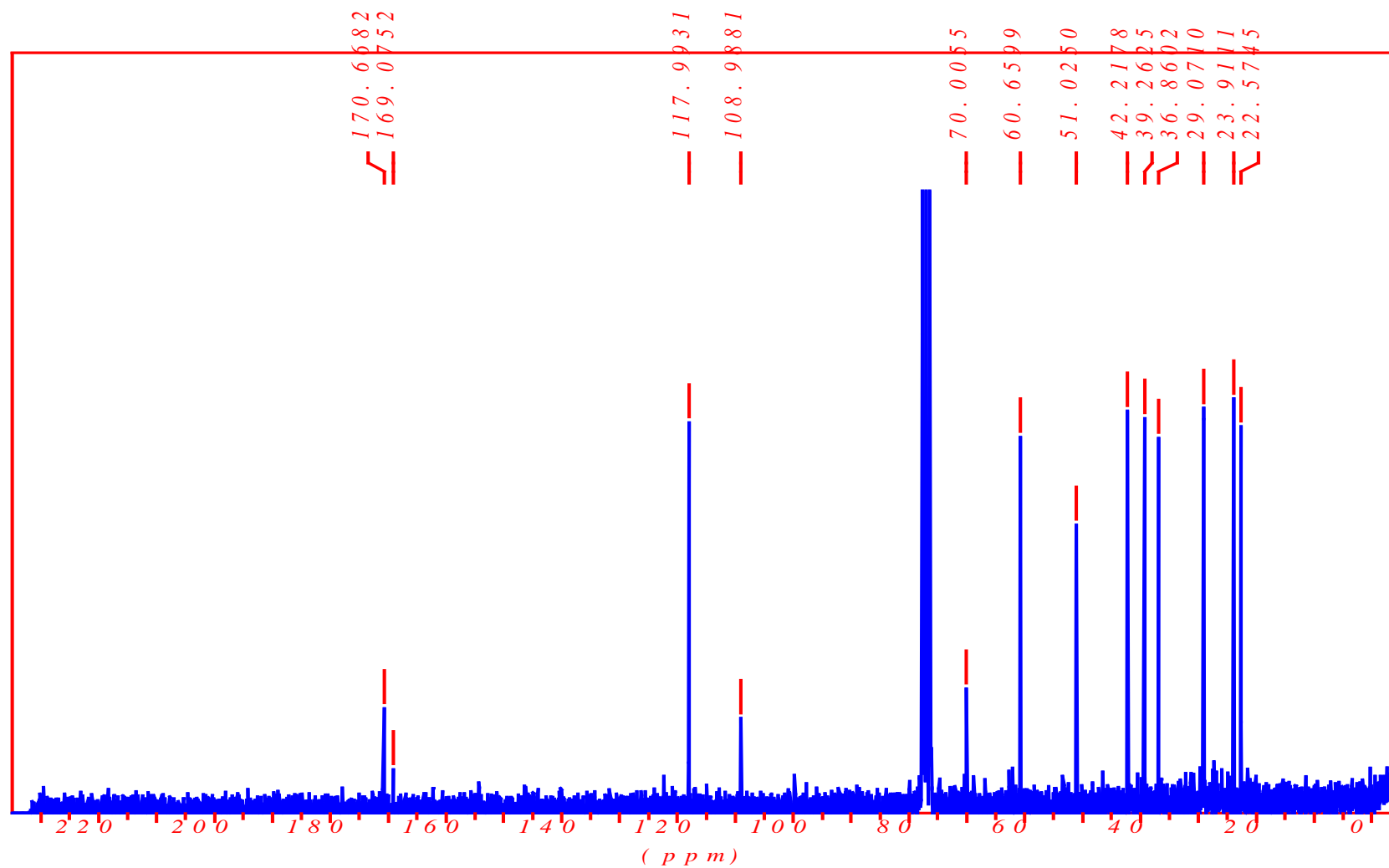


Figura 102: Espectro de ^{13}C RMN do composto 13 (LC28) em CDCl_3 (50 MHz).

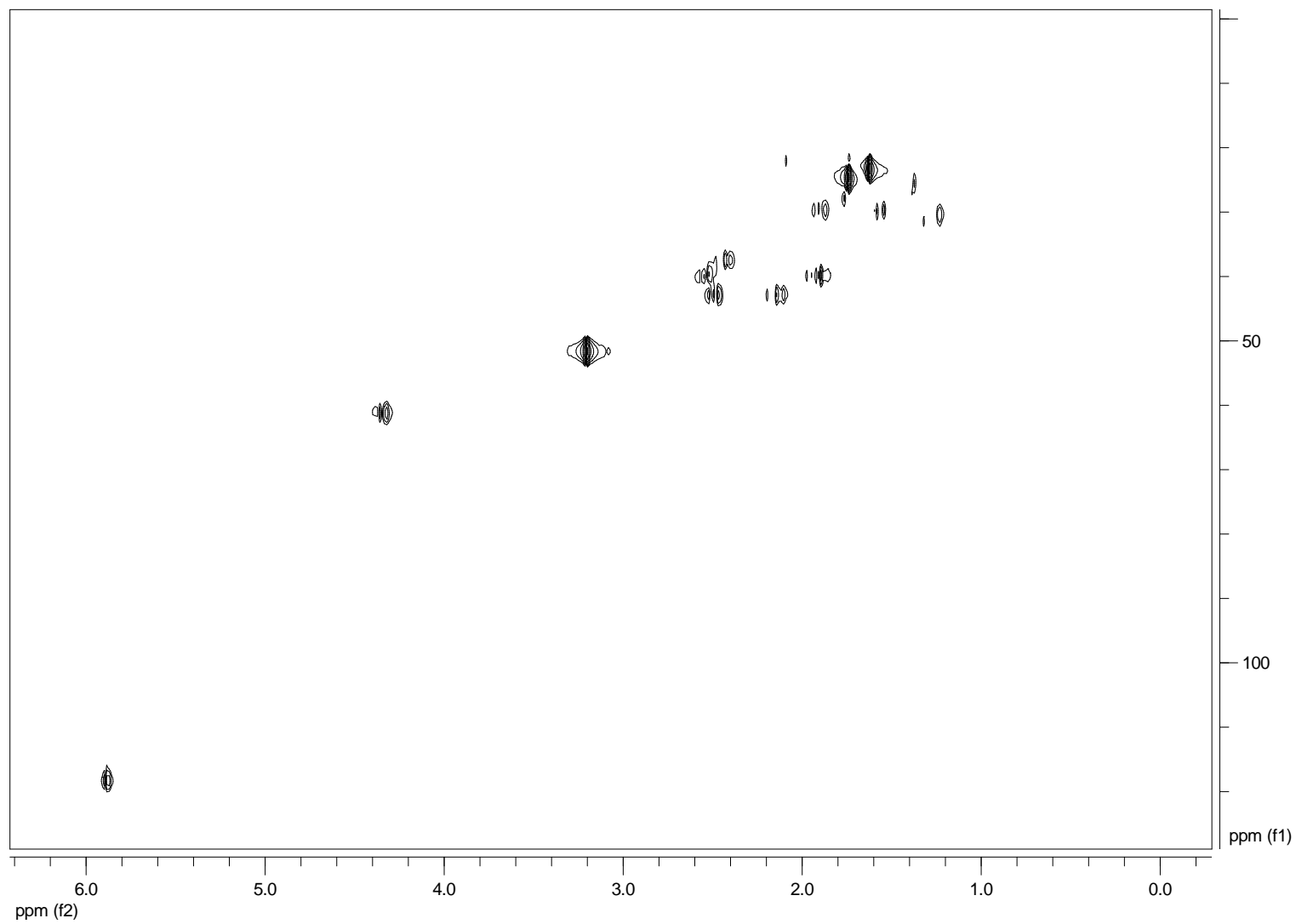


Figura 103: Espectro HSQC-HSQC-DEPT do composto 13 (LC28) em CDCl₃ (400 MHz).

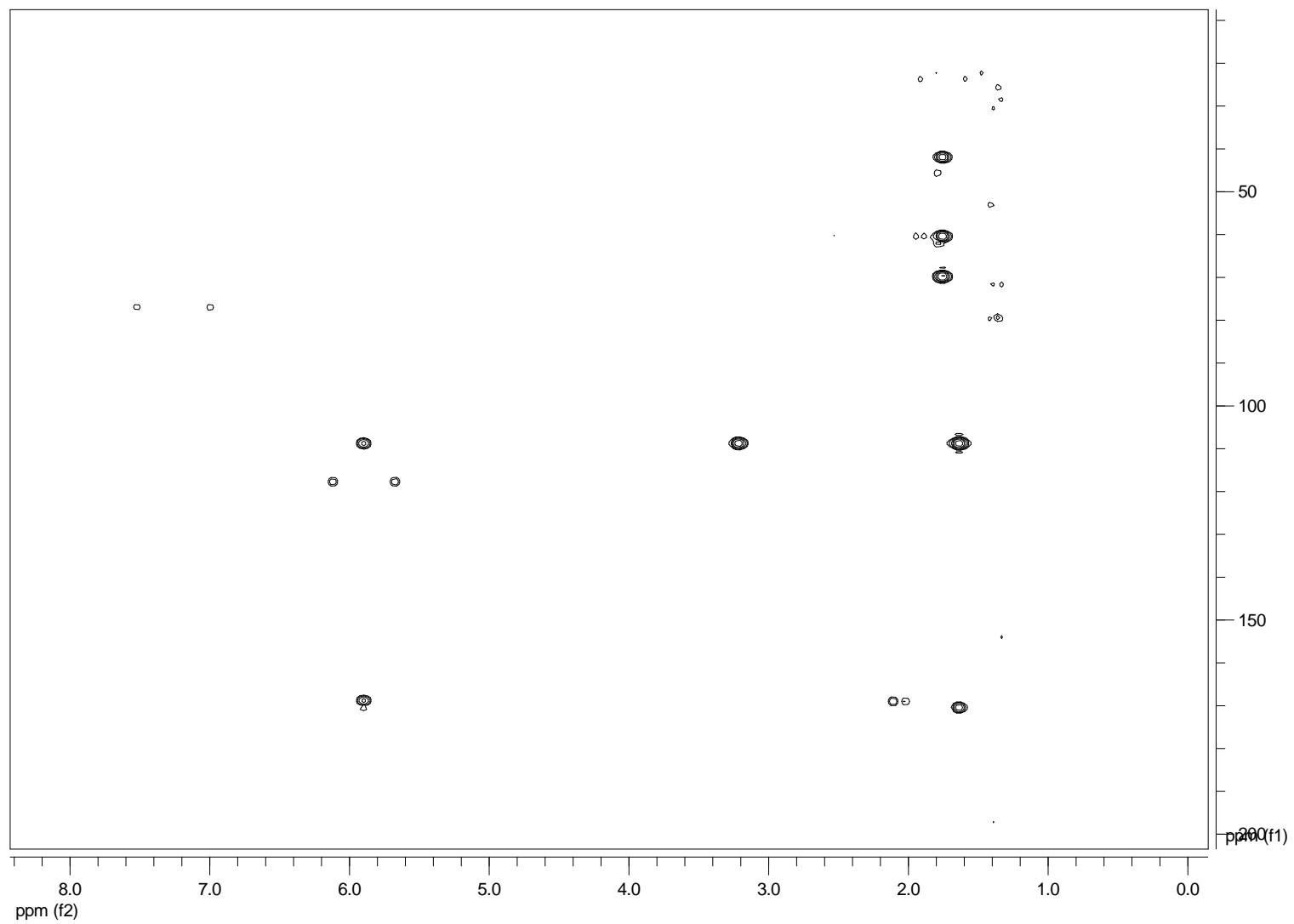


Figura 104: Espectro HMBC do composto 13 (LC28) em CDCl₃ (400 MHz).

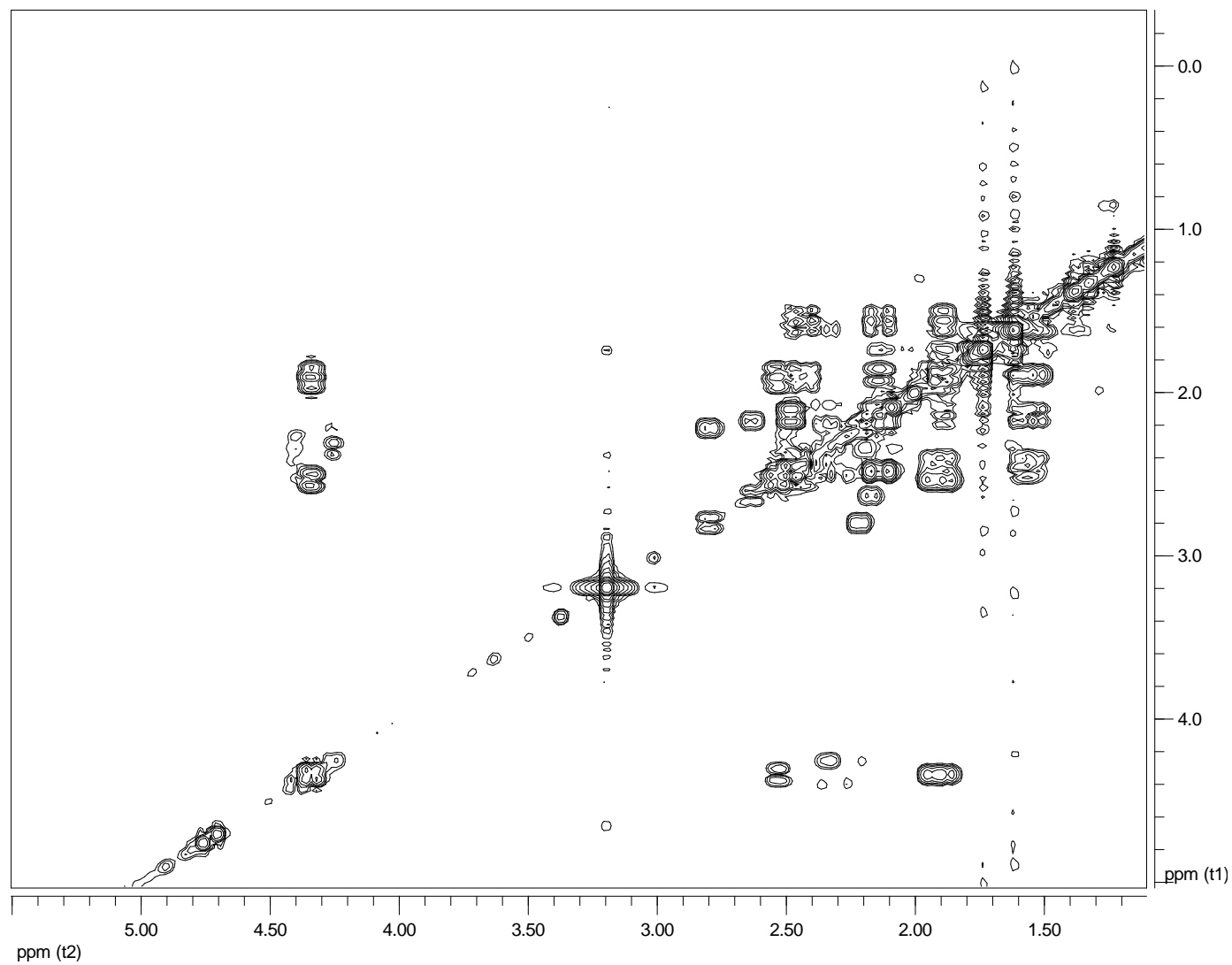


Figura 105: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 13 (LC27) em CDCl_3 (400 MHz).

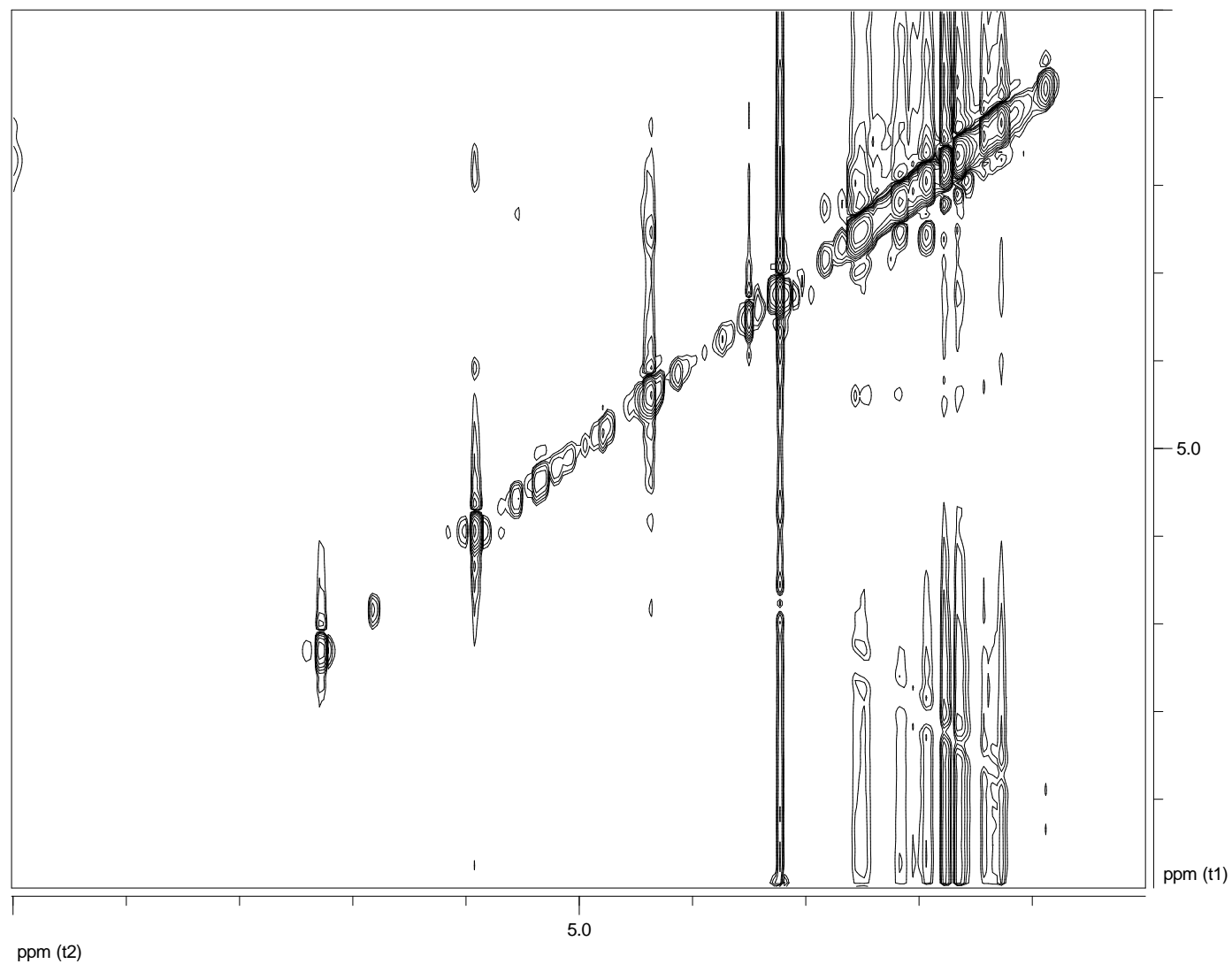


Figura 106: Espectro NOE do composto 13 (LC28) em CDCl₃ (400 MHz).

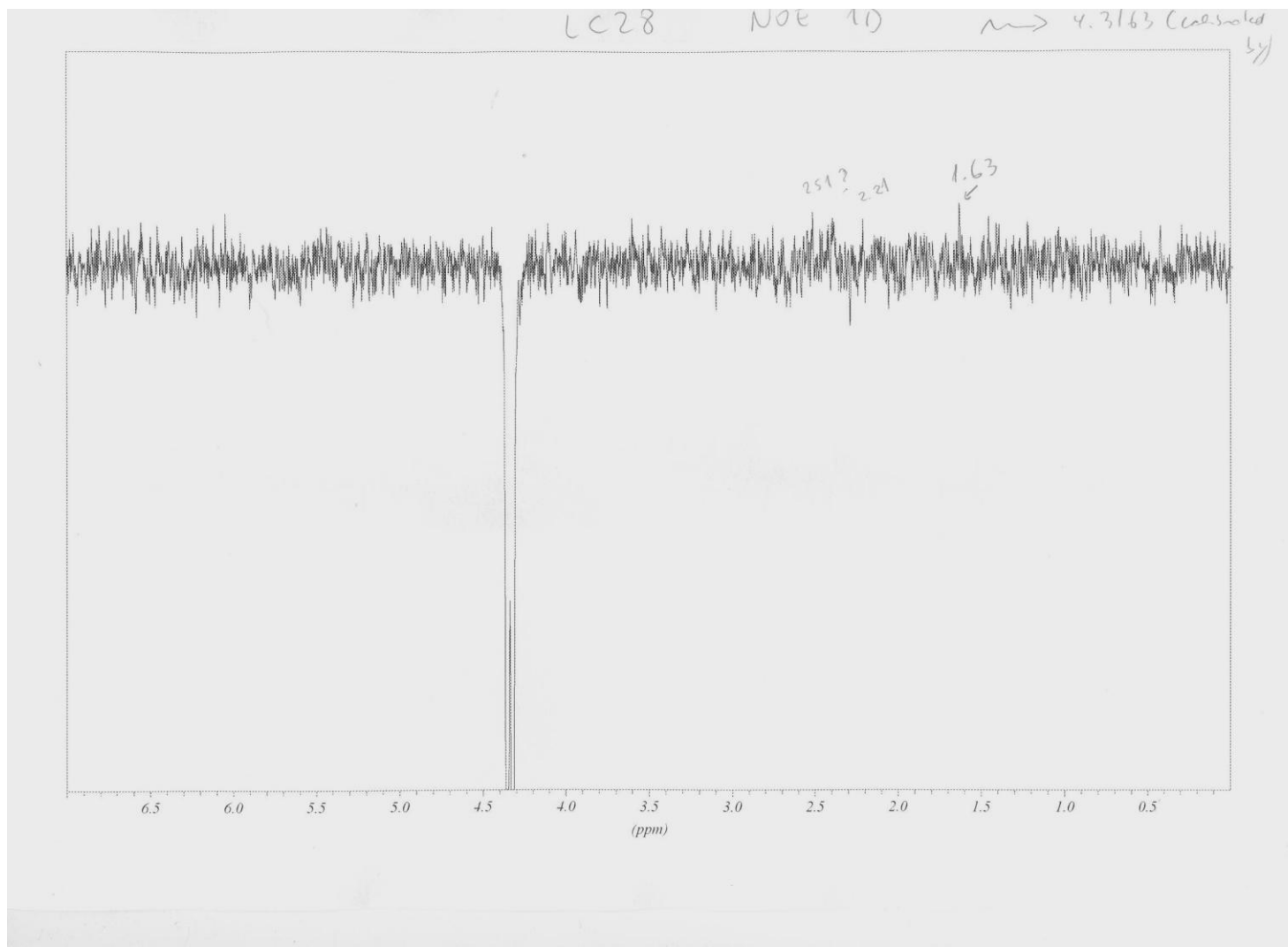


Figura 107: Espectro NOE diferencial do composto 13 (LC28) em CDCl₃ (400 MHz).

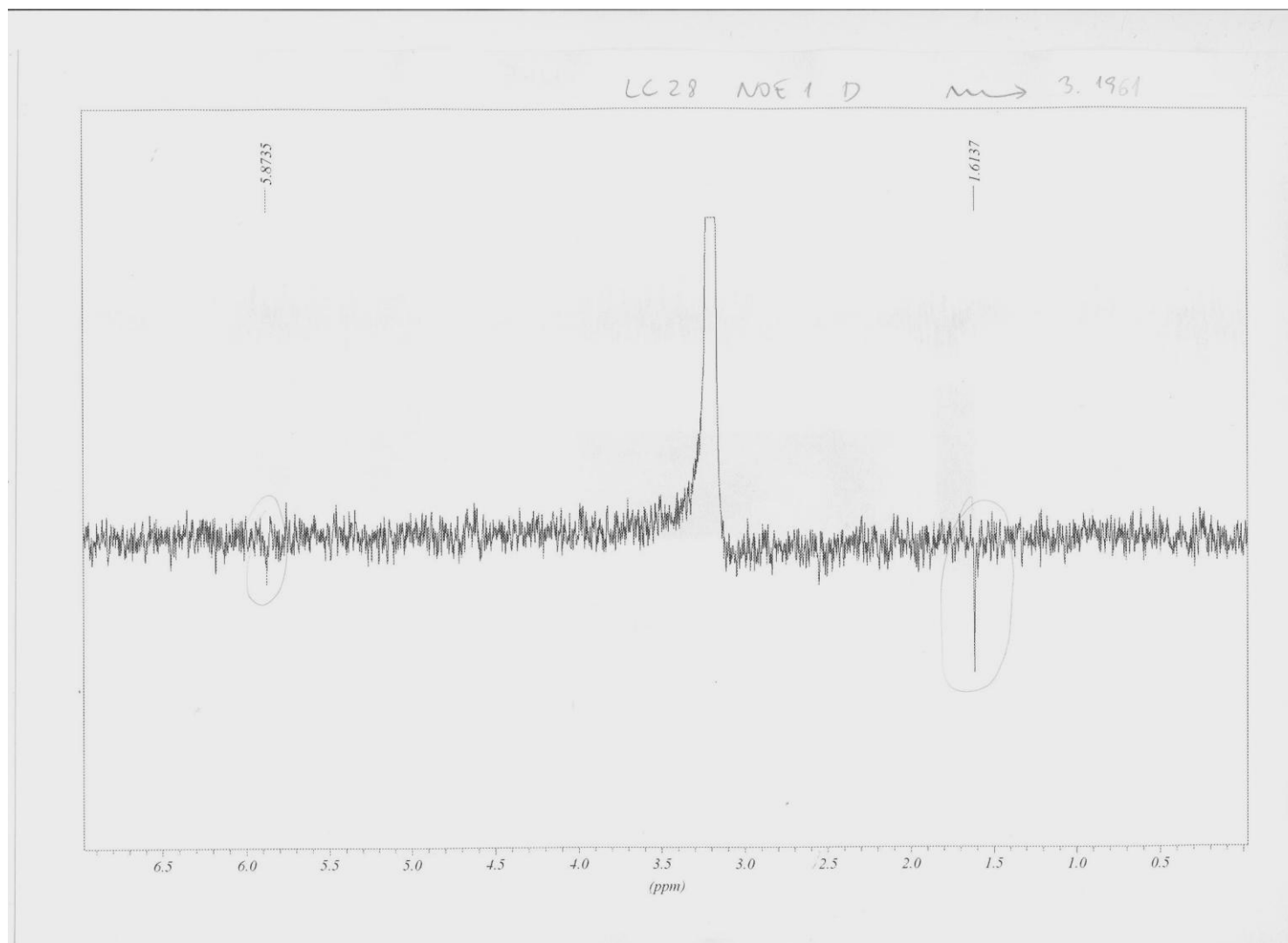


Figura 108: Espectro NOE diferencial do composto 13 (LC28) em CDCl_3 (400 MHz).

LC28 #28 RT: 0.73 AV: 1 NL: 1.15E6
T: + c Full ms [50.00-800.00]

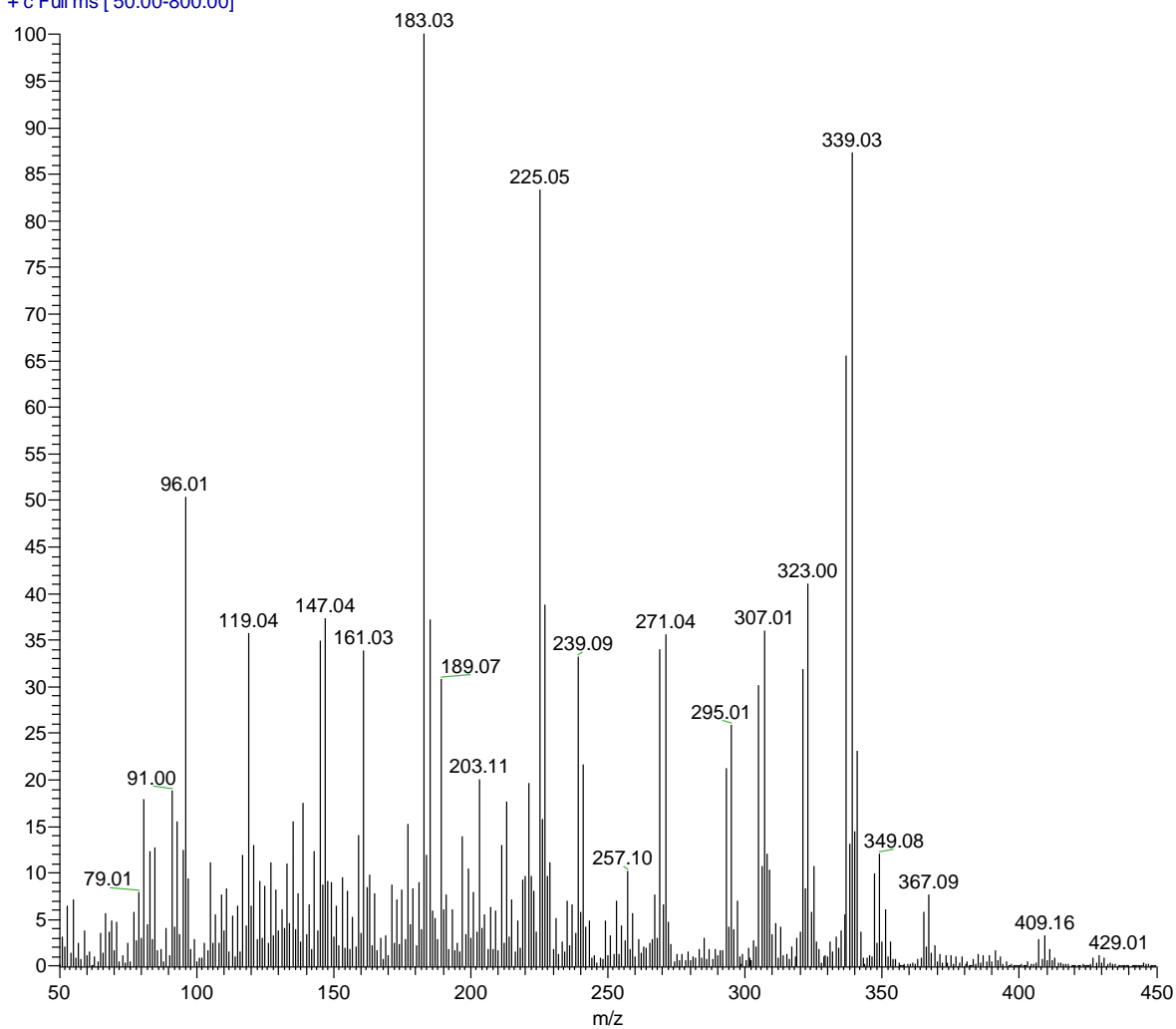


Figura 109: Espectro de massas por ionização química do composto 13 (LC28).

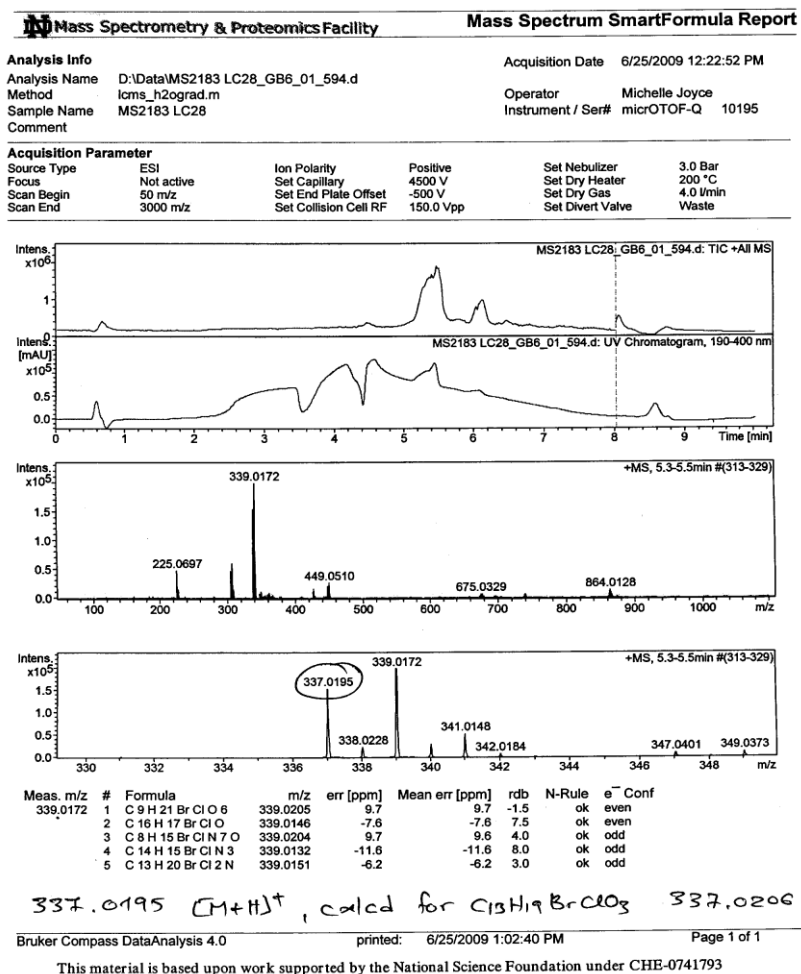


Figura 110: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 13 (LC28).

- Composto 14:

O composto **14 (LC03)** (7,3 mg) foi isolado após purificação em coluna cromatográfica de gel de sílica de diferentes frações obtidas durante o processo de fracionamento (**Figura 1**) como um líquido incolor e inodoro. O espectro de ^{13}C RMN e experimento HSQC-DEPT mostraram 15 carbonos, três carbonos quaternários, quatro carbonos metínicos, quatro metilenos e quatro grupos metilas. O espectro ^1H RMN apresentou sinais em δ 4,35 (1H, dd, $J = 4,4; 13,2$ HZ) e 4,50 (1H, brs) com deslocamentos químicos característicos de grupamentos CH ligados a halogênios e a presença de hidrogênio carbinol em δ 3,54 (1H, brs). O espectro de massas apresentou os picos de maior massas em m/z 431/433/435/437 com um padrão de intensidades relativas semelhante ao composto **1**, sugerindo a presença de dois átomos de bromo e um cloro na molécula. A fragmentação observada no CIMS (**Figura 111**) é coerente com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{ClBr}_2\text{O}_2$. A presença de dois equivalentes de dupla ligação sugere um álcool sesquiterpenico halogenado com dois anéis.

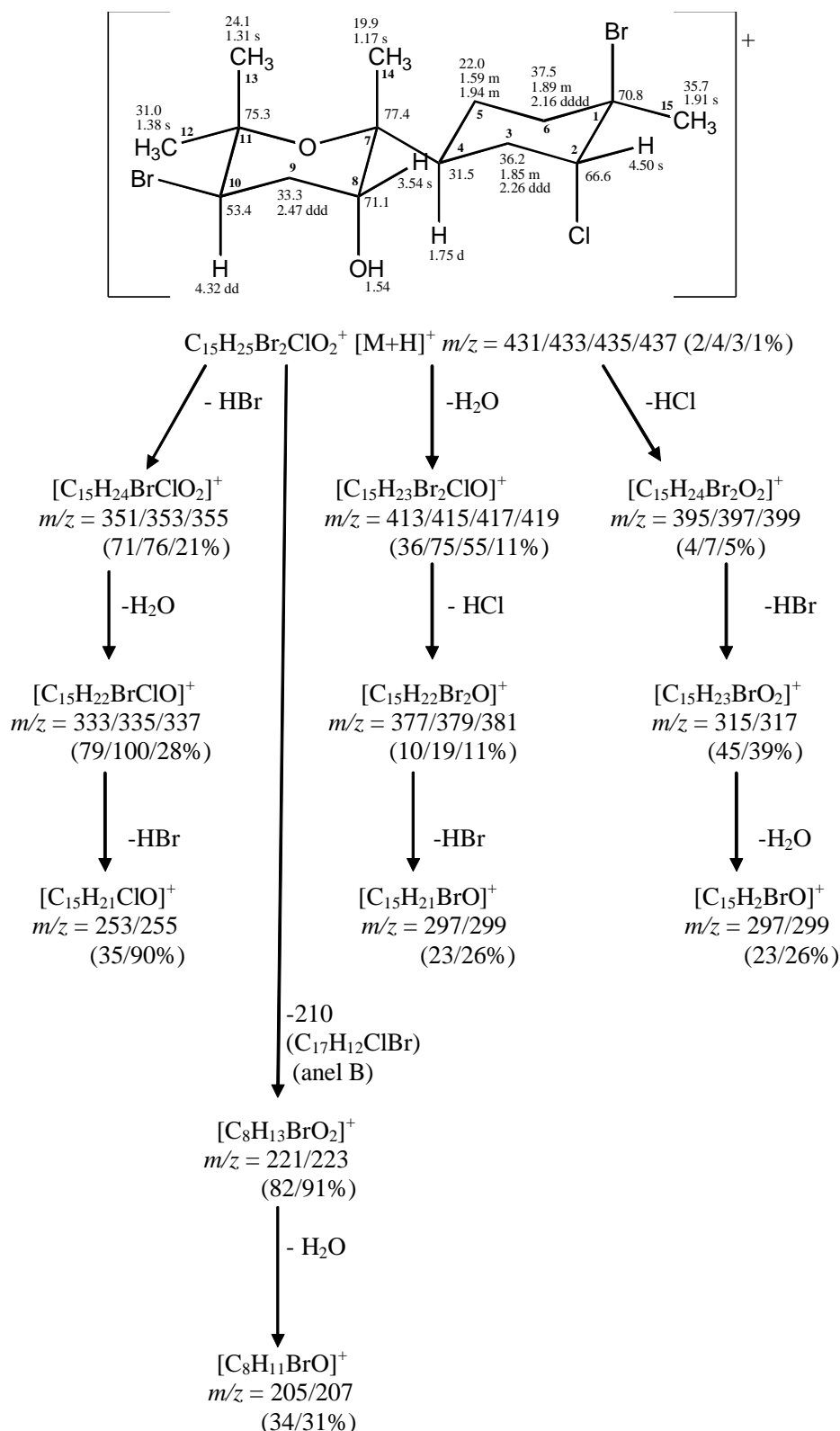


Figura 111: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização química do composto **14**.

Análise detalhada do espectro de correlação ¹H-¹H COSY mostra para o anel B, um sistema de spins CH_{eq}CH₂CH_{ax}, considerando-se o valor baixo da constante de acoplamento entre δ 4,50 (CH) e δ 1,85 (CH₂), bem como os deslocamentos químicos do metino em δ 66,6 do carbono quaternário em δ 70,8 e dos hidrogênios da metila ressonando em δ 1,91, pode-se

inferir que o sistema de spins em questão está inserido em um anel ciclohexano com bromo e cloro com relação diaxial entre os halogênios (González *et al.*, 1979). As configurações dos centros assimétricos restantes foram proposta nas constantes de acoplamento. No anel A, observa-se uma constante de acoplamento alta do hidrogênio em δ 4,32 ($J= 13,2$ Hz), indicando a posição axial do mesmo e uma posição equatorial do bromo no anel tetraidropirano, semelhante ao caespitol, (**Figura 112**).

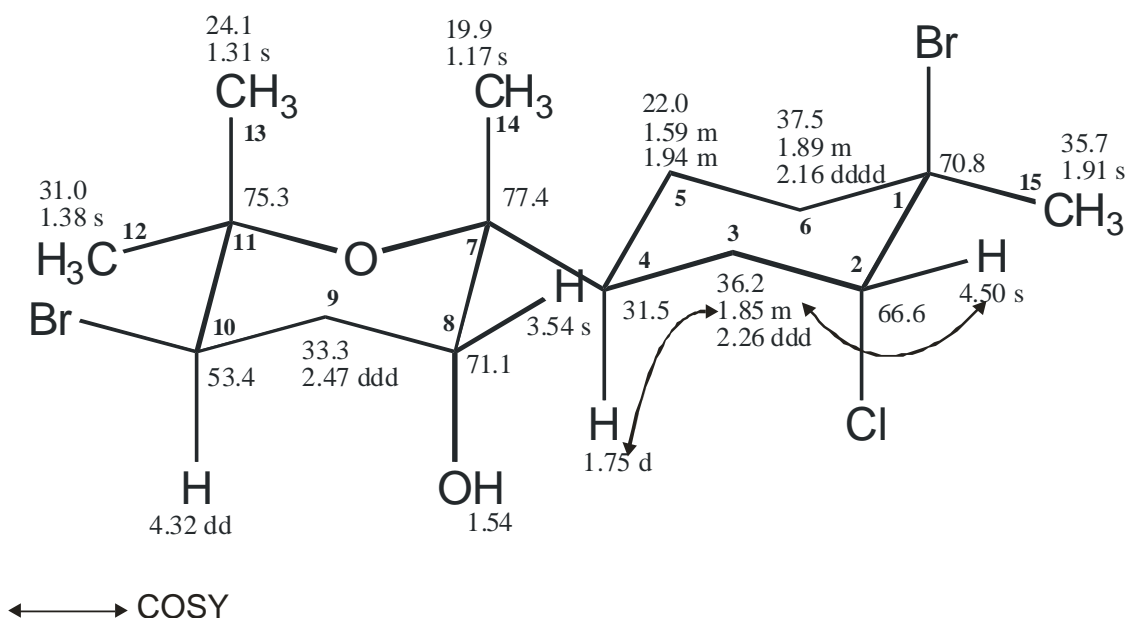


Figura 112: Estrutura do composto **14** com correlações ^1H - ^1H COSY.

Com base nos dados de espectros de massas, infravermelho e ressonância magnética nuclear podemos sugerir que o composto **14** trata-se do **isocaespitol**, previamente descrito para *Laurencia caespitosa* (González *et al.*, 1975, 1979) e *Aplysia dactylomela* (Wessels *et al.*, 2000).

Quadro 14: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 14 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0) em comparação com a literatura (González et al., 1979, CDCl_3).

C	δ H (J Hz)	δ C	δ C González et al., 1979
1	-	70,8	70,6
2	4,50 sl	66,6	66,6
3	2,26 ddd (13,2 x2; 2,9) 1,85 m	36,2	36,3
4	1,75 d br (5,5)	31,5	31,3
5	1,94 m 1,59 m	22,0	22,0
6	2,16 dddd (12,4 x 2, , 2,6 x 2) 1,89 m	37,5	37,5
7	-	77,4	77,0
8	3,54 s b	71,1	72,6
9	2,47 ddd (13,5; 13,2; 2,6)	33,3	33,1
10	4,32 dd (13,2; 4,4)	53,4	53,1
11	-	75,3	75,4
12	1,38 s	31,0	31,1
13	1,31 s	24,1	24,0
14	1,17 s	19,9	19,9
15	1,91 s	35,7	33,4
OH	1,54		

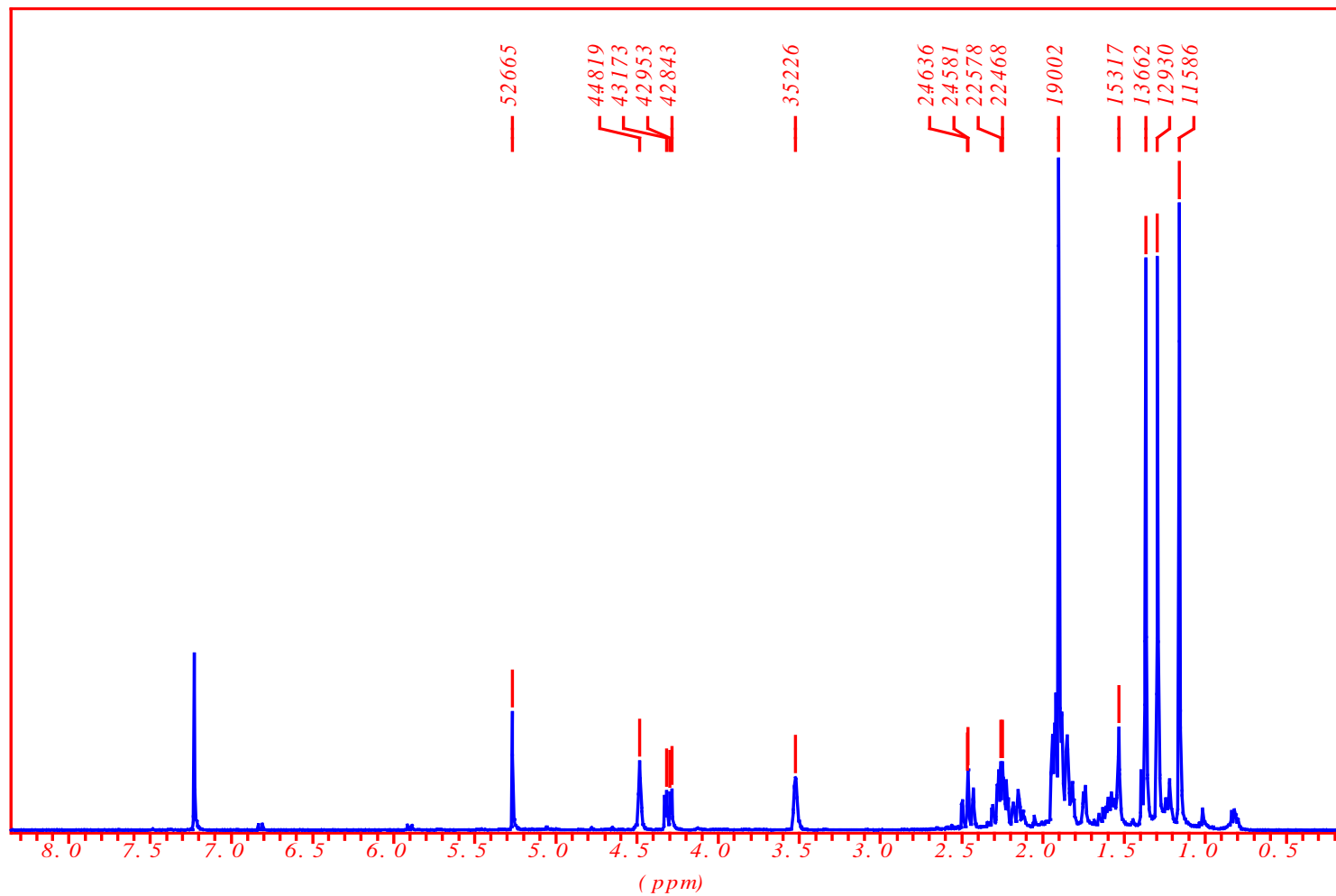


Figura 113: Espectro de ¹H RMN do composto 14 (LC3) em CDCl₃ (400 MHz).

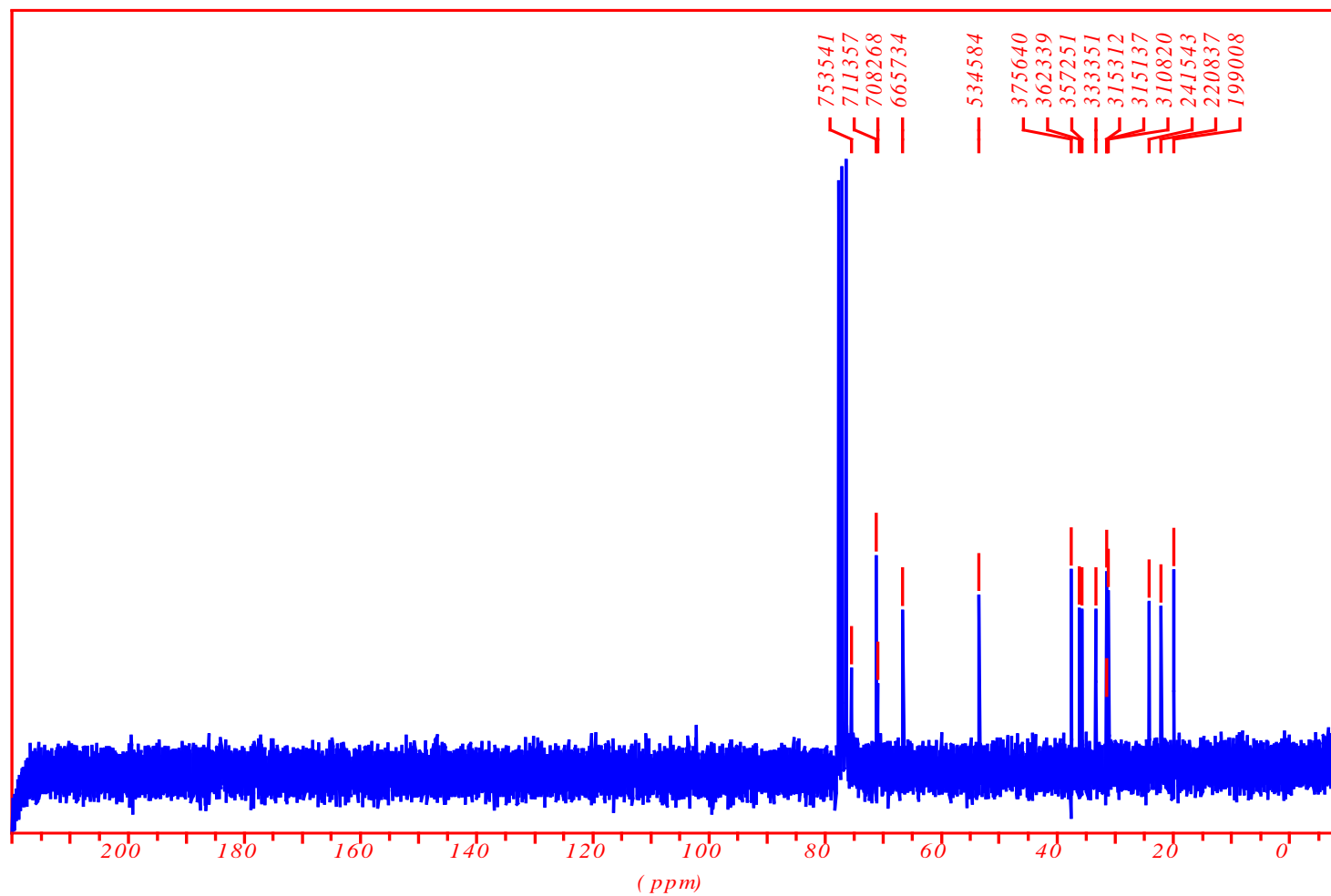


Figura 114: Espectro de ^{13}C RMN do composto 14 (LC3) em CDCl_3 (50 MHz).

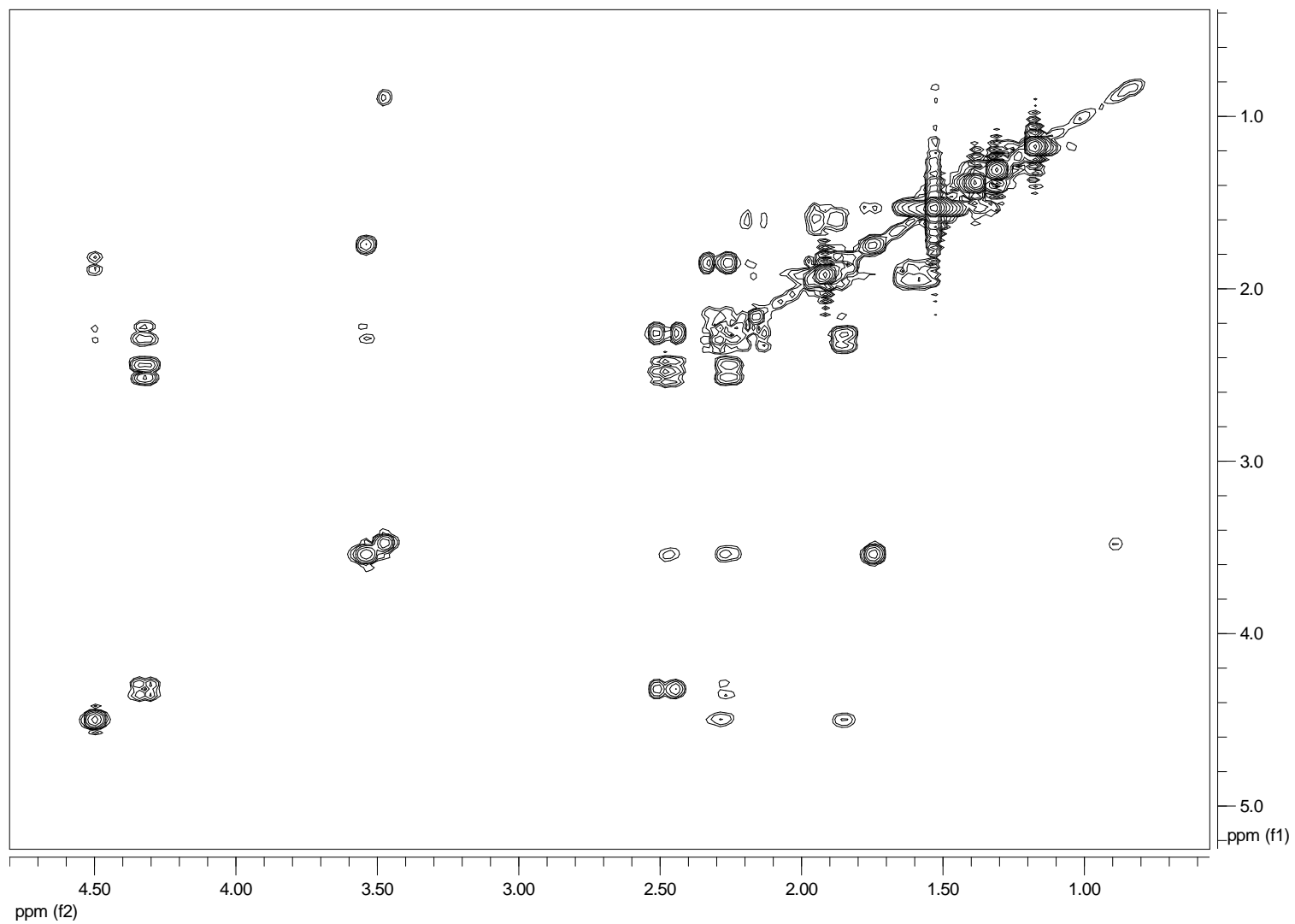


Figura 115: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto14 (LC3) em CDCl_3 (400 MHz).

