#### Universidade de São Paulo



Faculdade de Ciências Farmacêuticas Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

## Barcode e bioprospecção de metabólitos das algas marinhas *Laurencia aldingensis*, *L. dendroidea* e *Laurenciella* sp. (Ceramiales, Rhodophyta)

Erika Mattos Stein

Tese apresentada junto ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, na área de concentração Toxicologia e Análises toxicológicas, para obtenção do título de DOUTOR.

Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo

SÃO PAULO

2015

#### Universidade de São Paulo



Faculdade de Ciências Farmacêuticas Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

## Barcode e bioprospecção de metabólitos das algas marinhas *Laurencia aldingensis*, *L. dendroidea* e *Laurenciella* sp. (Ceramiales, Rhodophyta)

Erika Mattos Stein

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese apresentada junto ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, na área de concentração Toxicologia e Análises toxicológicas, para obtenção do título de DOUTOR.

Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo

SÃO PAULO

2015

Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Stein, Erika Mattos

S819b Barcode e bioprospecção de metabólitos das algas marinhas Laurencia aldingensis, L. dendroidea e Laurenciella sp. (Ceramiales, Rhodophyta) / Erika Mattos Stein. -- São Paulo, 2015. 317p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Colepicolo, Pio

1. Toxicologia 2. Produtos naturais 3. Rhodophyta I. T. II. Colepicolo, Pio, orientador.

615.9 CDD

Erika Mattos Stein

## Barcode e bioprospecção de metabólitos das algas marinhas Laurencia aldingensis, L. dendroidea e Laurenciella sp. (Ceramiales, Rhodophyta)

Comissão julgadora da Tese para obtenção do título de Doutor

> Prof. Dr. Pio Colepicolo Orientador/Presidente

> > 1° Examinador

 $2^\circ$  Examinador

 $3^{\circ}$  Examinador

4° Examinador

São Paulo, 15 de Dezembro de 2015

Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado apoiando as minhas escolhas e acreditando nos meus sonhos.

#### "Andei...

Dor caminhos difíceis, eu sei. Mas olhando o chão sob meus pés, vejo a vida correr. E assim a cada passo que der Tensarei fazer o melhor que puder. **Hprendi...** 

Não sanso quanso quis, mas vi que conhecendo O universo ao meu redor aprendo a me conhecer melhor; Assim escusarei o sempo que me ensinará A somar a decisão cersa a cada momenso.

### E partirei...

Em busca de muisos ideais,

Mas sei que hoje se enconsram meu passado, presense e fusuro. Itoje sinso em mim a emoção da despedida. Itoje é o ponso de chegada. Mas, ao mesmo sempo, sempo de parsida<sup>\*</sup>.

(Autor desconhecido)

#### AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado coragem, força e perseverança.

Aos meus pais por terem me apoiado e acreditado.

Ao meu Orientador Dr. Pio Colepicolo pela confiança e por todos estes anos de trabalho juntos.

Ao Dr. Anthony D. Wright pela oportunidade que me deu ao abrir as portas do seu laboratório para me receber. O estágio realizado na UH-Hilo sob sua supervisão, foi o diferencial deste trabalho. Simplesmente aprendi com o autor das minhas referências!

À Dra. Mutue Toyota Fujii por ser este exemplo de pesquisadora, por ter me supervisionado na etapa de biologia molecular.

Aos amigos do LabPio atualmente presentes ou que já seguiram seu caminho, Aline, Cíntia, Cícero, Daniel, Eliezer, Tati, Léo, Luiza, Natália, Ed, Sandra, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos da Seção de Ficologia-IBot que me aturaram durante todo o experimento de Barcode, Luanda, Bia, Pati, Alan.

À Pesquisadora Dra. Luciana Retz de Carvalho do IBot que me conduziu os primeiros passos no mundo da fitoquímica, por ter feito de mim uma companheira de trabalho, por toda ajuda com as minhas moléculas, meus textos descritivos e, simplesmente, pelo seu exemplo de dedicação e entusiasmo pela ciência.

À Prof. Dra. Valéria Cassano do IB-USP por ter disponibilizado seu tempo para me ensinar e sanar minhas dúvidas, e suas sequências que muito me ajudaram como referência para as minhas.

À Dra. Lydia Fumiko Yamaguchi que me ajudou e muito me ensinou com os espectros de RMN.

Ao Dr. Vaeudo Oliveira pela ajuda com os espectros de Infravermelho, pelo companheirismo e por nos trazer sempre alegria dentro de casa.