LC03 #23 RT: 0.60 AV: 1 NL: 4.63E5
T: + c Full ms [50.00-800.00]

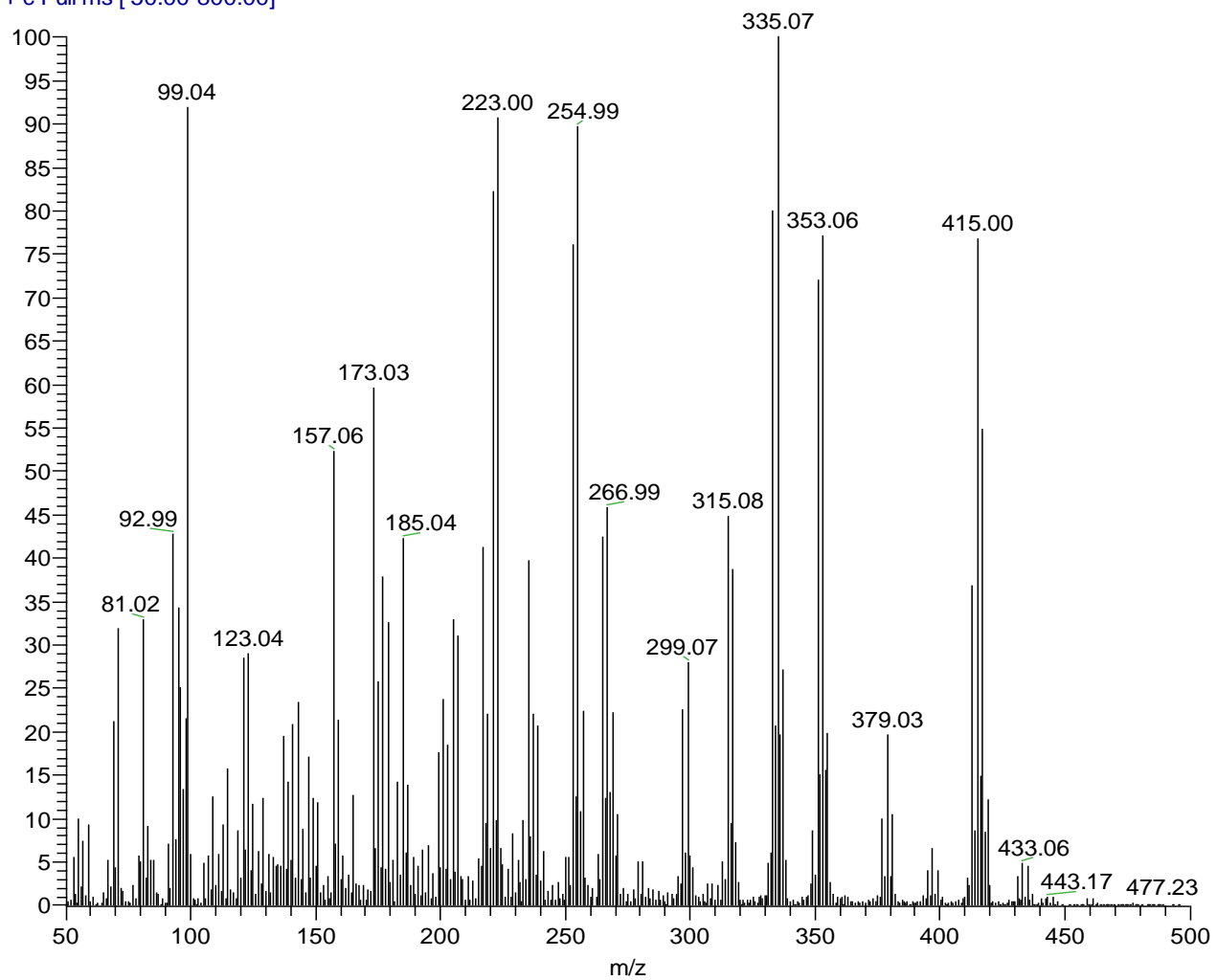


Figura 116: Espectro de massas por ionização química do composto 14 (LC3).

- Composto 15:

O composto **15 (LC06)** (1,5 mg) foi isolado após purificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de uma fração obtida durante o processo de fracionamento (**Figura 1**) como um líquido incolor e inodoro. O espectro de infravermelho indicou a ausência de grupos funcionais como hidroxila e carbonila. O espectro de hidrogênio apresentou semelhanças ao composto **14** com a presença de sinais em δ 4,49 (1H, t, J = 2,6 Hz) e 3,81 (1H, dd, J = 4,1; 12,5 Hz) correspondentes a hidrogênios ligados a carbonos halogenados, mas com ausência do hidrogênio carbinólico. A comparação dos dados apresentados com dados da literatura confirma a identificação do composto **15** como o **deoxisocaespitol (Figura 117)**, isolado previamente para *Laurencia caespitosa* (González et al., 1980).

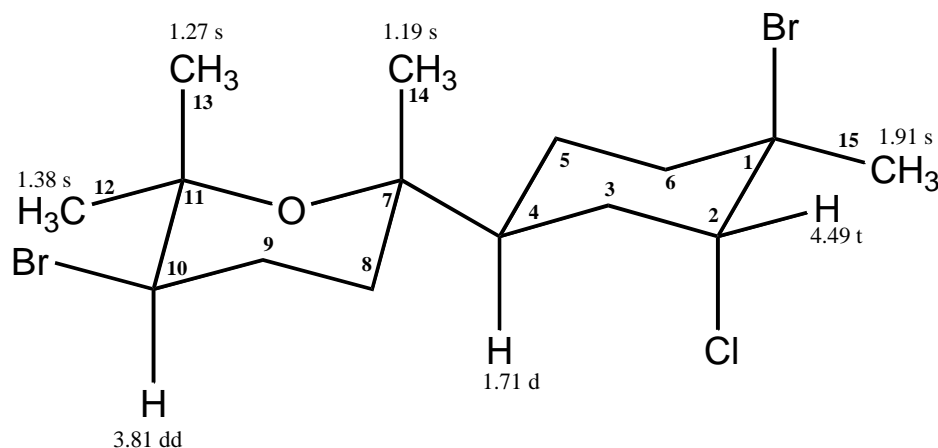


Figura 117: Estrutura do composto **15** com base nos dados de ¹H RMN.

Quadro 15: Dados de ¹H do composto 15 (400 MHz; CDCl₃ H= 7,24) em comparação com a literatura (González et al., 1980, CDCl₃).

C	δ H (J Hz)	δ H (J Hz) González et al., 1980
1	-	-
2	4,49 t (2,6)	4,45 t (3,5)
3		
4		
5		
6		
7	-	-
8		
9		
10	3,81 dd (12,5, 4,1)	3,81 dd (12,0, 6,0)
11	-	-
12	1,38 s	1,30 s
13	1,27 s	1,29 s
14	1,19 s	1,20 s
15	1,91 s	1,91 s

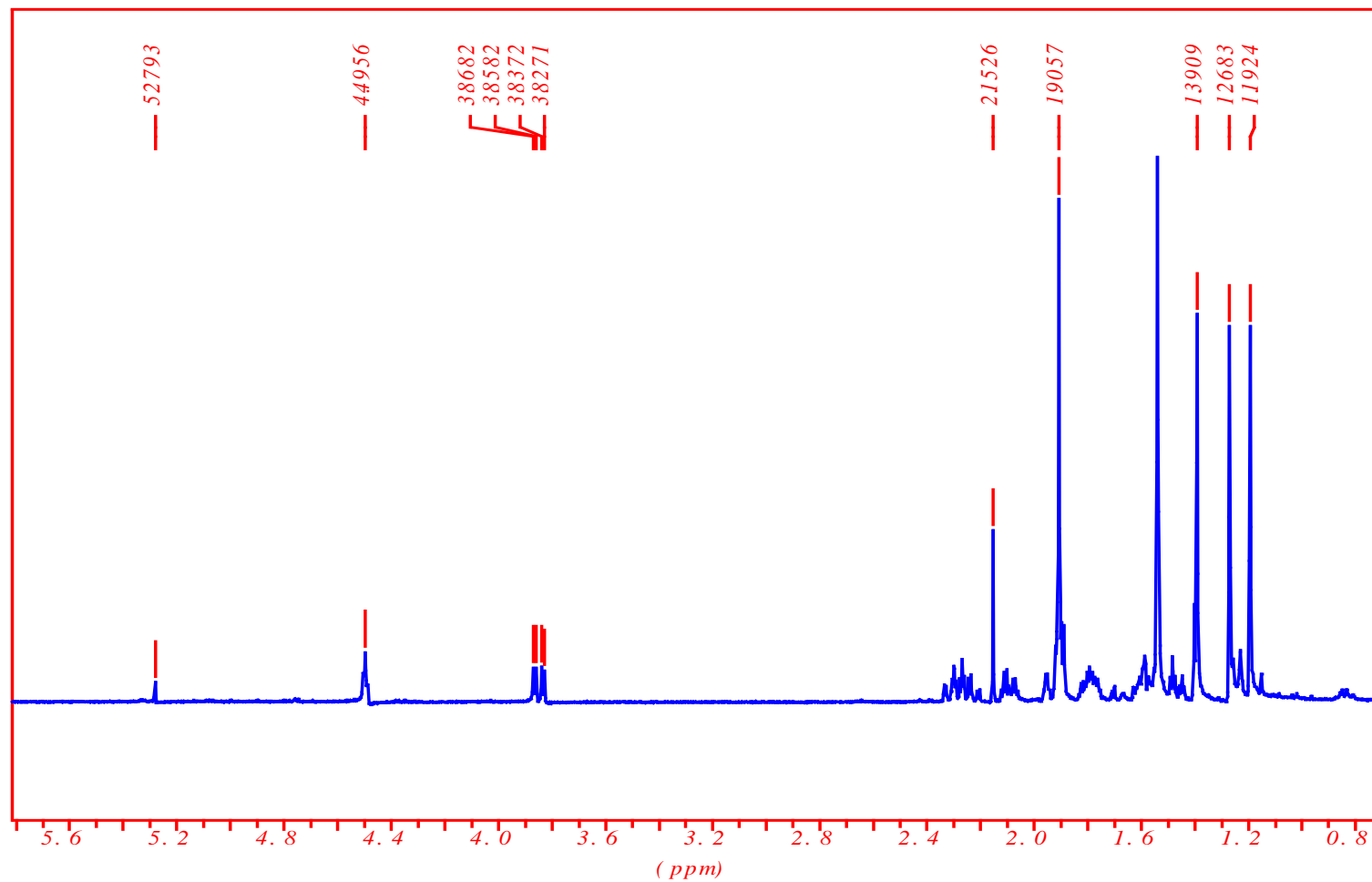


Figura 118: Espectro de ¹H RMN do composto 15 (LC6) em CDCl₃ (400 MHz).

- Composto 16:

O composto **16 (LC14)** (8,0 mg) foi isolado após purificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de uma fração obtida durante o processo de fracionamento (**Figura 1**) como um líquido incolor e inodoro. O espectro de ^{13}C RMN e experimento HSQC-DEPT apresentaram 15 carbonos, três carbonos quaternários, três carbonos metínicos, cinco metilenos e quatro grupos metilas. Em relação aos carbonos, três são ligados provavelmente a oxigênio ou halogênio em δ 66,9 (CH), 70,8 (Cq) e 73,9 (Cq), e 70,8 (Cq) e dois são olefínicos em δ 124,3 (CH) e 132,1 (Cq).

O espectro ^1H RMN apresentou sinal em δ 4,50 ppm (1H, dd, $J = 2,4; 3,1$ Hz) com deslocamento químico característico de grupamento CH ligado a halogênio e quatro metilas em δ 1,12, 1,60, 1,65 e 1,90. O espectro de massas apresentou os picos de maior massas em m/z 319/321/323 com razão 3:4:1 o que sugere a presença de um grupo bromo e um cloro na molécula. O pico base em m/z 109 sugere a perda do anel B com os grupamentos bromo e cloro e perda de água, sugerindo a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{BrClO}$, em que o íon molecular esperado em m/z 337/339/341 não foi detectado (**Figura 119**). O espectro de massas de alta resolução (observado e calculado) confirmou a fórmula molecular proposta.

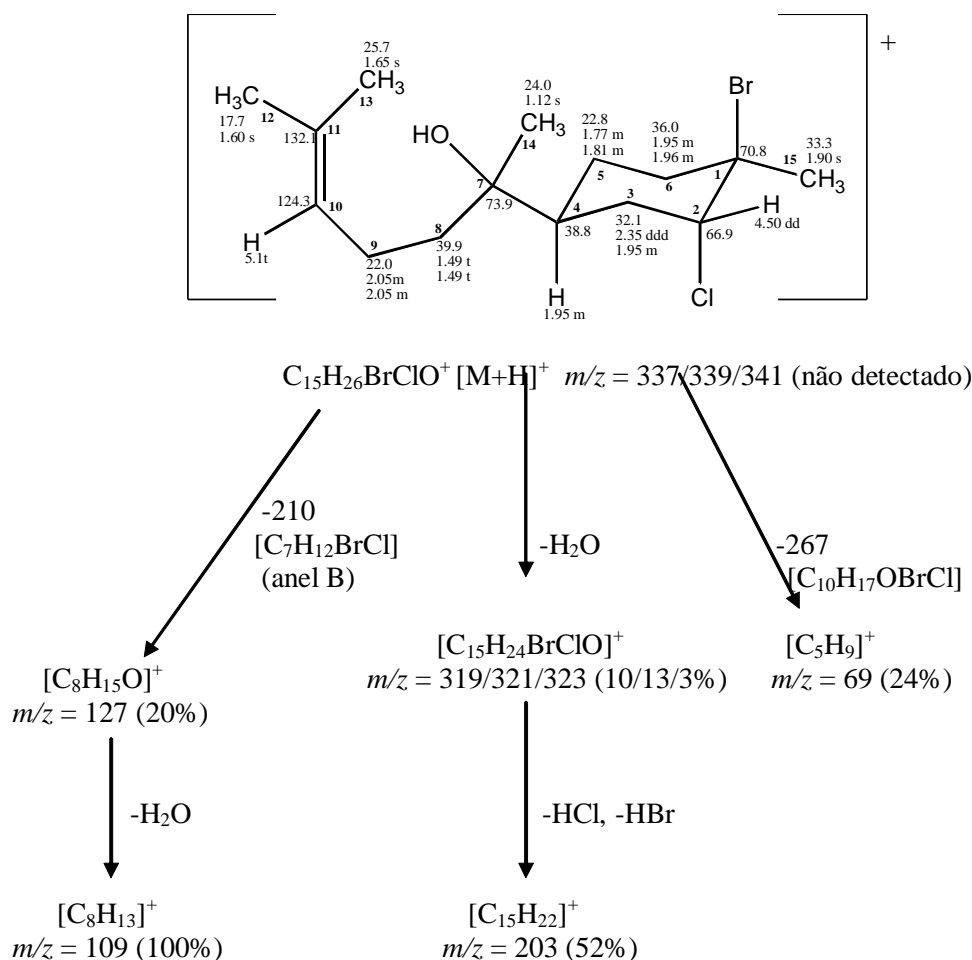


Figura 119: Fragmentação observada no espectro de massas por ionização química do composto **16**.

Os deslocamentos químicos da metila em δ 1,9, do carbono halometino em δ 66,9 e do carbono quaternário em δ 70,8 confirmam que a estrutura no anel B é semelhante ao do isocaespitol. A conectividade no anel foi estabelecida com base nas correlações ^1H - ^1H COSY e HMBC. Já para cadeia restante, a posição dos carbonos olefínicos é demonstrada pelas correlações HMBC entre o carbono em δ 132,1 com o hidrogênio em δ 1,60 e do carbono em δ 124,3 com os hidrogênios em δ 1,60 e 2,05 (**Figura 120**).

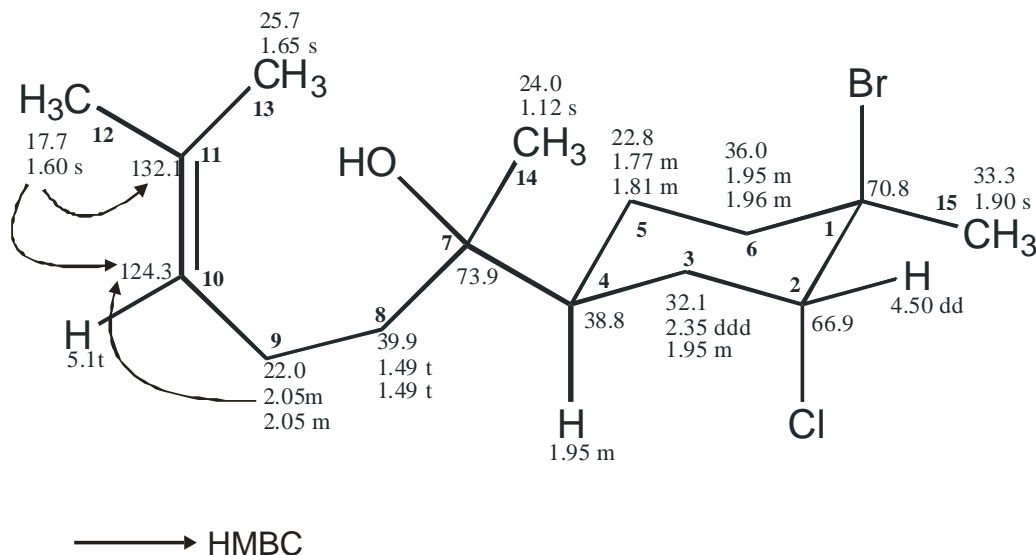


Figura 120: Estrutura do composto **16** com correlações HMBC.

De acordo com os dados apresentados, o composto **16** é um derivado do isocaespitol, descrito primeiramente para *Laurencia catarinensis*. A atividade ótica observada é $[\alpha]_D = -46,0^\circ$ (0,33, CHCl_3).

Quadro 16: Dados de ^1H e ^{13}C do composto **16** (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0).

C	δ C (HSQC/HMBC)	δ H (J Hz)
1 C	70,8	
2 CH	66,9	4,50 s
3 CH ₂	32,1	2,35 ddd (2,8; 13,2; 13,2) 1,95 m
4 CH	38,8	1,95 m
5 CH	22,8	1,77 m 2,0 m
6 CH ₂	36,0	1,95 m 1,47 m
7 C	77,6	
8 CH ₂	39,8	1,49 t
9 CH ₂	22,0	2,05 m
10 CH	124,3	5,1 t (7,3)
11 C	132,1	
12 CH ₃	17,7	1,60 s
13 CH ₃	25,7	1,65 s
14 CH ₃	24,0	1,12 s
15 CH ₃	33,3	1,90 s

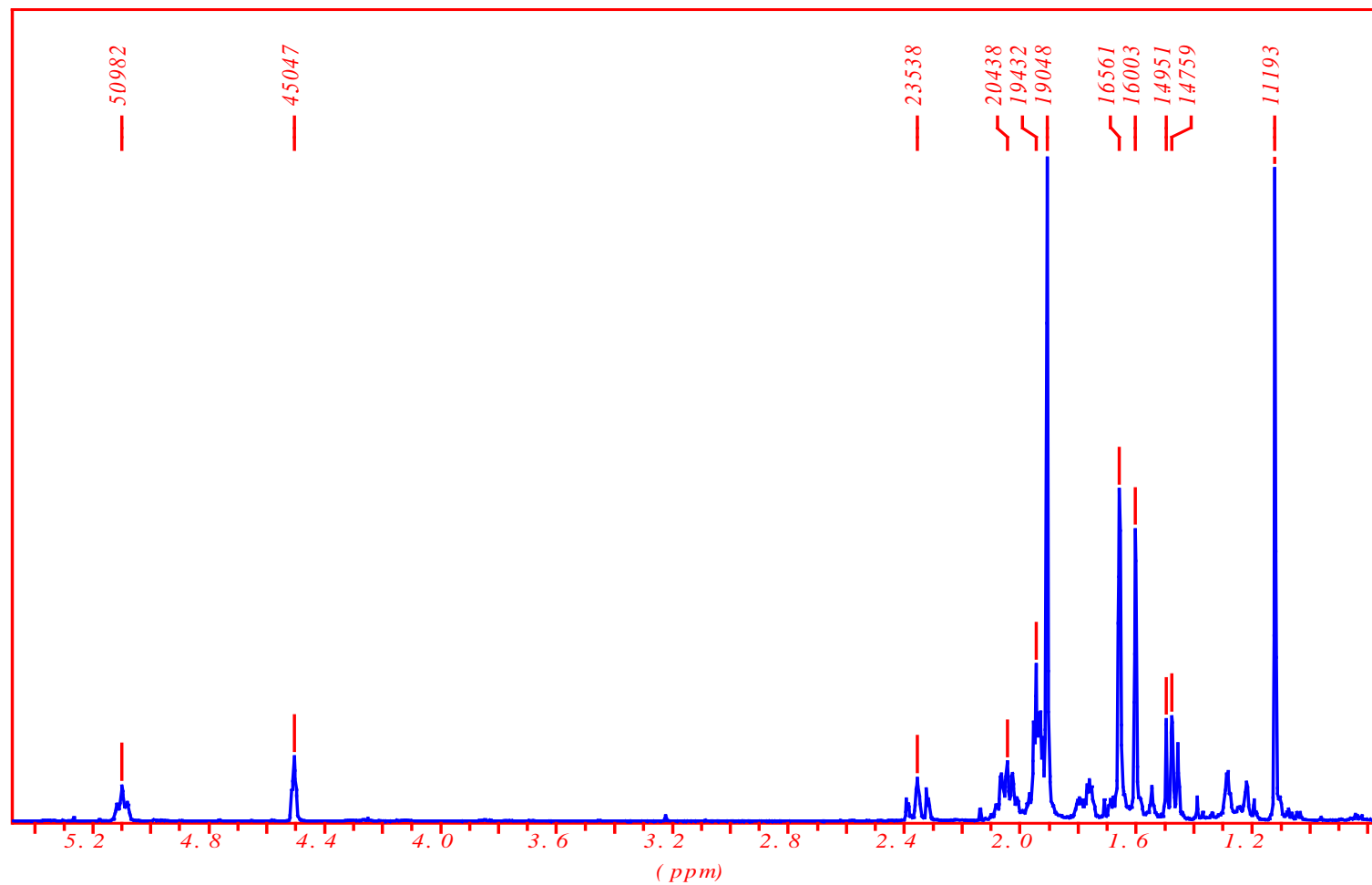


Figura 121: Espectro de ¹H RMN do composto 16 (LC14) em CDCl₃ (400 MHz).

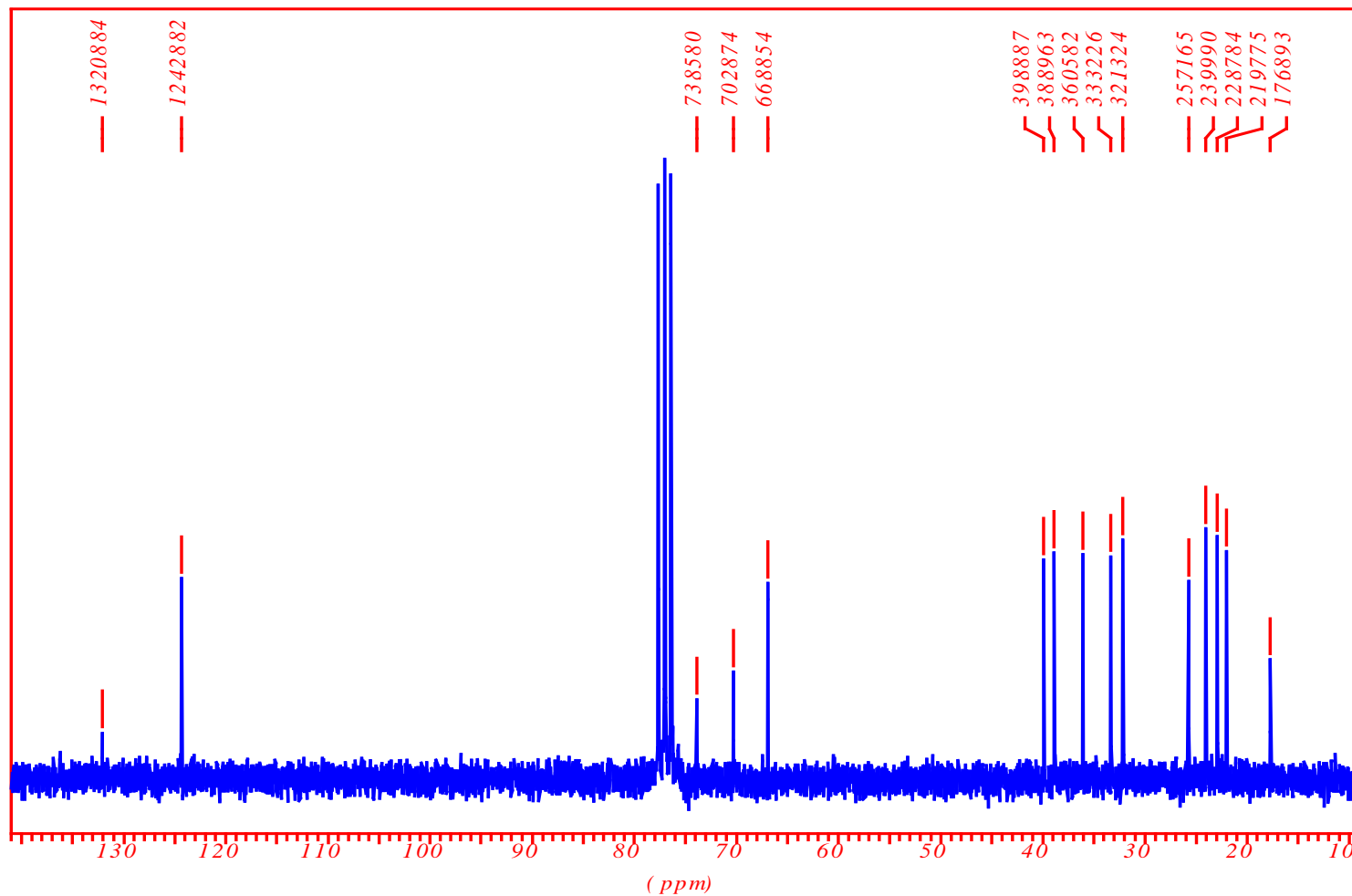


Figura 122: Espectro de ^{13}C RMN do composto 16 (LC14) em CDCl_3 (50 MHz).

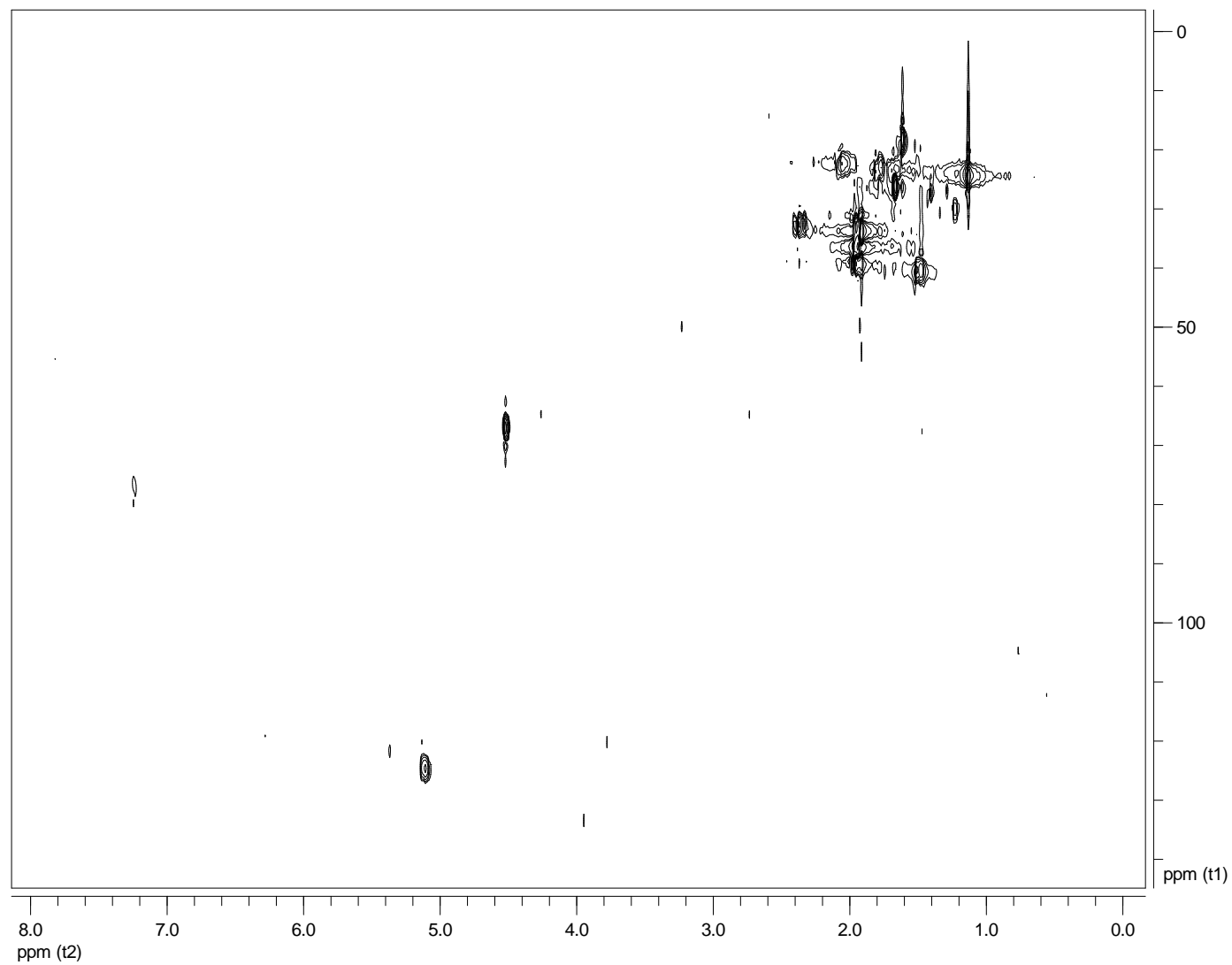


Figura 123: Espectro HSQC-DEPT do composto 16 (LC14) em CDCl₃ (400 MHz).

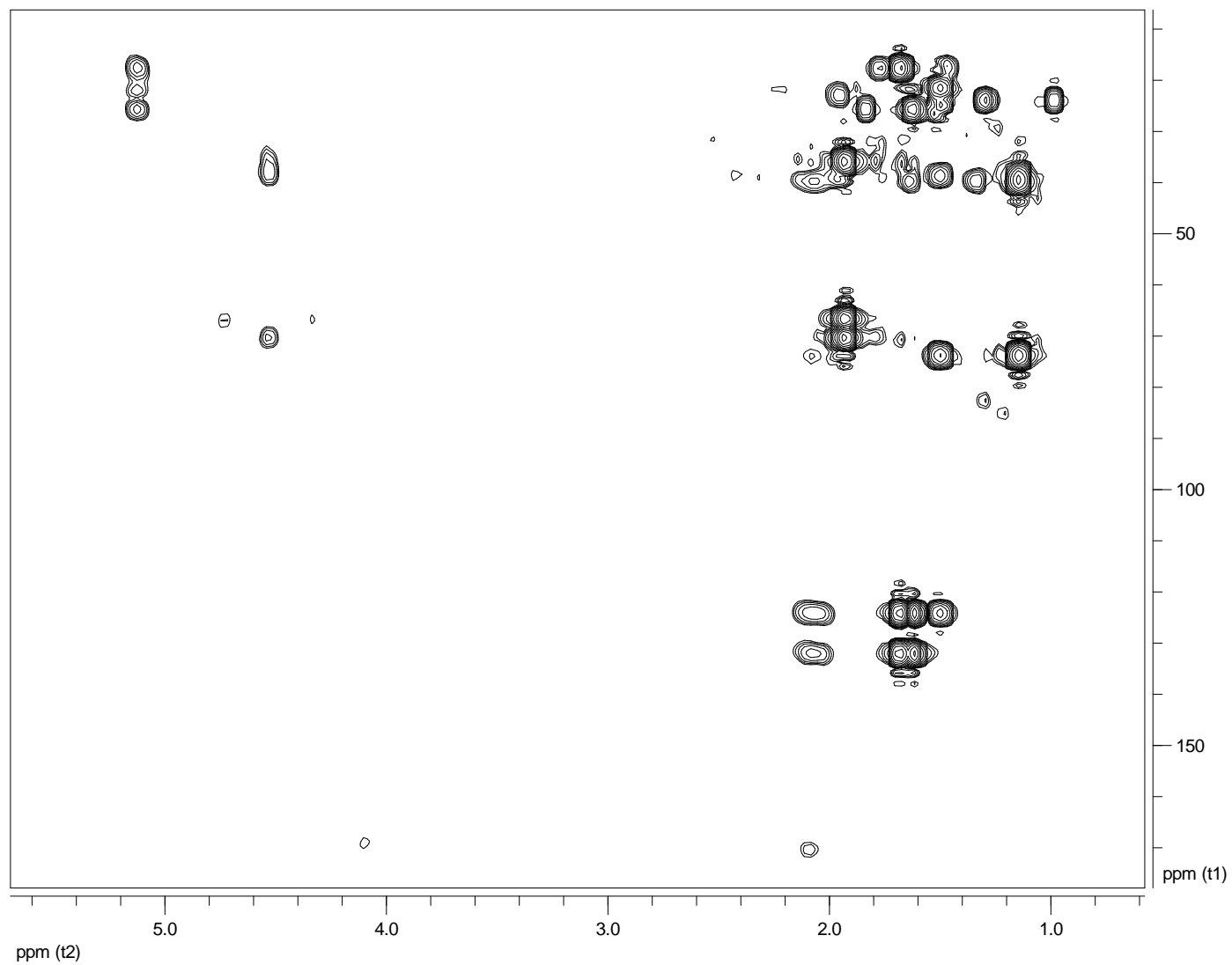


Figura 124: Espectro HMBC do composto 16 (LC14) em CDCl_3 (400 MHz).

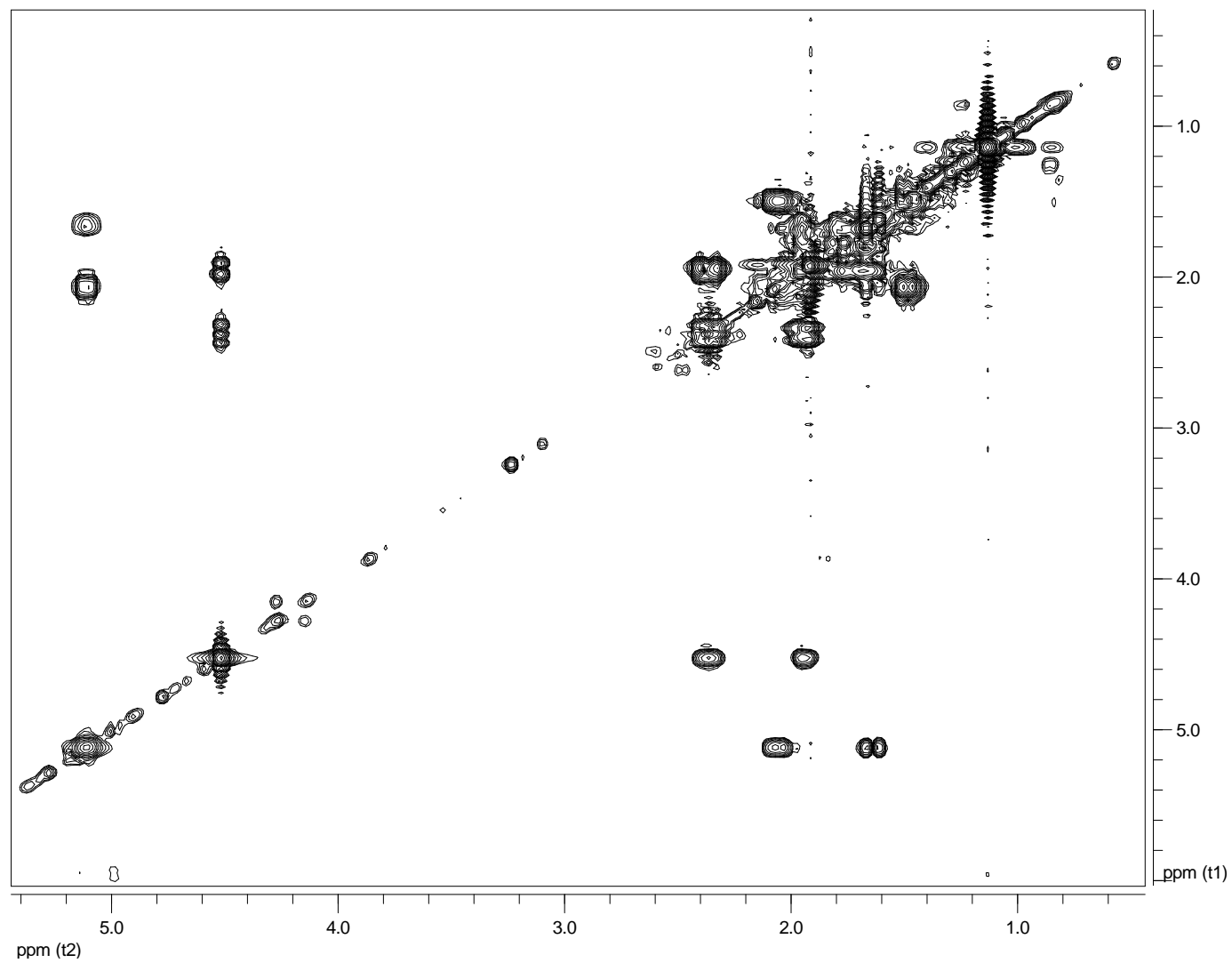


Figura 125: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto 16 (LC14) em CDCl_3 (400 MHz).

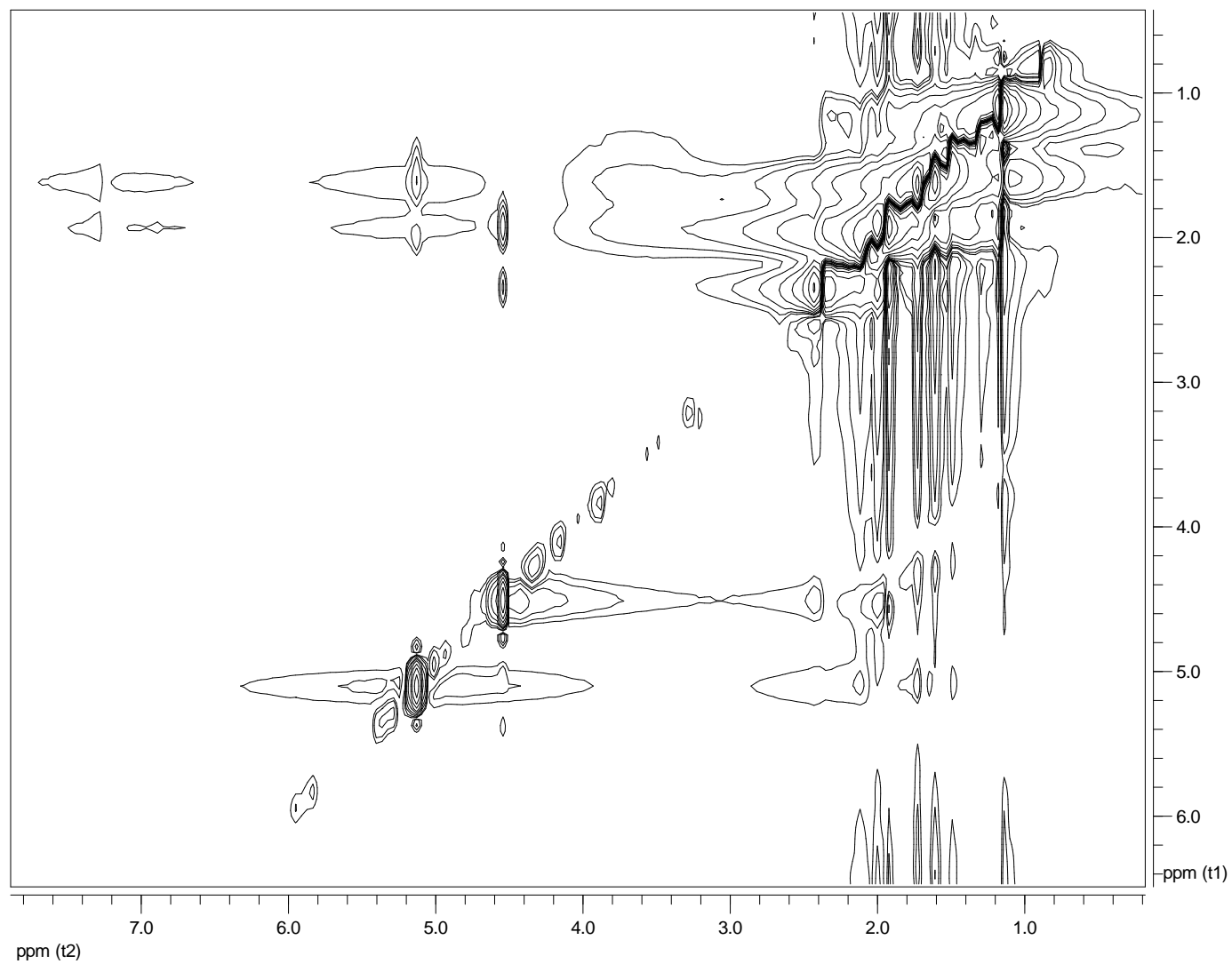


Figura 126: Espectro NOE do composto 16 (LC14) em CDCl_3 (400 MHz).

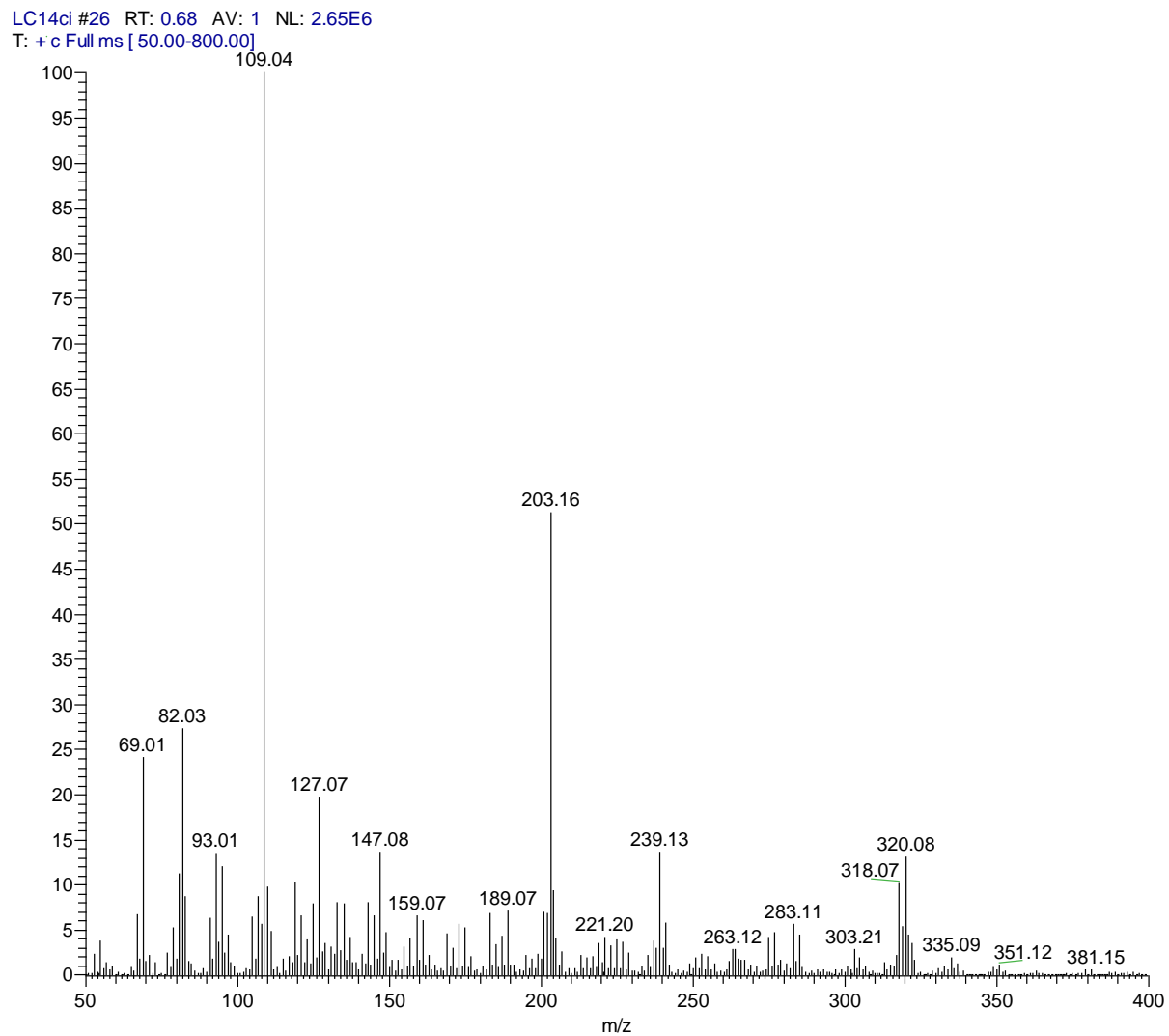
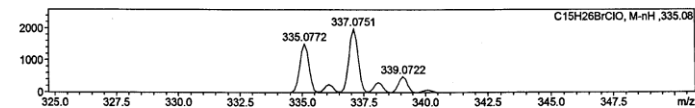
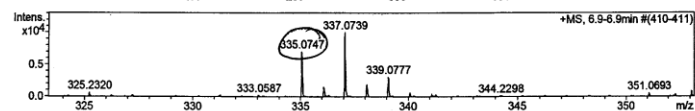
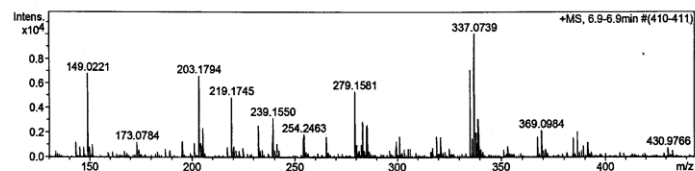
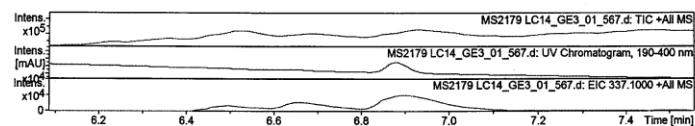


Figura 127: Espectro de massas por ionização química do composto 16 (LC14).

Mass Spectrometry & Proteomics Facility **Mass Spectrum SmartFormula Report**

Analysis Info
 Analysis Name D:\Data\061909\MS2179 LC14_GE3_01_567.d Acquisition Date 6/19/2009 3:38:18 PM
 Method lcms_h2ograd.m Operator Nonka Sevova
 Sample Name MS2179 LC14 Instrument / Ser# microTOF-Q 10195
 Comment

Acquisition Parameter
 Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 3.0 Bar
 Focus Not active Set Capillary 4500 V Set Dry Heater 200 °C
 Scan Begin 50 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Dry Gas 4.0 l/min
 Scan End 3000 m/z Set Collision Cell RF 150.0 Vpp Set Divert Valve Source



Meas. m/z	#	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdB	N-Rule	e ⁻	Conf
335.0747	1	C ₁₅ H ₂₅ BrClO	335.0772	7.6	-1.9	2.5	ok	even	

335.0747 [M-H]⁺, calcd for C₁₅H₂₅BrClO 335.0777

Figura 128: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto 16 (LC14).

- Composto 17:

O composto **17 (LC25)** (1,7 mg) foi isolado após purificação por CLAE de uma fração obtida durante o processo de fracionamento (**Figura 1**) como um líquido incolor e inodoro. O espectro de ^{13}C RMN e experimento HSQC-DEPT demonstraram claramente 14 carbonos, dois carbonos quaternários, três carbonos metínicos, cinco metilênicos e quatro grupos metilas. Através de experimentos de HMBC foi possível observar a presença de mais um carbono quaternário. Em relação a estes carbonos, três apresentam deslocamentos compatíveis aos carbonos ligados a oxigênio ou halogênio em δ 63,5 (CH), 71,8 (Cq) e 73,2 (Cq) e dois são olefínicos em δ 123,9 (CH) e 132,7 (Cq).

O espectro de ^1H RMN apresentou sinal em δ 4,30 (1H, dd, $J=4,4$; 12,6 Hz) com deslocamento característico de grupamento CH ligado a halogênio em um anel, tal como observado no anel B do caespitol. O espectro de correlação ^1H - ^1H COSY mostrou um sistema de spins $\text{CH}_{\text{ax}}\text{CH}_2\text{CH}_{\text{ax}}$, com a alta constante de acoplamento entre os hidrogênios em δ 4,30 e 1,35 ($J= 12,6$ Hz). Adicionalmente, o deslocamento do carbono metínico em δ 63,5, do carbono quaternário em δ 71,8 e da metila ressonando em δ 1,67 demonstram a presença de um anel ciclohexano com bromo e cloro semelhante ao caespitol (**Figura 129**).

Para a cadeia restante, a posição dos carbonos olefínicos é demonstrada pelas correlações HMBC entre o carbono em δ 132,7 com os hidrogênios em δ 1,60 e 1,67 e do carbono em δ 123,9 com os hidrogênios em δ 1,60, 1,67 e 1,46. A conectividade dos carbonos foi estabelecida com base nas correlações ^1H - ^1H COSY e HMBC (**Figura 129**).

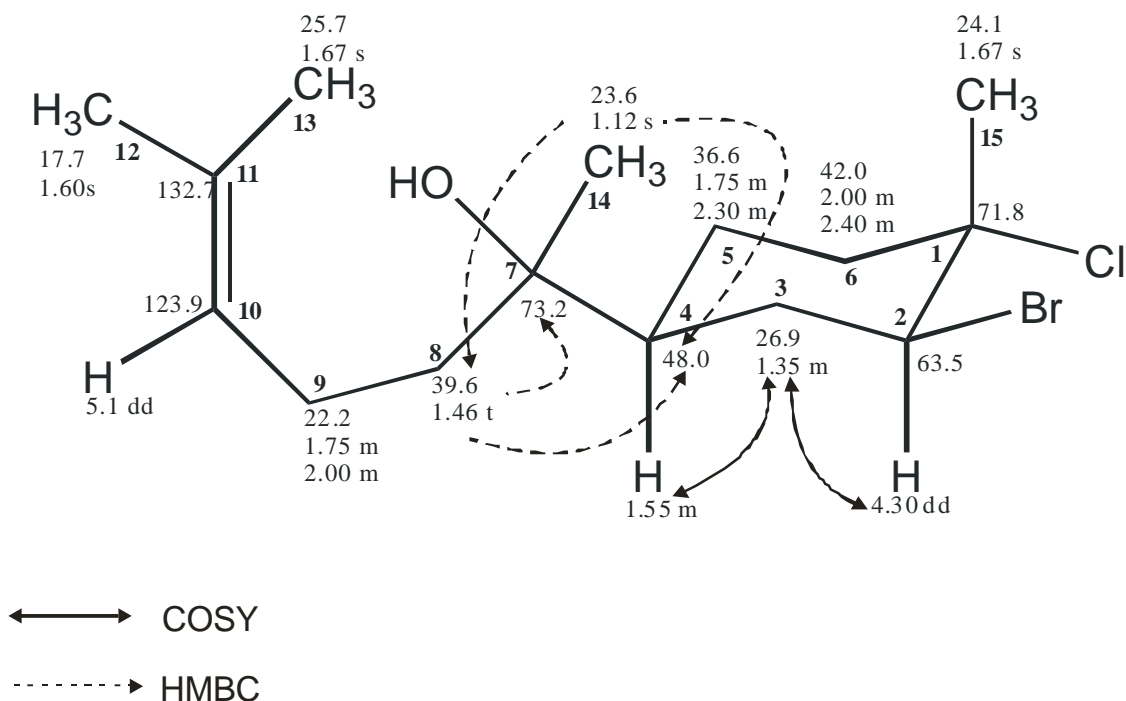


Figura 129: Estrutura do composto **17** com correlações ^1H - ^1H COSY e HMBC.

De acordo com os dados apresentados, o composto **17** é um derivado do caespitol, provavelmente um produto de degradação, descrito primeiramente para *Laurencia catarinensis*.

Quadro 17: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 17 (400 e 50 MHz; CDCl_3 H= 7,24 e C=77,0).

C (multiplicidade)	δ C (HSQC/HMBC)	δ H (J Hz)
1 C	71,8	-
2 CH	63,09	4,3 0 dd (4,4; 12,6)
3 CH ₂	26,9	1,35 m
4 CH	48,0	1,55 m
5 CH	36,6	1,75 m 2,30 m
6 CH ₂	42,0	2,00 m 2,40 m
7 C	73,2	-
8 CH ₂	39,6	1,46 t
9 CH ₂	22,2	1,75 m 2,00 m
10 CH	123,9	5,10 dd (7,1; 14,4)
11 C	132,7	-
12 CH ₃	17,7	1,60 s
13 CH ₃	25,7	1,67 s
14 CH ₃	23,6	1,12 s
15 CH ₃	24,1	1,67 s

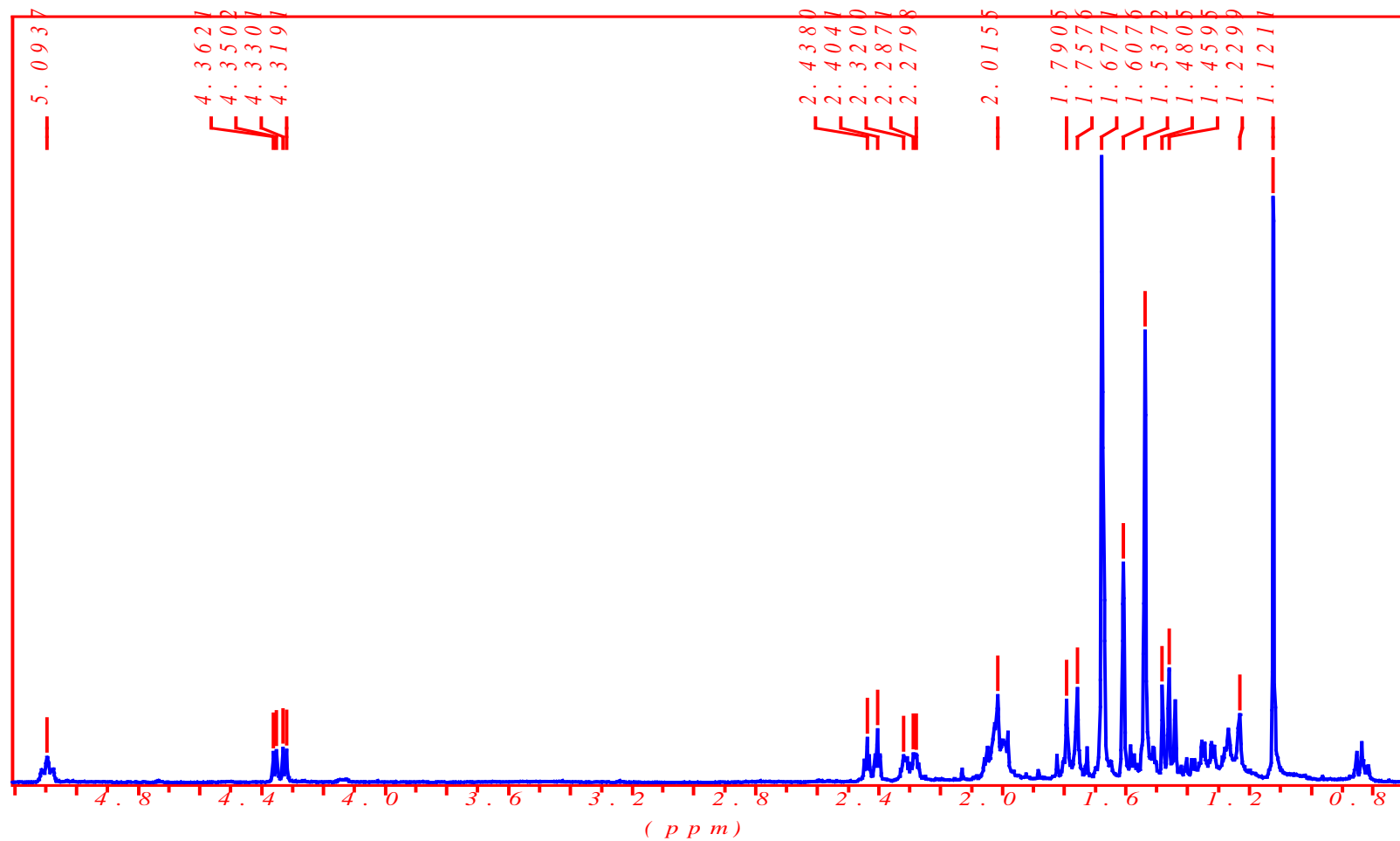


Figura 130: Espectro de ¹H RMN do composto 17 (LC25) em CDCl₃ (400 MHz).

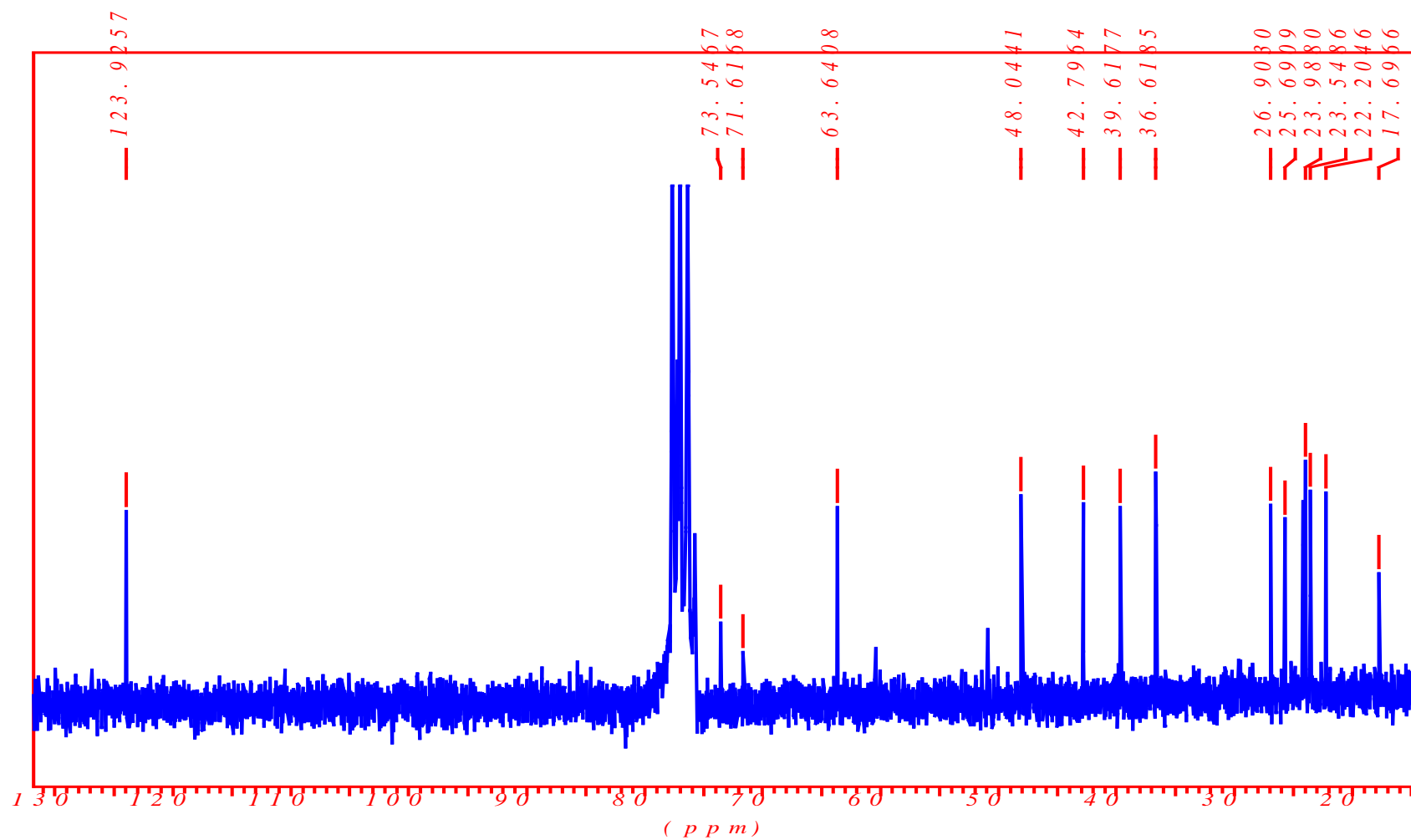


Figura 131: Espectro de ^{13}C RMN do composto 17 (LC25) em CDCl_3 (50 MHz).

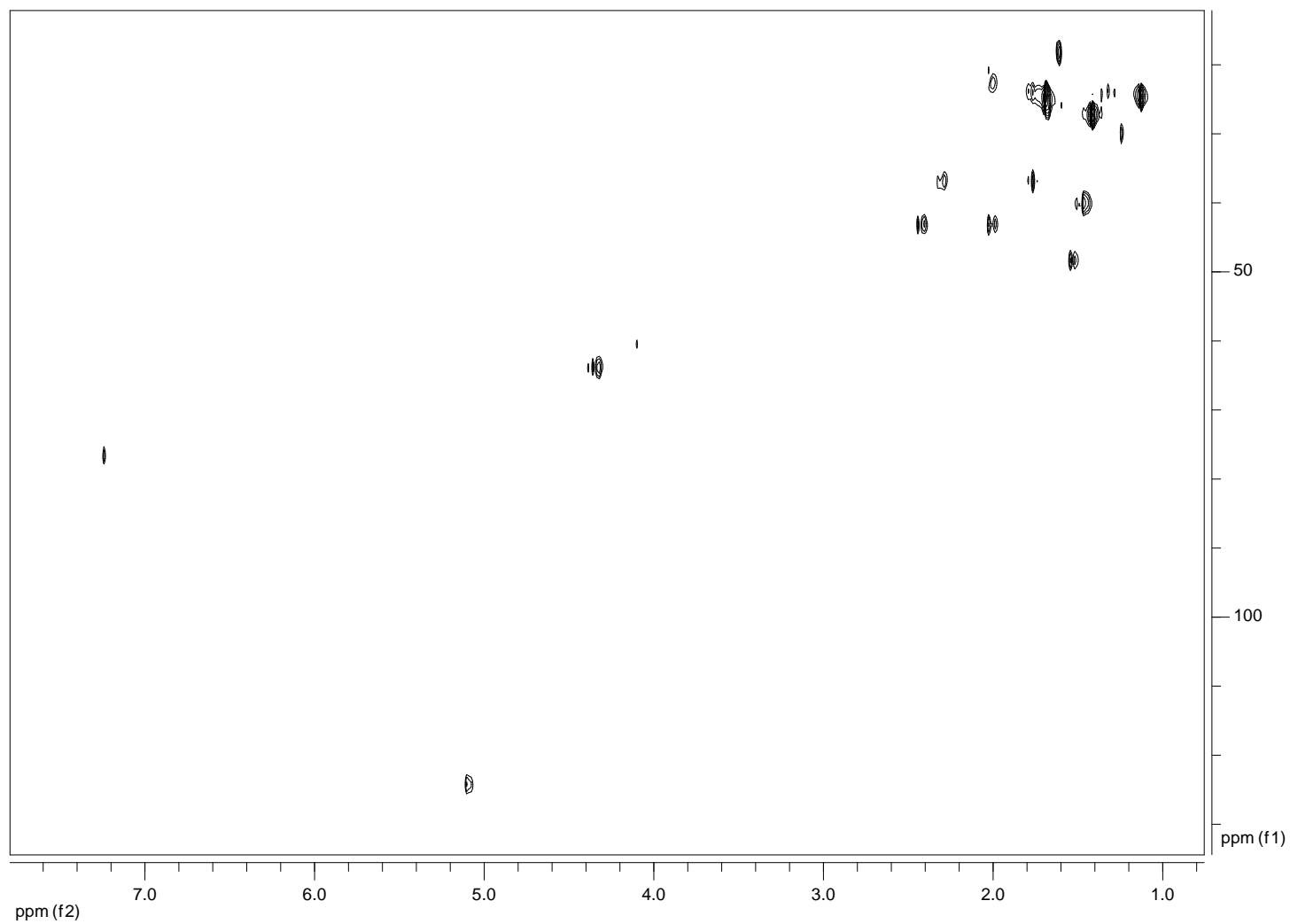


Figura 132: Espectro de HSQC-DEPT do composto 17 (LC25) em CDCl_3 (400 MHz).

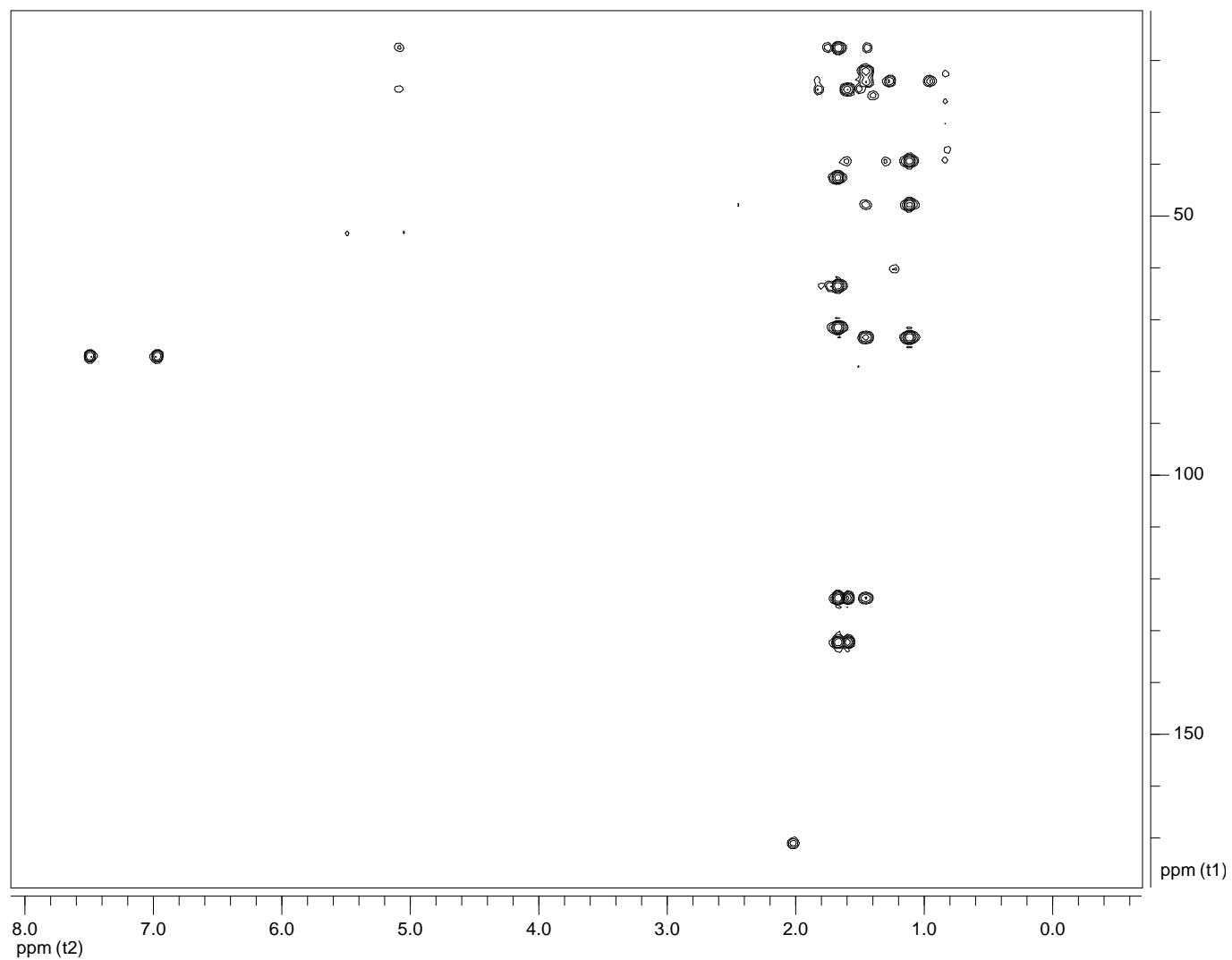


Figura 133: Espectro de HMBC do composto 17 (LC25) em CDCl_3 (400 MHz).

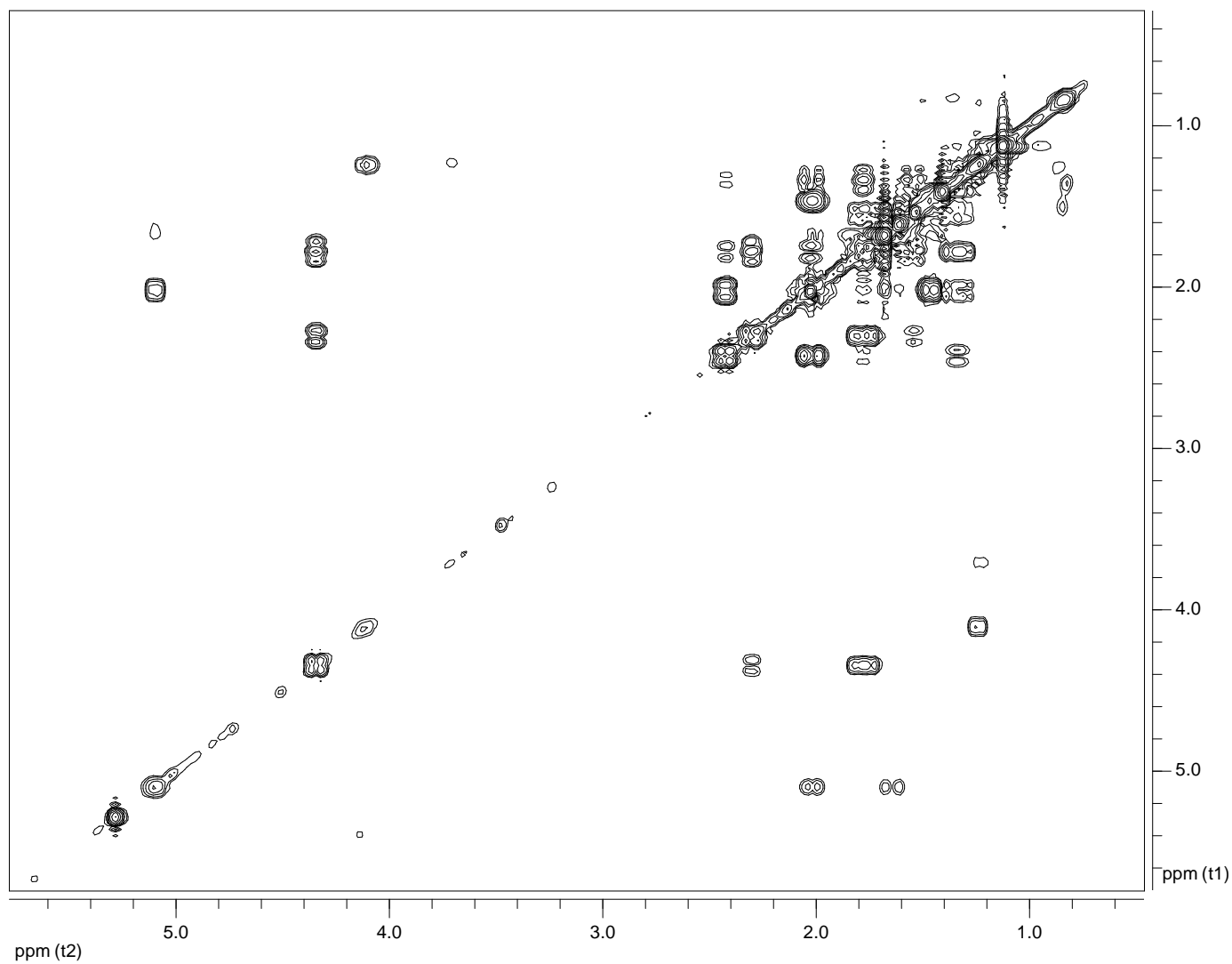


Figura 134: Espectro de ^1H - ^1H COSY do composto 17 (LC25) em CDCl_3 (400 MHz).

J=5,9; 11,7 Hz) indica que este está na posição axial. A análise detalhada do espectro de correlação ^1H - ^1H COSY mostra a presença de um sistema de spins semelhante ao anel B do caespitol, com a constante de acoplamento alta entre os hidrogênios em δ 4,31 e 2,09 (J=7,8 Hz), o deslocamento químico do grupo metino em δ 58,0, do carbono quaternário em δ 70,8 e da metila ressonando em δ 1,76, indicam que este sistema de spins está inserido em um anel ciclohexano com bromo e cloro e com relação diequatorial entre os halogênios (**Figura 136**).

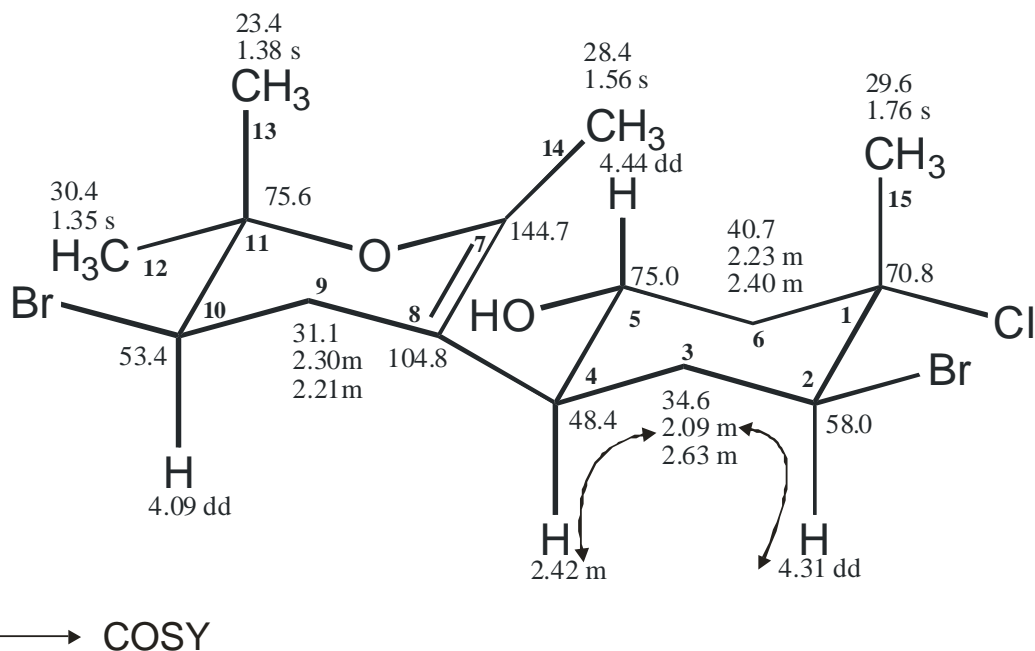


Figura 136: Estrutura do composto **18** com correlações ^1H - ^1H COSY.

A configuração relativa do outro centro assimétrico (anel A) foi proposta baseada na constante de acoplamento alta entre os hidrogênios em δ 4,09 e 2,30 (J= 11,2 Hz) indicando a posição axial do mesmo e posição equatorial do bromo no anel.

Este conjunto de dados sugere para o composto **18** uma estrutura semelhante ao laucapiranóide A (composto 9) com uma hidroxila adicional em C5, um composto novo.

Quadro 18: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 18 (400 e 50 MHz; CDCl_3 , H= 7,24 e C=77,0).

C	δ C (HSQC/HMBC)	δ H (J Hz)
1 C	70,8	-
2 CH	58,0	4,31 dd (4,3;7,8)
3 CH ₂	34,6	2,09 m 2,63 m
4 CH	48,4	2,42 m
5 CH	75,0	4,44 dd (5,9, 11,7)
6 CH ₂	40,7	2,23 m 2,40 m
7 C	144,7	-
8 C	104,8	-
9 CH ₂	31,1	2,30 m 2,21 m
10 CH	53,4	4,09 dd (4,0; 11,2)
11 C	75,6	-
12 CH ₃	30,4	1,35 s
13 CH ₃	23,4	1,38 s
14 CH ₃	28,4	1,56 s
15 CH ₃	29,6	1,76 s

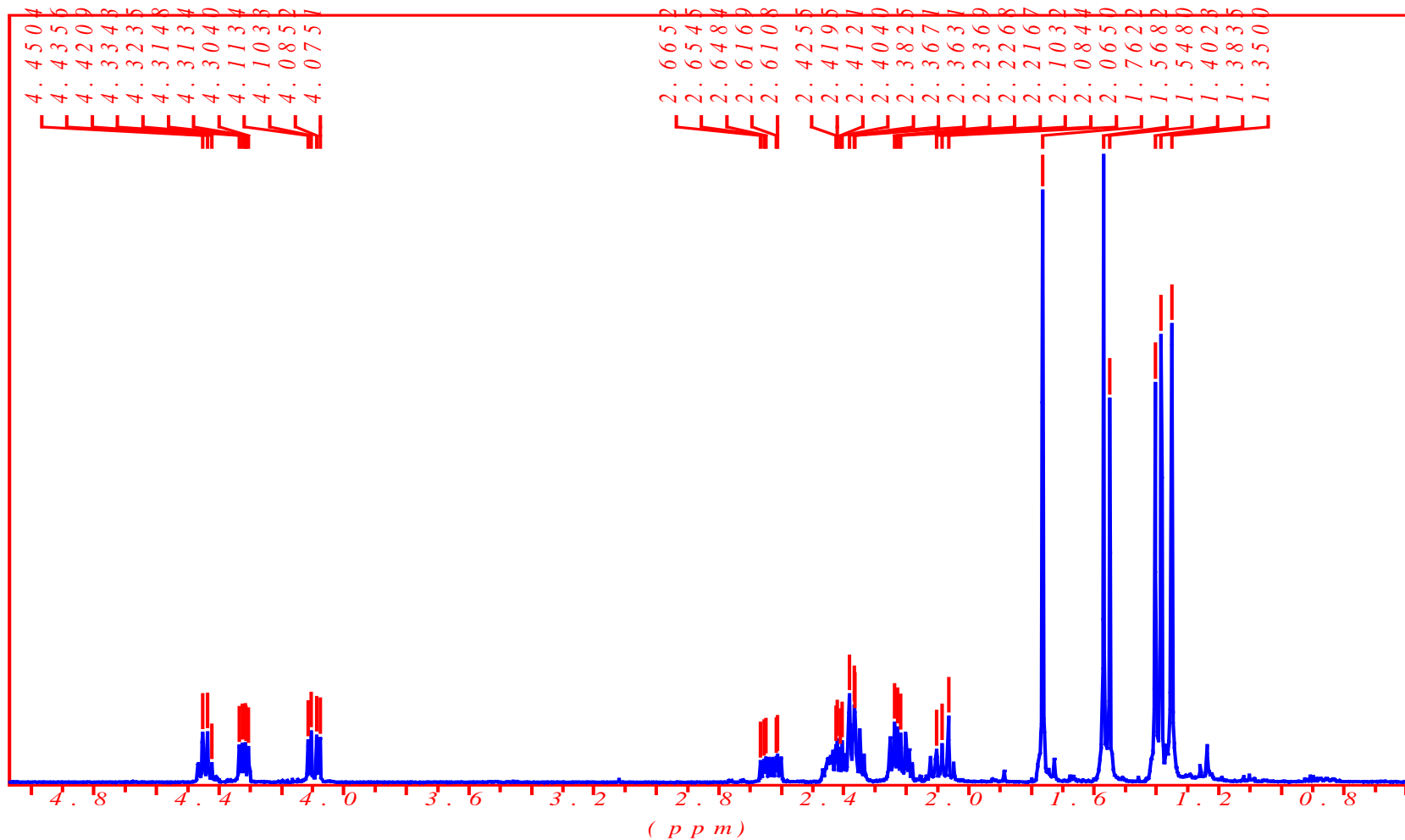


Figura 137: Espectro de ¹H RMN do composto 18 (LC12) em CDCl₃ (400 MHz).

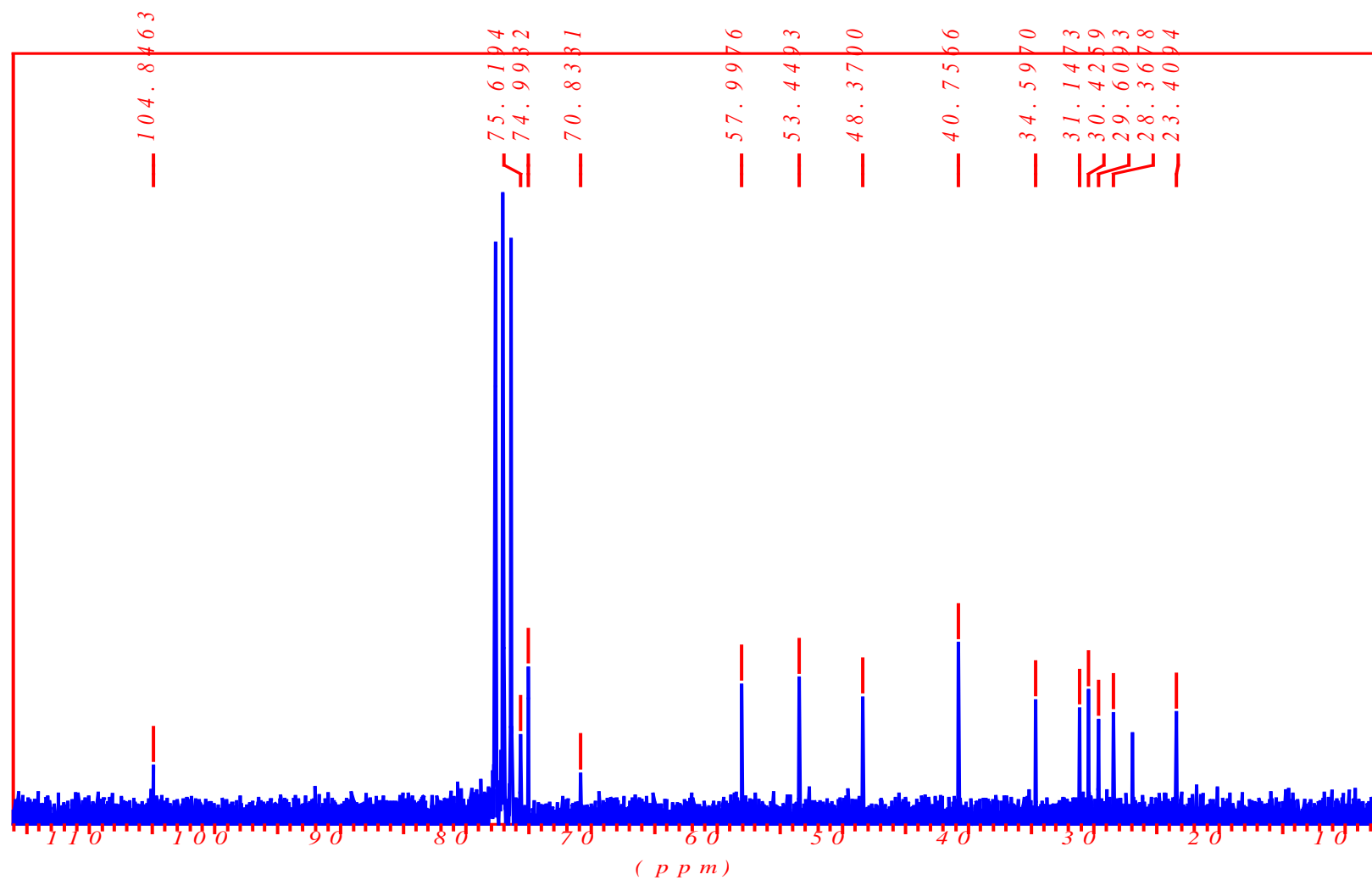


Figura 138: Espectro de ^{13}C RMN do composto 18 (LC12) em CDCl_3 (50 MHz).

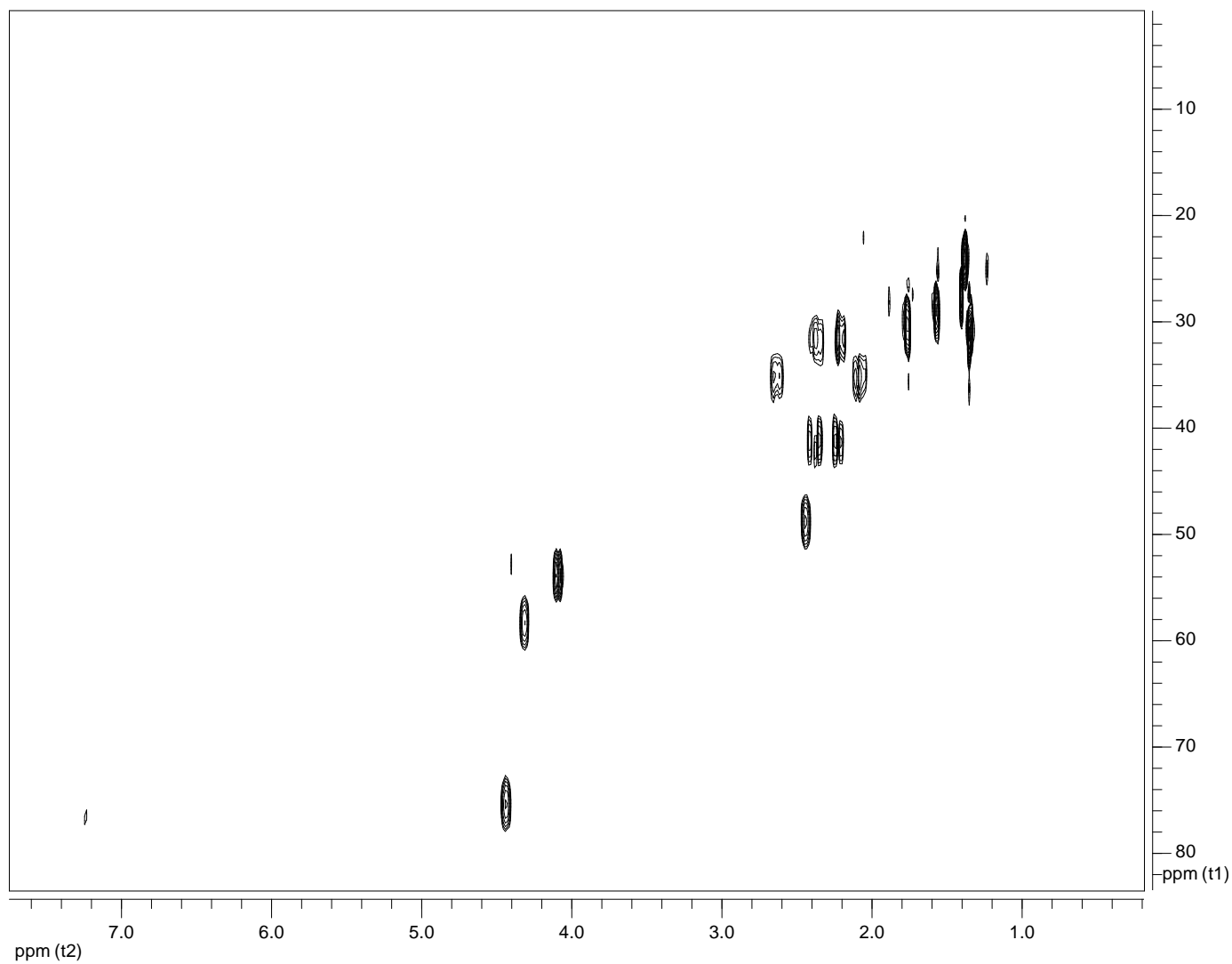


Figura 139: Espectro de HSQC-DEPT do composto 18 (LC12) em CDCl₃ (400 MHz).

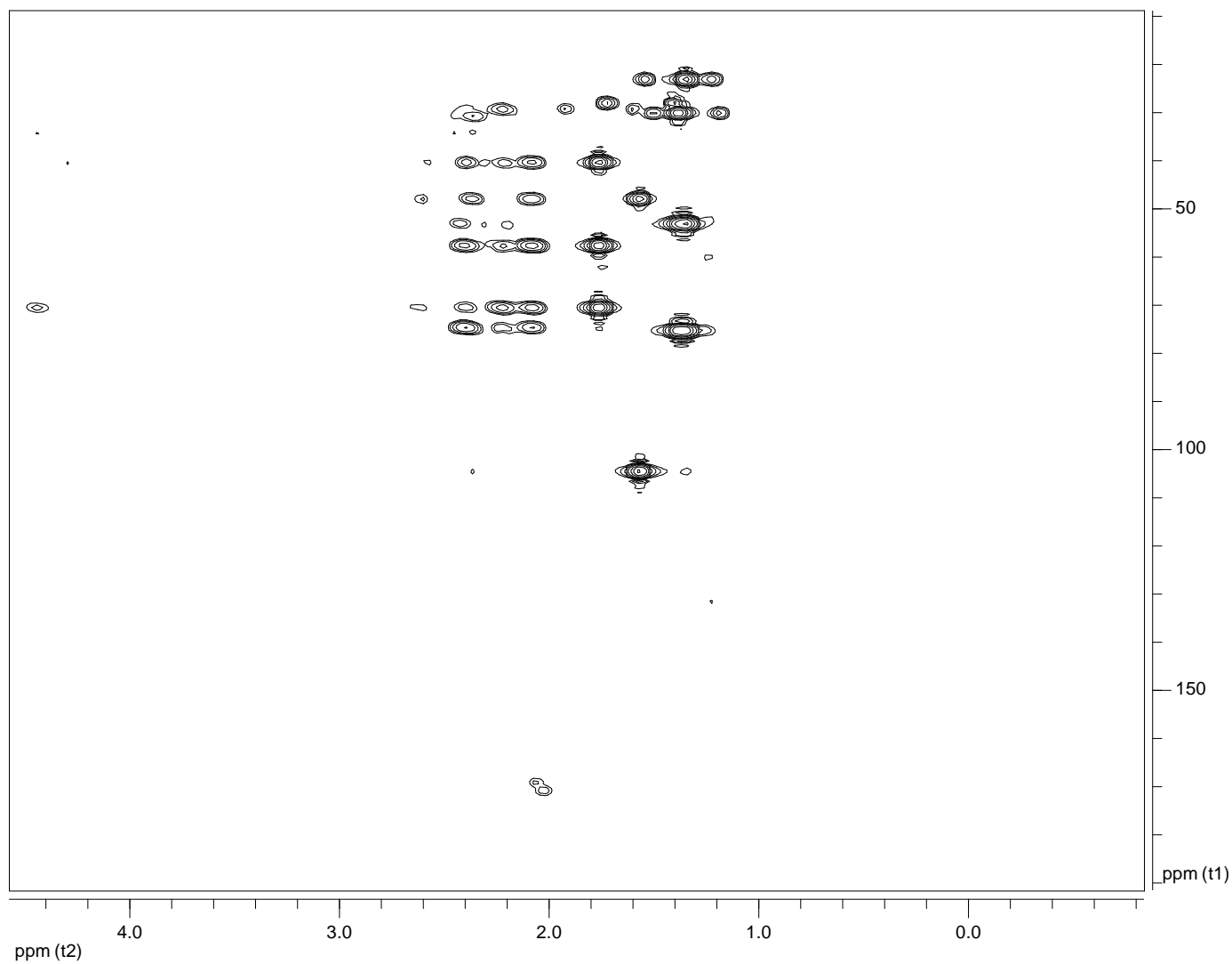


Figura 140: Espectro de HMBC do composto 18 (LC12) em CDCl₃ (400 MHz).

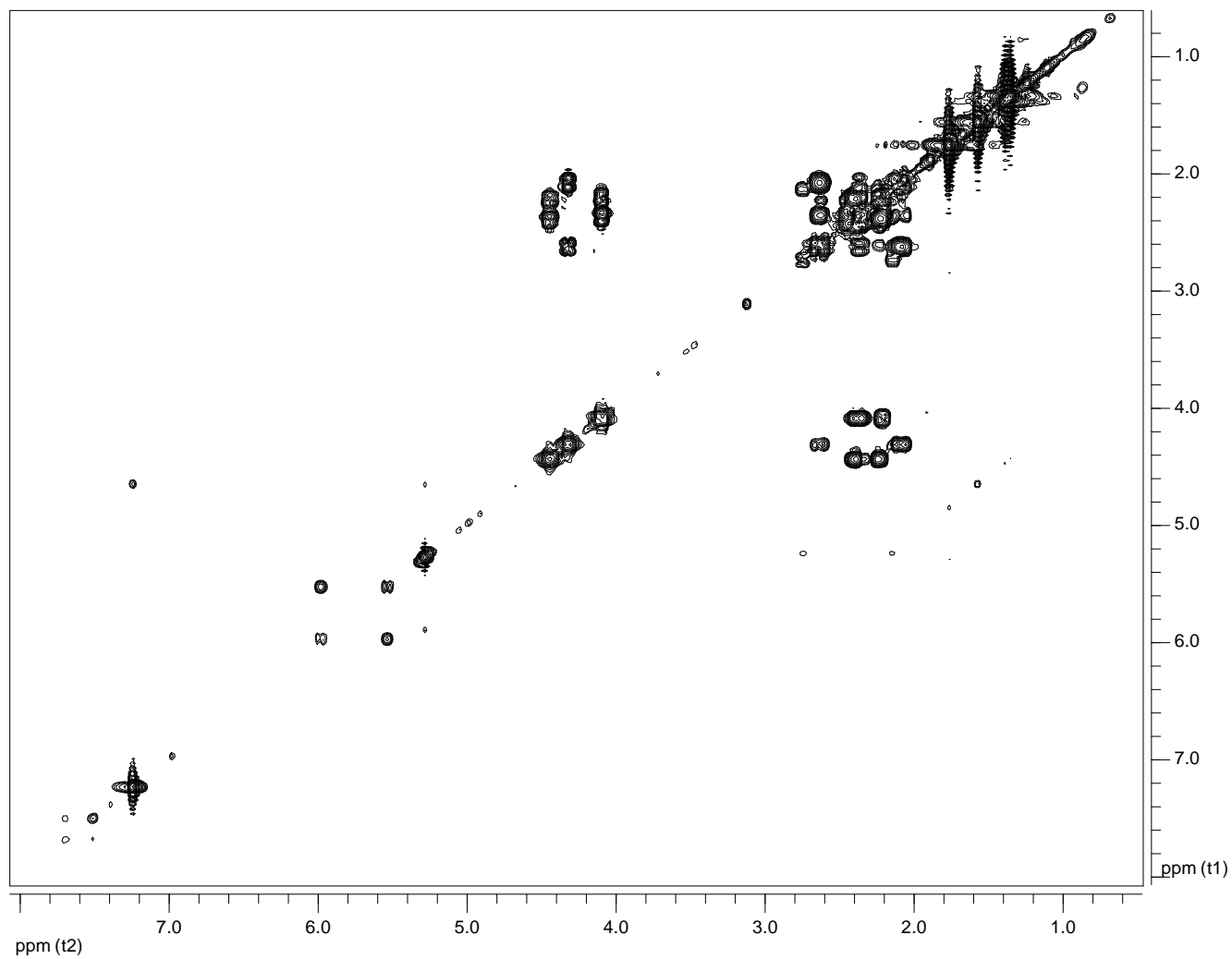


Figura 141: Espectro de ^1H - ^1H COSY do composto 18 (LC12) em CDCl_3 (400 MHz).

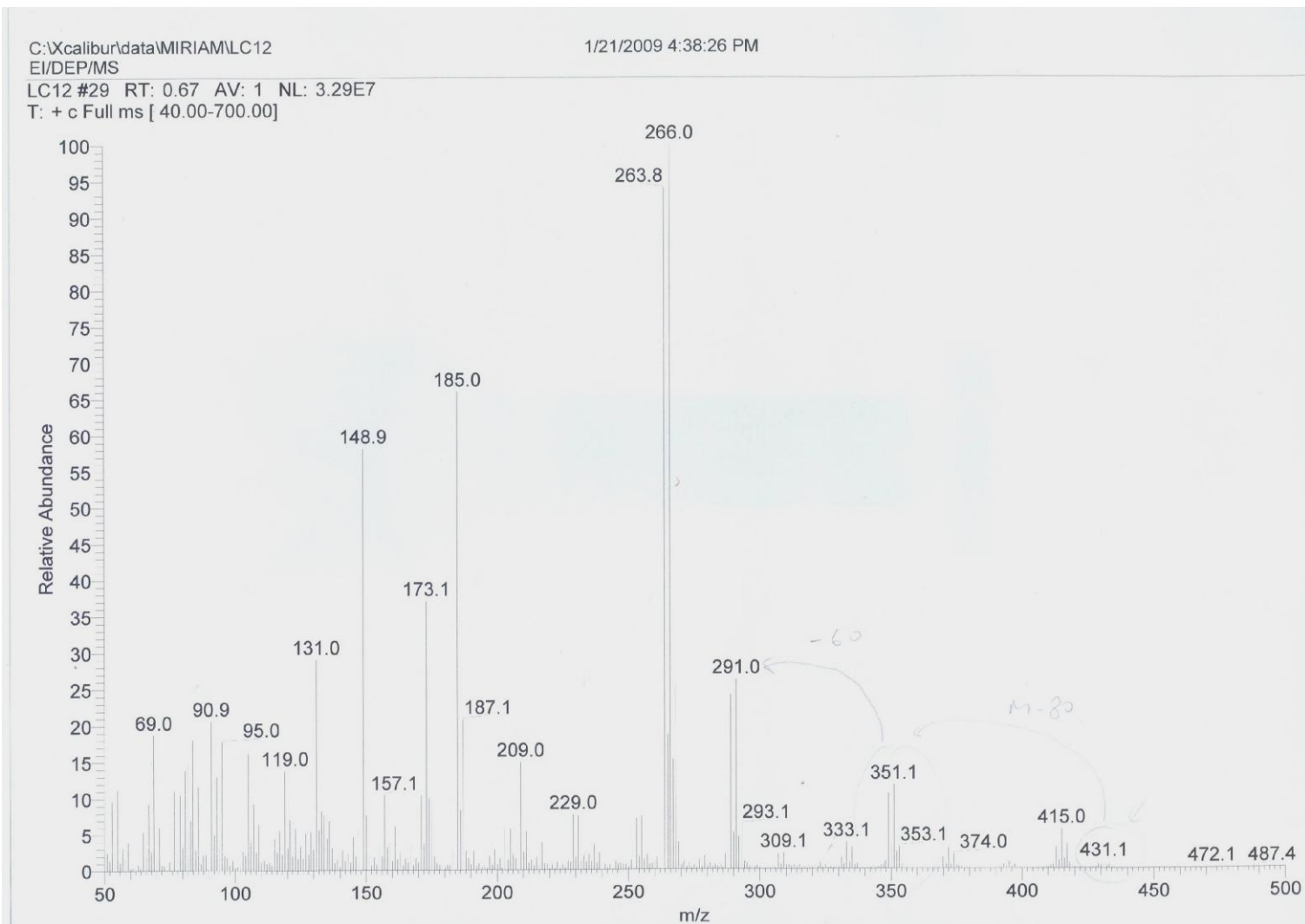


Figura 142: Espectro de massas por ionização eletrônica do composto 18 (LC12).

- Composto 19:

O composto **19** (**LC24**) (0,9 mg) foi isolado como um líquido incolor e indolor após purificação por CLAE de uma fração obtida durante o processo de fracionamento (**Figura 1**). O espectro de massas apresentou os picos de maiores massas em m/z 305/307/309 com razão 3:4:1, diferente do observado com outros compostos derivados do caespitol, o que sugere a presença de um grupo cloro e um bromo na molécula. Observa-se fragmentos em m/z 225/227 correspondente a M-HBr e seguida de uma eliminação de HCl que resulta em um pico em m/z 189 (**Figura 143**).

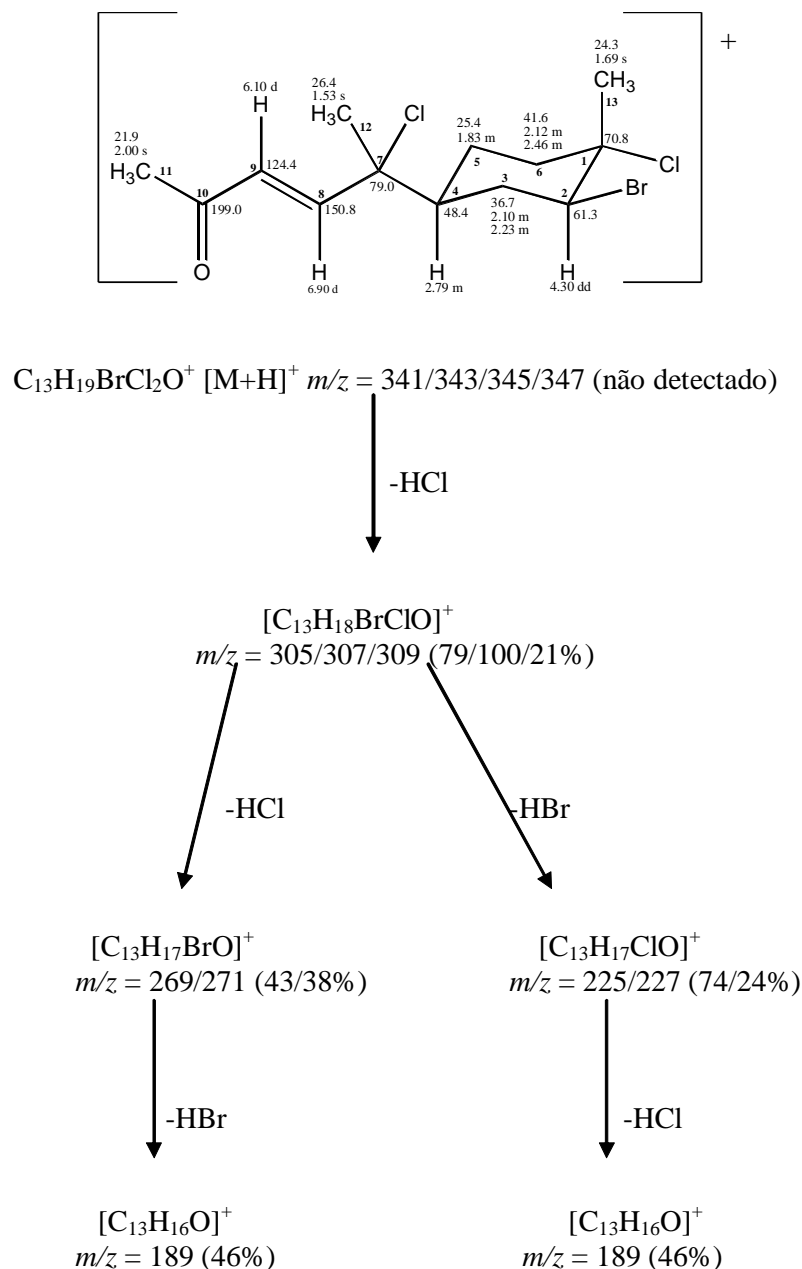


Figura 143: Fragmentação proposta através do espectro de massas por ionização química do composto **19**.

O espectro de ^{13}C RMN e experimento HSQC-DEPT indicaram a presença de 13 carbonos, sendo três carbonos quaternários, quatro metínicos, três metilenos e três metilas.

Adicionalmente, o experimento de correlação HMBC mostrou a presença de mais um carbono quaternário. Em relação a estes carbonos, três são carbonos tipicamente ligados a oxigênio ou halogênio em δ 61,3 (CH), 70,8 (Cq) e 79,1 (Cq), um é carbonílico em δ 199,0 (Cq) e dois são olefínicos em δ 124,4 (CH) e 150,8 (CH). Dessa forma, a fórmula molecular proposta é $C_{13}H_{18}BrCl_2O$, em que o íon molecular esperado em m/z 340/342/344/346 não foi detectado. De acordo com o grau de insaturação, o composto **19** apresenta um anel, além de um grupo cetônico e uma dupla ligação.

O espectro de 1H RMN apresentou um sinal de hidrogênio compatível com CH ligado a halogênio em δ 4,30 (1H, dd, $J=4,3; 12,4$ Hz), dois hidrogênios ligados a carbonos olefínicos em δ 6,90 (1H, d, $J=16,0$ Hz) e 6,10 (1H, d, $J=16,0$ Hz) e três metilas em δ 1,53, 1,69 e 2,00. Dessa forma, a estrutura do anel é semelhante ao anel B do caespitol, com a presença de um sistema de spins $CH_{ax}CH_2CH_{ax}$, observado no espectro de correlação 1H - 1H COSY (**Figura 144**), com constante de acoplamento alta entre os hidrogênios em δ 4,30 e 2,33 ($J=12,4$ Hz), os deslocamentos químicos dos carbonos metino em δ 61,3 e do carbono quaternário em δ 70,8 e da metila ressonando em δ 1,69.

Para a cadeia restante, a posição dos carbonos olefínicos foi proposta através do experimento de correlação HMBC, onde se observam correlações entre o hidrogênio em δ 6,10 com os carbonos em δ 79,0 e 199,0 e entre o hidrogênio em δ 6,90 com o carbono em δ 199,0 (**Figura 144**).

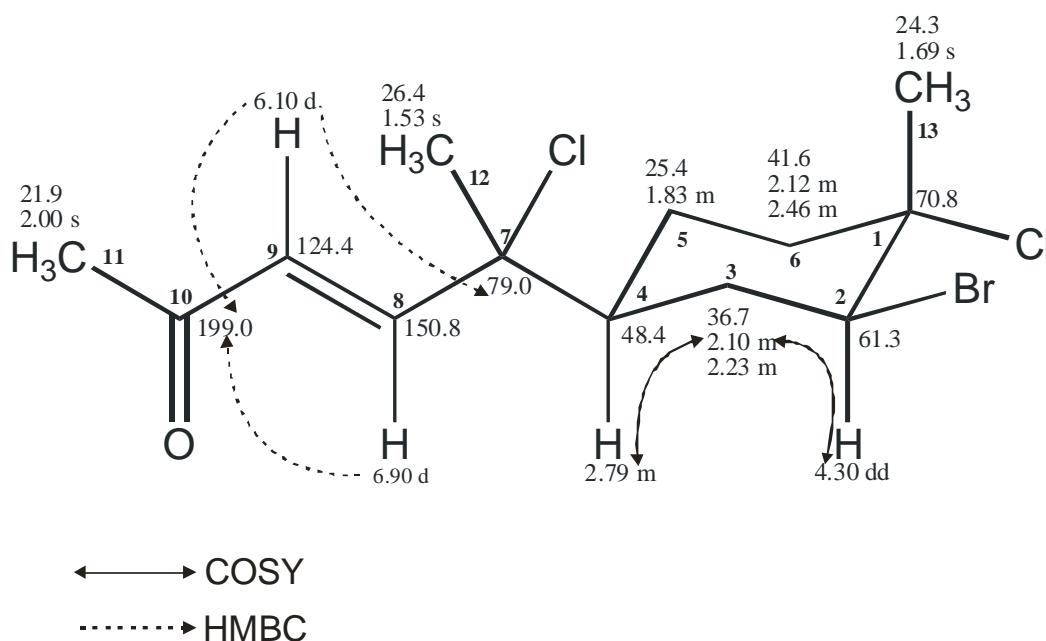


Figura 144: Estrutura do composto **19** com correlações 1H - 1H COSY e HMBC.

Com base nos dados apresentados, sugere que o composto **19** é um derivado do caespitol com a abertura do anel A, descrito primeiramente para *Laurencia catarinensis*.

Quadro 19: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 19 (400 e 50 MHz; CDCl_3 , H= 7,24 e C=77,0).

C (multiplicidade)	δ C (HSQC/HMBC)	δ H (J Hz)
1 C	70,8	-
2 CH	61,3	4,30 dd (4,3; 12,4)
3 CH ₂	36,7	2,10 m 2,38 m
4 CH	48,4	2,78 m
5 CH ₂	25,4	1,83 m
6 CH ₂	41,6	2,12 m 2,46 m
7 C	79,0	-
8 CH	150,8	6,90 d (16,0)
9 CH	124,4	6,10 d (16,0)
10 CO	199,0	-
11 CH ₃	21,9	2,00 s
12 CH ₃	26,4	1,53 s
13 CH ₃	24,3	1,69 s

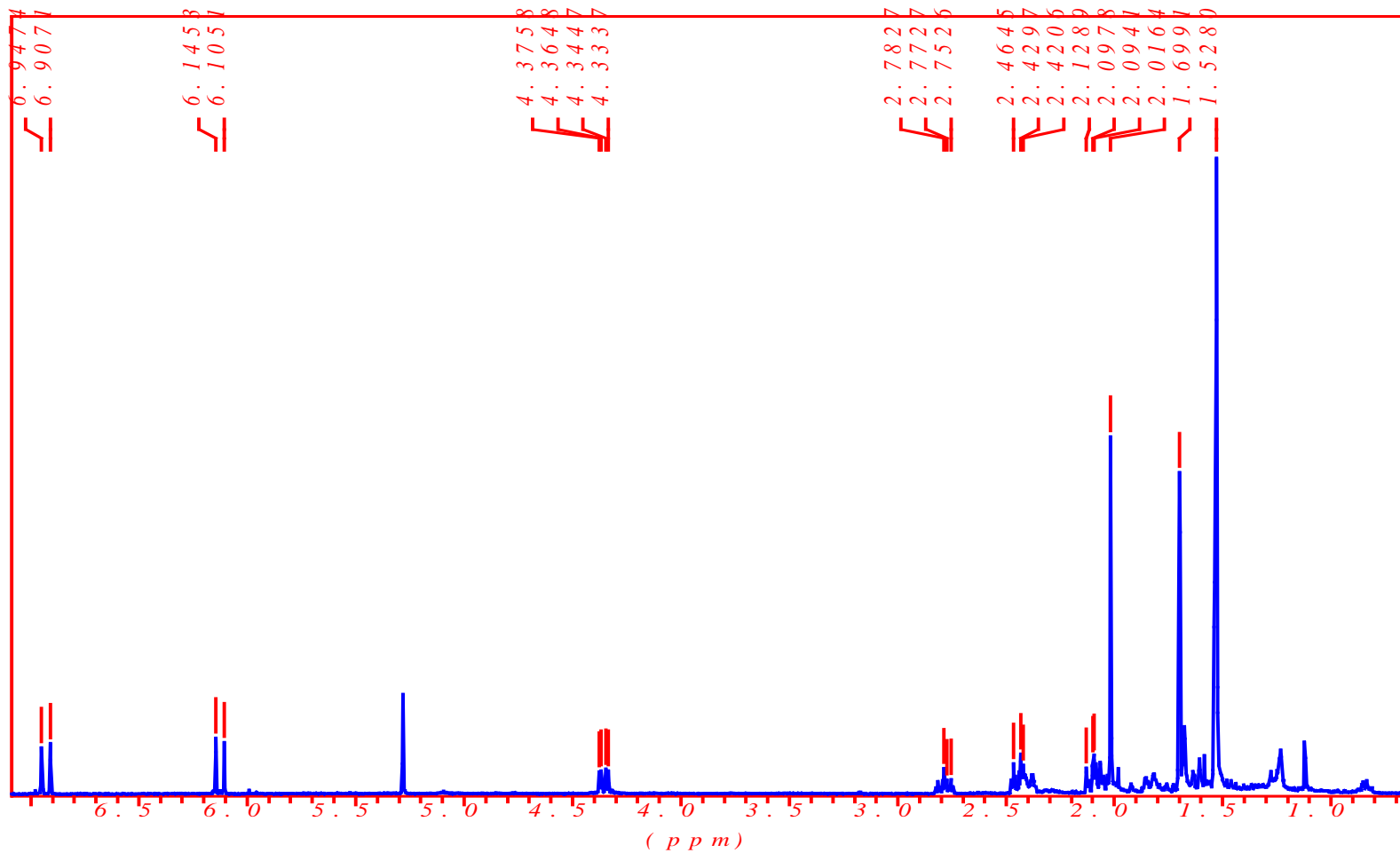


Figura 145: Espectro de ¹H RMN do composto 19 (LC24) em CDCl₃ (400 MHz).

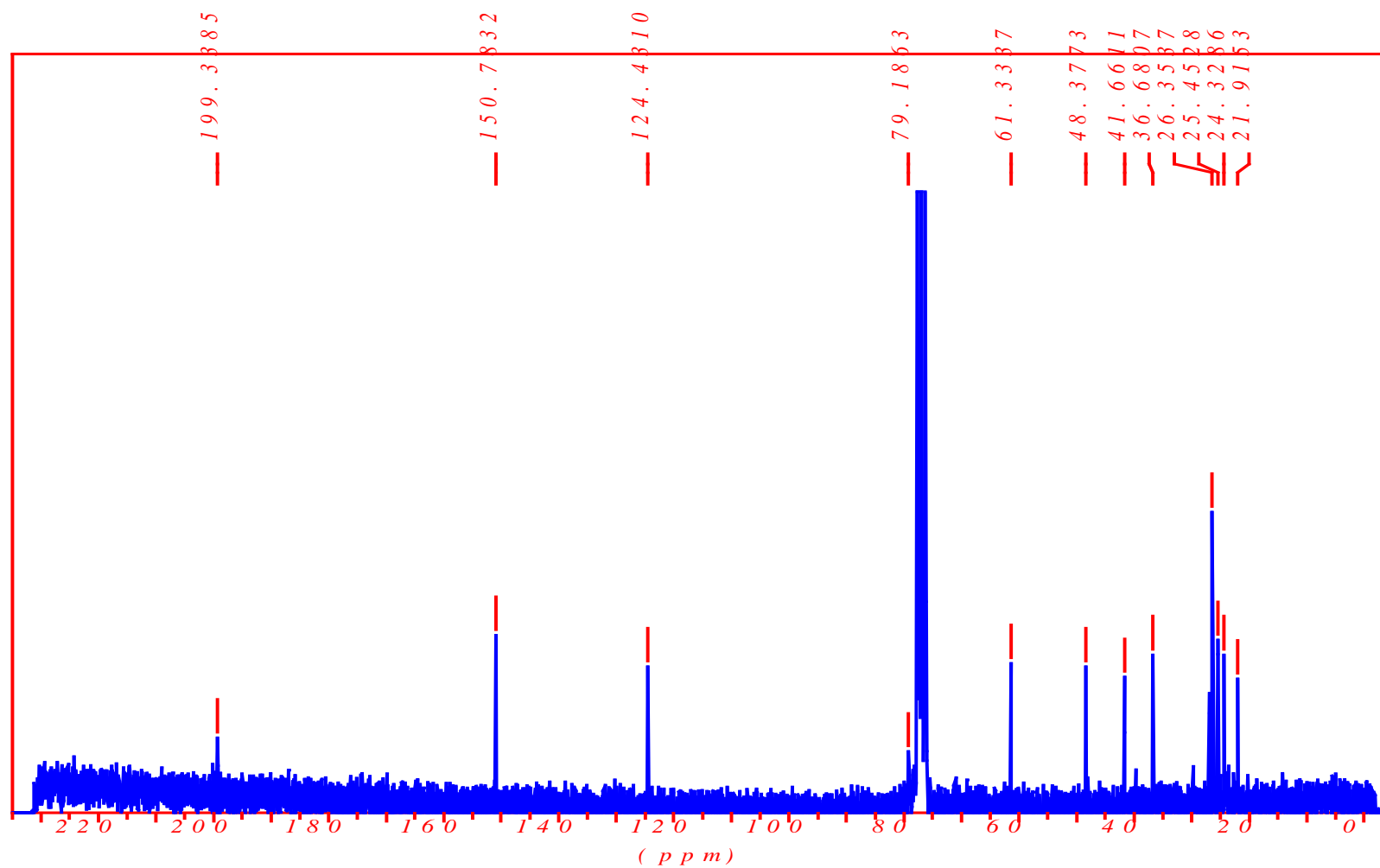


Figura 146: Espectro de ¹³C RMN do composto 19 (LC24) em CDCl₃ (50 MHz).

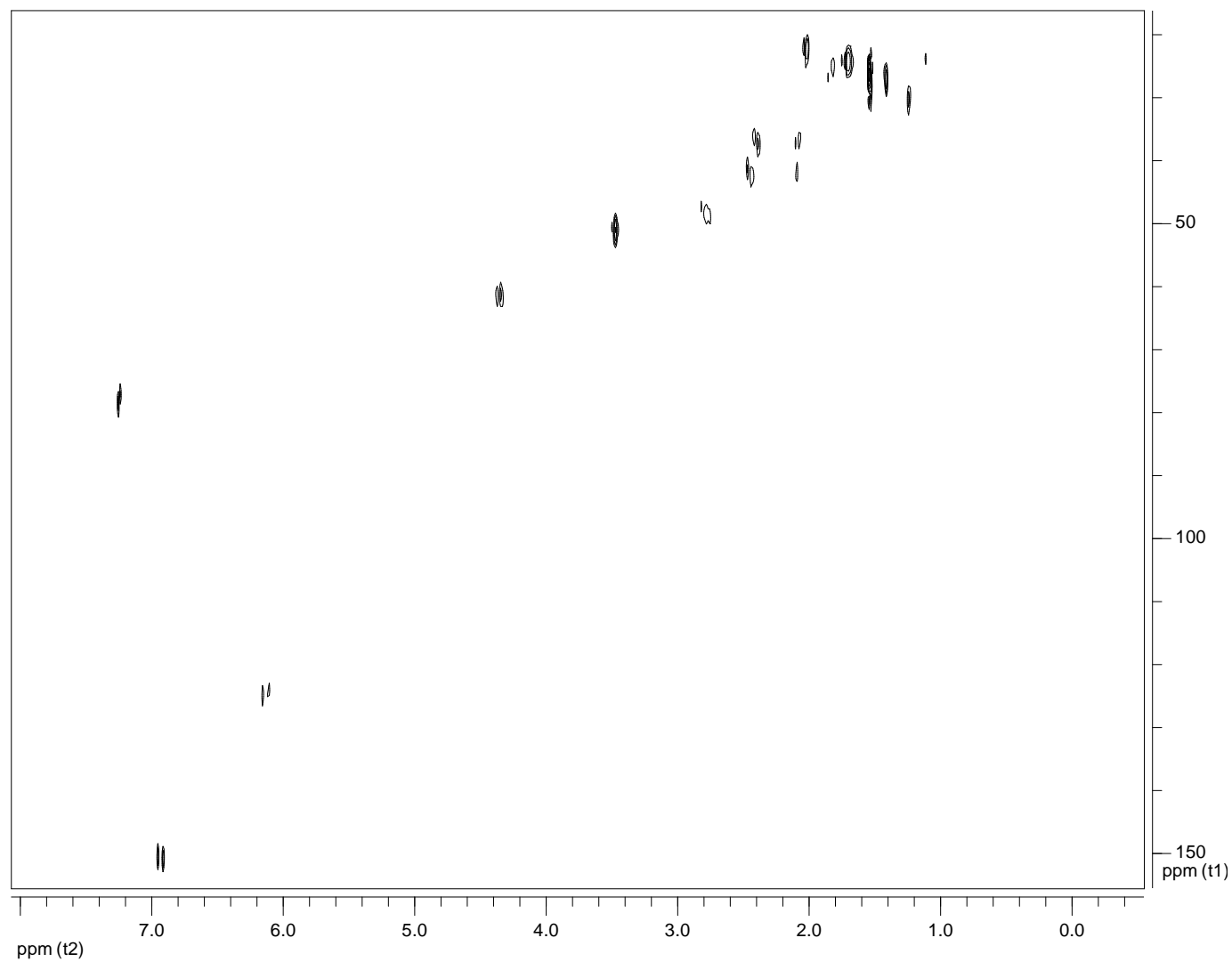


Figura 147: Espectro de HSQC-DEPT do composto 19 (LC24) em CDCl_3 (400 MHz).

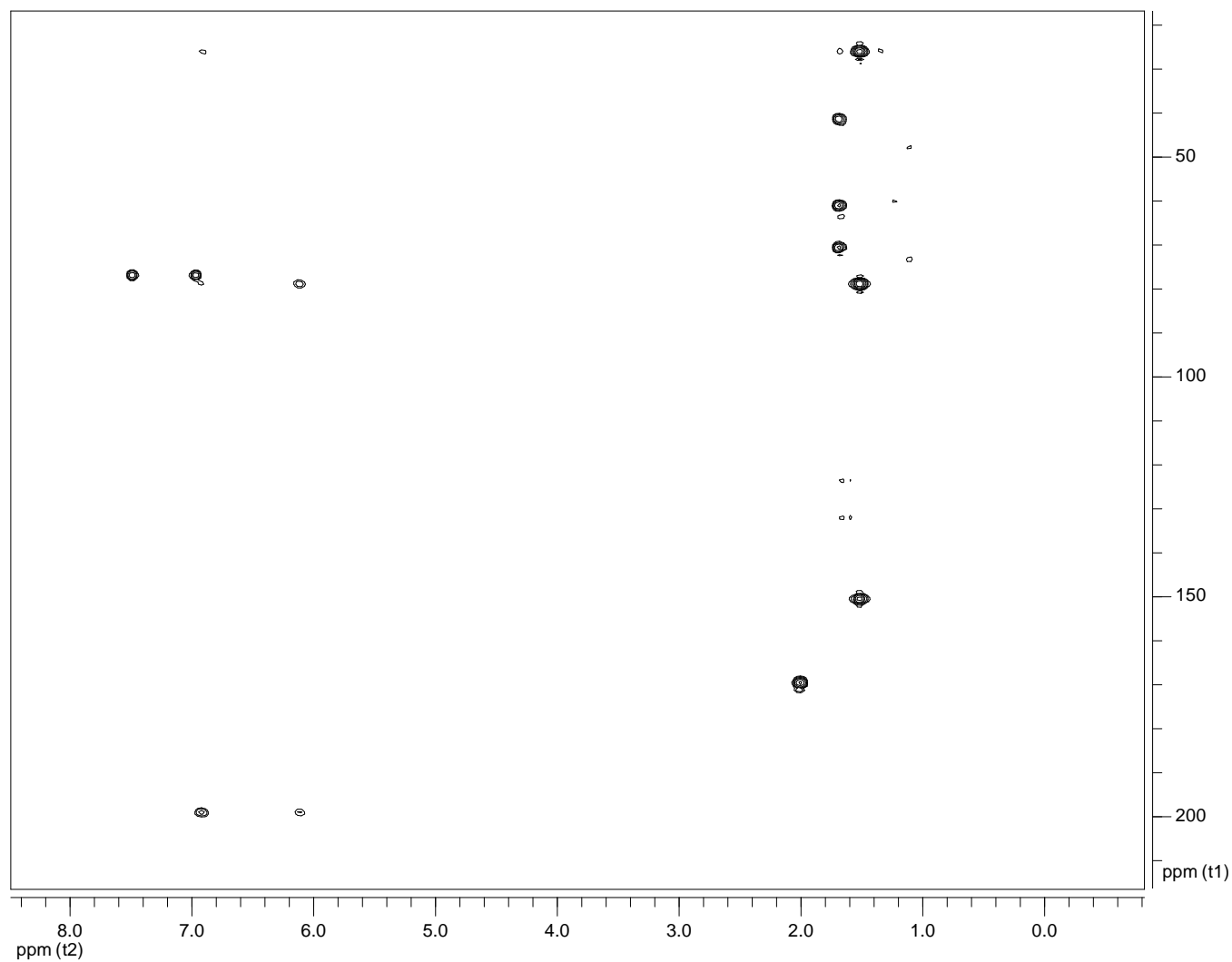


Figura 148: Espectro de HMBC do composto 19 (LC24) em CDCl_3 (400 MHz).

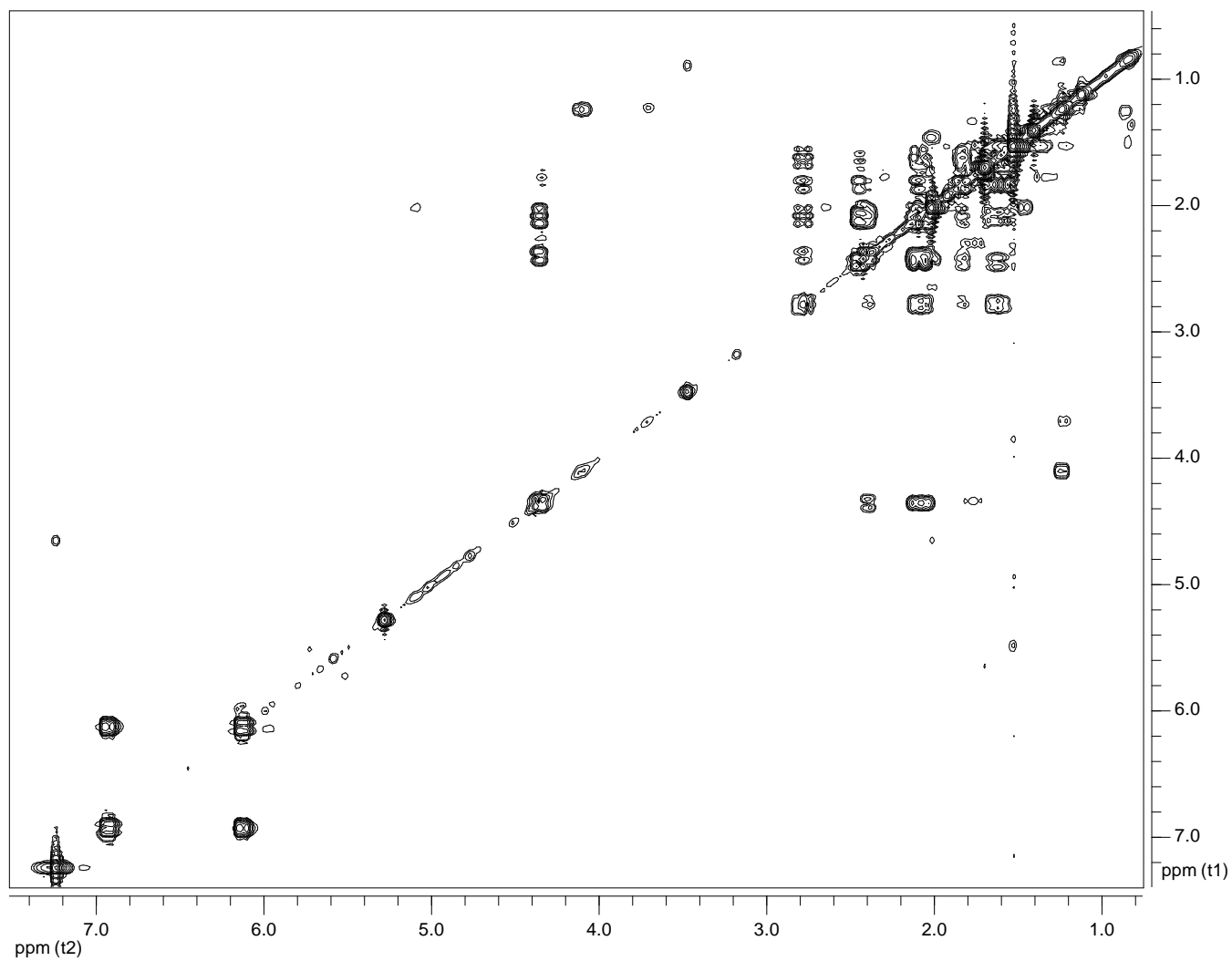


Figura 149: Espectro de ^1H - ^1H COSY do composto 19 (LC24) em CDCl_3 (400 MHz).

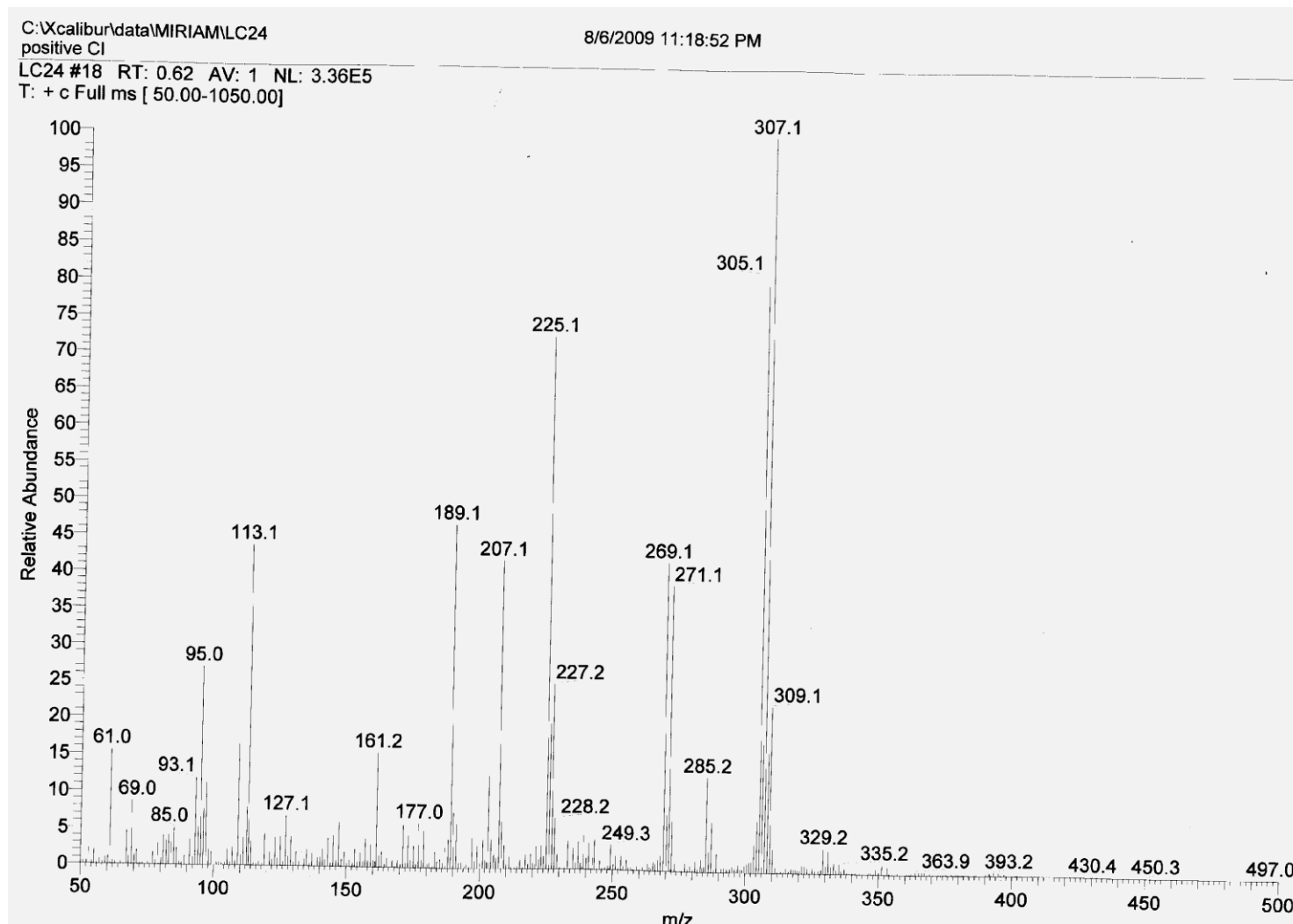


Figura 150: Espectro de massas do composto 19 (LC24) por ionização química.

- Composto 20:

O composto **20 (LC15)** (1,8 mg) foi isolado após purificação por CLAE de uma fração obtida durante o processo de fracionamento (**Figura 1**) como um líquido incolor e inodoro. O espectro de massas apresentou os picos de maior massas em m/z 385/387/389/391 com um padrão de intensidades relativas semelhante ao composto **1**, sugerindo a presença de dois bromos e um cloro na molécula. O espectro de ^{13}C RMN e experimento HSQC-DEPT indicaram a presença de 14 carbonos, sendo três quaternários, três metínicos, quatro metilenos e quatro metilas. O experimento de correlação HMBC indicou a presença de mais um carbono quaternário.

Em relação a estes carbonos, três apresentam deslocamento semelhante aos de carbonos ligados a oxigênio ou halogênio em δ 60,4 (CH), 62,0 (CH) e 71,0 (Cq) e um é carbonílico em δ 210,0. Dessa forma, a fórmula molecular proposta é $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{Br}_2\text{ClO}_3$, onde o íon molecular em m/z 446/448/450/452 não foi observado (**Figura 151**). De acordo com o grau de insaturação, o composto **20** possui apenas um anel, além de um grupo cetônico.

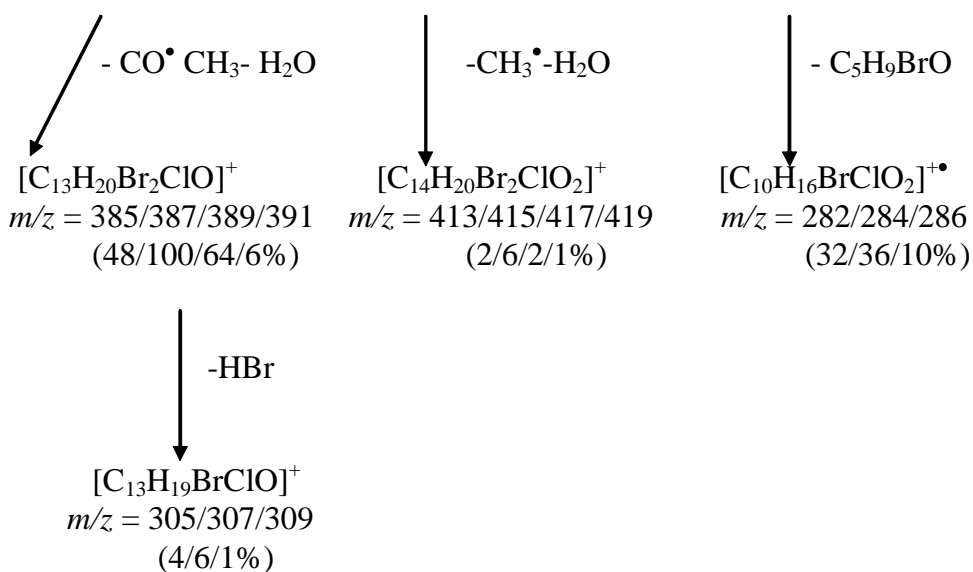
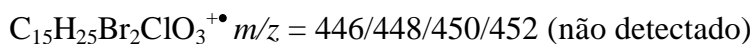
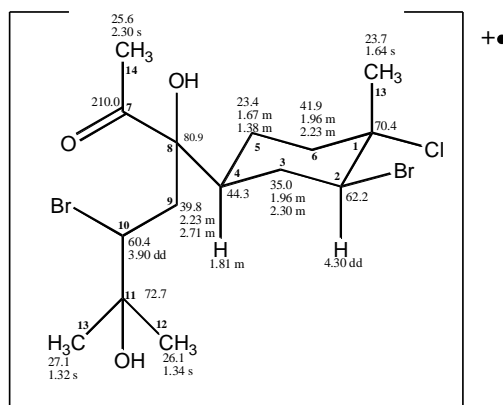


Figura 151: Fragmentação em relação ao espectro de massas do composto **20** por ionização eletrônica.

Quadro 20: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 20 (400 e 50 MHz; CDCl_3 , H= 7,24 e C=77,0) em comparação com a literatura (Britto et al., 2006, CDCl_3).

C	δ H (J Hz)	δ C	δ H (J Hz) Britto et al., 2006	δ C Britto et al., 2006
1	-	70,4	-	71,0
2	4,30 dd (4,4; 12,8)	62,2	4,27 dd (4,3; 12,8)	62,0
3	1,96 m 2,30 m	35,0	1,80 m 1,98 m	35,7
4	1,81 m	44,3	1,84 brs	46,3
5	1,38 m 1,67 m	23,4	1,60 m 1,76 m	23,8
6	1,96 m 2,23 m	41,9	2,06 m 2,45 ddd (3,4; 3,4; 13,7)	42,2
7	-	210,0	-	212,7
8	-	80,9	-	82,7
9	2,23 m 2,71 dd (2,1; 15,8)	39,8	2,27 dd (9,5; 15,6) 2,55 dd (2,1; 15,6)	39,4
10	3,90 dd (2,1; 8,5)	60,4	3,67 dd (2,1; 9,5)	60,4
11	-	72,7	-	72,9
12	1,34 s	26,1	1,35 s	27,6
13	1,32 s	27,1	1,32 s	25,5
14	2,30 s	25,6	2,30 s	26,6
15	1,64 s	23,7	1,68 s	22,8

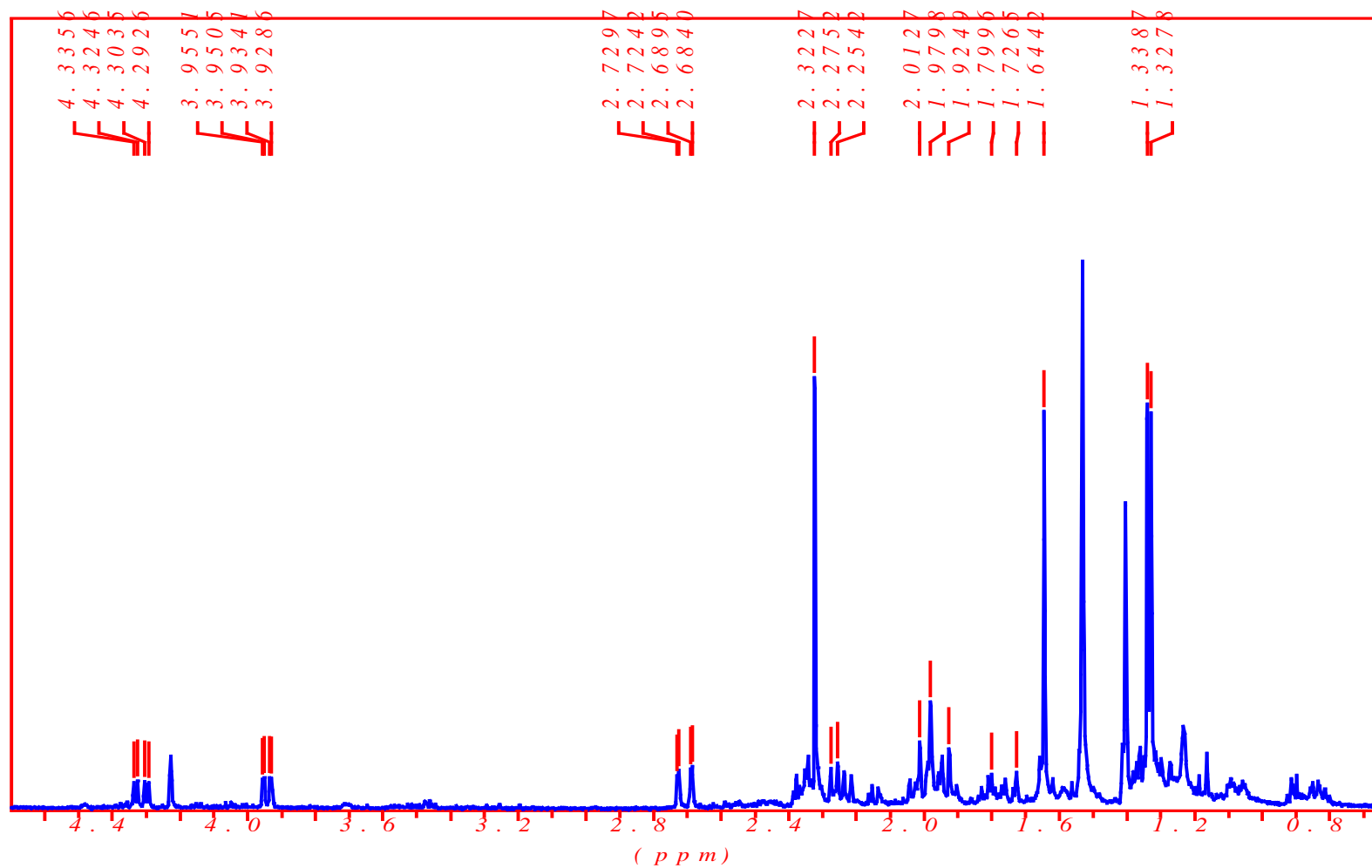


Figura 153: Espectro de ¹H RMN do composto 20 (LC15) em CDCl₃ (400 MHz).

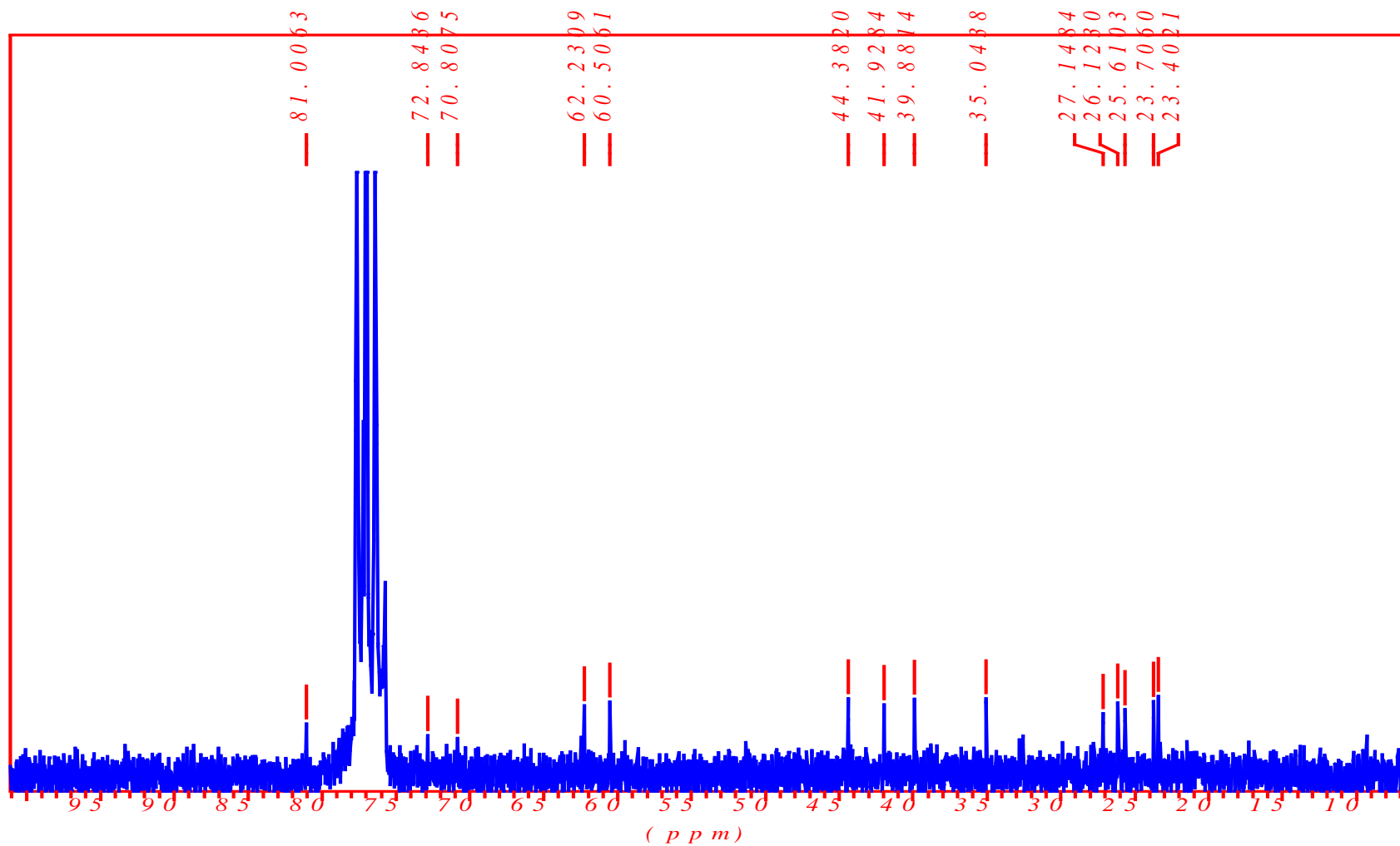


Figura 154: Espectro de ^{13}C RMN do composto 20 (LC15) em CDCl_3 (50 MHz).

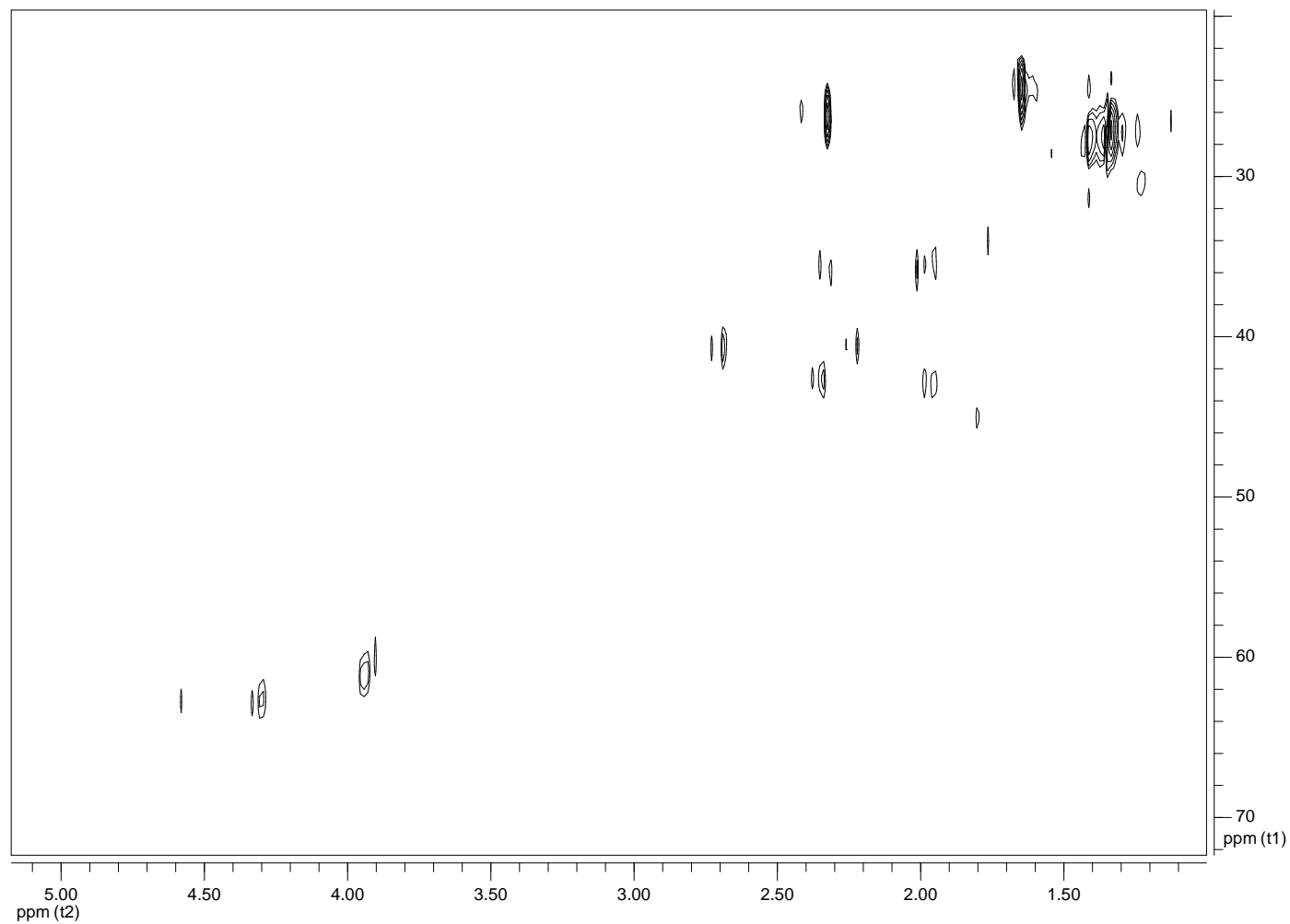


Figura 155: Espectro de HSQC-DEPT do composto 20 (LC15) em CDCl₃ (400 MHz).

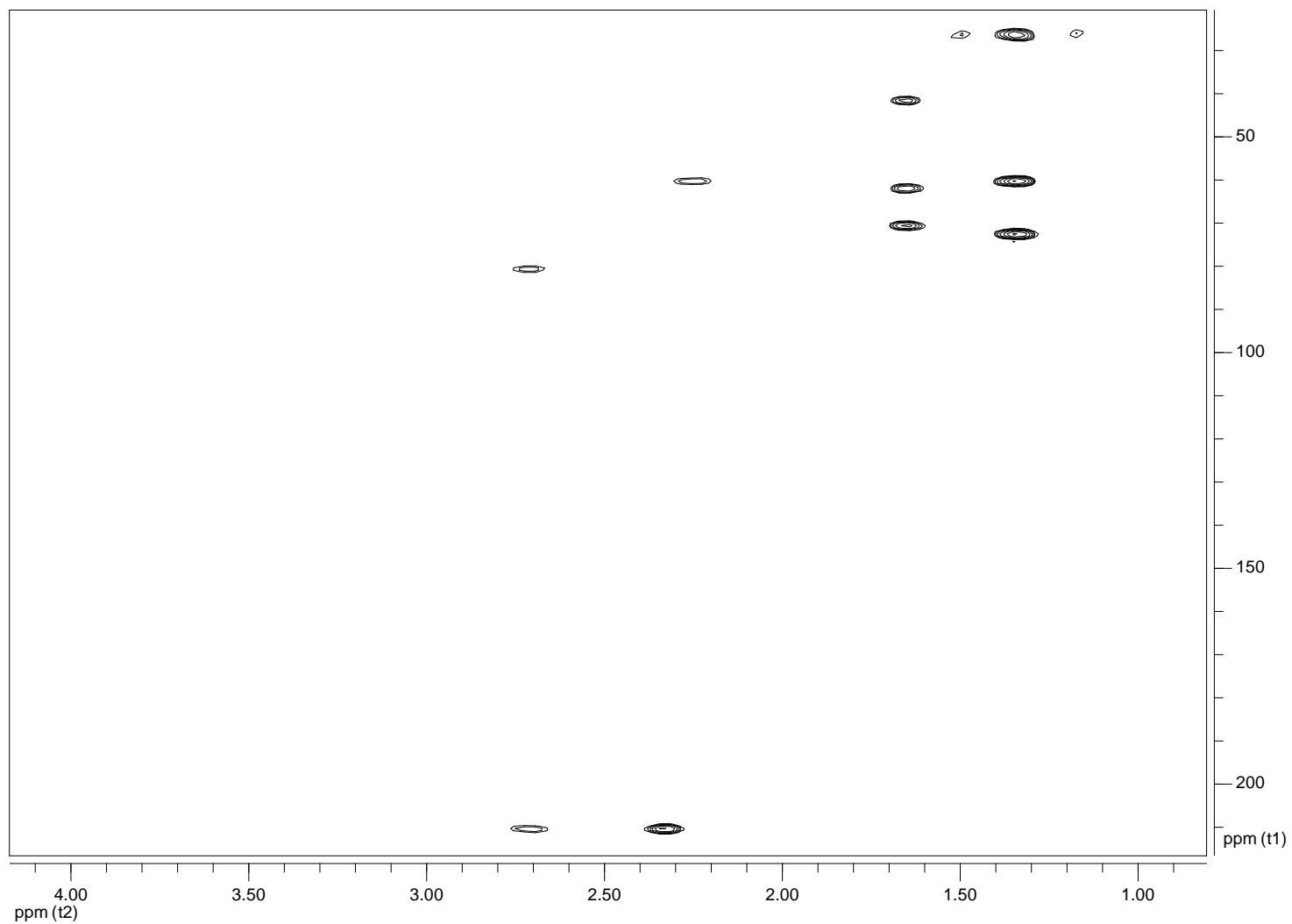


Figura 156: Espectro de HMBC do composto 20 (LC15) em CDCl_3 (400 MHz).

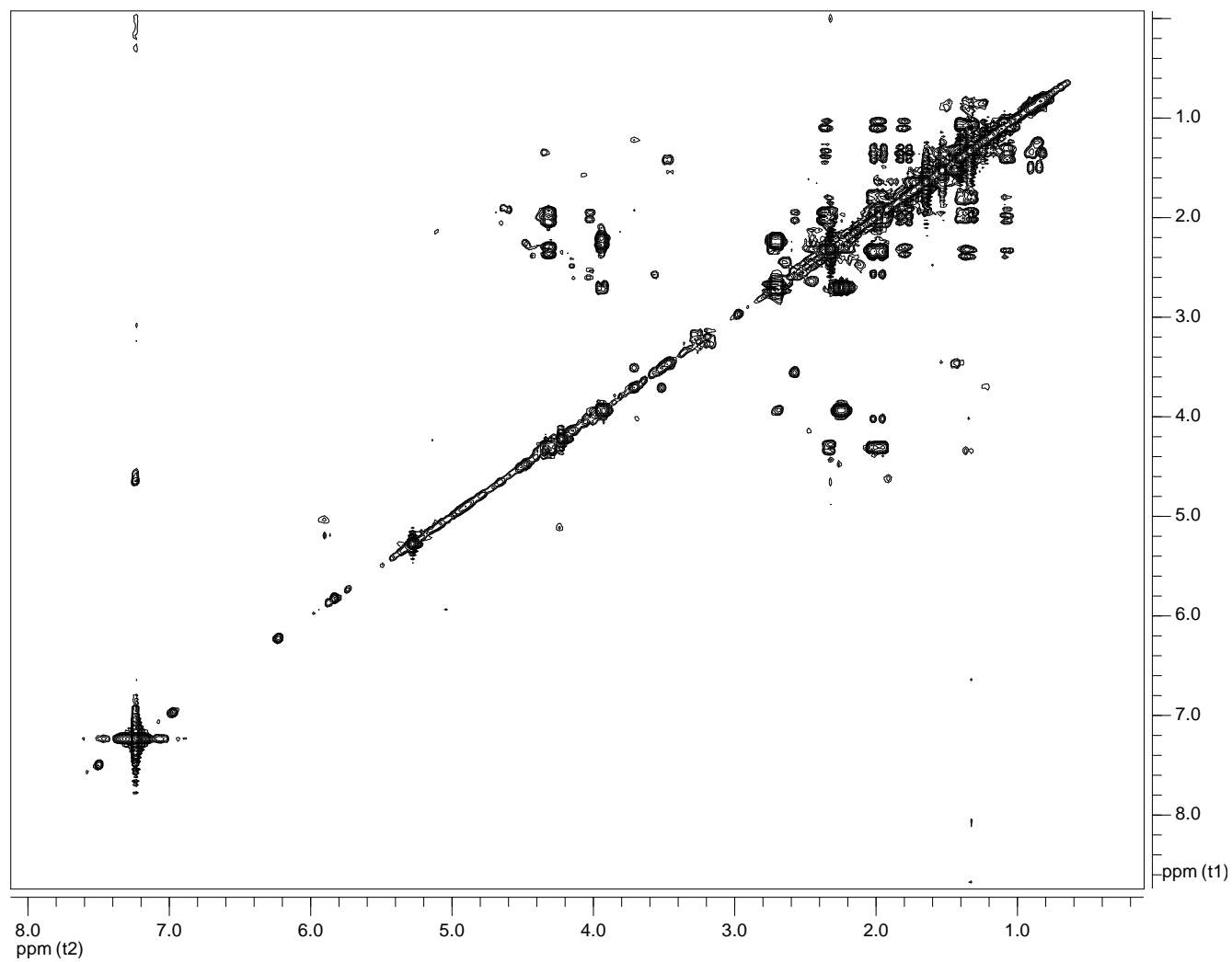


Figura 157: Espectro de ^1H - ^1H COSY do composto 20 (LC15) em CDCl_3 (400 MHz).

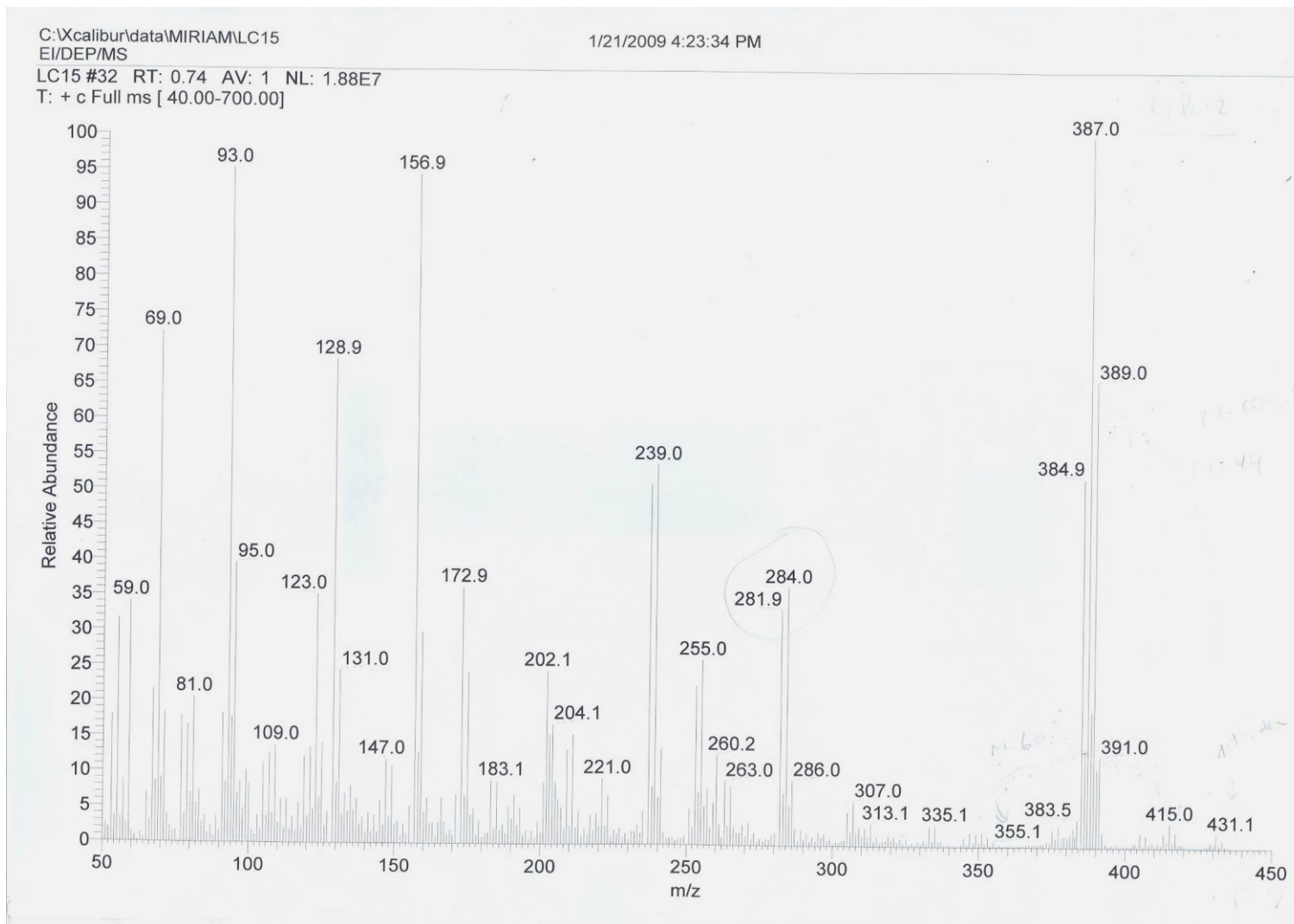


Figura 158: Espectro de massas do composto 20 (LC15) por ionização eletrônica.

- Composto 21:

O composto **21 (LC21)** (13,3 mg) foi isolado como um líquido incolor e inodoro após purificação por CLAE de uma fração obtida durante o processo de fracionamento (**Figura 1**). O espectro de massas apresentou os picos de maiores massas em m/z 318/320/322 com intensidades relativas compatíveis com a presença de um bromo e um cloro na molécula. O espectro de ^{13}C RMN e experimento HSQC-DEPT indicaram a presença de 15 carbonos, sendo três quaternários, quatro metínicos, quatro metilenos e três metilas. Em relação a estes carbonos, um apresenta deslocamento semelhante a carbono ligado a halogênio ou oxigênio em δ 65,0, um possui deslocamento semelhante a metileno terminal em δ 111,7 e três são olefinicos em δ 126,0, 133,5 e 145,0. Dessa forma, a fórmula molecular proposta é $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{BrCl}$, com índice de insaturação 3, possuindo um anel na molécula e duas duplas ligações (**Figura 159**).

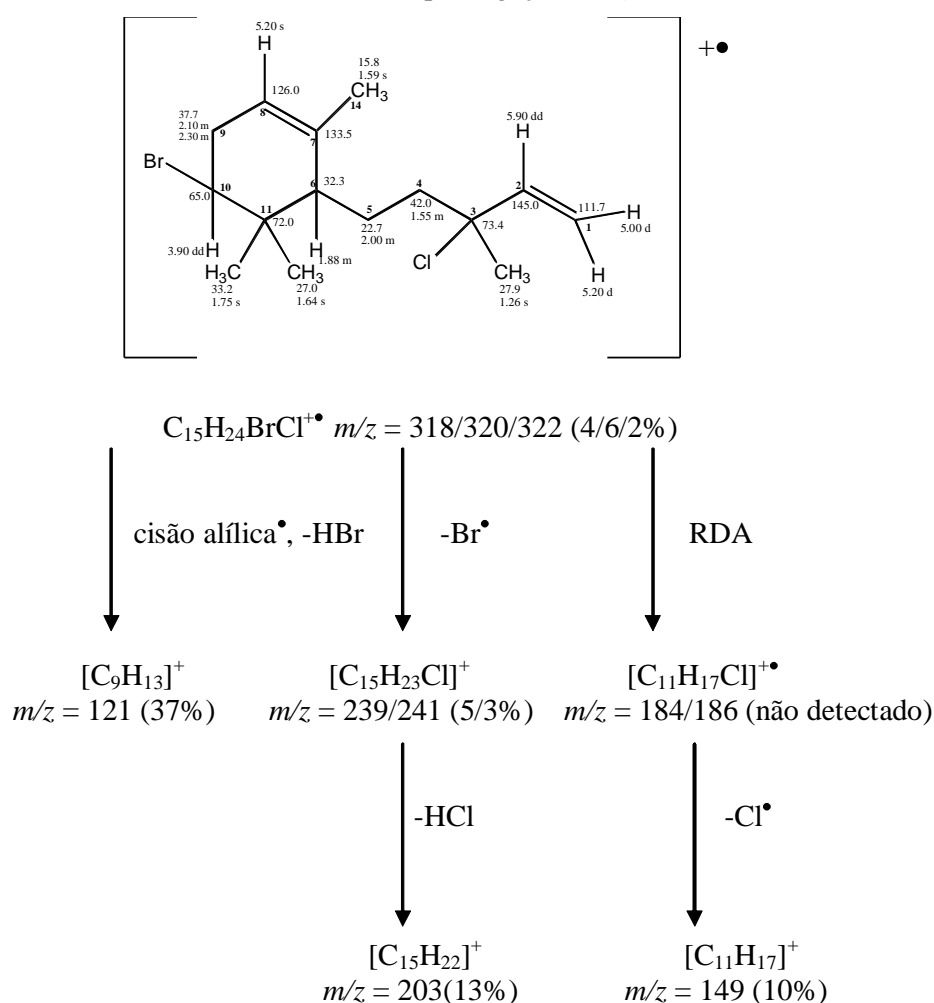


Figura 159: Fragmentação através de espectro de massas do composto 21 por ionização eletrônica.

O espectro de ^1H RMN indicou a presença de um hidrogênio desprotegido em δ 3,90 (1H, dd, $J=1,1$; 17,3 Hz), dois hidrogênios ligados aos carbonos olefínicos em δ 5,20 (1H, s) e 5,90 (1H, dd, $J=10,7$; 17,3 Hz), dois hidrogênios ligados ao carbono metileno terminal em δ 5,20 (1H, d, $J=17,3$ Hz) e 5,00 (1H, d, $J=10,7$ Hz) e quatro metilas em δ 1,26, 1,58, 1,64 e 1,75.

A posição dos substituintes no anel é observada através dos espectros de correlações ^1H - ^1H COSY e HMBC. A correlação ^1H - ^1H COSY do hidrogênio em δ 3,90 com o hidrogênio δ 1,75, juntamente com a alta constante de acoplamento ($J=17,3$ Hz) indicam que o bromo está na posição equatorial no anel e, conseqüentemente, seu hidrogênio na posição axial. A posição dos carbonos olefínicos foi atribuída através das correlações HMBC entre os hidrogênios em δ 1,59 (CH_3) com os carbonos em δ 133,5 (Cq), 126 (Cq) e 32,3 (CH); o hidrogênio em δ 5,20 (CH_2) com os carbonos em δ 73,4 e 145,0 (Cq) e o hidrogênio em δ 5,00 (CH_2) com o carbono em δ 145,0 (Cq).

Para a cadeia linear, os carbonos olefínicos foram atribuídos através das correlações HMBC entre o hidrogênio em δ 5,90 com o carbono em δ 73,4 (Cq) e o hidrogênio em δ 1,26 (CH_3) com o carbono em δ 145,0 (CH). A correlações ^1H - ^1H COSY entre os hidrogênios em δ 5,90 do carbono olefínico e δ 5,00 do carbono metileno terminal, juntamente com a alta constante de acoplamento ($J=10,7$ Hz) indicam para esse halogênio a posição cis em relação ao hidrogênio em δ 5,00 (**Figura 160**).

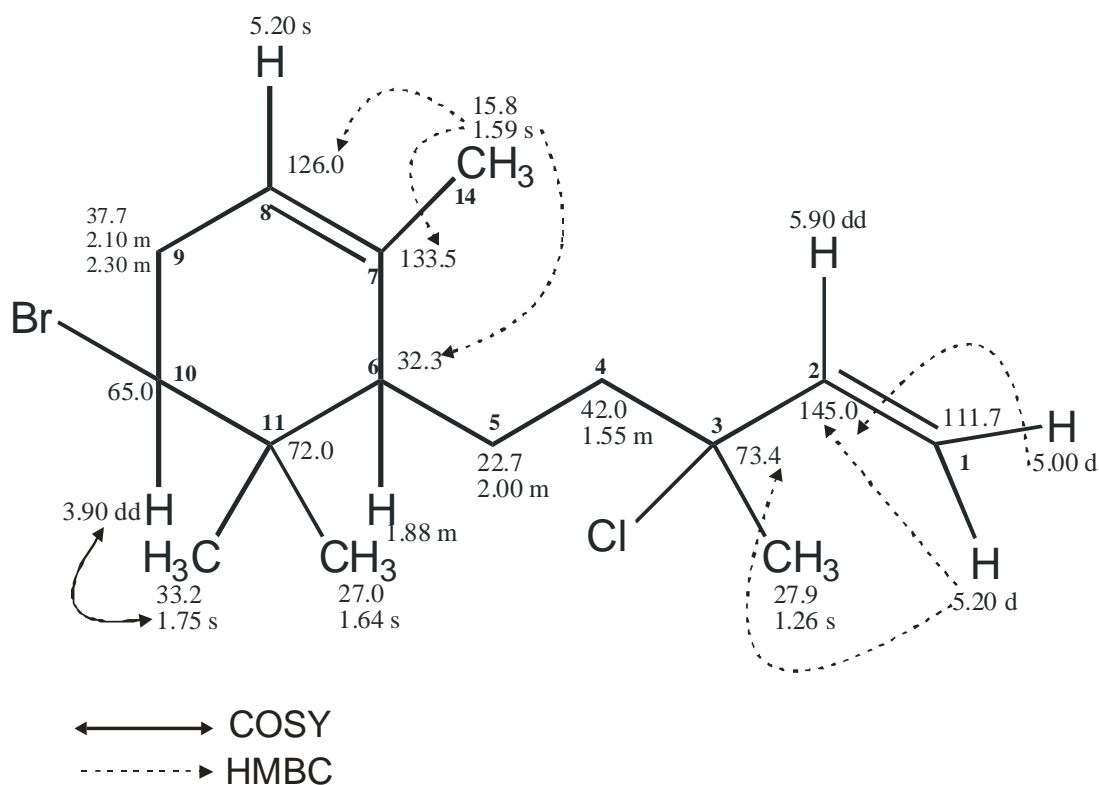


Figura 160: Estrutura do composto 21 com correlações ^1H - ^1H COSY e HMBC.

Com base nos dados apresentados, o composto **21** trata-se de um derivado do **sniderol**, com grupamento cloro na cadeia linear, primeiramente descrito para *Laurencia catarinensis*. Até o presente, haviam sido descritos na literatura os três derivados do sniderol, no entanto é a primeira vez que é reportado um derivado do sniderol com cloro ao invés de hidroxila na cadeia lateral.

Quadro 21: Dados de ^1H e ^{13}C do composto 21 (400 e 50 MHz; CDCl_3 , H= 7,24 e C=77,0).

C	δ C (HSQC/HMBC)	δ H (J Hz)
1 CH ₂	111,7	5,00 d (10,7) 5,20 d (17,3)
2 CH	145,0	5,90 dd (10,7; 17,3)
3 C	73,4	-
4 CH ₂	42,0	1,55 m
5 CH ₂	22,7	2,00 m
6 CH	32,3	1,88 s
7 C	133,5	-
8 CH	126,0	5,20 s
9 CH ₂	37,7	2,10 m 2,30 m
10 CH	65,0	3,90 dd (1,1; 17,3)
11 C	72,0	-
12 CH ₃	27,0	1,64 s
13 CH ₃	33,2	1,75 s
14 CH ₃	15,8	1,59 s
15 CH ₃	27,9	1,26 s

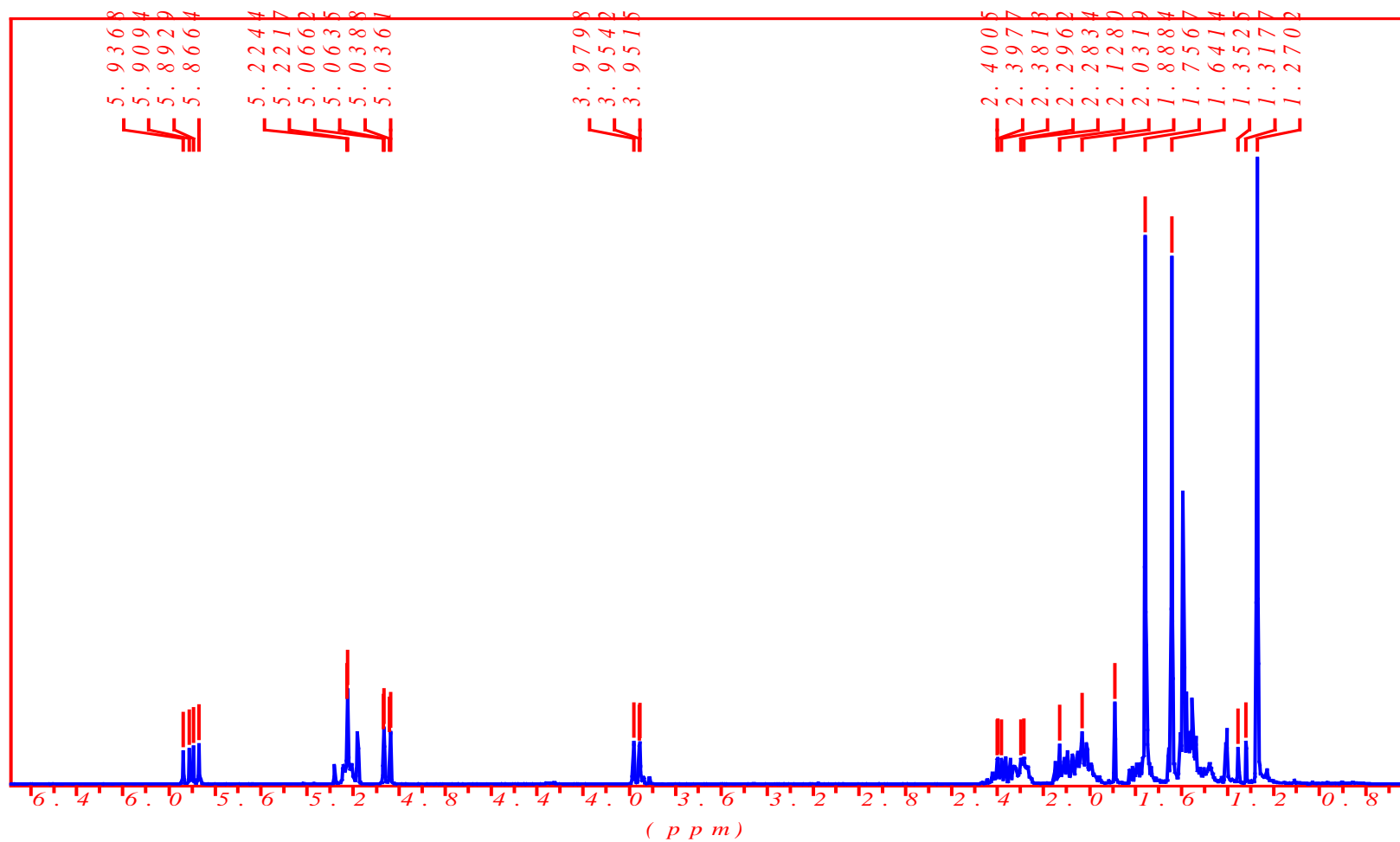


Figura 161: Espectro de ^1H RMN do composto 21 (LC21) em CDCl_3 (400 MHz).

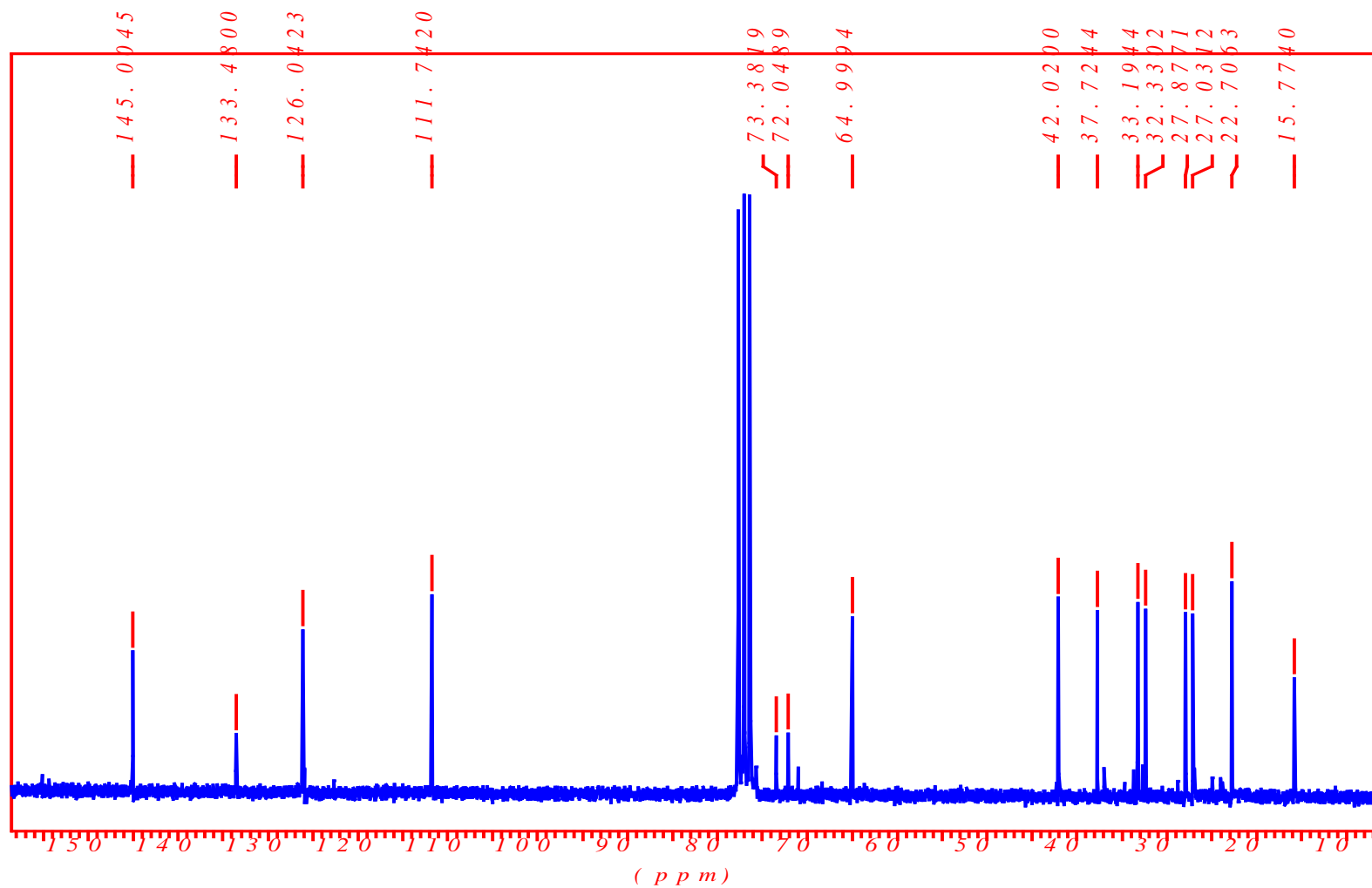


Figura 162: Espectro de ^{13}C RMN do composto 21 (LC21) em CDCl_3 (50 MHz).

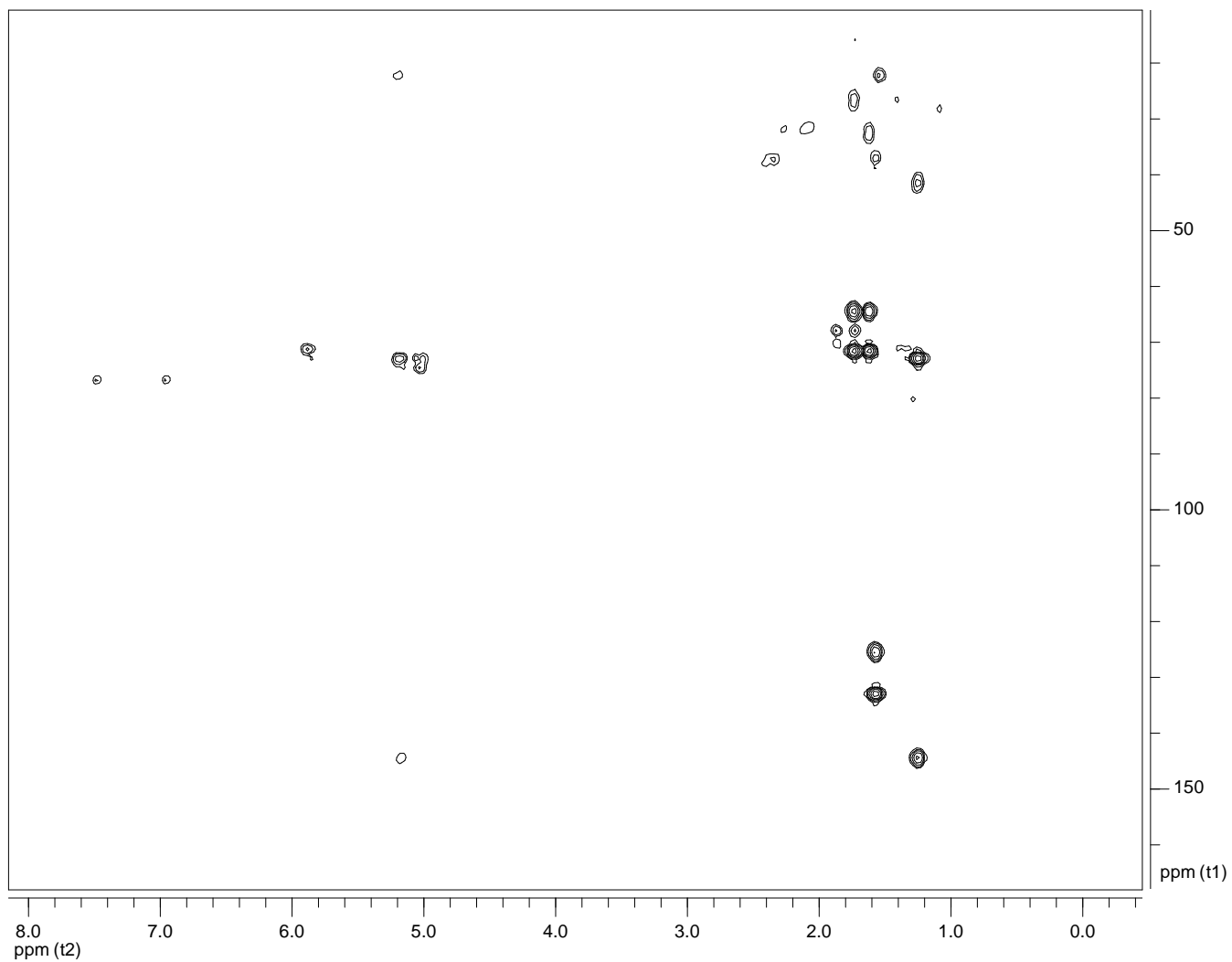


Figura 164: Espectro de HMBC do composto 21 (LC21) em CDCl₃ (400 MHz).

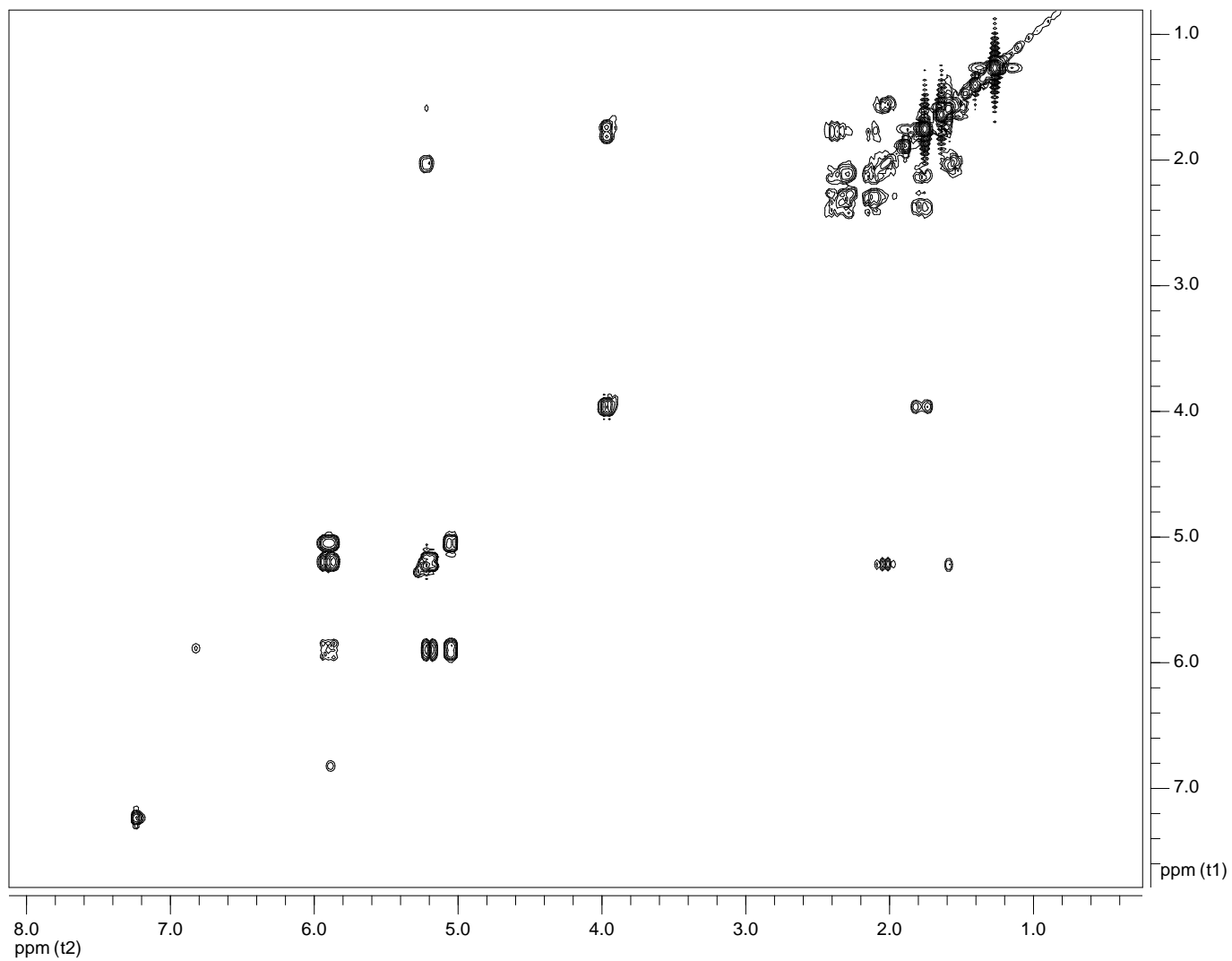


Figura 165: Espectro de ^1H - ^1H COSY do composto 21 (LC21) em CDCl_3 (400 MHz).

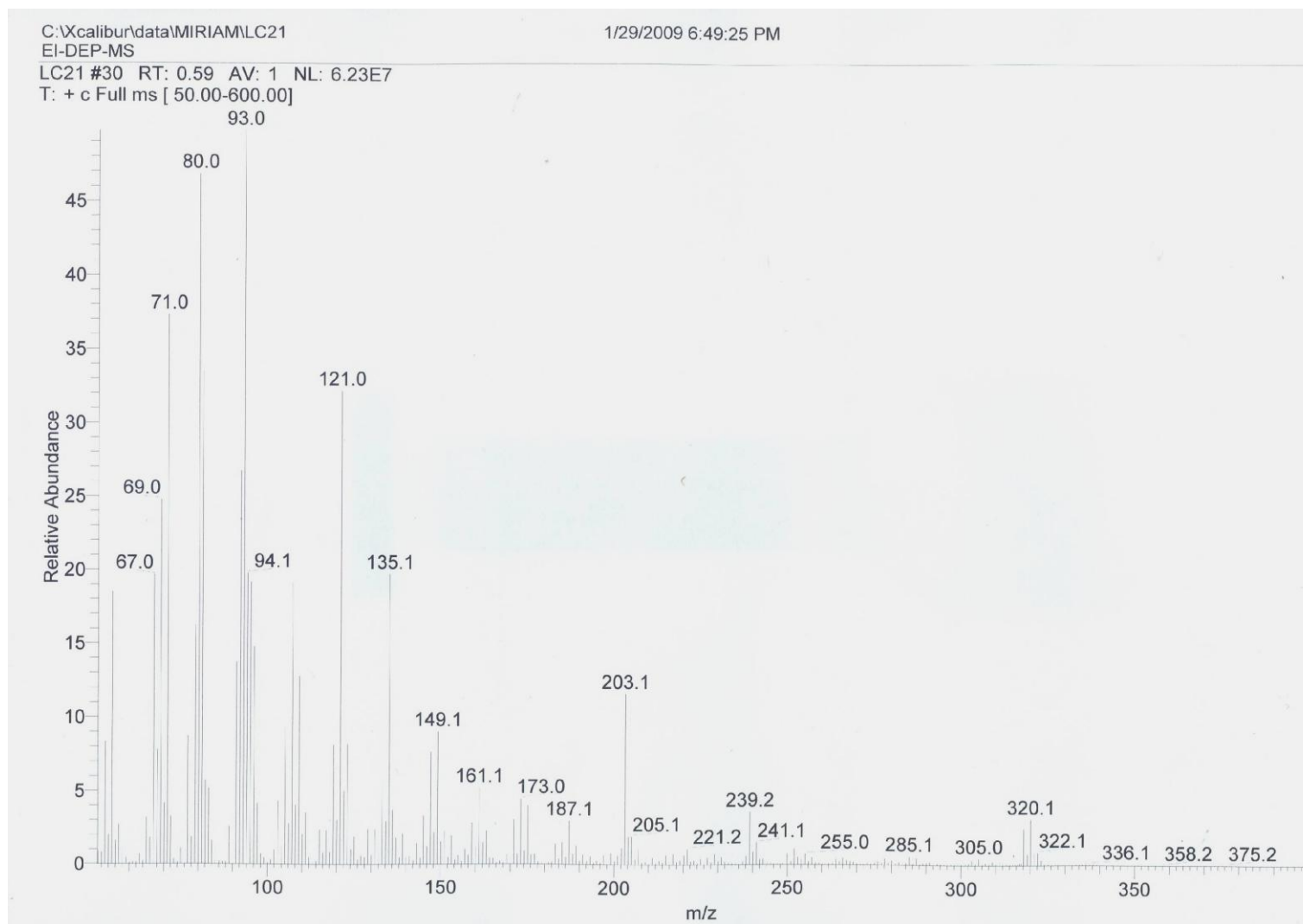


Figura 166: Espectro de massas do composto 21 (LC21) por ionização eletrônica.

- Compostos conhecidos com estruturas não relacionadas com o caespitol:

Os compostos **22 (LC01)**, **23 (LC11)** e **24 (LC17)** foram identificados através de comparação com amostras autênticas isoladas anteriormente no Departamento de Farmacognosia e Química de Produtos Naturais da Universidade de Atenas como **tirsiferol**, **trans-nerolidol** e **trans-fitol**. Para estes três compostos serão apresentados apenas seus espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN, exceto para o composto 24, para o qual foi obtido apenas o espectro de hidrogênio.

Figura 167: Estrutura do composto 22.

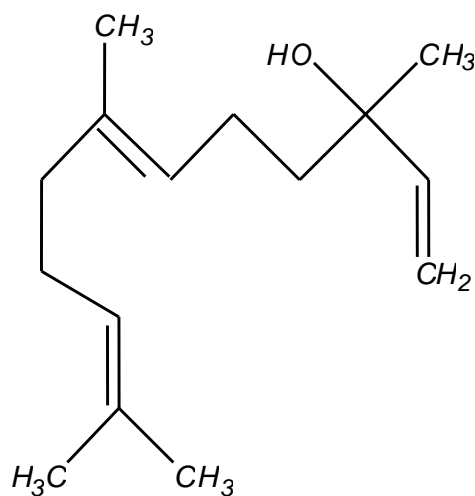


Figura 168: Estrutura do composto 23.

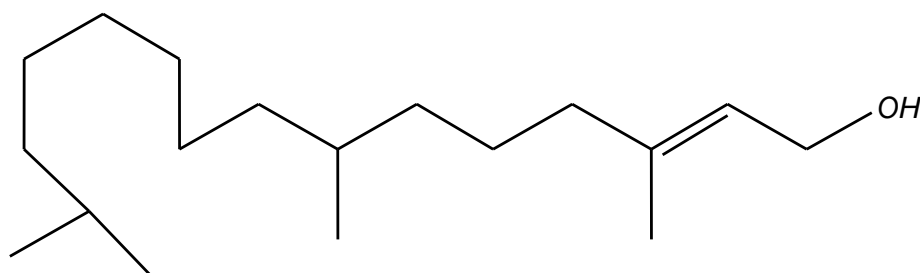


Figura 169: Estrutura do composto 24.

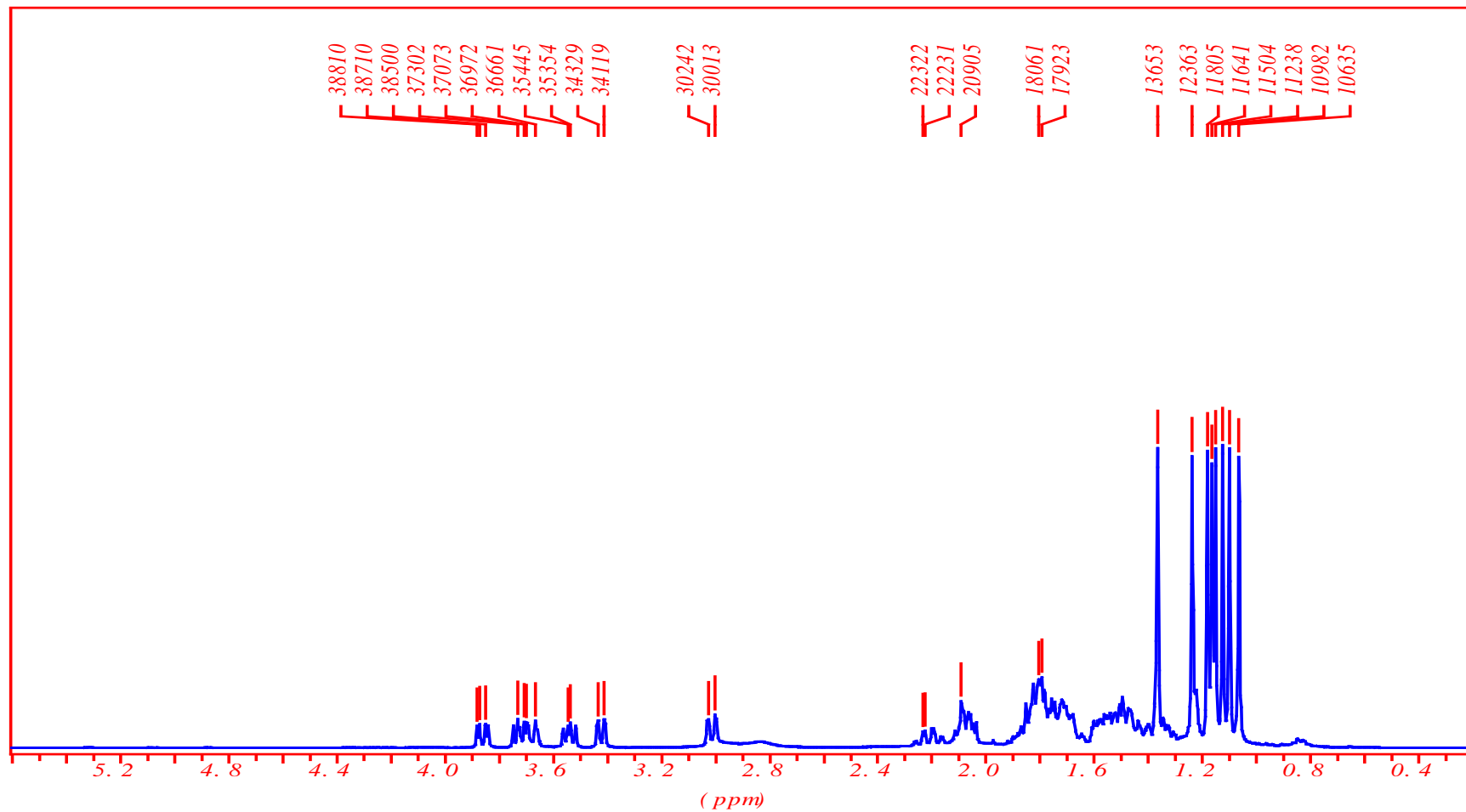


Figura 170: Espectro de ¹H RMN do composto 22 (LC01) em CDCl₃ (400 MHz).

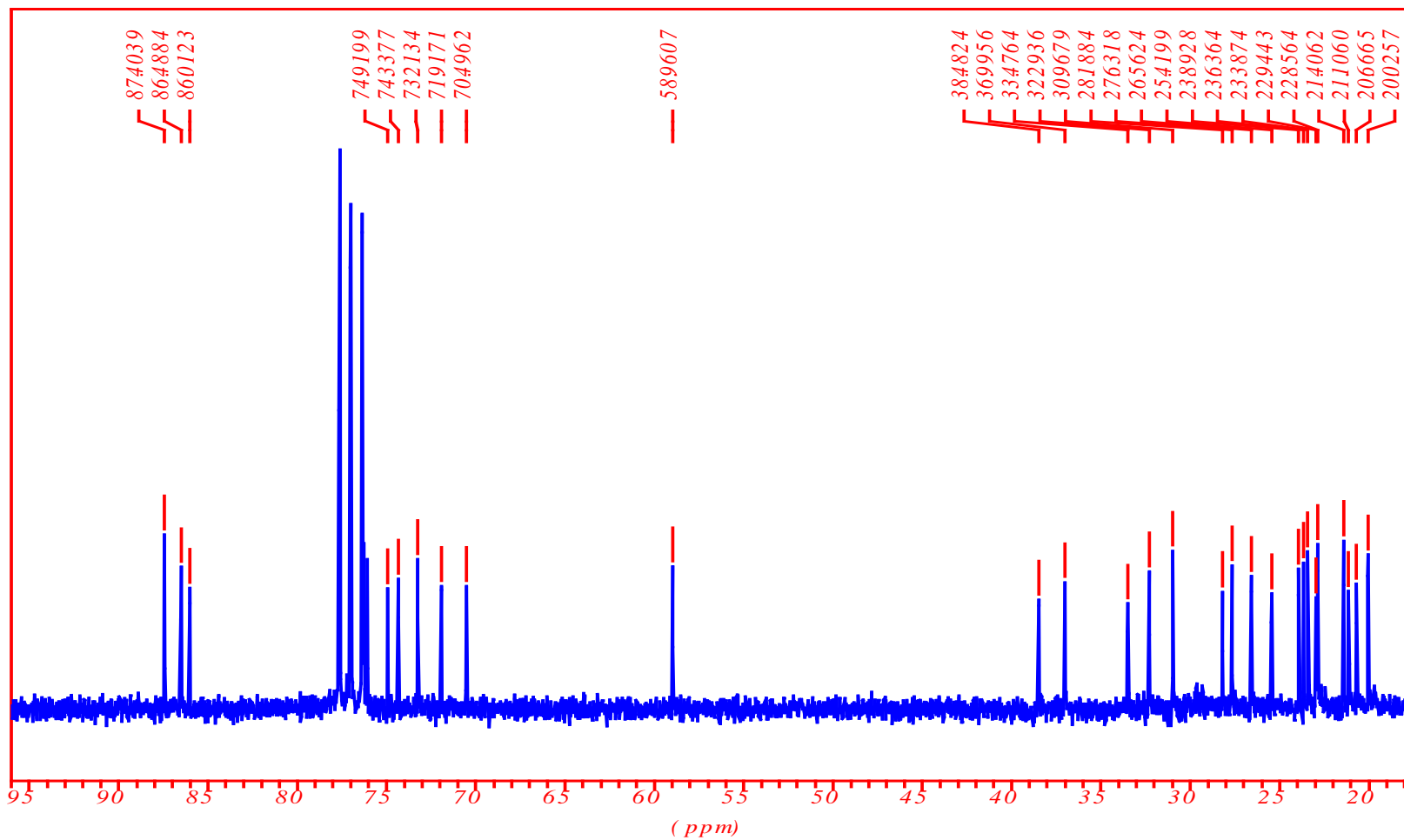


Figura 171: Espectro de ^{13}C RMN do composto 22 (LC01) em CDCl_3 (50 MHz).

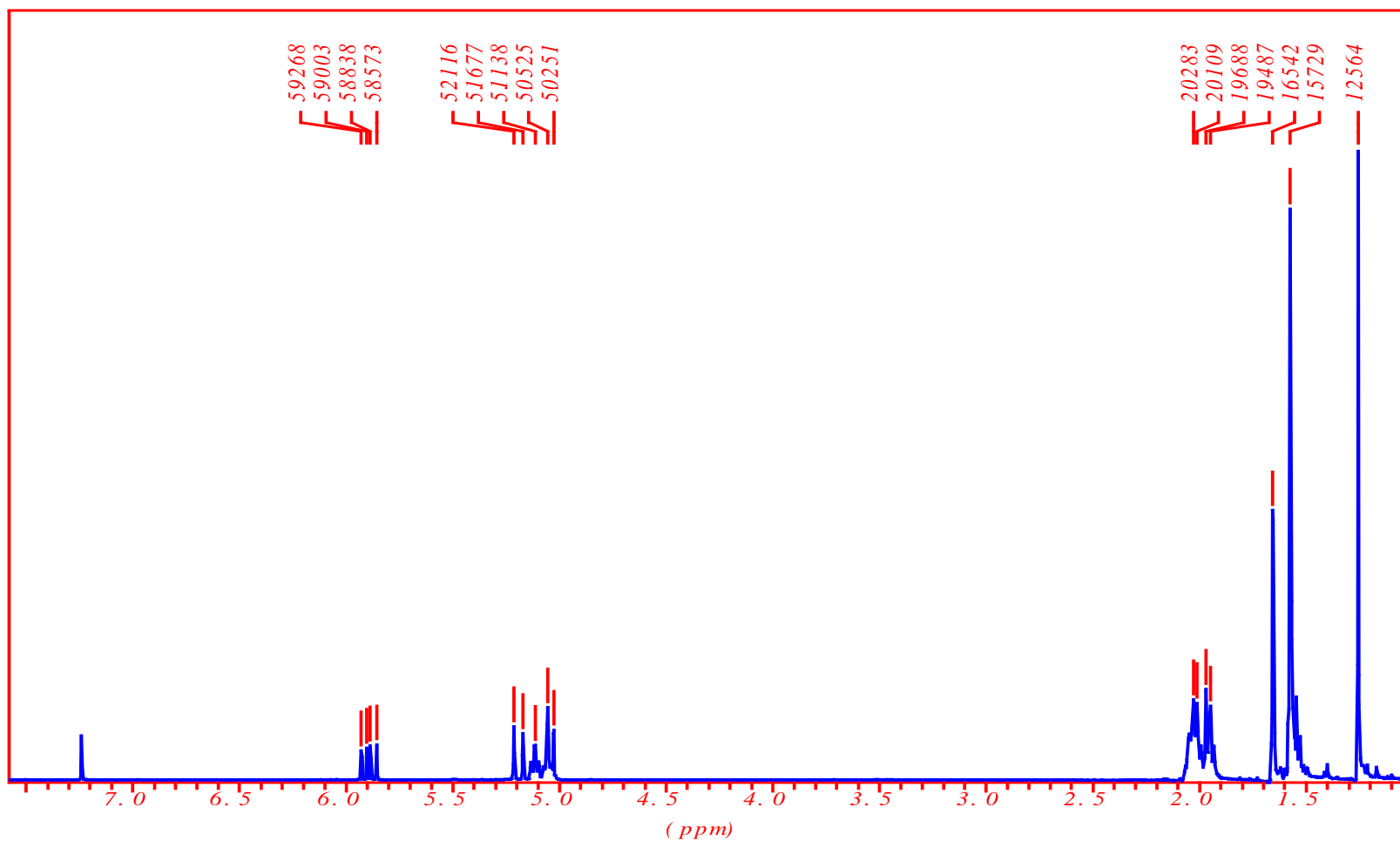


Figura 172: Espectro de ¹H RMN do composto 23 (LC11) em CDCl₃ (400 MHz).

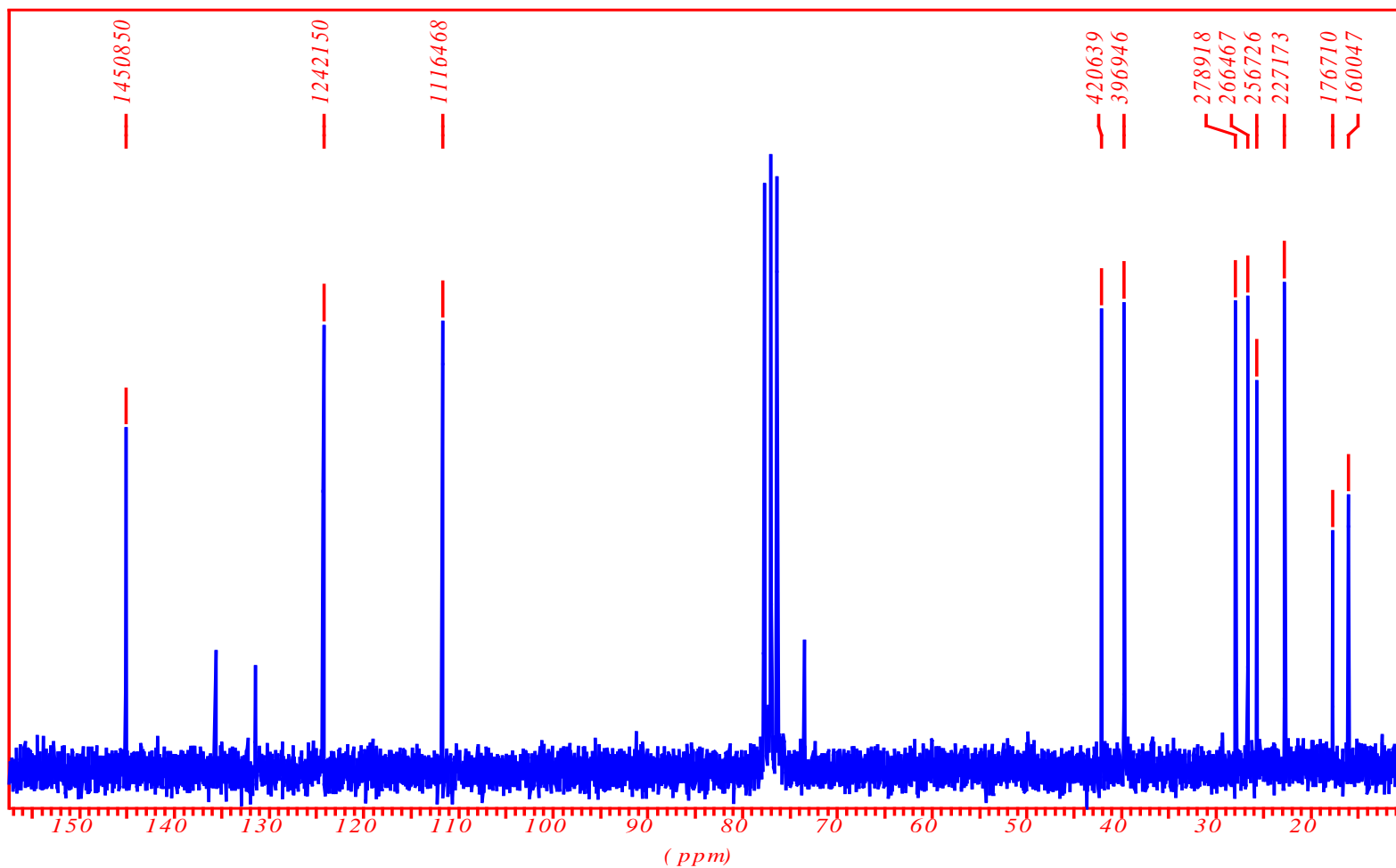


Figura 173: Espectro de ^{13}C RMN do composto 23 (LC11) em CDCl_3 (50 MHz).

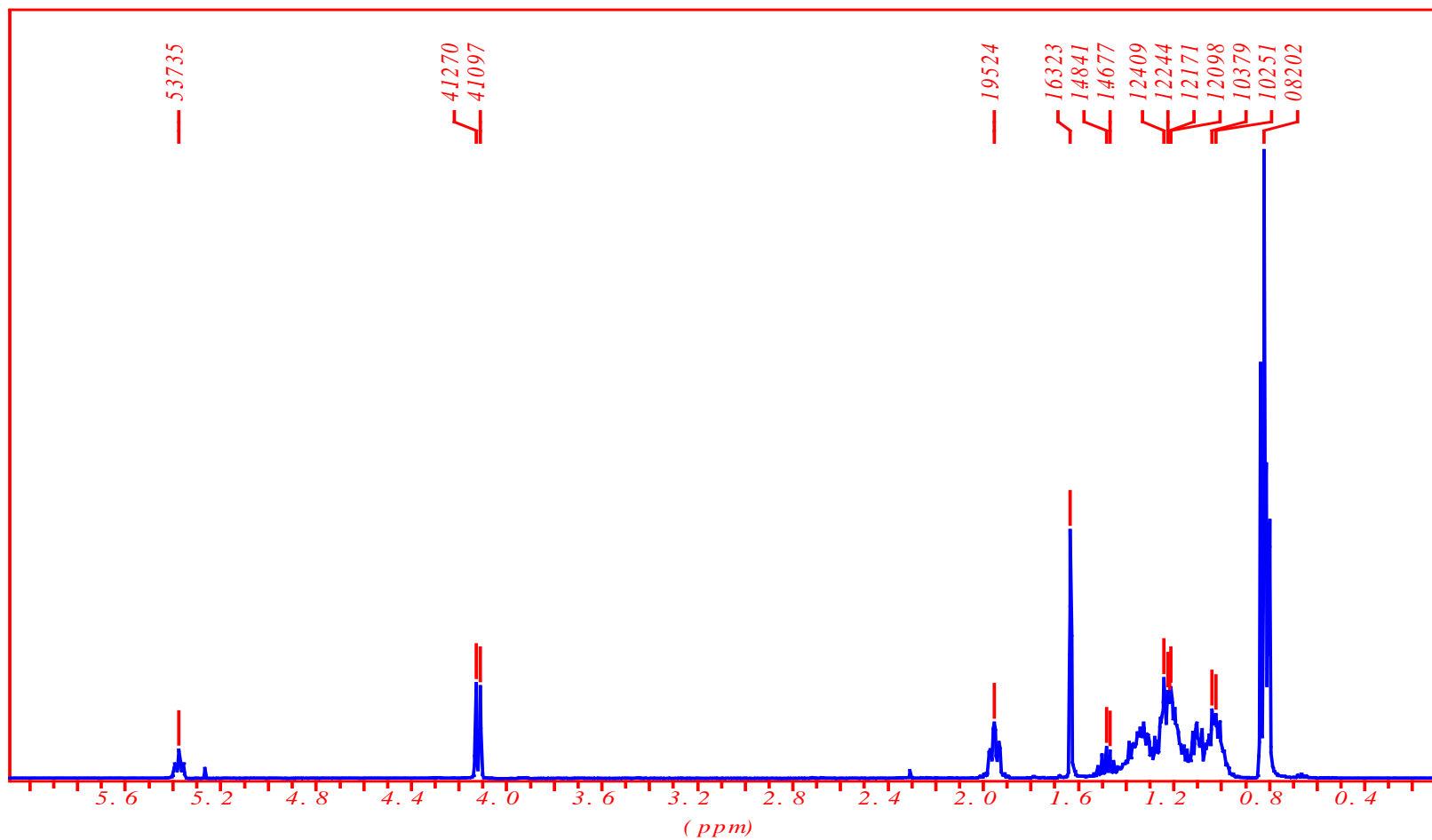


Figura 174: Espectro de ¹H RMN do composto 24 (LC17) em CDCl₃ (400 MHz).

- Atividades Biológicas para os compostos 1 (LC02), 4 (LC04) e 14 (LC03):

Em relação às possíveis atividades biológicas, os compostos **1 (LC02)** e **14 (LC03)**, respectivamente identificados como caespitol e isocaespitol, foram avaliados no Departamento de Farmacognosia da Universidade de Mississippi (coordenado pelo Prof, Dr, Dale Nagle) para atividade antitumoral *in vitro* em células T47D para tumor de mama, inibindo o fator 1 de ativação de hipóxia em -13% e -16% para a concentração de 10 μM , respectivamente. Dessa forma estes compostos não se revelaram promissores para esta linha de pesquisa. Também foram avaliados no Laboratório de Toxicologia da Universidade de Bruxelas (coordenado pelo Prof, Dr, Robert Kiss) para células U373 (glioblastoma), A549 (câncer de pulmão) e PC3 (câncer de próstata), observando-se $\text{CI}_{50} = 44-48 \mu\text{M}$ para o composto **1** e $\text{CI}_{50} = 70-73 \mu\text{M}$ para o composto **14**.

Os compostos **1 (LC02)** e **4 (LC04)** foram testados para atividade antiviral frente aos vírus herpéticos do tipo 1 (2 cepas) [modelo viral de genoma DNA], e do rotavírus SA-11 [modelo viral de genoma RNA], através do ensaio de inibição do efeito citopático viral (grupo coordenado pela Profa, Dra Claudia Simões) tendo sido observado elevada citotoxicidade para às células VERO utilizadas para esse modelo de atividade antiviral.

CAPÍTULO 4: *Laurencia flagellifera*

1. INTRODUÇÃO

Laurencia flagellifera foi descrita inicialmente por J. Agardh (1852) a partir de material coletado na Indonésia. As mudanças na classificação para *Chondrophycus* e, posteriormente, para *Palisada* foram propostas por Nam (1999, 2007), respectivamente. Trabalhos realizados por Fujii et al. (2006), demonstraram que a espécie é de fácil reconhecimento pelo seu talo cartilaginoso rígido, pouco ramificado e por características apresentadas em suas células corticais, além de detalhes da morfologia vegetativa e reprodutiva dos espécimes brasileiros analisadas.

Em relação à composição química desta espécie, os trabalhos na literatura estão relacionados com a análise de aminoácidos (LOURENÇO et al., 2002) e isolamento de xilomanas sulfatadas (CARDOSO et al., 2007). Já para atividades biológicas foram relatadas atividade antifouling (DA GAMA et al., 2008) e atividade anti-herbivoria para o anfípodo *Elasmopus brasiliensis* (WEIDNER et al., 2004).

Após fracionamento do extrato hidroetanólico de *Laurencia flagellifera*, a análise preliminar da fração lipofílica não apresentou comportamento cromatográfico, no que concentra a presença de terpenóides semelhantes aos encontrados para as espécies *L. microcladia* e *L. catarinensis*. Tendo em vista que a fração hidrofílica apresentou resultados positivos para atividade antiviral frente aos vírus herpéticos do tipo 1 (2 cepas) [modelo viral de genoma DNA] e do vírus herpético tipo 1 (2 cepas) [modelo viral de genoma de RNA] (DA SILVA, 2009), optou-se por proceder a investigação química utilizando esta fração.

Além disso, glicolipídeos sulfatados, como o sulfoquinovosildiacilglicerol estão envolvidos com proteínas para manter as atividades catalíticas nas células eucarióticas (GOURNAIS & BARBER, 1985) e presentes em membranas fotossintéticas de algas e cianobactérias (FATTORUSSO, E. et al, 1993). Como exemplos de atividades biológicas, o sulfoquinovosildiacilglicerol possui propriedades antivirais contra HIV tipo 1 (GUSTAFSON et al., 1989) e HIV tipo 2 (WANG et al., 2007) e atividade antipromotora de tumores (SHIRAHASHI et al., 1993).

O presente capítulo tem como objetivo o isolamento e a elucidação estrutural de dois compostos majoritários presentes no extrato aquoso da espécie *Laurencia flagellifera*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal:

O material utilizado nesta investigação foi coletado na zona meso e supralitoral em Março de 2006 na Praia da Sepultura, Município de Bombinhas, Santa Catarina, Brasil. Um exemplar é mantido no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR4135).

2.2. Procedimentos Gerais:

Os espectros de infravermelho foram obtidos usando modelo Shimadzu. Os espectros de massas alta resolução por eletrospray (quadripolo) e de ressonância magnética de carbono 13 (HSQC) e hidrogênio (COSY) foram obtidos no Instituto de Química Orgânica da Universidade de Buenos Aires, em espectrômetro Bruker AM 500 (500 MHz para hidrogênio e 125 MHz para carbono 13), pelo Prof Dr, Jorge Palermo e pelo Instituto de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, em espectrômetros Bruker AM 300 (300 MHz para hidrogênio e 75 MHz para carbono 13), pelo Prof. Dr. Miguel Caro. Os solventes utilizados foram de grau analítico de procedência Nuclear, Merck e Vetec. As fases estacionárias utilizadas nas colunas cromatográficas a vácuo (CCV) e colunas cromatográficas hidrostáticas foram gel de sílica 60 em duas faixas de granulometria (70-270 e 230- 400 mesh) da marca Vetec além de Sephadex LH-20 (Pharmacia). Para as cromatografias em camada delgada (CCD) foram usadas placas de gel de sílica 60 F 254 sobre base de alumínio, de marcas Merck e 27 Macherey-Nagel, com 0,25 mm de espessura e partículas entre 5 a 40 µm de diâmetro e revelador Orcinol-sulfúrico (KOSCIELAR et al., 1978).

2.3. Procedimentos de extração e isolamento dos compostos de *L. flagellifera*:

Os procedimentos descritos a seguir são apresentados de forma esquemática na figura 1.

Inicialmente, a alga foi limpa para a retirada de todas as epífitas e extraída por maceração durante 3 dias, repetindo-se a operação 3 vezes com etanol 99%. O extrato foi concentrado utilizando rotavapor sob temperatura de 40°C até a eliminação do etanol, constatando-se a formação de duas fases: um resíduo oleoso verde escuro e uma fase aquosa marrom (17 g). As duas fases foram extraídas com acetato de etila, e separados utilizando uma pêra de separação resultando em uma fração orgânica (acetato de etila) (12 g) e uma fração aquosa (4,5 g).

A fração orgânica (12 g) foi submetida à coluna cromatográfica a vácuo (CCV) com sílica gel, usando n-hexano como fase móvel com aumento gradual de acetato de etila e finalizando com metanol, resultando 8 frações. A fração 7 (AcOEt:MeOH (1:1)) (2,3 g) foi submetida a uma

Laurencia flagellifera

coluna cromatográfica em gel de sílica, usando clorofórmio: etanol:ácido acético (8:6:0,4) como fase móvel e resultando em 11 frações. A fração 6 (90 mg) foi submetida a uma coluna Sephadex LH-20 utilizando metanol como fase móvel, obtendo-se o composto **GLIF6** (50 mg).

Na fração aquosa (4,5 g), após concentração em rotavapor rotatório, observou-se a formação de um precipitado branco (2 g), o qual foi filtrado, lavado e seco em dessecador, denominado **PPTLF**.

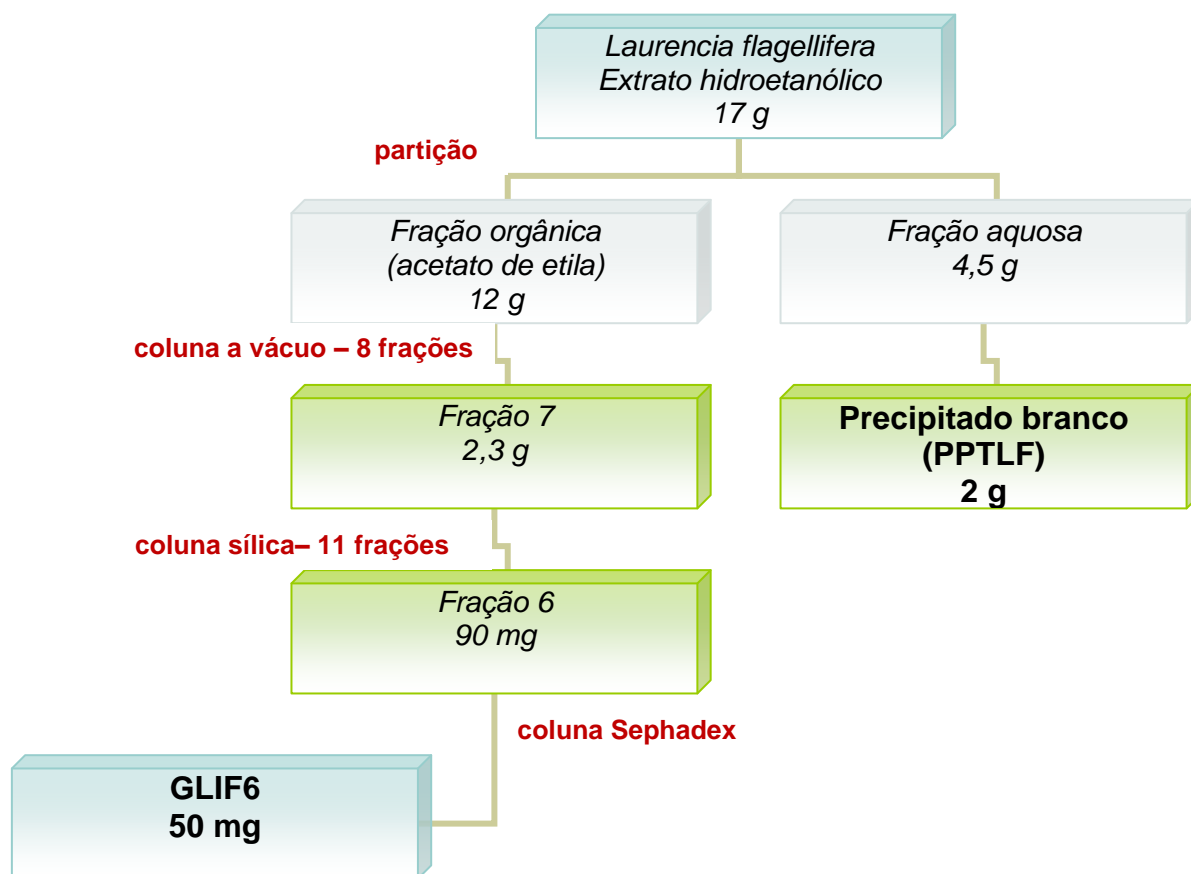


Figura 1: Organograma do isolamento dos compostos de *Laurencia flagellifera*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

As substâncias isoladas, conforme descrito na parte experimental, foram analisadas por métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 e infravermelho.

- Composto PPTLF:

O precipitado branco (2 g) foi obtido após processo de fracionamento (**Figura 1**) como um sólido branco e inodoro e apresentando ponto de fusão entre 242-249 °C. O espectro de infravermelho apresentou bandas de absorção intensa entre 3100 a 3400 cm^{-1} e 1200 a 1000 cm^{-1} , indicando a presença de composto altamente hidroxilado. O espectro de ^1H RMN apresentou sinais na região de δ 3,35 a 4,98 (12H) com deslocamento típico para hidrogênios ligados a carbonos oximetilenos ou oximetinos. O experimento de HSQC permitiu observar a presença de 9 carbonos, sendo três carbonos metilenos e seis carbonos metinos.

A presença de uma unidade de açúcar foi evidenciada pelo sinal em δ 98,0 (provavelmente C1) e os sinais na região de C-2 a C-6 (δ 62,2-74,0), no experimento de HSQC. Como havia nesta região a presença de sinais em δ 62,2, 63,0 e 68,0 para carbonos metilenos, foi sugerido a presença de uma molécula de glicerol ligada a unidade de açúcar. O sinal em δ 4,98 foi visto como um singlete largo, sugerindo uma unidade α -galactopiranosila ou α -glicopiranosila, as quais apresentam baixa constante de acoplamento entre os hidrogênios 1 e 2. Análise detalhada do ^1H - ^1H COSY possibilitou estabelecer as atribuições nas moléculas de açúcar e do glicerol (**figura 2**).

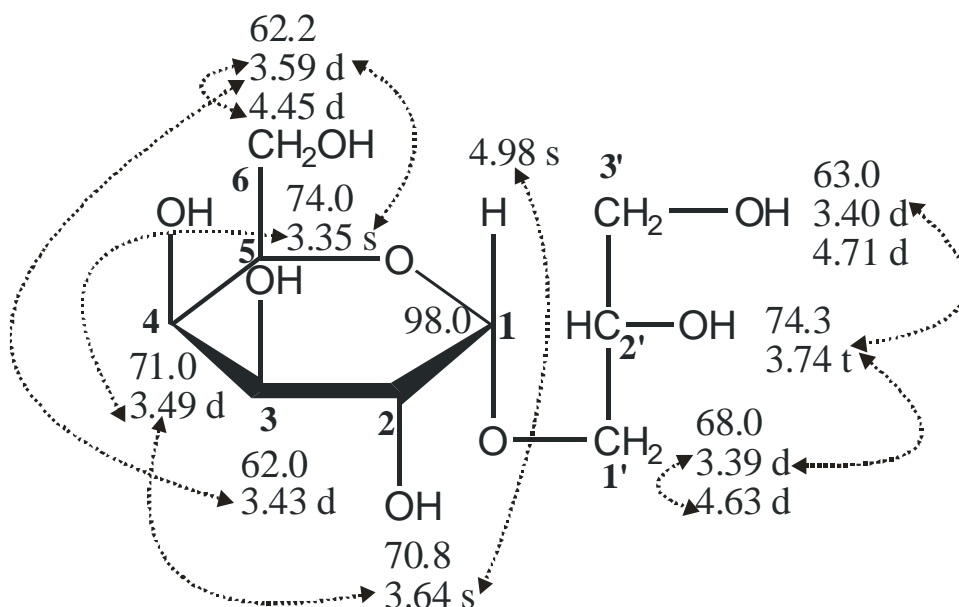


Figura 2: Estrutura do composto PPTLF com correlações ^1H - ^1H COSY.

O composto PPTFL foi acetilado para confirmação da estrutura proposta, O composto acetilado apresentou ponto de fusão em 112 °C. O espectro de infravermelho indicou a ausência de bandas na região de 3400-3100 cm⁻¹ e apresentou banda proeminente em 1747 cm⁻¹, indicando que o composto foi totalmente acetilado. O espectro de hidrogênio apresentou seis sinais de acetilas na região em δ 2,00 a 2,15, correspondente as hidroxilas presentes nas moléculas de açúcar e glicerol. Análise detalhada do ¹H-¹H COSY possibilitou estabelecer as atribuições nas moléculas de açúcar e do glicerol.

A comparação com dados apresentados na literatura (SASSAKI et al., 1998) para o composto PTFLL e seu derivado acetilado, sugere que o composto PPTLF trata-se do **monogalactopiranosilglicerol**, isolado para diversos organismos marinhos como dinoflagelados (OSHIMA et al., 1994), moluscos (KATSUOKA et al., 1990) e algas (DEMBITSKY et al., 1991).

Quadro 1: Dados de ¹H e ¹³C (DMSO) do composto PPTFL e do composto acetilado (CDCl₃).

C	δ H (J Hz) PPTFL	δ C (HSQC) PPTFL	δ H (J Hz) acetilado	δ C acetilado
1	4,98 s	98,0	4,11 d (1,2)	96,1
2	3,84 s	70,8	4,40 dt (1,2; 6,2)	74,2
3	3,43 d (8,0)	62,0	4,07 dd (1,2; 3,4)	68,1
4	3,49 d (4,8)	71,0	5,46 dd (1,2; 3,4)	67,5
5	3,35 s	74,0	5,09 dd (3,4; 10,6)	63,9
6	3,59 d (11,1) 4,45 d (4,8)	62,2	5,35 dd (3,4; 10,6)	61,8
1'GLI	4,63 d (4,8) 3,39 d (9,6)	68,0	4,13 d (1,8) 4,14 d (1,2)	66,8
2'GLI	3,74 t (7,0)	74,3	4,25 m	68,1
3'GLI	4,71 d (4,8) 3,40 d (7,0)	63,0	4,03 d (5,6) 4,17 d (5,6)	63,5

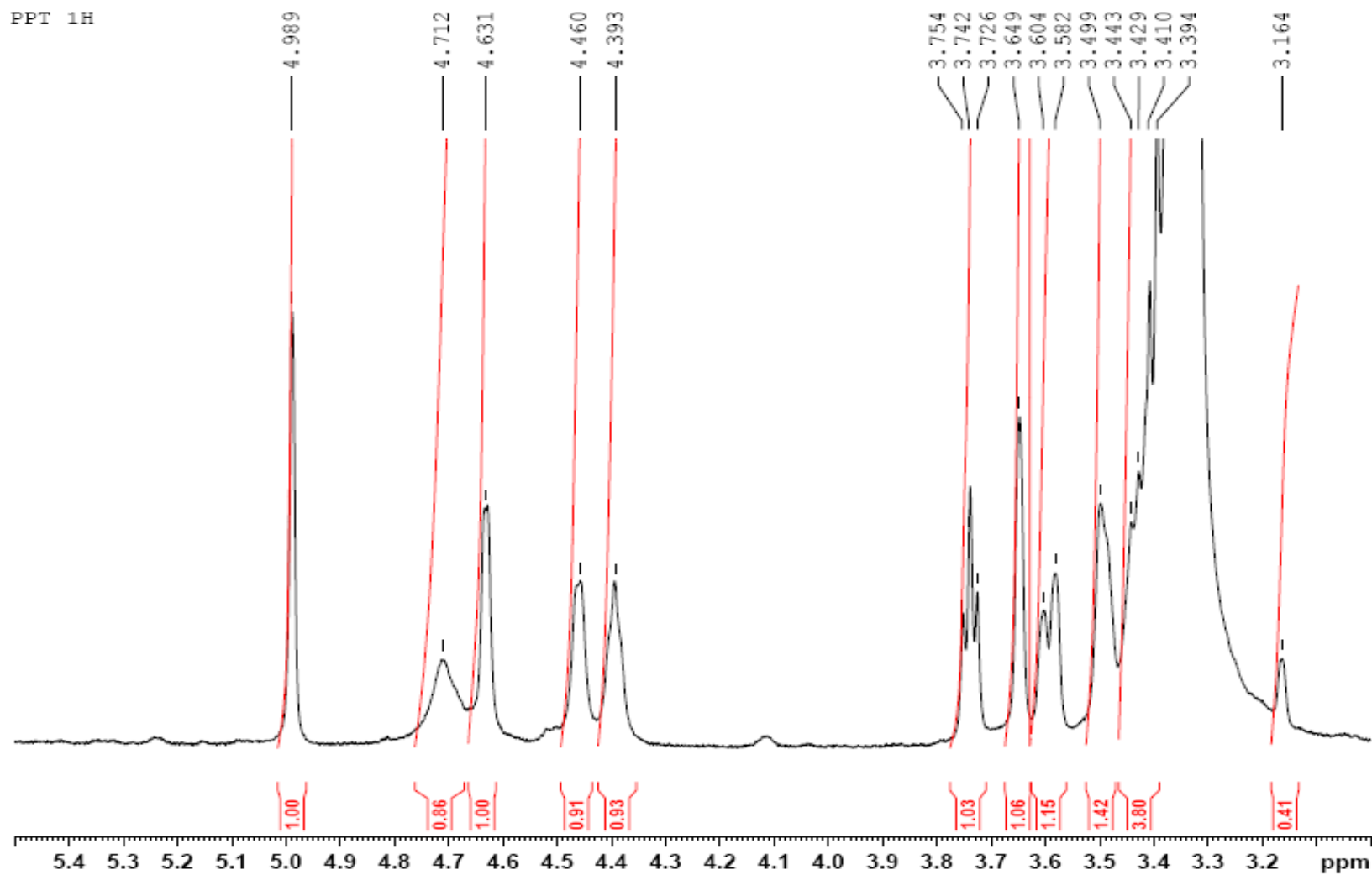


Figura 3: Espectro ^1H RMN do composto PPTFL em DMSO (500 MHz).

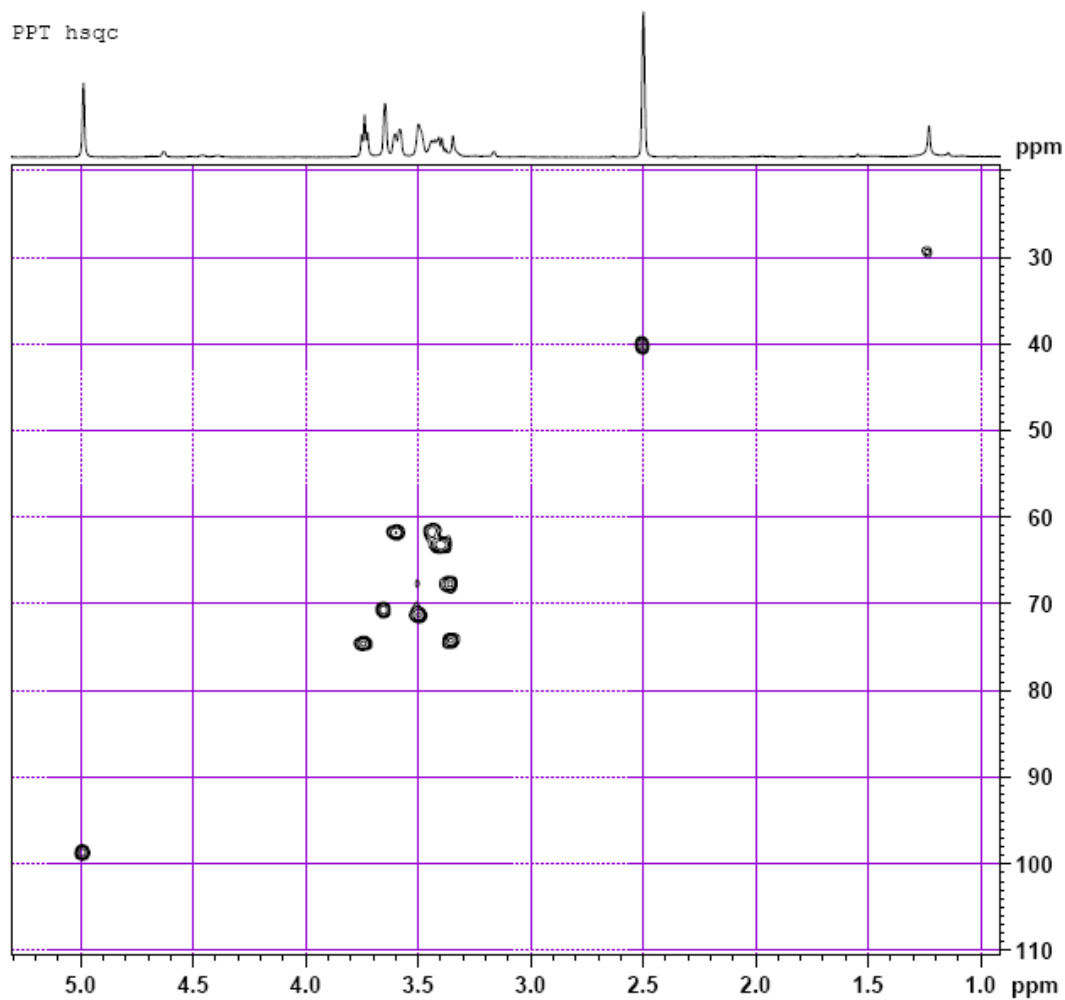


Figura 4: Espectro de correlação HSQC do composto PPTFL em DMSO (500 MHz).

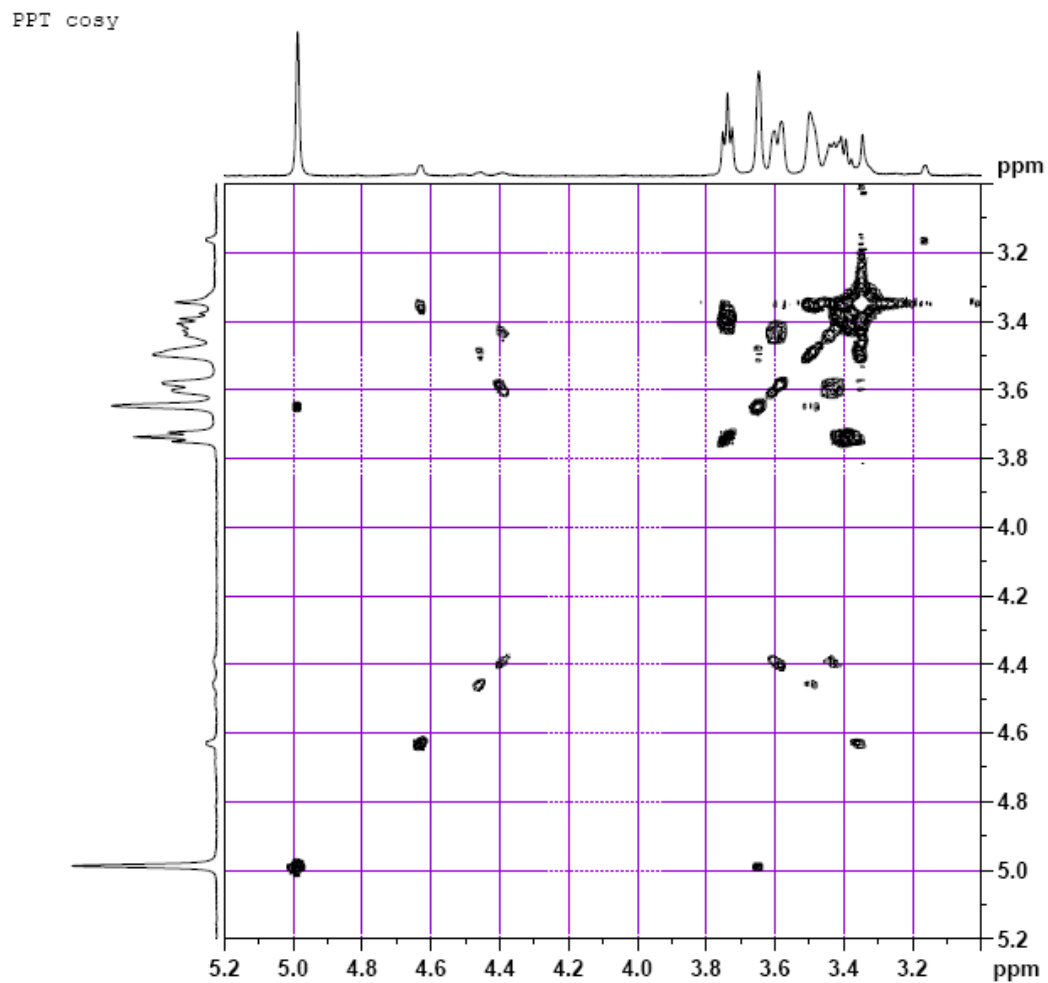


Figura 5: Espectro de correlação ^1H - ^1H COSY do composto PPTFL em DMSO (500 MHz).

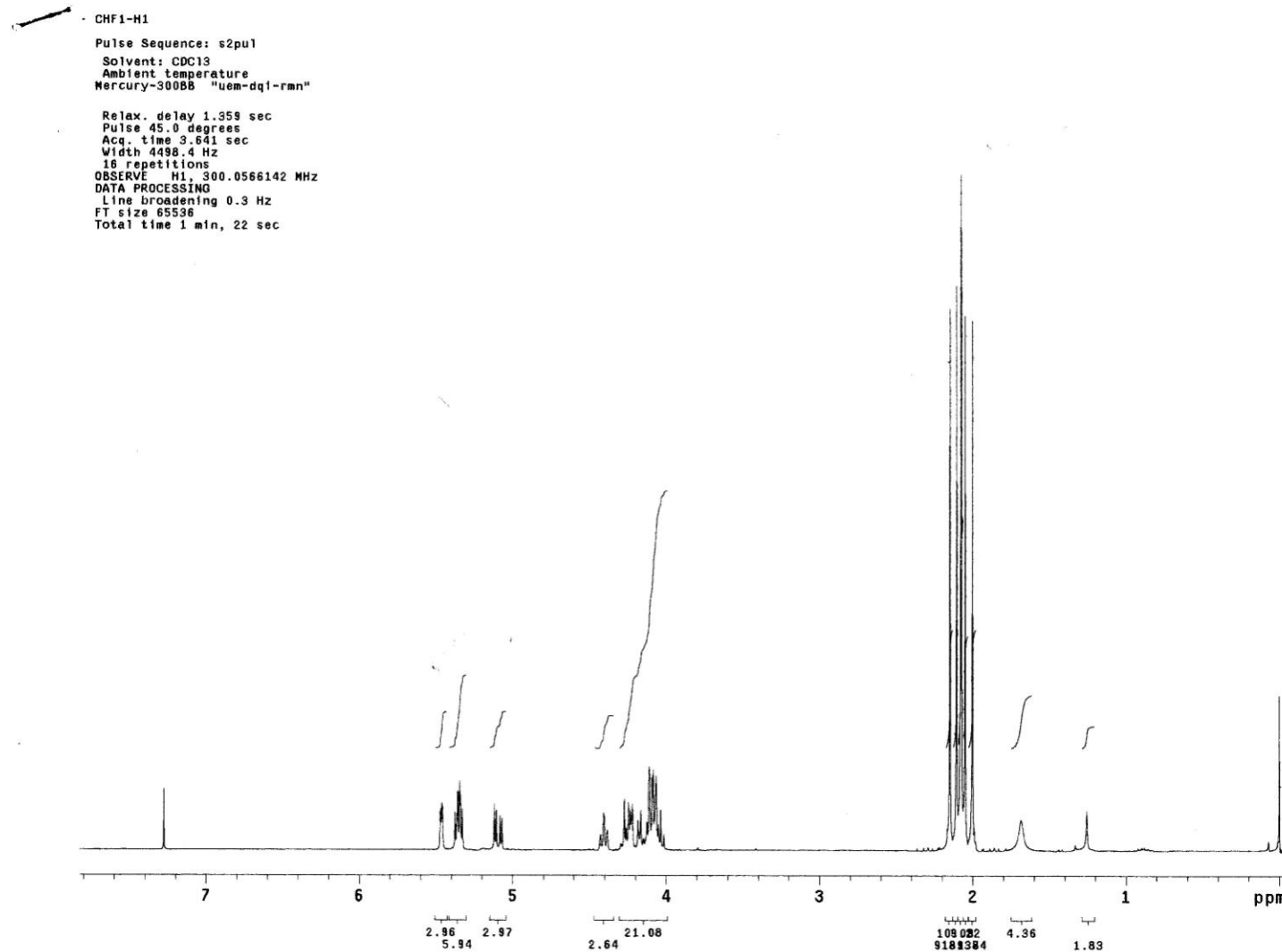


Figura 6: Espectro ^1H RMN do composto PPTFL acetilado em CDCl_3 (300 MHz).

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Mercury-30008 "uom-dq1-rmn"

Relax. delay 1.132 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 0.868 sec
Width 18867.9 Hz
1024 repetitions
OBSERVE C13, 75.4492792 MHz
DECOUPLE H1, 300.0581721 MHz
Low power 1023 dB atten.
Continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 32768
Total time 36 min, 57 sec

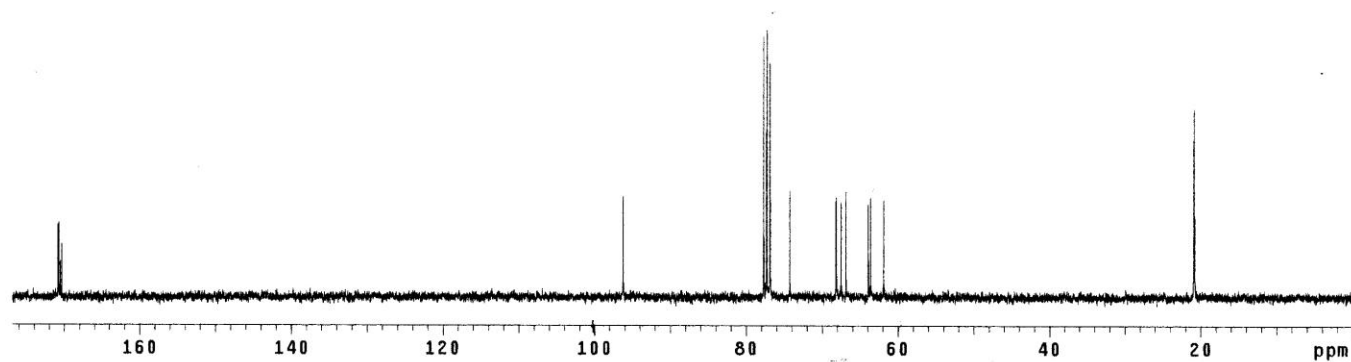


Figura 7: Espectro ^{13}C RMN do composto PPTFL acetilado em CDCl_3 (75 MHz).

CHF1-COSY
Pulse Sequence: COSY
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Mercury-300BS "uem-dqi-rm"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.180 sec
Width 2843.3 Hz
2D Width 2843.3 Hz
12 repetitions
128 increments
OBSERVE F1, 300.0566142 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.090 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.045 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 33 min, 2 sec

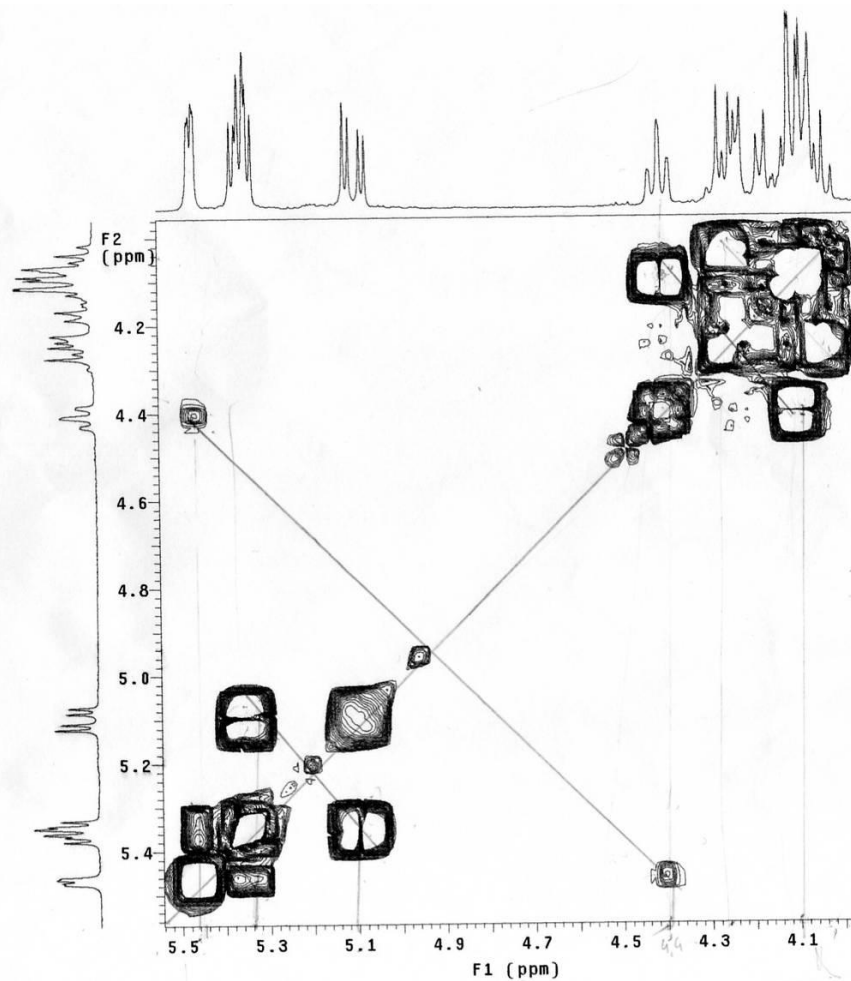


Figura 8: Espectro ^1H - ^1H COSY do composto PPTFL acetilado em CDCl_3 (300 MHz).

- Composto GLIF6:

O composto GLIF6 foi obtido após processo de fracionamento (**Figura 1**) como um líquido branco e inodoro. O espectro de infravermelho apresentou bandas entre 3400 e 3100 cm^{-1} e 1150 a 1000 cm^{-1} , indicando a presença de hidroxilas. O espectro de ^1H RMN apresentou sinais na região de δ 5,33 a 2,94 (12H) com deslocamento típico para hidrogênios ligados a carbonos oximetilenos ou oximetinos, sinais de hidrogênios metilênicos em δ 2,38 (4H) e 1,64 (4H). A presença de um sinal intenso em 1,31 (52H) e sinais de metilas em δ 0,92 (7H) sugerem uma cadeia longa, de ácidos graxos saturados.

As bandas intensas no espectro de infravermelho em 1261, 1020 e 800 cm^{-1} sugerem a presença de um grupo sulfato na molécula, hipótese esta decorrente da constatação de altas constantes de acoplamento na molécula de açúcar em torno de 14,3 Hz. As constantes de acoplamento vicinais de cada hidrogênio, com exceção do $J_{\text{H1}}\text{-}J_{\text{H2}} = 3,8\text{ Hz}$, variam de 5,5 a 14,3 Hz mostrando que todos os outros hidrogênios são *trans*-diaxial. Isto corresponde a estrutura da α -D-glucopiranosil, a qual quando sulfatada em C6 (6-deoxi-6-sulfo- α -D-glicose) recebe a denominação de sulfoquinovose, composto descrito inicialmente em 1959 (Benson et al., 1959) como o primeiro sulfolípido derivado do glicerol (sulfoquinovosildiacilglicerol).

O espectro de massas permitiu identificar as cadeias de ácidos graxos saturados. Foi observada a presença de dois picos na região de maiores massas em m/z 765 e 793 indicando que o composto GLIF6 estava em mistura. Para o primeiro composto (m/z 765), com fórmula molecular $\text{C}_{39}\text{H}_{73}\text{O}_{12}\text{S}$, os picos em m/z 537 e 509 indicam $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}]$ e $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}]$, respectivamente, indicando a eliminação de fragmentos correspondentes aos ácidos mirístico (14:0) e palmítico (16:0). Estes foram confirmados com as presenças dos picos em m/z 227 e 255. Já para o segundo composto (m/z 793), com fórmula molecular $\text{C}_{41}\text{H}_{77}\text{O}_{12}\text{S}$, a presença de um pico em m/z 537 indicou $[\text{M}-\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}]$, correspondente a eliminação de fragmento correspondente ao ácido palmítico (16:0).

Em conclusão, para a substância codificada como GLIF6 constatou a presença de uma mistura de glicolípídeos, que em comparação dos dados obtidos pelo espectro de hidrogênio com dados da literatura (KEUSGEN et al., 1997; SASSAKI et al., 2001; WANG et al., 2007) permitiu propor trata-se do **sulfoquinovosildiacilglicerol (Figura 9)**, isolado de moluscos (KATSUOKA et al., 1990) e algas (DEMBITSKY et al., 1991, WANG et al., 2007), mas primeiramente descrito para *Laurencia flagellifera*.

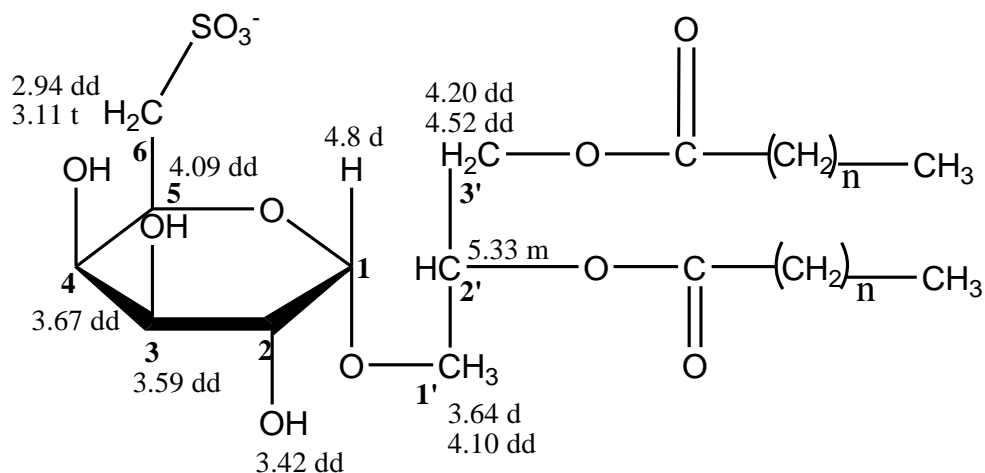


Figura 9: Estrutura geral do composto GLIF6 com dados obtidos do espectro de hidrogênio.

Quadro 2: Dados de ^1H RMN do composto GLIF6 (MeOD) em comparação com dados da literatura (Keusgen et al., 1997; Sasaki et al., 2001).

C	δ H (J Hz)	δ H (J Hz) CDCl_3 Keusgen et al., 1997	δ H DMSO Sasaki et al., 2001
1	4,8 d (3,8)	4,77 d (3,8)	4,70
2	3,42 (3,8; 10,0)	3,38 dd (3,8; 9,8)	3,30
3	3,59 (6,2; 10,0)	3,62 dd (8,8; 9,8)	3,49
4	3,67 dd (5,5; 11,0)	3,06 dd (8,8; 9,8)	3,05
5	4,09 dd (5,5; 14,3)	4,05 ddd (2,1;9,8;9,9)	3,91
6	2,94 dd (9,5; 14,3) 3,11 t (9,5)	2,90 dd (9,2; 14,3) 3,37 dd (2,1; 14,3)	2,69 3,04
1'GLI	3,64 dd (5,5; 11,0) 4,10 dd (5,2; 11,0)	3,55 dd (6,4; 10,8) 4,08 dd (5,3; 10,8)	3,52 4,00
2'GLI	5,33 m	5,30 m	5,27
3'GLI	4,20 dd (7,2; 12,0) 4,52 dd (3,8; 12,4)	4,18 dd (6,2; 12,0) 4,49 dd (3,0; 12,0)	4,25 4,47
CH_2	2,38-1,31	-	2,30-1,10
CH_3	0,92	-	0,85

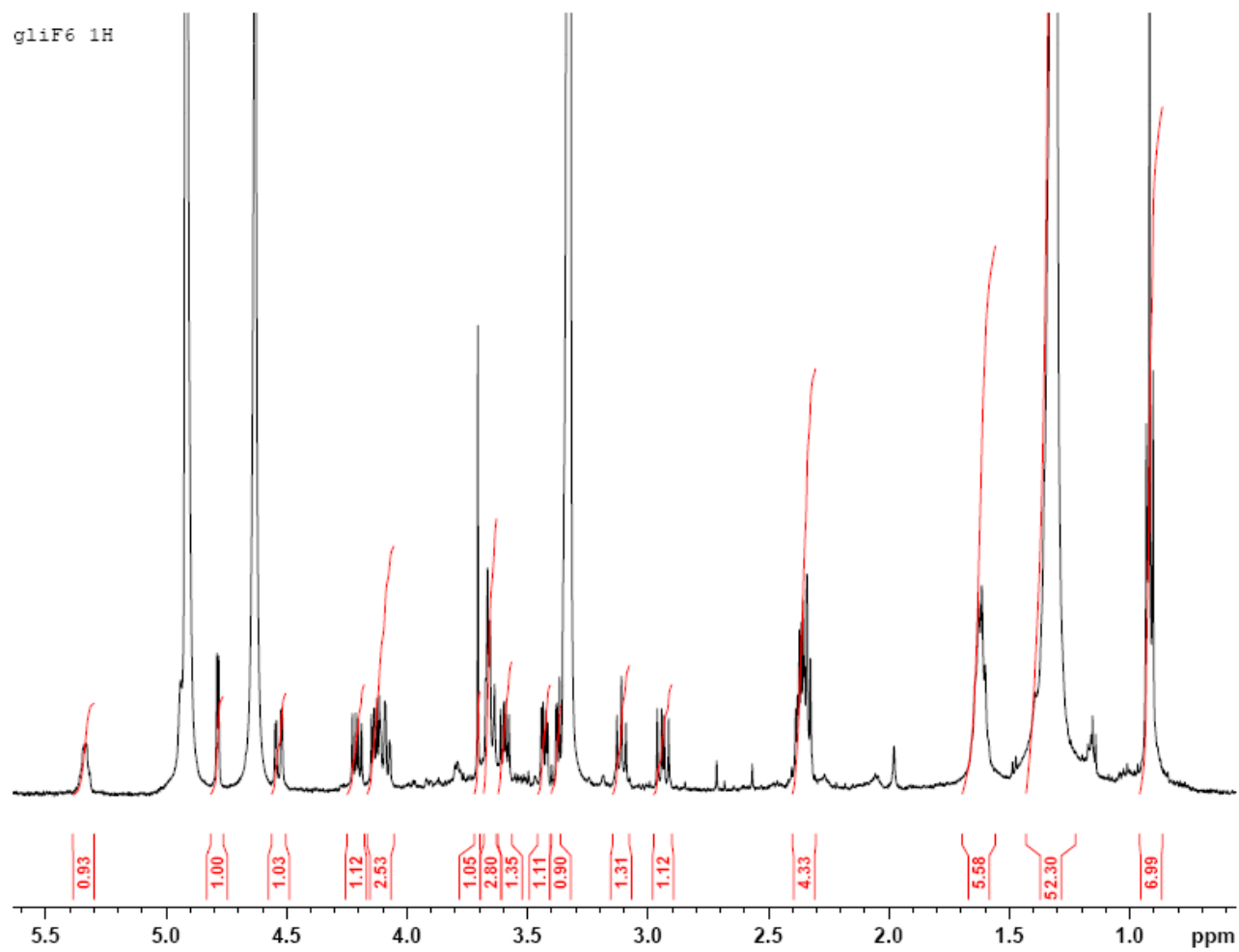


Figura 10: Espectro de ^1H RMN do composto GLIF6 em MeOD (500 MHz).

Generic Display Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Gaby\GLI6000005.d
Method tune_low formiato.m
Sample Name Gli F6
Comment 40 eV

Acquisition Date 5/20/2009 9:49:21 AM

Operator BDAL@DE
Instrument micrOTOF-Q

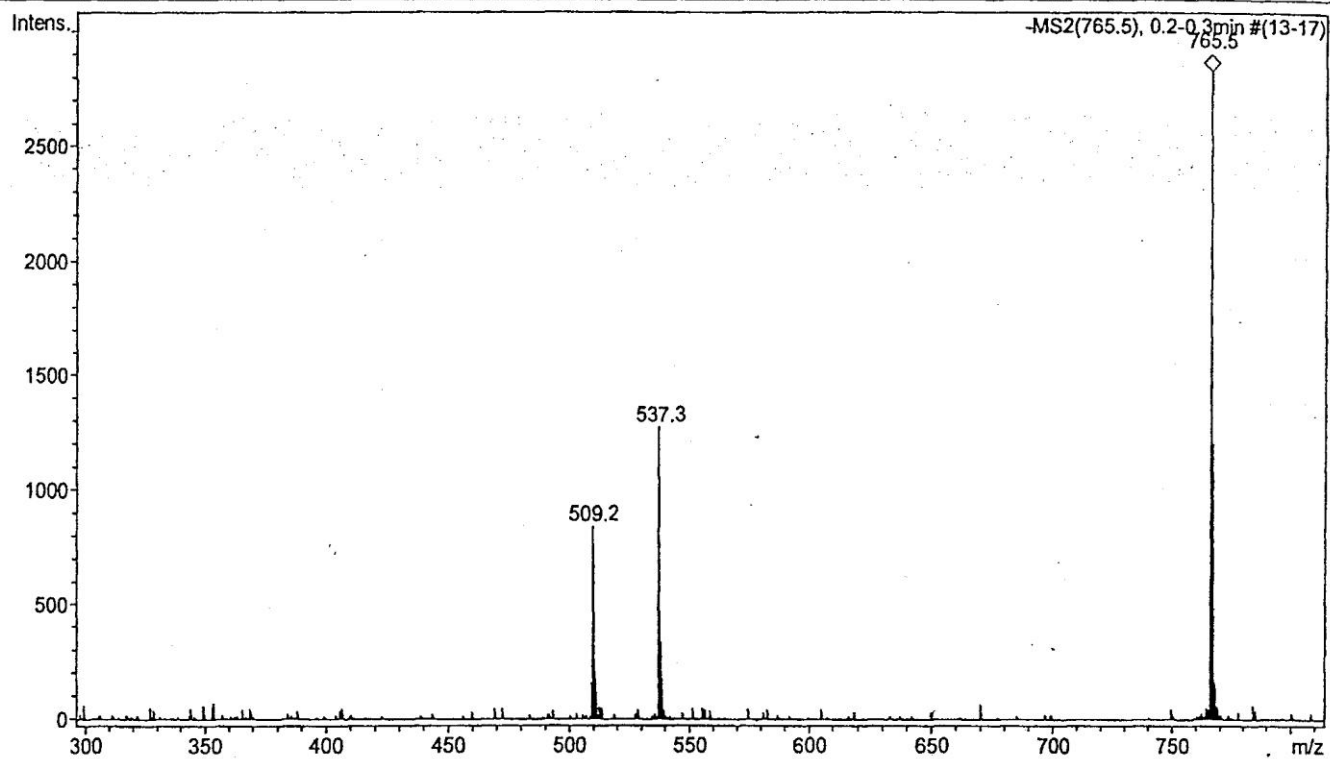
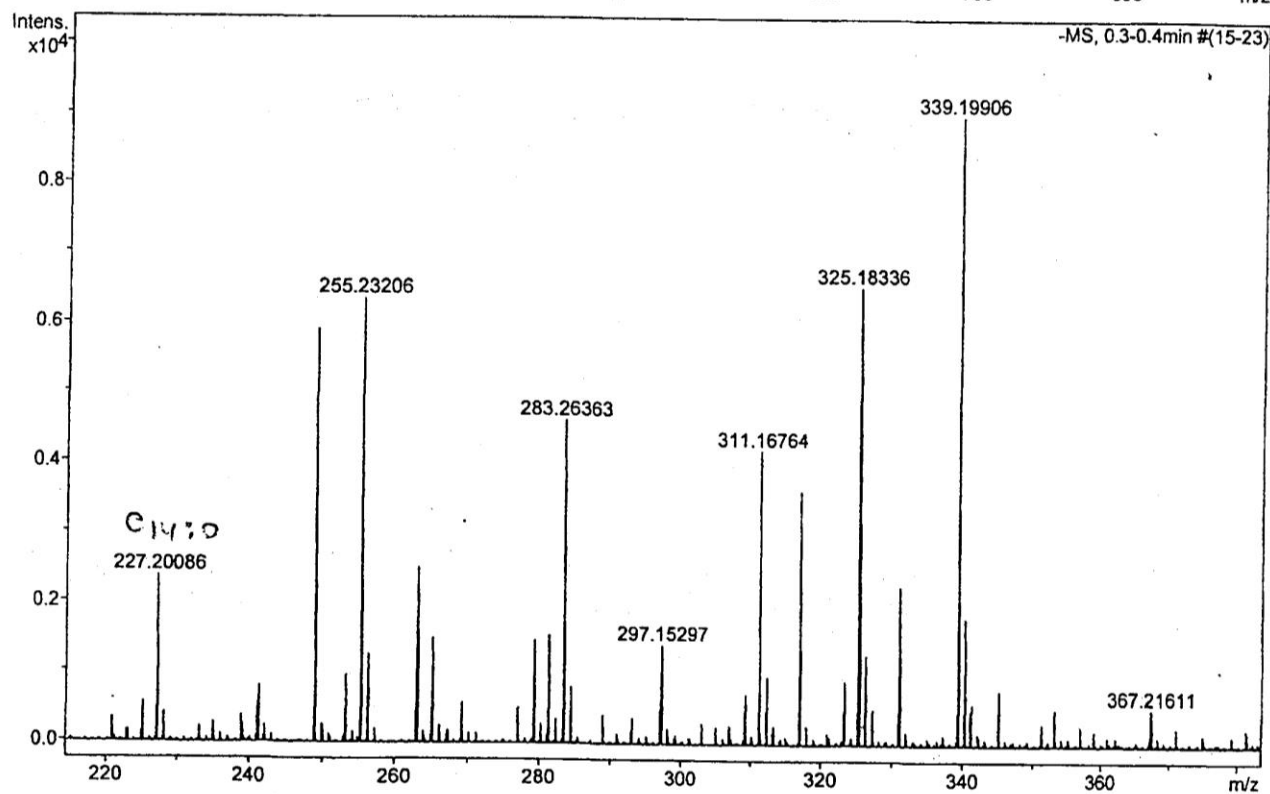


Figura 11: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto GLIF6.



Bruker Compass DataAnalysis 4.0

printed: 5/20/2009 12:06:10 PM

Page 1 of 1

Meas. m/z	#	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻ Conf
765.48183	1	C ₃₉ H ₇₃ O ₁₂ S	765.48282	1.3	1.5	3.5	ok	even

Figura 12: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto GLIF6.

Generic Display Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Gaby\GLI6000006.d
Method tune_low formiato.m
Sample Name Gli F6
Comment 400V

Acquisition Date 5/20/2009 9:51:59 AM

Operator BDAL@DE
Instrument micrOTOF-Q

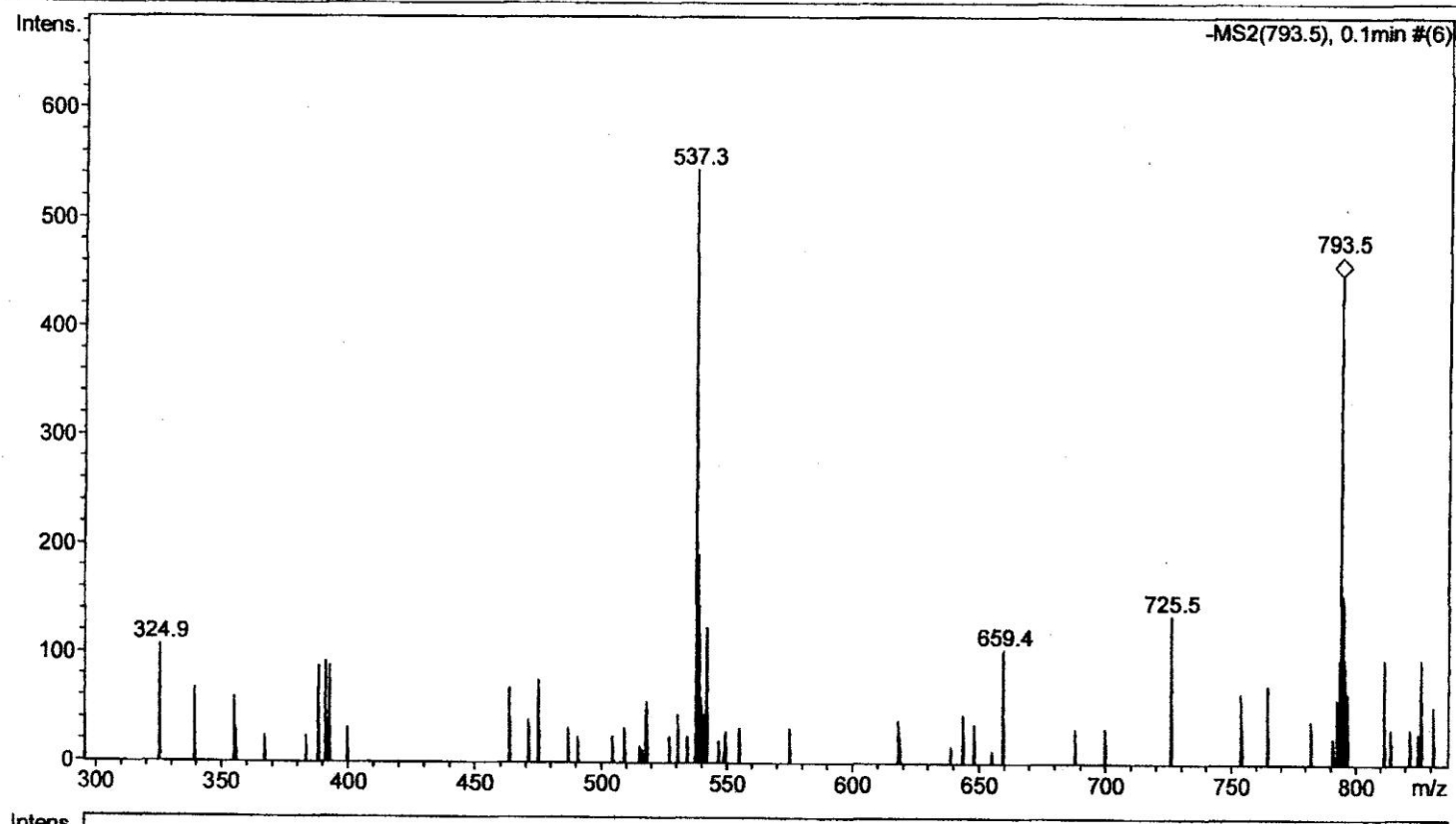
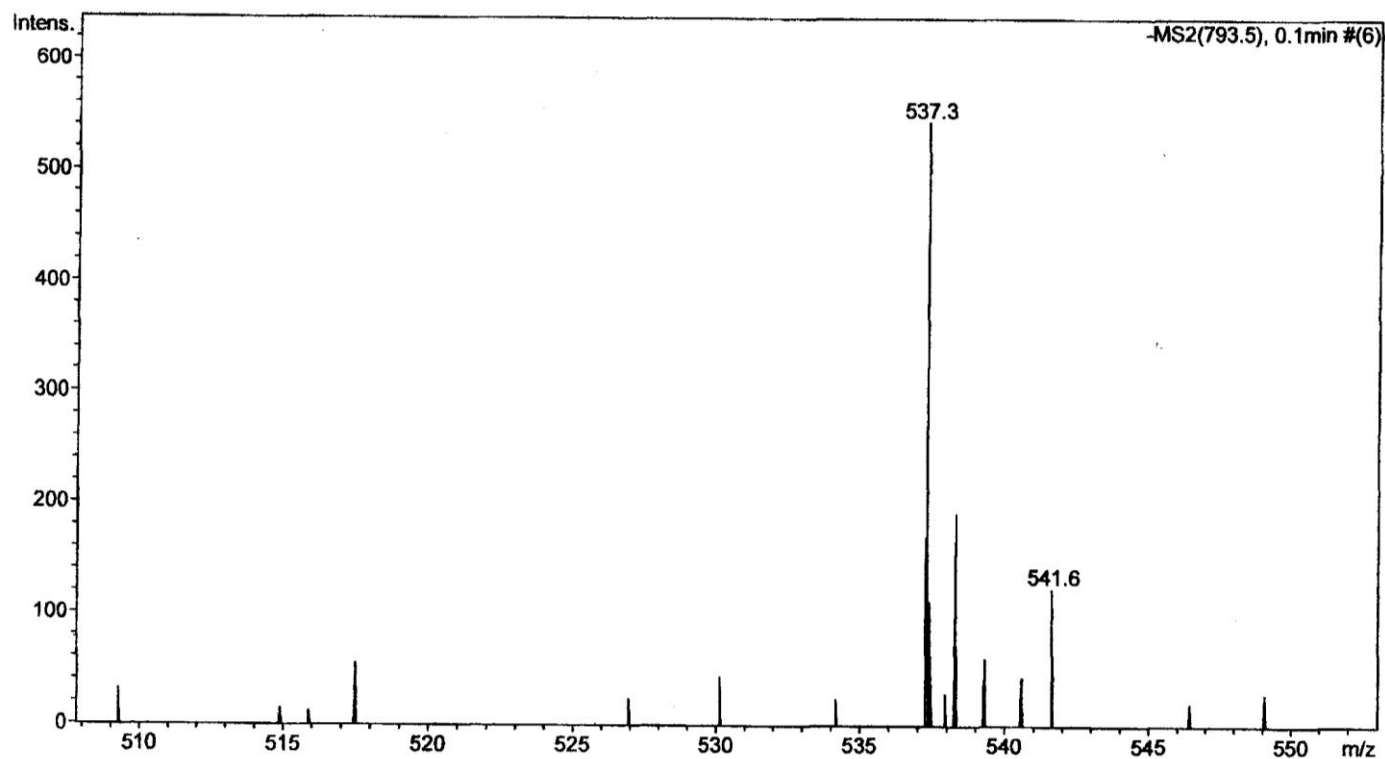


Figura 13: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto GLIF6.



Bruker Compass DataAnalysis 4.0 printed: 5/20/2009 10:15:51 AM Page 1 of 1

Meas. m/z	#	Formula	m/z	err [ppm]	Mean err [ppm]	rdb	N-Rule	e ⁻	Conf
793.51179	1	C ₄₁ H ₇₇ O ₁₂ S	793.51412	2.9	2.2	3.5	ok	even	

Figura 14: Espectro de massas de alta resolução por eletrospray do composto GLIF6.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A abundância de compostos halogenados isolados de organismos marinhos distingue-os dos produtos naturais provenientes de plantas terrestres. Em particular, os compostos isolados de algas marinhas vermelhas (Rhodophyta) exibem a maioria dos metabólitos halogenados reportados na literatura (FENICAL, 1975; GRIBBLE, 1998; FAULKNER, 2002). Por causa da grande quantidade de substâncias halogenadas, as quais na sua maioria são terpenóides, e em parte por que os terpenos são precursores biogénéticos de muitos produtos naturais bioativos, a biossíntese de terpenos cíclicos halogenados tem causado interesse na comunidade científica. Van Tamelen e Hessler (1966, 1968) demonstraram que n-bromosuccinamida reage com o metil farnesato em um mistura aquosa de tetrahydrofurano resultando na produção de um derivado bromado bicíclico derivado do farnesano. Essa reação foi a primeira demonstração que o íon bromônio induz a ciclização dos terpenos formando produtos bromocíclicos.

Subsequentemente, reagentes foram desenvolvidos para produzir terpenos cíclicos bromados (WOLINSKY & FAULKNER, 1976; HOYE & KURTH, 1978, 1979; HOYE et al., 1981; GONZÁLEZ et al., 1976; GONZÁLEZ & FORSYTH, 2000; KATO *et al.*, 1980; MURAI et al., 1981, 1984; SHIEH & PRESTWICH, 1982; GOLAPAN et al., 1992), conduziu a hipótese de terpenos naturais cíclicos bromados são resultantes da ciclização de um precursor terpênico acíclico induzida por um íon bromônio. Posteriormente, no ano de 1983, Vilter iniciou a descoberta da enzima vanádio bromoperoxidase (V-BrPO) e demonstrou o seu envolvimento na formação desse tipo de terpenos halogenados. A presença desta enzima foi subsequentemente encontrada na maioria das classes de algas marinhas, incluindo espécies que produzem produtos naturais halogenados quirais (WEYAND et al., 1999; ISUPOV et al., 2000).

A enzima vanádio peroxidase cataliza a oxidação de haletos (I⁻, Br⁻, Cl⁻) através de um complexo peróxido e o halogênio oxidado intermediário pode halogenar um substrato orgânico apropriado ou oxidar um segundo equivalente de peróxido de hidrogênio, produzindo oxigênio no estado singleto excitado, completando o ciclo catalítico (WEYAND et al., 1999; EVERETT et al., 1990) (**Figura 1**). O papel desta enzima na biossíntese de sesquiterpenos bromados foi observado para os compostos nerodiol e sniderol, que foram isolados de espécies do gênero *Laurencia* Lamourox (CARTER-FRANKLIN & BUTLER, 2004).

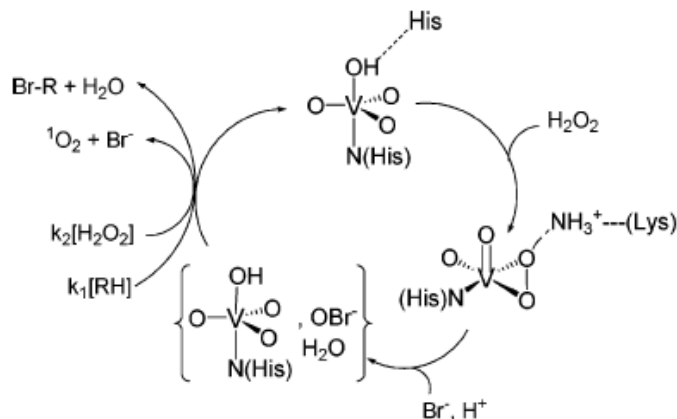


Figura 1: Reação química catalizada pela V- BrPO (CARTER-FRANKLIN & BUTLER, 2004).

Essas investigações explicam a acumulação de terpenos halogenados em espécies de *Laurencia*. O primeiro composto desse tipo isolado foi o elatol em 1974, por Sims e colaboradores. No decurso deste trabalho de doutorado, concentrado em espécies do gênero *Laurencia*, foi constatado a predominância de mais de 80%, através de espectro de ^1H RMN, de um álcool sesquiterpênico halogenado, identificado como elatol presente no extrato orgânico da espécie *Laurencia microcladia*.

Os estudos com essa espécie se concentraram no papel ecológico do elatol em outros organismos marinhos, visto que foi observada, em avaliação por cromatografia em camada delgada, a presença deste composto também em extratos brutos de ouriços do mar (*Echinometra lucunter*) e pepino-do-mar (*Holothuria grisea*). Os resultados obtidos no presente trabalho apresentaram o fato da utilização de espécies de algas contendo elatol com o elemento (*L. microcladia*) e ausência de papel deterrente, em concentrações de até 0,2 mg/pellets e em condições experimentais utilizando ouriços vivos em tanques de água salgada por sete dias.

O elatol, também foi avaliado para possíveis atividades farmacológicas com colaboração de diferentes grupos de pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina, como atividade antiviral, antitumoral e antiparasitária. Foi observado na literatura que o elatol havia demonstrando atividade antibacteriana e antifúngica (KÖNIG & WRIGHT, 1997a, VAIRAPPAN et al., 2001; VAIRAPPAN et al., 2003). Observou-se elevada citotoxicidade para o elatol frente às células VERO utilizadas para avaliar atividade antiviral, o que não permitiu a continuidade deste composto para este tipo de avaliação.

Para a espécie *Laurencia catarinensis* a presença do elatol foi detectada, mas como composto minoritário. Por outro lado foi verificada, a acumulação de terpenóides, sendo possível o isolamento de 40 compostos. Destes, 21 possuem características estruturais semelhantes ao álcool sesquiterpênico caespitol, sendo 13 compostos inéditos na literatura. A formação do caespitol e

isocaespitol foi proposta por González e colaboradores (1976), antes mesmo da descoberta da enzima V-BrPO, e a sequência biogenética para este sesquiterpeno é mostrada na **figura 2**. A formação do (+)- β -chamigrano e derivados de (-)- β -chamigrano pode ser explicados pela aproximação do íon bisabolônio (1) a um sítio básico de uma enzima, a qual realiza a bromação deste íon e a adição antiparalela de Cl⁻ dando um sistema trans-diaxial bromoclorado. A estrutura trans-diaxial pode ser rearranjada para um sistema trans-diequatorial mais estável. A deprotonação de C8 nos sistemas trans-diaxial e trans-diequatorial bromoclorados dá origem a um α -bisaboleno, que é precursor do caespitol e isocaespitol.

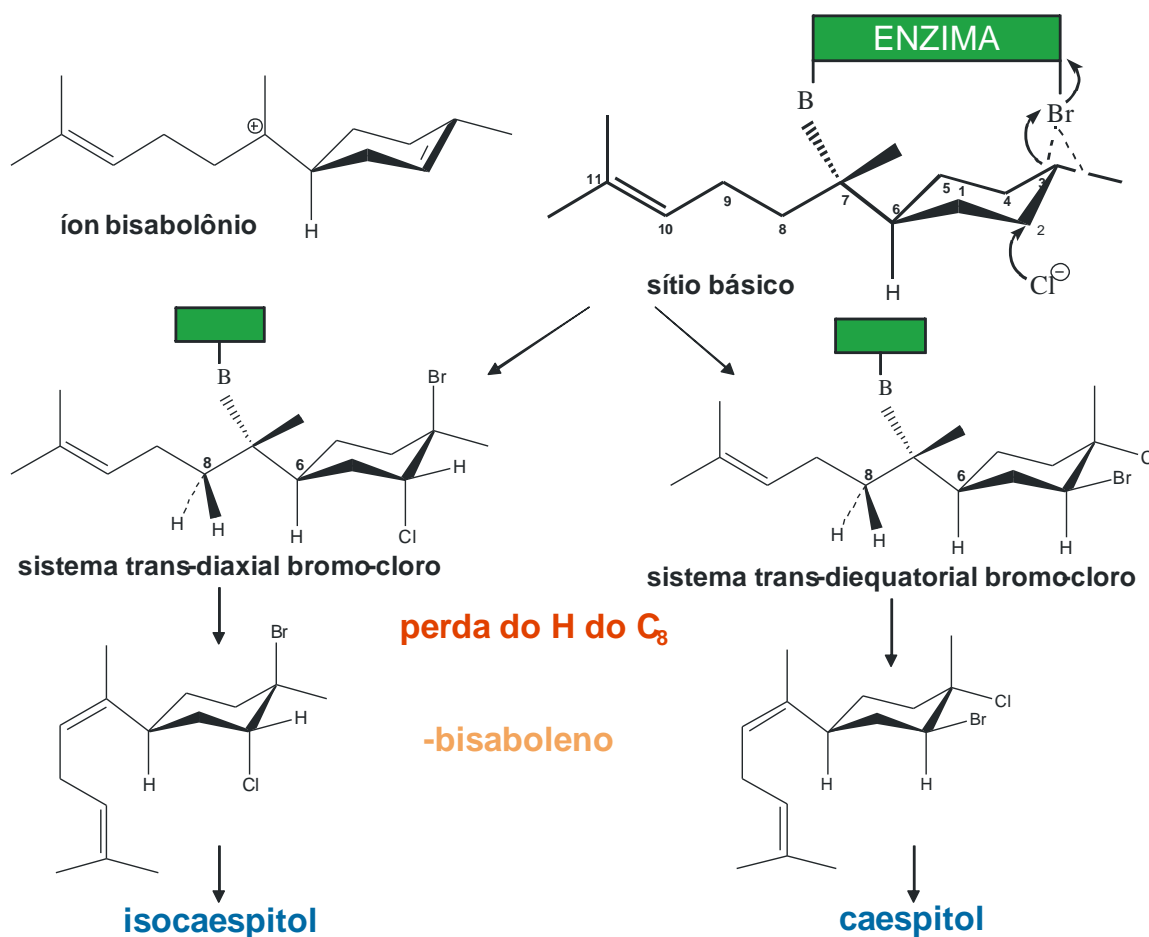


Figura 2: Sequência da biogênese dos sesquiterpenos caespitol e isocaespitol proposta por GONZÁLEZ et al. (1976), adaptado.

Da mesma forma que os derivados do caespitol e isocaespitol isolados, o laucapiranóide A e seus derivados (compostos 9, 10 e 18) podem ser formados através da mesma sequência biogenética conforme Britto e colaboradores (2006). Além disso, os compostos 16, 17, 19 e 20 podem ser considerados metabólitos derivados do caespitol e isocaespitol degradados.

Por outro lado, para a alga *Laurencia flagellifera* foi constatada a acumulação de compostos polares. A fração lipofílica apresentou baixo rendimento e não foram observados compostos do tipo terpenóides. Por esses resultados, foi realizada a investigação química do o extrato polar com o isolamento de dois compostos majoritários.

O composto PPTFL foi identificado como monogalactopiranosil, esse composto também é conhecido como floridosido, descrito inicialmente para células eucarióticas (WEGMANN, K., 1986). A este composto altamente hidrofílico é atribuído um papel importante de osmorregulação. As células de organismos eucariotos marinhos (algas) possuem uma osmorregulação por dois principais mecanismos: transporte de íons através da membrana celular por bombas iônicas ou pela síntese e degradação (ou excreção) de metabólitos de baixo peso molecular. Wegmann (1986) observou em estudos realizados com algas pertencentes as classes das clorofitas, phaeofitas e rodofitas, a presença de floridosido em algas vermelhas (WEGMANN, K., 1986). Chama a atenção que o mesmo composto foi obtido de forma similar para as espécies do gênero *Laurencia* (*L. microcladia* e *L. catarinensis*) e para as algas vermelhas *Acanthophora spicifera* e *Pterocladia capillaceae*. Com este resultado podemos propor que o composto PPTFL está diretamente ligado ao metabolismo primário destas algas.

O composto sulfoquinovosildiacilglicerol foi isolado como um composto abundante na espécie *Laurencia flagellifera*. Glicolípídeos sulfatados, como o sulfoquinovosildiacilglicerol estão envolvidos com proteínas para manter as atividades catalíticas nas células eucarióticas (GOURNAIS & BARBER, 1985) e presentes em membranas fotossintéticas de algas e cianobactérias (FATTORUSSO, E. et al, 1993) .Como exemplos de atividades biológicas, o sulfoquinovosildiacilglicerol possui propriedades antivirais contra HIV tipo 1 (GUSTAFSON et al., 1989) e HIV tipo 2 (WANG et al., 2007) e atividade antipromotora de tumores (SHIRAHASHI et al., 1993). Em continuidade a esse trabalho, o composto GLIF6 será purificado e enviado para testes de atividade antiviral e antitumoral realizados por grupos parceiros pertencentes a Universidade Federal de Santa Catarina.

CONCLUSÕES

A investigação química do extrato orgânico da espécie *Laurencia microcladia* indicou a presença de um metabólito majoritário identificado como o álcool sesquiterpênico halogenado, elatol, isolado em outras espécies do gênero *Laurencia* Lamouroux, mas observado pela primeira vez em *L. microcladia*.

Os estudos em cromatografia em camada delgada para extratos brutos de macroalga (*Laurencia microcladia*), ouriço do mar (*Echinometra lucunter*) e pepino do mar (*Holothuria grisea*) indicaram a presença de elatol em todos os extratos.

Os experimentos de herbivoria utilizando ouriços do mar (*Echinometra lucunter*), elatol em diferentes concentrações e macroalgas *L. microcladia*, *Gracilaria domingensis* e *Ulva fasciata* demonstraram que a ingestão de algas com elatol (*L. microcladia*) e de pellets de elatol com diferentes concentrações, foi ingerido até a concentração de 0,2 mg/pellets.

A investigação química do extrato orgânico da espécie *Laurencia catarinensis* resultou na identificação de 21 compostos sesquiterpenos halogenados ou sesquiterpenos halogenados degradados. Destes 21 compostos, 8 são compostos conhecidos e foram identificados como: caespitol, caespitano, 3-acetilcaespitol, laucapiranóide A, caespitenona, isocaespitol, deoxiisocaespitol e aplisiadiol. 13 compostos são inéditos na literatura e identificados como: o-metilfurocaespitano e seu estereoisômero no carbono 7, um isômero do caespitano, o derivado 5-acetoxi do caespitol, o derivado 5-acetoxi do caespitano, o derivado 5-acetoxi do 8-acetilcaespitol, o derivado 5-hidroxi do 8-acetilcaespitol, o derivado 5-acetoxi do laucapiranóide A, o derivado 5-hidroxi do laucapiranóide A, um derivado do isocaespitol, dois derivados do caespitol e um derivado do sniderol. Adicionalmente, foram isolados três compostos com características não semelhantes ao caespitol e identificados como: tirsiferol, trans-nerolidol e trans-fitol.

A investigação química do extrato aquoso da espécie *Laurencia flagellifera* resultou no isolamento de dois compostos majoritários identificados como monogalactopiranosilglicerol e sulfoquinovosildiacylglicerol.

Em relação aos ensaios biológicos, realizados através de colaboração com outros grupos, o composto elatol apresentou atividade tripanocida *in vitro* (*Trypanosoma cruzi*) ($CI_{50} = 13,86$ (12,39-15,51) μM) e leishmanicida *in vitro* (*Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*) (CI_{50} *L. amazonensis* = 2,54 (2,44-2,64) μM e CI_{50} *L. chagasi* = 2,56 (1,94-3,38) μM). Mostrou também atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* para células B16F10 (melanoma), mas apresentou elevada citotoxicidade frente às células VERO utilizadas para avaliar a atividade antiviral frente aos vírus herpéticos do tipo 1 (2 cepas) [modelo viral de genoma DNA], e do rotavírus SA-11 [modelo viral de genoma RNA]. Os compostos caespitol (composto 1) e

isocaespitol (composto 14) não apresentaram atividade antitumoral *in vitro* contra células T47D (tumor de mama) quanto a inibição do fator de ativação de hipóxia e apresentaram atividade antitumoral *in vitro* quando testados contra as células U373 (glioblastoma), A549 (câncer de pulmão) e PC3 (câncer de próstata) com $CI_{50} = 44-48 \mu\text{M}$ para o composto **1** e $CI_{50} = 70-73 \mu\text{M}$ para o composto **14**. Os compostos caespitol e derivado 5-acetoxi do caespitol apresentaram elevada citotoxicidade frente às células VERO utilizadas para avaliar atividade antiviral frente aos vírus herpéticos do tipo 1 (2 cepas) [modelo viral de genoma DNA], e do rotavírus SA-11 [modelo viral de genoma RNA].

REFERÊNCIAS

- ALGAMARE. www.ib.usp.br/algamare-br
- BAPTISTA, L.R.M. Flora marinha de Torres (Chlorophyta, Xanthophyta, Phaeophyta, Rhodophyta). **Boletim do Instituto de Biociências**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Série Botânica, 37, 1-244, 1977.
- BENNING, C. Questions remaining in sulfolipid biosynthesis: a historical perspective. **Photosynthesis Research**, 92, 199-203, 2007.
- BENSON, A.A.; DANIEL, H.; WISER, R. A sulfolipid in plants. **Proceedings of National Academy of Science USA**, 45, 1582-1587, 1959.
- BERLINCK, R.G.; OGAWA, C.A.; ALMEIDA, A.M.; SANCHEZ, M.A.; MALPEZZI, E.L.; COSTA, L.V.; HAJDU, E.; DE FREITAS, J.C. Chemical and pharmacological characterization of halitoxin from *Amphimedon viridis* (Porifera) from the southeastern Brazilian coast. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology**, v. 115, p. 155-163, 1996.
- BERLINCK, R.G.; HAJDU, E.; ROCHA, R.M.; OLIVEIRA, J.H. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 510-522, 2004.
- BHAKUNI, D.S.; RAWAT, D.S. **Bioactive Marine Natural Products**. Springer, 2005.
- BLUNT, J. W.; HARTSHORN, M. P.; MCLENNAN, T. J.; MUNRO, M. H. G., ROBINSON, W. T.; YORKE, S. C. Thyrsiferol: a squalene-derived metabolite of *Laurencia thyrsefera*. **Tetrahedron Letters**, 69-72, 1978.
- BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; HU, W.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, 24, 31-86, 2007.
- BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, 20, 1-48, 2003.
- BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, 21, 1-49, 2004.
- BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, 23, 26-78, 2006.
- BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, 22, 15-61, 2005.
- BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; WU, P.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, 25, 35-94, 2008.
- BOURGUET-KONDROCKI, M.L.; KORNPROBST, J.M. Marine Pharmacology: Potentialites in the treatment of infectious diases, osteoporosis and Alzheimer's disease. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 97, p. 105-131, 2005.
- BRASCO, M.F.R., SELDES, A.M., PALERMO, J.A. Paesslerins A and B: novel tricyclic sesquiterpenoids from the soft coral *Alcyonium paessleri*. **Organic Letters**, 3, 1415-1417, 2001.
- BREITMAIER, E. Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry: A practical guide, John Wiley and Sons Ltda, 2002.
- BRENNAN, M. R.; ERICKSON, K. L. Austradiol acetate and austradiol diacetate, 4,6-dihydroxy-(+)-selinane derivatives from an Australian *Laurencia* sp. **Journal of Organic Chemistry**, 47, 3917-3921, 1982.

- BRITO, I.; DIAS, T.; DIAZ-MARRERO, A.R.; DARIAS, J.; CUETO, M. Aplysiadiol from *Aplysia dactylomela* suggested a key intermediate for a unified biogenesis of regular and irregular marine algal bisabolene-type metabolites. **Tetrahedron**, 62, 9655-9660, 2006.
- BUDZIKIEWICZ, H. *Massemspektrametrie*, 5 ed.; Toronto: Wiley-Veh, 1998.
- CACCAMESE, S.; AZZOLINA, R.; DUESLER, E.N.; PAUL, J.C.; RINEHART, K.L. Laurencienyne, a new acetylenic cyclic ether from the marine red alga *Laurencia obtusa*. **Tetrahedron Letters**, 21, 2299-2302, 1980
- CALDERON G.J., CASTELLANOS L., DUQUE C., ECHIGO S., HARA N., FUJIMOTO Y. Ophirasterol, a new C31 sterol from the marine sponge *Topsentia ophiraphidites*. **Steroids**, 69, 93-100, 2004.
- CARDOSO, M. A.; NOSEDA, M.D.; FUJII, M.T.; ZIBETTIC, R.M.G.; DUARTEA, M.E.R. Sulfated xylomannans isolated from red seaweeds *Chondrophycus papillosus* and *C. flagelliferus* (Ceramiales) from Brazil. **Carbohydrate Research**, 342, 2766–2775, 2007.
- CARTER-FRANKLIN, J.N.; BUTLER, A. Vanadium bromoperoxidase-catalyzed biosynthesis of halogenated marine natural products. **Journal of the American Chemical Society**, 126, 15060-15066, 2004.
- CASSANO, V., FUJII, M.T., DÍAZ-LARREA, J., OLIVEIRA, M.C., GIL RODRIGUEZ, M.C. & SENTÍES, A.G. Evidence for the conspecificity of *Palisada papillosa* with *P. perforate* (Ceramiales, Rhodophyta) from the western and eastern Atlantic Ocean on the basis of morphological and molecular analyses. **Phycologia**, 48, 86-100, 2009.
- CASSANO, V., SZÉCHY, M. T. M. & FUJII, M.T. *Laurencia caduciramulosa* (Ceramiales, Rhodophyta) from Ilha Grande Bay, Rio de Janeiro, Brazil: a recently introduced species into the Atlantic Ocean. **Cryptogamie, Algologie**, 27, 265-277, 2006.
- CHANG, M.; VAZQUEZ, J.T.; NAKANISHI, K.; CATALDO, F.; ESTRADA, D.M.; FERNANDEZ, J.; GALLARDO, A.; MARTIN, J.D.; NORTE, M.; PÉREZ, R.; RODRIGUEZ, M. Regular and irregular sesquiterpenes containing a halogenated hydropyran from *Laurencia caespitosa*. **Phytochemistry**, 28, 1417-1424, 1989.
- CORDEIRO-MARINO, M. & FUJII, M.T. *Laurencia catarinensis* (Rhodomelaceae, Rhodophyta), a new species from Ilha de Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, 8, 47-53, 1985.
- CORDEIRO-MARINO, M., FUJII, M.T. & PINHEIRO-JOVENTINO, F. Morphological and cytological studies of *Laurencia furcata* Cordeiro-Marino and Fujii (Rhodophyta, Rhodomelaceae): a new species from Brazil. **Cryptogamic Botany**, 4, 373-380, 1994.
- CORDEIRO-MARINO, M., FUJII, M.T. & YAMAGHISHI-TOMITA, N. Morphological and cytological studies on Brazilian *Laurencia*. 1: *L. arbuscula* Sonder (Rhodomelaceae, Rhodophyta). **Rickia**, 10, 29-391, 1983.
- COSTANTINO, V., FATTORUSSO, E., MANGONI, A., AKNIN, M., FALL, A., SAMB, A., MIRALLES, J. An unusual ether glycolipid from the Senegalese sponge *Trikentrion loeve* Caster. **Tetrahedron**, 49, 2711-2714, 1993.
- COUTINHO, A.F.; CHANAS, R.; SOUZA, T.M. L.; FRUGRULHETTI, I. C.P.P.; EPIFÂNIO, R.A. Anti HSV-1 Alkaloids from a Feeding Deterrent Marine Sponge of the Genus *Aaptos*. **Heterocycles**, v. 57, p. 1265-1272, 2002.

- DA GAMA, B.A.P. ; CARVALHO, A.G.V ; WEIDNER, K. ; SOARES, A.R. ; COUTINHO, R. ; FLEURY, B.G. ; TEIXEIRA, V.L. ; PEREIRA, R.C. . Antifouling activity of natural products from Brazilian seaweeds. **Botanica Marina**, 51, 191-201, 2008.
- DA SILVA, I. **Triagem anti-herpética de alguns táxons da biodiversidade brasileira: Fracionamento biomonitorado de *Cecropia glaziovii* Sneath, Urticeae (embaúba)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 133 p, 2009.
- DAVYT, D.; FERNANDEZ, R.; SUESCUN, L.; MOMBRU, A.W.; SALDANA, J.; DOMINGUEZ, L.; COLL, J.; FUJII, M.T.; MANTA, E. New sesquiterpene derivatives from the red alga *Laurencia scoparia*. Isolation, structure determination, and antihelmintic activity. **Journal of Natural Products**, 64, 1552-1555, 2001.
- DEMBITSKY, V.M.; PECHENKINA-SHUBINA, E.E.; ROZENTSVET, O.A. Glycolipids and fatty acids of some seaweeds and marine grasses from the black sea. **Phytochemistry**, 30, 2279-2283, 1991.
- EL SAYED, K.A.; DUNBAR, D.C.; PERRY, T.L.; WILKINS, S.P.; HAMANN, M.T.; GREENPLATE, J.T.; WIDEMAN, M.A. Marine natural products as prototype insecticidal agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45, 2735-2739, 1997.
- EL-GAMAL, A. A.; WANG, W.; DU, C. Sulfur-containing polybromoindoles from the Formosan Red Alga *Laurencia brongniartii*. **Journal of Natural Products**, 68, 815-817, 2005.
- ERICKSON, K. L. in: **Marine natural products. chemical and biological perspectives**. New York. Scheuer, P.J., vol. V, chap. 4, Academic Press, 1983.
- EPIFÂNIO, R.A.; MARTINS, D.L.; VILLACA, R.; GABRIEL, R.J. Chemical Defenses Against Fish Predation in Three Brazilian Octocorals: 11 β ,12 β -Epoxy-pukalide as a Feeding Deterrent in ***Phyllogorgia dilatata***. *Journal of Chemistry Ecology*, v. 25, p. 2255-2265, 1999.
- EPIFÂNIO, R.A.; MAIA, L.F.; FENICAL, W. Chemical defenses of the endemic Brazilian gorgonian *Lophogorgia violacea* Pallas (Octocorallia, Gorgonacea). **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 11, p. 584-591, 2000.
- EVERETT, RR; SOEDJAK, HS; BUTLER, A. Mechanism of dioxygen formation catalyzed by vanadium bromoperoxidase. Steady state kinetic analysis and comparison to the mechanism of bromination. **Journal of the Biological Chemistry**, 265, 15671 - 15679, 1990.
- FALKENBERG, P. **Die Rhodomelaceen des Golfes von Neapel und der Angrenzenden Meeres-Abschnitte**. Fauna Flora Golfes Neapel 26. Berlin. 754p, 1901.
- FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, 1, 1-251, 1984.
- FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, 13, 13-75, 1996.
- FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Products Reports**, 15, 113-157, 1998.
- FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Products Reports**, 16, 155-198, 1999.
- FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Products Reports**, 17, 7-55, 2000.
- FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Products Reports**, 18, 1-49, 2001.
- FENICAL, W. Halogenation in the Rhodophyta: a review. **Journal of Phycology**, 11, p. 245-259, 1975.
- FLEURY, B.G.; PEREIRA, M.V.G.; SILVA, J.R.P.; KAISIN, M.; TEIXEIRA, V.L.; KELECOM, A. Comparative study of monohydroxylated sterols from seven species of marine brown algae from the Dictyotales and Fucales. **Phytochemistry**, 37, 1647-1649, 1994.

- FRANCISCO, M. E. Y.; ERICKSON, K. L. Ma'iliohydrin, a cytotoxic chamigrene dibromohydrin from a Philippine *Laurencia* Species. **Journal of Natural Products**, 64, 790-791, 2001.
- FRANCO, L.H., DE KIER JOFFE, E.B., PURICELLI, L., SELDES, A., PALERMO, J. Indole alkaloids from the tunicate *Aplidium meridianum*. **Journal of Natural Products**, 61, 1130-1132, 1998.
- FREILE-PELEGRIN, Y.; ROBLEDO, D.; CHAN-BACAB, M.J.; ORTEGA-MORALES, B.O. Antileishmanial properties of tropical marine extracts. **Fitoterapia**, 79, 374-377, 2008.
- FRIEBOLIN, H. Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy, 4. ed., Weinheim: VCH, 2005.
- FUJII, M.T. & SENTÍES, G. A. Taxonomia do complexo *Laurencia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) do Brasil, com ênfase nas espécies dos estados de São Paulo e do Espírito Santo. In: Senties, G. A. & Dreckmann, K.M. (Eds). **Monografias Ficológicas**. II. México, Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, México, Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil, 69-135, 2005.
- FUJII, M.T. **Estudos morfológicos, quimiotaxonômicos e citológicos em quatro espécies selecionadas de *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) do litoral brasileiro**. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 176p, 1998.
- FUJII, M.T. **Gênero *Laurencia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) no Estado de São Paulo: aspectos biológicos e taxonômicos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 145p, 1990.
- FUJII, M.T., GUIMARÃES, S.M.P.B., GURGEL, C.F.D. & FREDERICQ, S. Characterization and phylogenetic affinities of the red alga *Chondrophyucus flagelliferus* (Rhodomelaceae, Ceramiales) from Brazil based on morphological and molecular evidence. **Phycologia** 45, 432–441, 2006.
- FUKUSAWA, A.; HONMA, T.; TAKASUGI, Y.; MURAI, A. Biogenetic intermediates, (3*e* and 3*z*,12*z*)-laurediols and (3*e* and 3*z*)-12,13- dihydrolaurediols, isolated from *Laurencia nipponica*. **Phytochemistry**, 32, 1435-1438, 1993.
- GONZÁLEZ, A.G.; DARIAS, J., DIAZ, A.; FOURNERON, J.D.; MARTIN, J.D.; PEREZ, C. Evidence for the biogenesis of halogenated chamigranes from the red alga *Laurencia obtusa*. **Tetrahedron Letters**, 35, 3051-3054, 1976.
- GONZÁLEZ, A.G.; DARIAS, J.; MARTÍN, J.D. Caespitol, a new halogenated sesquiterpene from *Laurencia caespitosa*. **Tetrahedron Letters**, 26, 2381-2384, 1973.
- GONZÁLEZ, A.G.; DARIAS, J.; MARTÍN, J.D., PÉREZ, C. Isocaespitol, a new halogenated sesquiterpene from *Laurencia caespitosa*. **Tetrahedron**, 31, 2449-2451, 1975.
- GONZÁLEZ, A.G.; DARIAS, J.; MARTÍN, J.D., PÉREZ, C. Revised structure of caespitol and its correlation with isocaespitol. **Tetrahedron Letters**, 14, 1249-1250, 1974.
- GONZÁLEZ, A.G.; MARTÍN, J.D., MARTÍN, V.S.; NORTE, N. Carbon-13 NMR application to *Laurencia* polyhalogenated sesquiterpens. **Tetrahedron Letters**, 29, 2719-2722, 1979.
- GONZÁLEZ, A.G.; MARTÍN, J.D., PÉREZ, C.; RAMÍREZ, M.A.; RAVELO, F. Total synthesis of 8-desoxy-isocaespitol, a new polyhalogenated sesquiterpene from *Laurencia caespitosa*. **Tetrahedron Letters**, 21, 187-188, 1980.

- GONZÁLEZ, I.C.; FORSYTH, C.J. Total synthesis of thyriferyl 23-acetate, a specific inhibitor of protein phosphatase 2A and an anti-leukemic inducer of apoptosis. **Journal of the American Chemical Society**, 122, 9099-9108, 2000.
- GOPALAN, A. S.; PRIETO, R.; MUELLER, B.; PETERS, D. Polyene cyclizations using mercury (II) triflate-N,N-dimethylaniline complex - participation by internal nucleophiles. **Tetrahedron Letters**, 33, 1679-1982, 1992.
- GOURNAIS, K.; BARBER, J. Isolation and characterization of a photosystem II reaction centre lipoprotein complex. **FEBS Letters**, 188, 68-72, 1985.
- GRIBBLE, G.B. Naturally occurring organohalogen compounds. **Accounts of Chemical Research**, 31, 141-152, 1998.
- GUELLA, G.; MARCHETTI, F.; PIETRA, F. Rogioldiol A, a new obtusane diterpene, and rogiolal, a degraded derivative, of the red seaweed *Laurencia microcladia* from Il rogiolo along the coast of tuscany: A synergism in structural elucidation. **Helvetica Chimica Acta**, 80, 684-694, 1997.
- GUELLA, G.; PIETRA, F. A. New-skeleton diterpenoid, new prenylbisabolanes, and their putative biogenetic precursor, from the red seaweed *Laurencia microcladia* from Il rogiolo: assigning the absolute configuration when two chiral halves are connected by single bonds. **Helvetica Chimica Acta**, 83, 2946-2952, 2000.
- GUELLA, G.; PIETRA, F. Antipodal pathways to secondary metabolites in the same eukaryotic organism. **Chemistry European Journal**, 4, 1692-1697, 1998.
- GUELLA, G. SKROPETA, D.; BREUILS, S.; MANCINI, I.; PIETRA, F. Calensanol, the first member of a new class of sesquiterpene with a novel skeleton from the red seaweed *Laurencia microcladia* from the Bay of Calenzana, Elba Island. **Tetrahedron Letters**, 42, 723-725, 2001.
- GUELLA, G.; SKROPETA, D.; MANCINI, I.; PIETRA, F. Calenzanane sesquiterpenes from red seaweed *Laurencia microcladia* from the Bay of Calenzana, Elba-Island: acid-catalyzed stereospecific conversion of calenzanol into indeneand guaiazulene-type sesquiterpenes. **Chemistry – A European Journal**, 9, 5770-5777, 2003.
- GUELLA, G.; SKROPETA, D.; MANCINI, I.; PIETRA, F. The first 6,8-cycloodesmane sesquiterpene from a marine organism: the red seaweed *Laurencia microcladia* from the Baia di Calenzana, Elba Island. **Zeitschrift fuer Naturforschung B: Chemical Science**, 57, 1147-1151, 2002.
- GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. 2005. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>
- GÜNTHER, H. NMR spectroscopy: basic principles, concepts, and application in chemistry. New York: Willey & sons, 1995.
- GUSTAFSON, K.R., CARDELLINA, J.H. II; FULLER, R.W.; WEISLOW, O.W.; KISER, R.F.; SNADER, K.M.; PATTERSON, G.M.L.; BOYD, M.R. AIDS-antiviral sulpholipids from cyanobacteria (blue-green algae). *Journal of National Cancer Institut*, 81, 1254-1258, 1989.
- HARVEY, W.H. Algae. In: **Flora Hybernica**, part 3, Dublin: Mackay, J.T. Eds., 157-254 p, 1836.
- HAY, M.E., FENICAL, W., GUSTAFSON, K. Chemical defense against diverse coral-reef herbivores. **Ecology**, 68, 1581-1591, 1987.

- HIRATSUKA, Y., UEHARA, T., Feeding rates and absorption efficiencies of four species of sea urchins (genus *Echinometra*) fed a prepared diet. **Comparative Biochemical Physiology**, A 1, 223-229, 2007.
- HORTA, P.A. **Aspectos taxonômicos e ecologia de macroalgas bênticas**. UFSC, 2000.
- HOYE, T.R.; CARUSO, A.J.; KURTH, M.J. Internal nucleophilic termination in mercuric ion initiated diene cyclizations. **Journal of Organic Chemistry**, 46, 3550-3552, 1981.
- HOYE, T.R.; KURTH, M.J. Brominative cyclizations of geranyl derivatives. **Journal of Organic Chemistry**, 43, 3693-3701, 1978.
- HOYE, T.R.; KURTH, M.J. Mercuric trifluoroacetate mediated brominative cyclizations of dienes. Total synthesis of dl-3.beta.-bromo-8-epicaparrapi oxide. **Journal of Organic Chemistry**, 44, 3461-3467, 1979.
- ILIOPOULOU, D.; MIHOPOULOS, N.; VAGIAS, C.; PAPAZAFIRI, P.; ROUSSIS, V. Novel cytotoxic brominated diterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*. **Journal of Organic Chemistry**, 68, 7667-7674, 2003
- ILIOPOULOU, D.; ROUSSIS, V.; PANNECOUQUE, C.H.; DE CLERCQ, E.; VAGIAS C. Halogenated sesquiterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*. **Tetrahedron**, 58, 6749-6755, 2002
- IRIE, T.; FUKUZAWA, A.; IZAWA, M.; KUROSAWA, E. Laurenisol, a new sesquiterpenoid containing bromine from *Laurencia nipponica* yamada. **Tetrahedron Letters**, 1343-1346, 1969a.
- IRIE, T.; IZAWA, M.; KUROSAWA, E. Isolaureatin, a constituent from *Laurencia nipponica* yamada. **Tetrahedron Letters**, 2735-2738, 1968.
- IRIE, T.; IZAWA, M.; KUROSAWA, E. Laureatin, a constituent from *Laurencia nipponica* yamada. **Tetrahedron Letters**, 2091-2096, 1968.
- IRIE, T.; SUZUKI, M.; HAYAKAWA, Y. **Bulletin of the Chemistry Society of Japan**, 42, 843, 1969c.
- IRIE, T.; SUZUKI, M.; KUROSAWA, E., MASAMUNE, T. Laurinterol, debromolaurinterol and isolaurinterol, constituents of *Laurencia intermedia* Yamada. **Tetrahedron**, 26, 3271-3277, 1970.
- IRIE, T.; SUZUKI, M.; KUROSAWA, M.; MASAMUNE, T. Laurinterol and debromolaurinterol, constituents from *Laurencia intermedia*. **Tetrahedron Letters**, 1837-1840, 1966.
- IRIE, T.; SUZUKI, T.; SHOTA, I., KUROSAWA, E. The absolute configuration of laurene and α -cuparenone. **Tetrahedron Letters**, 3187-3189, 1967.
- IRIE, T.; SUZUKI, T.; YASUNARI, Y.; KUROSAWA, E., MASAMUNE, T. Laurene, a sesquiterpene hydrocarbon from *Laurencia* species. **Tetrahedron**, 25, 459-468, 1969b.
- IRIE, T.; YASUNARI, Y.; SUZUKI, T.; IMAI, N.; KUROSAWA, E.; MASAMUNE, T. A new sesquiterpene hydrocarbon from *Laurencia glandulifera*. **Tetrahedron Letters**, 3619-3624, 1965.
- ISUPOV, M.N.; DALBY, A.R. BRINDLEY, A.A.; IZUMI, Y.; TANABE, T.; MURSHUDOV, G.N.; LITTLECHILD, J.A. Crystal structure of dodecameric vanadium-dependent bromoperoxidase from the red algae *Corallina officinalis*. **Journal of Molecular Biology**, 299, 1035-1049, 2000.
- JUAGDAN, E.G.; KALIDINDI, R.; SCHEUER, P. Two new chamigranes from an Hawaiian red alga, *Laurencia cartilaginea*. **Tetrahedron**, 53, 521-528, 1997.

- KATSUOKA, M.; OGURA, C.; ETOH, H.; SAKATA, K.; INA, K. Galactosyl- and sulfoquinovosyldiacylglycerols isolated from the brown algae, *Undaria pinnatifida* and *Costaria costata* as a repellents of the blue mussel, *Mytilus edulis*. **Agriculture and Biochemical Chemistry**, 11, 3043-3044, 1990.
- KAISER, C.R.; PITOMBO, L.F.; PINTO, A.C. Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments of chamigrenes from *Aplysia dactilomela*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 39, p. 147-149, 2001.
- KATO, T.; ISHII, K.; ICHINOSE, I.; NAKAI, Y.; KUMAGAI, T. Brominative cyclisation of nerolidol and geranyl-linalool. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, 1106-1108, 1980.
- KELECOM, A. Marine natural products in Brazil. Part1. Isolation and structural determination. **Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the advancement of science**, 49, 321-330, 1997.
- KELECOM, A.; TEIXEIRA, V.L. On the absolute configuration of dolastane and secodolastane diterpenes. **Ciência e Cultura**, 39, 506, 1987.
- KEUSGEN, M.; CURTIS, J.M.; THIBAUT, P.; WALTER, J.A.; WINDUST, A.; AYER, S.W. Sulfoquinovosyl diacylglycerols from the alga *Heterosigma carterae*. **Lipids**, 32, 1101-1112, 1997.
- KLADI, M.; VAGIAS, C.; FURNARI, G.; MOREAU, D.; ROUSSAKIS, C.; ROUSSIS, V. Cytotoxic cuparene sesquiterpenes from *Laurencia microcladia*.. **Tetrahedron Letters**, 46, 5723-5726, 2005.
- KLADI, M.; VAGIAS, C.; PAPAFAFIRI, P.; FURNARI, G.; SERIO, D.; ROUSSIS, V. New sesquiterpenes from the red alga *Laurencia microcladia*. **Tetrahedron**, 63, 7606-7611, 2007.
- KLADI, M.; XENAKI, H.; VAGIAS, C.; PAPAFAFIRI, P.; ROUSSIS, V. New cytotoxic sesquiterpenes from the red alga *Laurencia obtusa* and *Laurencia microcladia*.. **Tetrahedron**, 62, 182-189, 2006.
- KÖNIG, G.M.; WRIGHT, A.D. *Laurencia rigida*: chemical investigations of its antifouling dichloromethane extract. **Journal of Natural Products**, 60, 967-970, 1997a
- KÖNIG, G.M.; WRIGHT, A.D. Sesquiterpene content of the antibacterial dichloromethane extract of the marine red alga *Laurencia obtusa*. **Planta Medica**, 63, 186-187, 1997a
- KYLIN, H. **Die Gattungen der Rhodophyceen**. Gleeerups, Lund, Gleeerups, 673p, 1956.
- KYLIN, H. Studien über die Entwicklungsgeschichte der Florideen. **Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar**, 63, 1-139, 1923.
- LAMPERT, J.B.; SHURUELL, H.F.; LIBHTNER, D.A.; COOKS, C.B. **Introduction to Organic Spectroscopy**. New York, MacMill, 1987.
- LYAKHOVA, E.G.; KALINOVSKY, A.I.; KOLESNIKOVA, S.A.; VASKOVSKY, E.V.; STONIK, V.A. Halogenated diterpenoids from the red alga *Laurencia nipponica*. **Phytochemistry**, 65, 2527-2532, 2004.
- LOURENÇO, S.O.; BARBARINO, E.; DE-PAULA, J.C.; PEREIRA, L.O.; MARQUEZ, U.M.L. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors from 19 tropical seaweeds. **Phycological Research**, 50, 233-241, 2002.

- MAIA, L.F.; EPIFÂNIO, R.A.; EVE, T.; FENICAL, W. New Fish Feeding Deterrents, Including a Novel Sesquiterpenoid Heterogorgiolide, from the Brazilian Gorgonian *Heterogorgia uatumani* (Octocorallia, Gorgonacea). **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 1322-1324, 1999.
- MAIA, L.F.; EPIFÂNIO, R.A.; FENICAL, W. New cytotoxic sterol glycosides from the octocoral *Carijoa* (Telesto) *riisei*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1427-1430, 2000.
- MARTENS, G. VON. Algae brasiliensis circa Rio de Janeiro a cl. A. Glaziou, horti publici directore, botanico indefesso, annis 1869 et 1870 collectae. **Vidensk. Medd. Fra den Naturh. Foren.**, Copenhagen 3, 144-148, 1871.
- MARTENS, G. VON. Conspectus algarum Brasiliae hactenus detectarum. Vidensk. Medd. **Dansk natur. Foren.**, Copenhagen, 18-20, 297-314, 1870.
- MARTINS, D.L.; EPIFÂNIO, R.A. New germacrane sesquiterpene from the brazilian endemic gorgonian *Phyllogorgia dilatata* Esper. **Journal Brazilian of Chemistry Society**, v. 9, p. 586-590, 1998.
- MASUDA, M. & ABE, T. The occurrence of *Laurencia saitoi* Perestenk (Ceramiales, Rhodophyta) in Japan. **Japanese Journal of Phycology**, 41, 7-18, 1993.
- MCDERMID, K.J. *Laurencia* from the Hawaiian Islands: key, annotated list and distribution of the species. In: Taxonomy of economic seaweeds with reference to some Pacific and Caribbean species. (Abbott, I.A. Eds) **California Sea Grant College Program**, 2, 231-247, 1988.
- MÖBIUS, M. VON. Bearbeitung der von H. Schenck in Brasilien gesammelten Algen. **Hedwigia**, 28, 309-347, 1889.
- MOHAMMED, K.A.; HOSSAIN, C.F.; ZHANG, I.; BRUICK, R.K.; ZHOU, Y.D; NAGLE, D.G. Laurenditerpenol, a new diterpene from the tropical marine alga *Laurencia intricata* that potently inhibits HIF-1 mediated hypoxic signaling in breast tumor cells. **Journal of Natural Products**, 67, 2002-2007, 2004.
- MONKS, N.R.; LERNER, C.; HENRIQUES, A.T.; FARIAS, F.M.; SHAPOVAL, E.E. S.; SUYENAGA, E.; ROCHA, A.B.; SCHWARTSMANN, G.; MOTHE, B. Anticancer, antichemotatic and antimicrobial activities of marine sponges collected of the coast of Santa Catarina, southern Brazil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 281, p. 1-12, 2002.
- MORTENSEN, T.H. **Monograph of the Echinoidea III**, 3, C.A. Reitzel, Copenhagen, 1943.
- MURAI, A.; ABIKO, A.; KATO, K.; MASAMUNE, T. Cationic cyclization of geranonitrile and related compounds via their bromohydrins: application to the synthesis of (±)-snyderols. **Chemistry Letters**, 10, 1125-1128, 1981.
- MURAI, A.; ABIKO, A.; MASAMUNE, T. Total synthesis of (±)-aplysin-20. **Tetrahedron Letters**, 25, 4955-4958, 1984.
- NAM, K.W. Morphology of *Chondrophyucus undulata* and *C. parvipapillata* and its implications for the taxonomy of the *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) complex. **European Journal of Phycology**, 34, 455-68, 1999.
- NAM, K.W. Phylogenetic re-evaluation of the *Laurencia* complex (Rhodophyta) with a description of *L. Succulenta* sp. nov. from Korea. **Journal of Applied Phycology**, 18, 679-697, 2006.
- NAM, K.W. Validation of the generic name *Palisada* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). **Algae**, 22, 53-55, 2007.

- OBATA, Y., FUKUZUMI, S. Essencial oil in *Laurencia glandulifera*. **Nippon Nogei Kagaku Kaishi**, 27, 331-334, 1953.
- OLIVEIRA FILHO, E. C. Algas marinhas do sul do estado do Espírito Santo (Brasil). I Ceramiales. **Boletim da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras**, Universidade de São Paulo, Série Botânica, 26, 1-277, 1969.
- OLIVEIRA FILHO, E.C. Algas marinhas bêmtonicas do Brasil. Tese de Livre-Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo, 407p., 1977.
- OSHIMA, Y.; YAMADA, S.; MATSUNAGA, K.; MORIYA, T.; OHIZUMI, Y. A monogalactosyl diacylglycerol from a cultured marine dinoflagellate, *Scrippsiella trochoidea*. **Journal of Natural Products**, 57, 534-536, 1994.
- PALERMO, J., RODRÍGUEZ BRASCO, M.F., SELDES, A., BALZARETTI, V., CABEZAS, E. Celenamide E from the Patagonian Sponge *Cliona chilensis*. **Journal of Natural Products**, 61, 488-490, 1998.
- PALERMO, J.A.; BRASCO, M.F.; SPAGNUOLO, C.; SELDES, A.M. Illudalane sesquiterpenoids from the soft coral *Alcyonium paessleri*: the first natural nitrate esters. **Journal of Organic Chemistry**, 65, p. 4482-4486, 2000.
- PAUL, V.J., WYLIE, C.R., SANGER, H.R. **Proc. 6th Coral Reef Symp.** 3, 73, 1998.
- PAVIA, O.L.; LAMPMANN, G.M.; KRIZ, C.S. **Introduction to Spectroscopy**, 2 ed., Fortworth: Saunders Collegue, 1996.
- PEC, M.K; AGUIRRE, A.; MOSER-THEIR, K., FERNANDEZ, J.J., SOUTO, M.L., DORTA, J.; DIAZ-GONZALEZ, F.; VILLAR, J. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothyriferol. **Biochemical and Pharmacology**, 65, 1451-1461, 2003.
- PEDRINI A.G. DE, CASSANO V., COELHO L.G. & LABRONICI G.J. Macroalgas marinhas da região sob influência da Central Nuclear Almirante Álvaro Alberto, Angra dos Reis, RJ, Brasil, I - Composição taxonômica. In: **V Congresso Geral de Energia Nuclear**. Associação Brasileira de Energia Nuclear, Rio de Janeiro, 2, 733-736, 1994.
- PEREIRA, R.C.; DA GAMA, B.A.; TEXEIRA, V.L.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. Ecological roles of natural products of the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. **Brazilian Journal of Biology**, 4, 665-672, 2003.
- PETRICHTCHEVA, N.V., DUQUE, C., DUEÑAS, A., ZEA, S., HARA, N., AND FUJIMOTO Y. New Nitrogenous Eudesmane-Type Compounds Isolated from the Caribbean Sponge *Axinyssa ambrosia*. **Journal of Natural Products** 65, 851 – 855, 2002.
- PINHEIRO-JOVENTINO, F., DANTAS, N.P. & MARASCHIN, C. D.H. Distribuição de algas marinhas no litoral de Fortaleza, Ceará, Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, 31, 29-40, 1998.
- PUYANA M., NARVAEZ G., PAZ A., OSORNO O., DUQUE C. Pseudopterosin content variability of the purple sea whip *Pseudopteroergorgia elisabethae* at the islands of San Andres and Providencia (SW-Caribbean). **Journal of Chemistry Ecology**, 30, 1183-201, 2004.
- RÜCKER, G.; NEUGEBAUER, M.; WILLEMS, G.G. **Instrumentele Pharmazeutische Analytik**, 3 ed., Stuttgart, Wissenschaftliche, 2001.
- SAINT-HILAIRE, A. DE . **Voyage dans le district des diamans et sur le littoral du Brésil**. Paris, 2, 1-457, 1833.

- SAITO, Y. & WOMERSLEY, H.B.S. The Southern Australian species of *Laurencia* (Ceramiaceae, Rhodophyta). **Australian Journal of Botany**, 22, 815-874, 1974.
- SAITO, Y. The algal genus *Laurencia* from the Hawaiian Islands, the Philippine Islands and adjacent areas. **Pacific Science**, 23, 148-160, 1969a.
- SAKEMI, S.; HIGA, T.; JEFFORD, C.W.; BERNARDINELLI, G. Venustatriol. A new, anti-viral, triterpene tetracyclic ether from *Laurencia venusta*. **Tetrahedron Letters**, 27, 4287-4290, 1986.
- SASSAKI, G.I.; MACHADO, M.J.; TISCHER, C.A.; GORIN, P.A.; IACOMINI, M. Glycosyldiacylglycerolipids from the lichen *Dictyonema glabratum*. **Journal of Natural Products**, 62, 844-847, 1999.
- SASSAKI, G.I.; GORIN, P.A.; TISCHER, C.A.; IACOMINI, M. Sulfonoglycolipids from the lichenized basidiomycete *Dictyonema glabratum*: isolation, NMR, and ESI-MS approaches. **Glycobiology**, 11, 345-351, 2001.
- SCHNEIDER, C.; BOEGLIN, W.E.; PRUSAKIEWICZ, J.J.; ROWLINSON, S.W.; MARNETT, J.C.; SAMEL, N.; BRASH, A.R. Control of prostaglandin stereochemistry at the 15-carbon by cyclooxygenases-1 and -2. **Journal of Biological Chemistry**, 277, 478-485, 2002.
- SENTÍES A. & FUJII, M.T. El complejo *Laurencia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) en el Caribe mexicano. In: A Sentíes & Dreckmann, K.M. (Eds). **Monografías Ficológicas**. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa y Red Latinoamericana de Botánica, 121-192, 2002.
- SHIEH, H.; PRESTWICH, G. D. Chiral, biomimetic total synthesis of (-)-aplysiastatin. **Tetrahedron Letters**, 23, 4643-4646, 1982.
- SHIRAHASHI, H.; MURAKAMI, N.; WATANABE, M.; NAGATSU, A.; SAKAKIBARA, J.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; IWASHIMA, A. Isolation and identification of anti-tumor-promoting principles from the fresh-water cyanobacterium *Phormidium tenue*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, 41, 1664-1666, 1993.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. Spectrometric identification of organic compounds, 7 ed.; New York: John Wiley & Sons, 2005.
- SMITH, C. **Infrared spectral interpretation – A systematic Approach**, 2 ed., New York, CRC Press, 1998.
- SUZUKI, T., SUZUKI, M.; FURUSAKI, A.; MATSUMOTO, T.; KATO, A.; IMANAKA, Y.; KUROSAWA, E. Teurilene and thyriferyl 23-acetate, meso and remarkably cytotoxic compounds from the marine red alga *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux. **Tetrahedron Letters**, 26, 1329-1332, 1985.
- SZÉCHY, M.T.M. & NASSAR, C.A.G. **Flora ficológica bentônica da Baía da Ribeira, sul do estado do Rio de Janeiro: Avaliação após duas décadas de operação da Central Nuclear Almirante Álvaro Alberto**. In: Pereira, R.C. *et al.* (Orgs). Formação de Ficólogos: um compromisso com a sustentabilidade dos recursos aquáticos. Museu Nacional, Rio de Janeiro. 373-397, 2005.
- SZÉCHY, M.T.M. & PAULA, E.J. DE. Macroalgas epífitas em *Sargassum* (Phaeophyta – Fucales) do litoral dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil. **Leandra**, 12, 1-10, 1997.
- TAKAHASHI, Y.; DAITON, M.; SUZUKI, M.; ABE, T.; MASUDA, M. Halogenated metabolites from the new Okinawan red alga *Laurencia yonauniensis*. **Journal of Natural Products**, 65, 395-398, 2002.

- TEIXEIRA, V.L.; KELECOM, A.; GOTTLIEB, O.R. Produtos naturais de algas marinhas. **Química Nova**, 14, 83-90, 1991.
- TOPCU, G.; AYDOGMUS, Z.; IMRE, S.; GOREN, A.C.; PEZZUTO, J.M.; CLEMENT, J.A., KINGSTON, D.G.I. Brominated sesquiterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*. **Journal of Natural Products**, 66, 1505-1508, 2003.
- URIBURU M.L., DE LA FUENTE J.R., PALERMO J., GIL R.R., SOSA V.E. Constituents of two *Flourensia* species. **Phytochemistry**, 65, 2039-43, 2004.
- VAIRAPPAN, C.S. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Biomolecular Engineering**, 20, 255-259, 2003.
- VAIRAPPAN, C.S.; DAITOH, M; SUZUKI, M.; ABE, T.; MASUDA, M. Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. **Phytochemistry**, 58, 291-297, 2001.
- VALMSEN, K.; JÄRVING, I.; BOEGLIN, W.E.; VARVAS, K.; KOLJAK, R.; PEHK, T.; BRASH, A.R.; SAMEL, N. The origin of 15*R*-prostaglandins in the Caribbean coral *Plexaura homomalla*: Molecular cloning and expression of a novel cyclooxygenase. **Proceedings of the National Academy of Science**, 98, 7700-7705, 2001.
- VAN-TAMELEN, E.E. Bioorganic chemistry: sterols and acrylic terpene terminal epoxides. **Accounts of Chemical Research**, 1, 111-120, 1968.
- VAN-TAMELEN, E.E.; HESSLER, E.J. The direct brominative cyclization of methyl farnesate. **Chemical Communications**, 411-413, 1966.
- VEIGA-SANTOS, P.; ROCHA, K.J.P; DOS SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.D.; LAUTENSCHLAGER, S.O.S; SUDATI, D.B.; BIANCO, E.M.; PEREIRA, R.C.; NAKAMURA, C.V. Antitrypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia obtusa*. **Planta Medica**, 74, 969-979, 2008.
- VERVOORT, H.; FENICAL, W.; EPIFÂNIO, R.A. Tamandarins A and B: new cytotoxic depsipeptides from a brazilian ascidian of the Family Didemnidae. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, p. 782-792, 2000.
- VILTER, H. Peroxidases from Phaeophyceae. III. Catalysis of halogenation by peroxidases from *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. **Botanica Marina**, 26, 429-435, 1983.
- WANG, H.; LI, Y.; SHEN, W.; RUI, W.; MA, X.; CEN, Y. Antiviral activity of a sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) compound isolated from the green alga *Caulerpa racemosa*. **Botanica Marina**, 50, 185-190, 2007.
- WEGMANN, K. Osmoregulation in eukaryotic algae. **Federation of European Microbiological Society: Microbiology Reviews**, 19, 37-43, 1986.
- WEIDNER, K.; LAGES, B.G.; DA GAMA, B.P.; MOLIS, M.; WAHL, M.; PEREIRA, R.C. Effect of mesograzers and nutrient levels on induction of defenses in several Brazilian macroalgae. **Marine Ecology Progress Series**, 283, 113-125, 2004.
- WEINHEIMER, A.J.; SPRAGGINS, R.L. The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-*epi*-PGA₂ and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla*. **Tetrahedron Letters**, 2, 5185-5188, 1969.

Referências

WESSELS, M.; KÖNIG, G.M.; WRIGHT, A.D. New natural product isolation and comparison of the secondary metabolite content of three distinct samples of the sea hare *Aplysia dactylomela* from Tenerife. **Journal of Natural Products**, 63, 920-928, 2000.

WEYAND, M.; HECHT, H.J.; KIEß, M.; LIAUD, M.F.; VILTER, H.; SCHOMBURG, D. X-ray structure determination of a vanadium-dependent haloperoxidase from *Ascophyllum nodosum* at 2.0 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, 293, 595-611, 1999.

WOLINSKY, L.E.; FAULKNER, D.J. Biomimetic approach to the synthesis of *Laurencia* metabolites. Synthesis of 10-bromo-.alpha.-chamigrene. **Journal of Organic Chemistry**, 41, 597-600, 1976.

WRIGHT, A.D.; GOCLICK, E.; KÖNIG, G.M. Three New sesquiterpenes from the red alga *Laurencia perforata*. **Journal of Natural Products**, 66, 435-437, 2003.

YONESHIGUE, Y. **Taxonomie et ecologie des algues marines dans la region de Cabo Frio, (Rio de Janeiro), Brésil**. Tese de Doutorado, Faculte des Sciences de Luminy, Univerisité d' Aix-Marseille II, Marseille, France, 466 p, 1985.

ZULETA, I. A., VITELLI, M.L., BAGGIO, R. GARLAND, M.T., SELDES, A.M., PALERMO, J.A. Novel pteridine alkaloids from the sponge *Clathria sp.* **Tetrahedron**, 58, 4481-4486, 2002.

ANEXOS – CAPÍTULO 2

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: E101r_Laurecia_metanol_22mai2006
File: PROTON

Pulse Sequence: s2pu1
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
Mercury-400BB "RMN"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.730 sec
Width 6398.0 Hz
8 repetitions
OBSERVE H1, 400.0480087 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 0 min, 32 sec

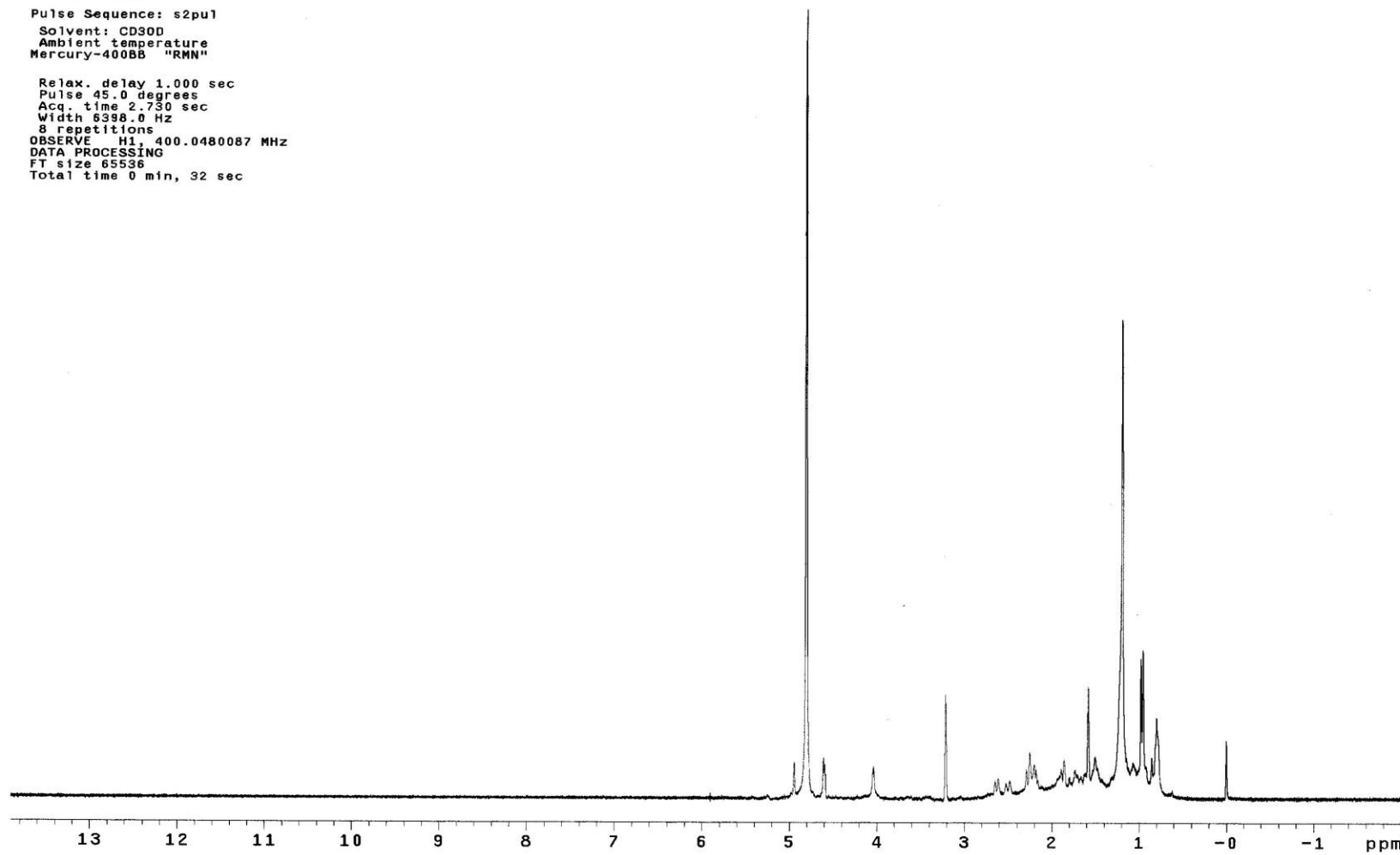


Figura 1: Espectro de ¹H RMN do extrato orgânico de *Laurencia microcladia* em CDCl₃ (400 MHz).

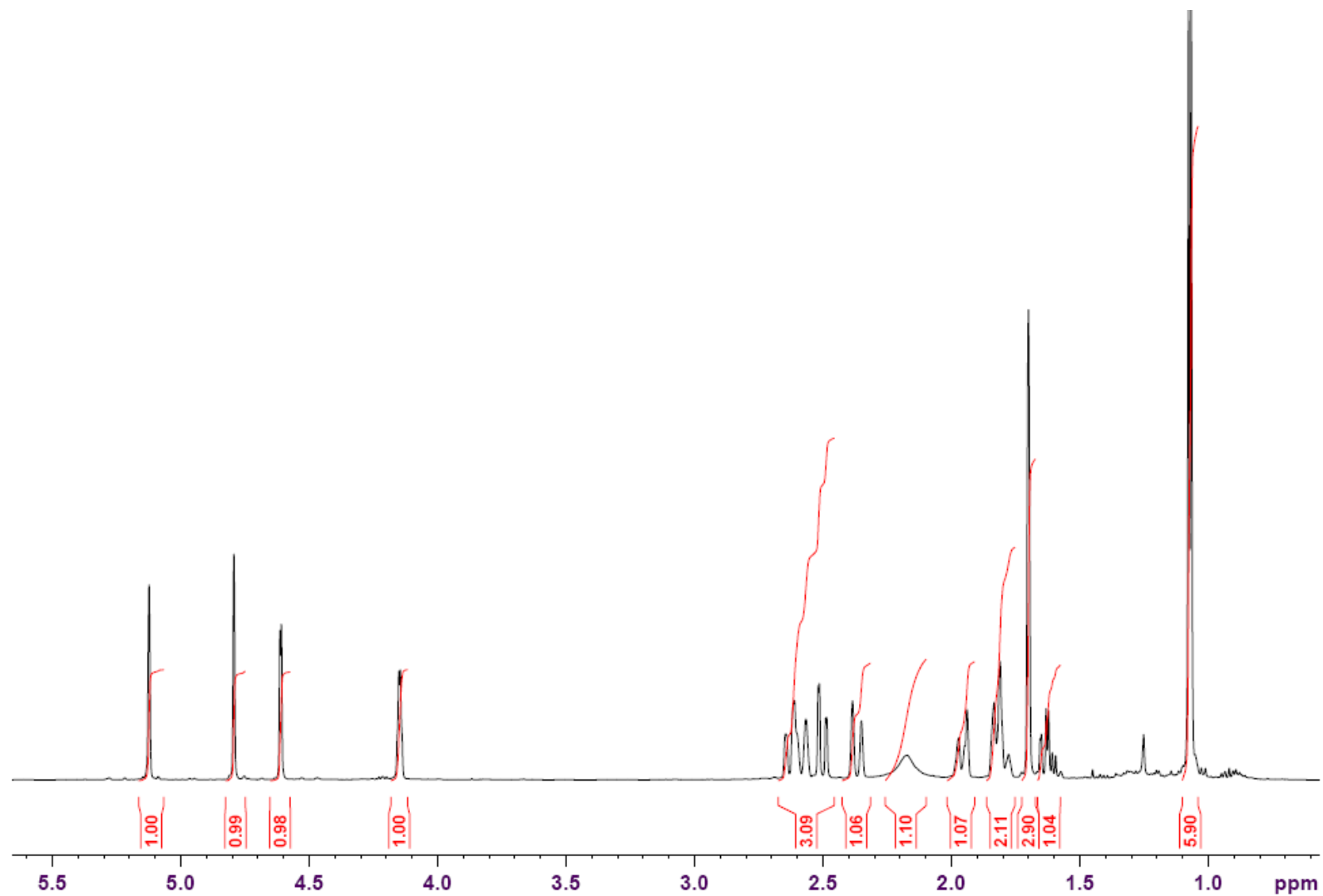


Figura 2: Espectro de ^1H RMN com integração da substância elatol em CDCl_3 (500 MHz).

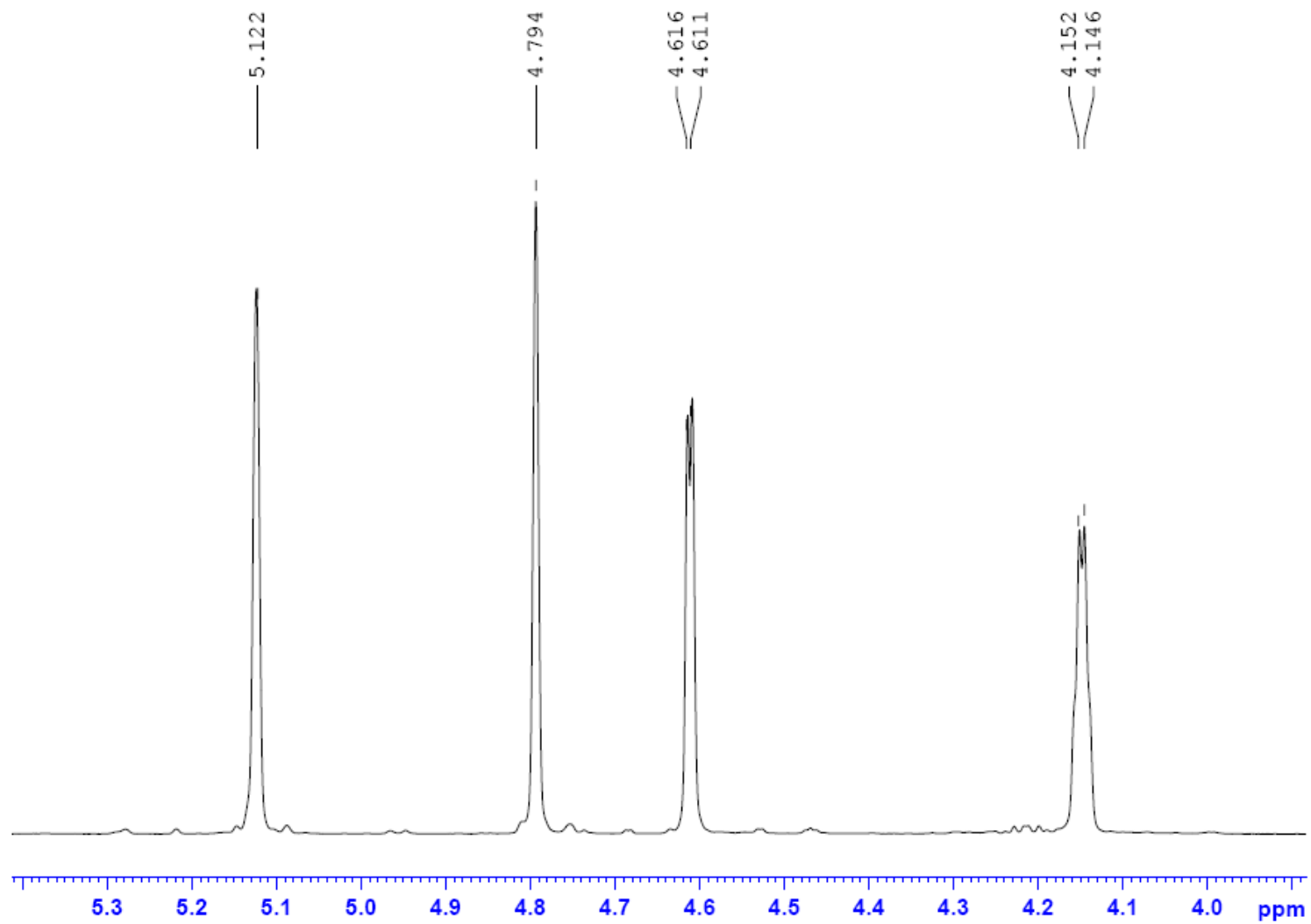


Figura 3: Expansão do espectro de ^1H RMN da substância elatol em CDCl_3 (500 MHz).

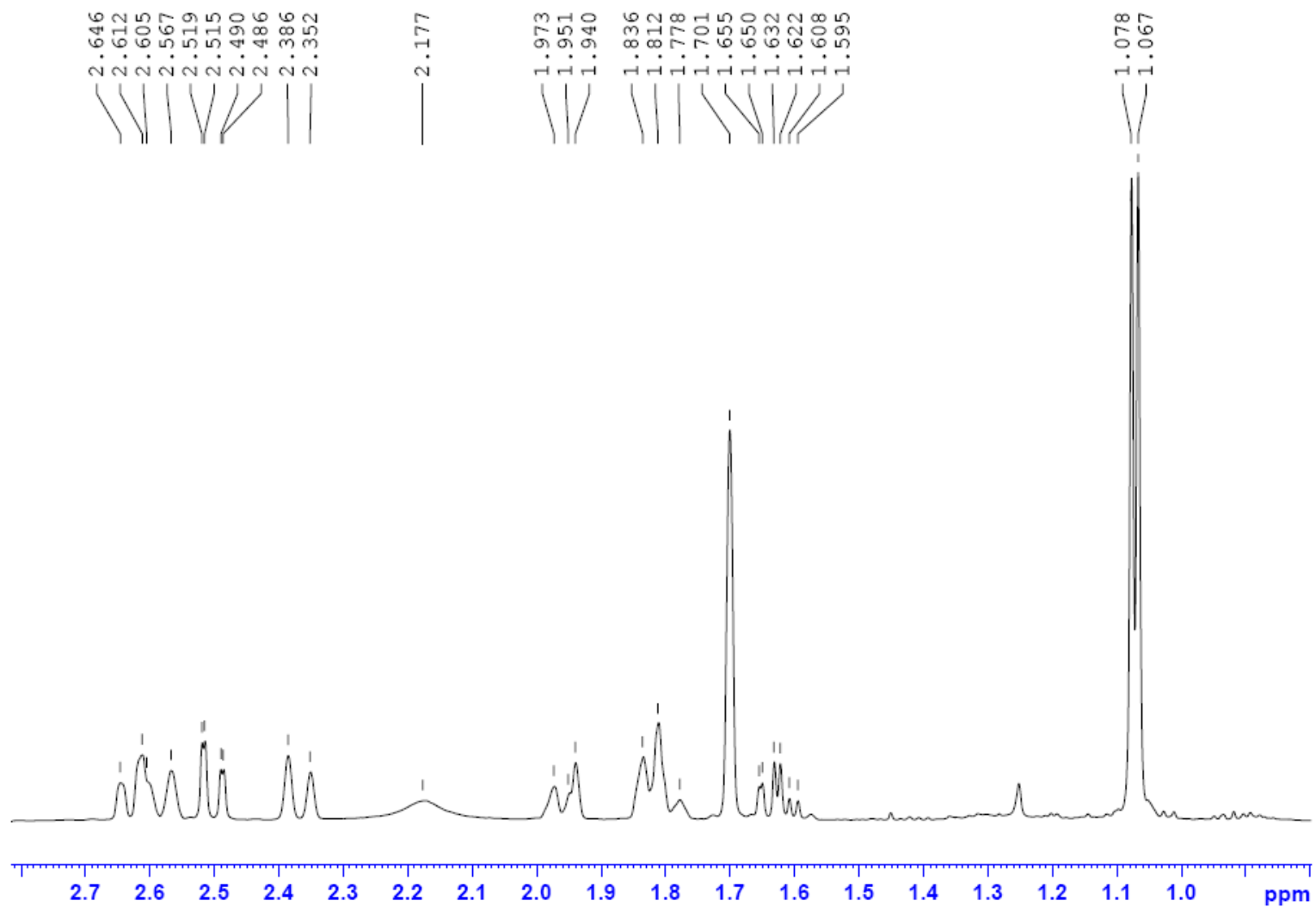


Figura 4: Expansão do espectro de ^1H RMN da substância elatol em CDCl_3 (500 MHz).

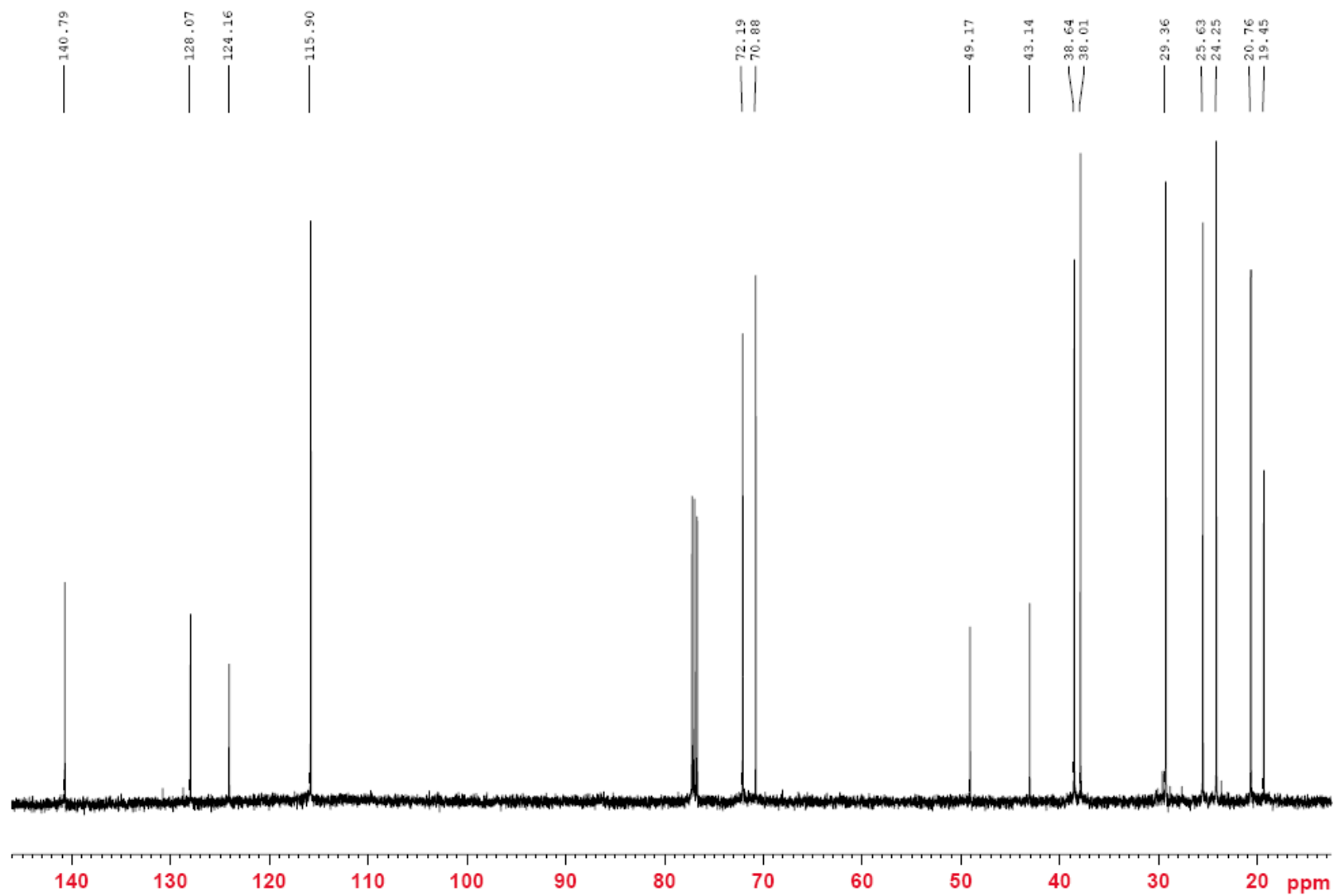


Figura 5: Espectro de ^{13}C RMN da substância elatol em CDCl_3 (125 MHz).

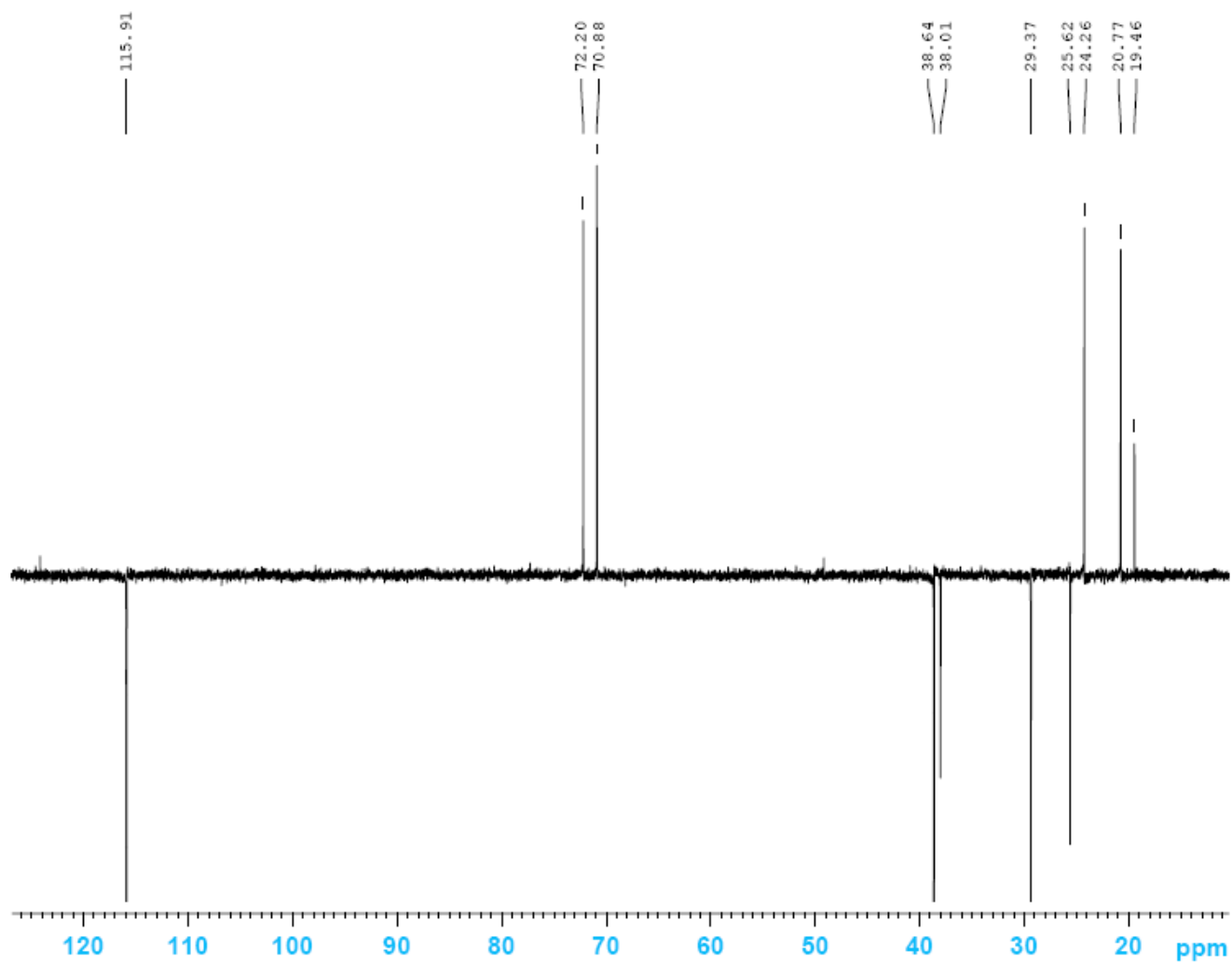


Figura 6: Espectro de DEPT 135 da substância elatol em CDCl₃ (125 MHz).

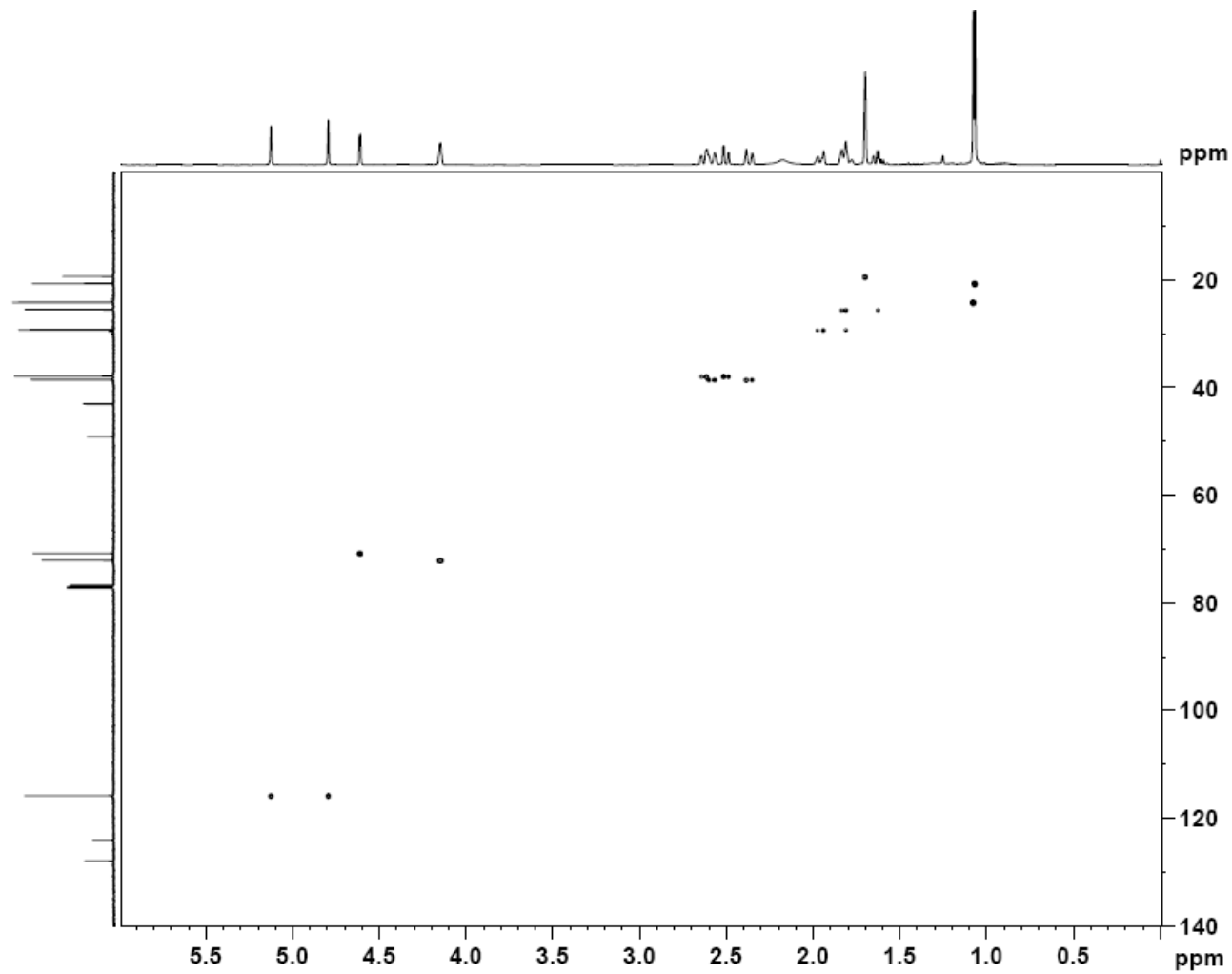


Figura 7: Espectro de correlação HSQC da substância elatol em CDCl_3 (500 MHz).

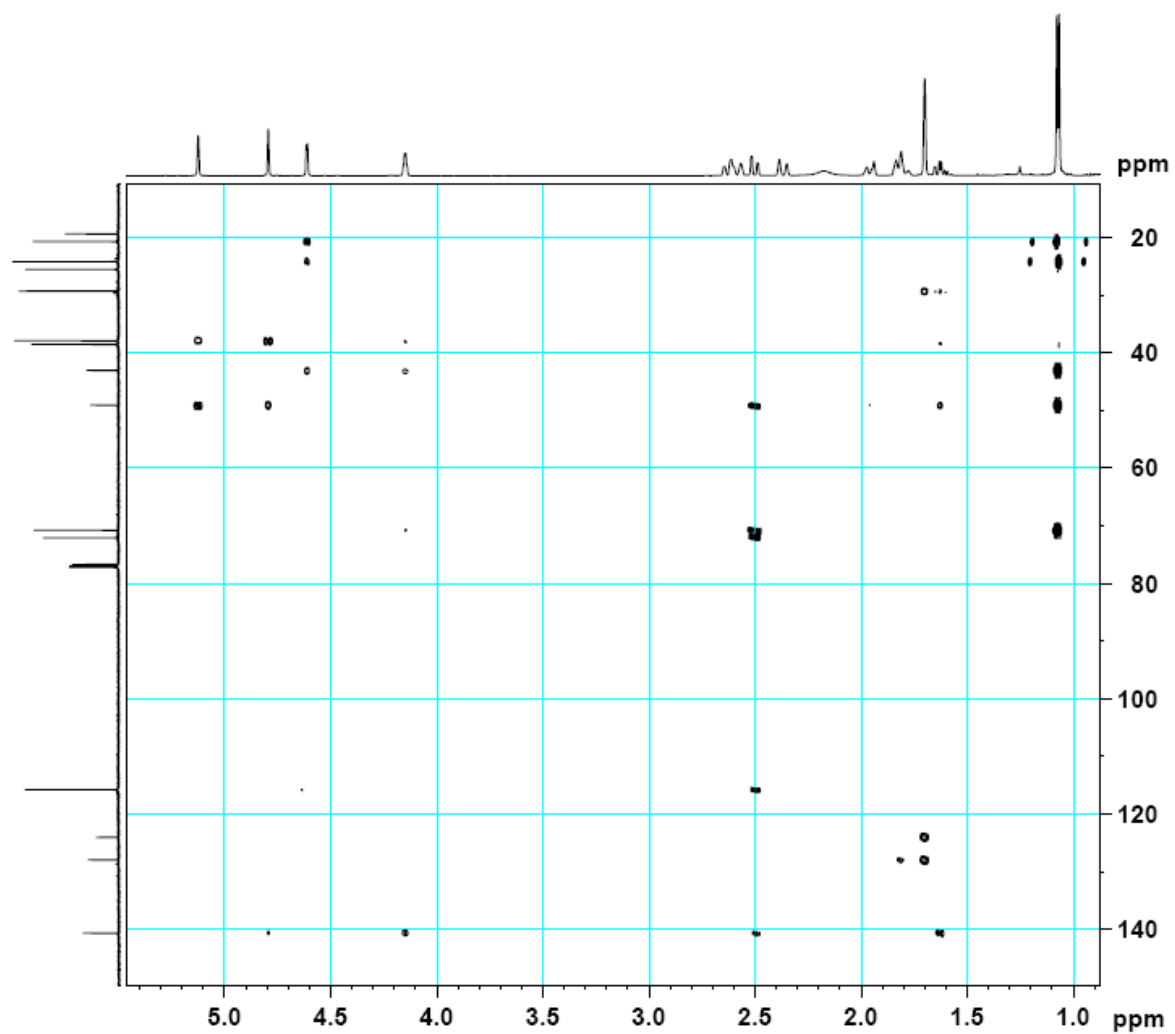


Figura 8: Espectro de correlação HMBC da substância elatol em CDCl_3 (500 MHz).

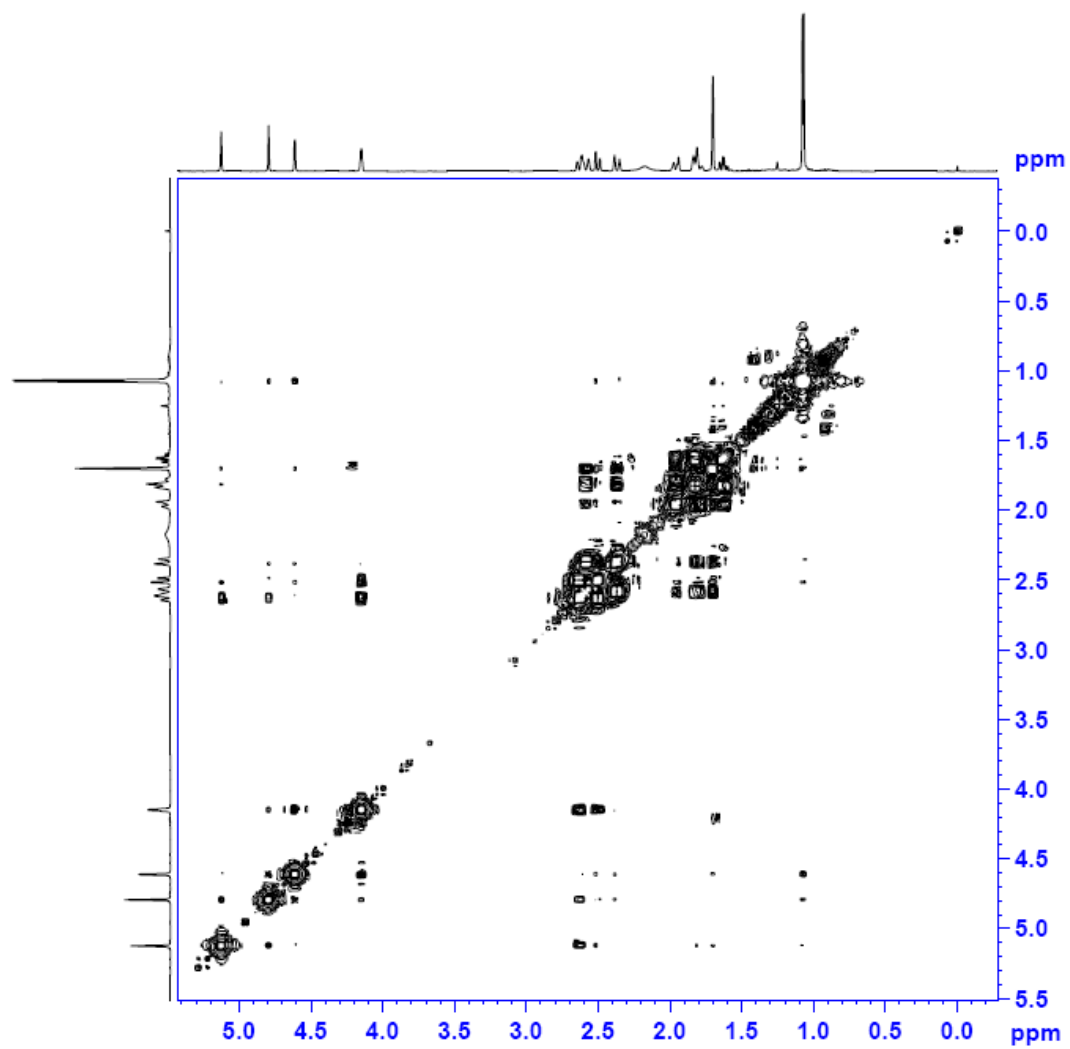


Figura 9: Espectro de correlação ^1H - ^1H COSY da substância elatol em CDCl_3 (500 MHz).

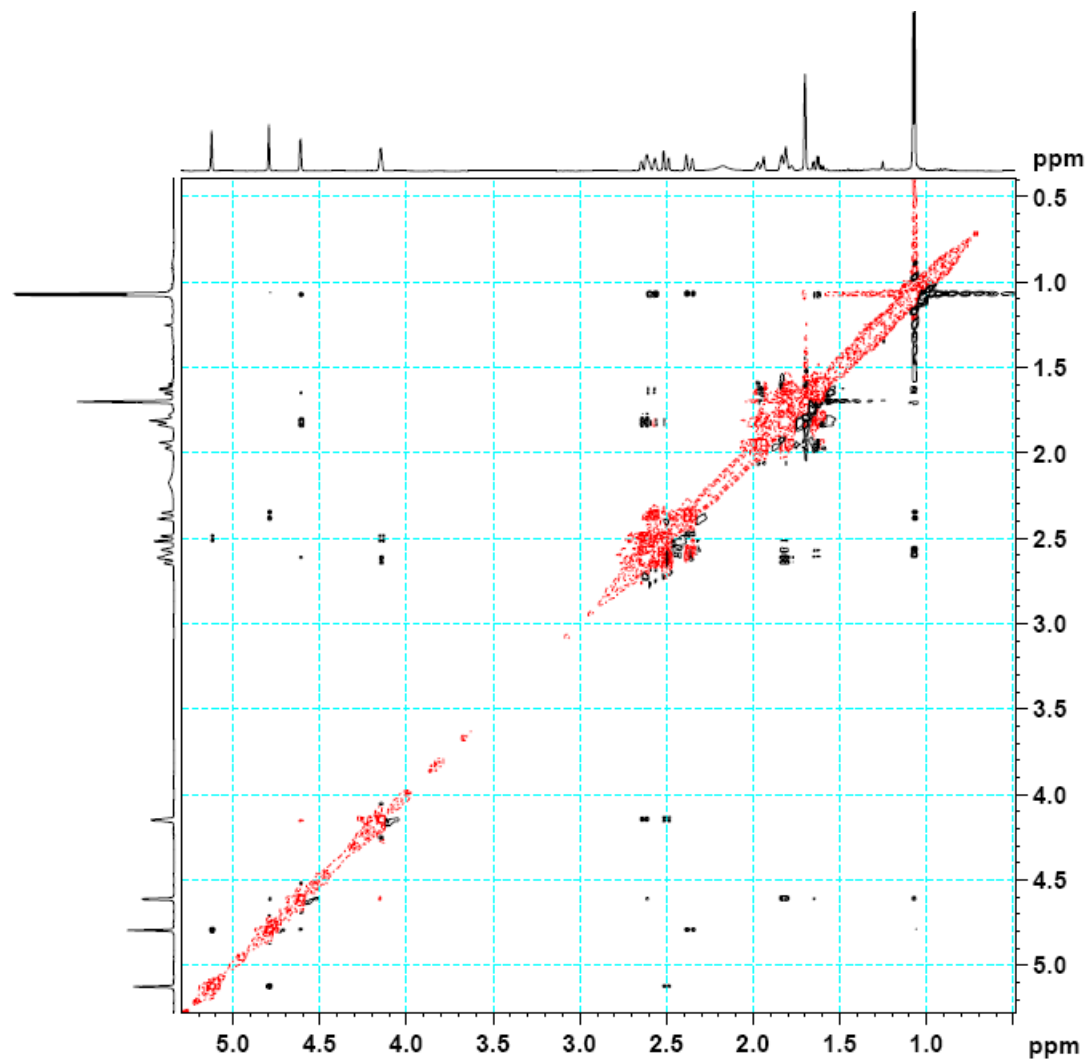


Figura 10 Espectro de correlação ROESY da substância elatol em CDCl_3 (500 MHz).

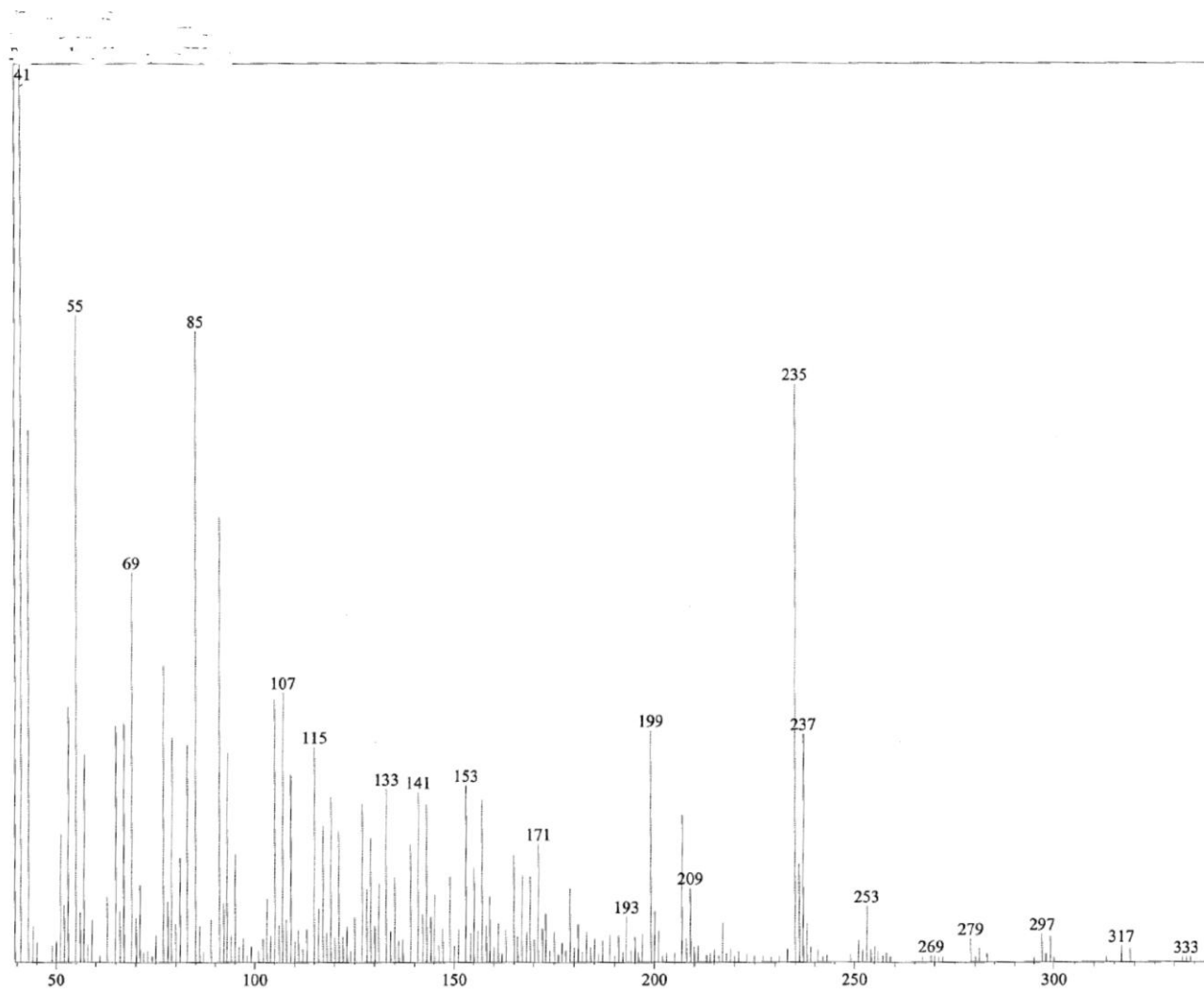


Figura 11: Espectro de massas por ionização eletrônica da substância elatol.