Ao meu namorado Walace Nunes que me aturou nesse fim de doutorado e abraçou a causa junto comigo. Afinal, não basta ser, tem que participar!

À querida Tia Bete Stein que sempre disponibilizou sua casa em Nova Guarapari, sem a qual as coletas tão teriam sido viáveis.

A todos os amigos que fiz em Hilo que fizeram meus oito meses ficarem ainda mais especiais!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida, sem a qual a permanência para o desenvolvimento do trabalho não teria sido viável.

#### RESUMO

STEIN, E. M. Barcode e bioprospecção de metabólitos das algas marinhas *Laurencia aldingensis*, *L. dendroidea* e *Laurenciella* sp. (Ceramiales, Rhodophyta).
2015. 317f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A natureza e diversidade das estruturas químicas com atividade farmacológica que se tem encontrado nos organismos marinhos justificam a busca por novos compostos que são de interesse nas mais diversas áreas de aplicação. As espécies de macroalgas vermelhas, em especial Laurencia spp., merecem destaque pela enorme variedade de terpenos e acetogeninas que produzem, sendo consideradas de grande potencial na produção de novos fármacos. O estudo de seus constituintes pode fornecer importantes subsídios para a quimiotaxonomia, ecologia química, caracterização das espécies e avaliação do potencial biotecnológico. Baseado nisso, Laurencia aldingensis, L. dendroidea e Laurenciella sp. foram selecionadas para o presente estudo para isolamento, caracterização e teste de atividades biológicas dos seus compostos. A técnica do DNA barcoding foi utilizada como ferramenta de diagnóstico para garantir a similaridade entre as amostras de cada espécie, que foram coletadas em época e locais diferentes. Do extrato orgânico de Laurencia aldingensis, nove substâncias foram isoladas, sendo quatro esfingosinas (1-4), três terpenos (5-7) e duas novas substâncias halogenadas (8 e 9). Do extrato orgânico de Laurencia dendroidea formam isolados dois terpenos halogenados conhecidos (10, 11) e, do extrato de Laurenciella sp. três novas substâncias halogenadas alifáticas insaturadas (12-14), assim como um ácido graxo (15) e um esterol (16) conhecidos. Dentre elas, a 8 apresentou atividade citotóxica, mas não se mostrou seletivo, e as substâncias 4 e 11 apresentaram atividade esquistossomicida, bastante promissora. No entanto, nenhum deles apresentou atividade antioxidante. Diante desta investigação, podemos dizer que as informações geradas com os estudos de Laurencia aldingensis, L. dendroidea e Laurenciella sp. expandiram significantemente o conhecimento no que tange a diversidade química no gênero e o potencial biológico-farmacêutico dos mesmos.

Palavras-chaves:esfingosinas,terpenos,substânciashalogenadas,antiesquistossomose,antioxidante,atividadecitotóxica

#### ABSTRACT

STEIN, E. M. Barcode and bioprospecting of metabolites from the marine algae *Laurencia aldingensis*, *L. dendroidea* e *Laurenciella* sp. (Ceramiales, Rhodophyta).
2015. 317p. Thesis (PhD) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The nature and diversity of chemical structures with pharmacological activity that have been found in marine organisms justifies the search for new compounds that may have applications in various areas of interest. Species of red seaweeds, especially Laurencia spp., are special because of the unprecedented variety of terpenes and acetogenins they produce that are considered potentially useful for the production of new drugs. Study of their constituents can also provide important insights relating to their chemotaxonomy, chemical ecology, characterization of species and biotechnological potential. On this basis Laurencia aldingensis, L. dendroidea and Laurenciella sp., were selected for study and isolation, characterization, and biological activity assessment of isolatable quantities of their compounds. The technique of DNA barcoding was used as a diagnostic tool to ensure similarity between samples of each species collected at different times and places. From the organic extract of Laurencia aldingensis nine compounds were isolated; four sphingosines (1-4), three terpenes (5-7) and other two new halogenated compound (8, 9). From the organic extract of Laurencia dendroidea two known halogenated terpenes (10, 11) were isolated while from a similar extract of Laurenciella sp., three new halogenated aliphatic compounds (12-14) were isolated together with known fatty acid (15) and sterol (16). Among all isolates, 8 demonstrated unspecific cytotoxic activity and compounds 4 and 11 showed promising schistosomicidal activity. In applied antioxidant assays none of the isolates we noted to have activity. From the overall investigation it is also clear that the information gleaned from the studies of Laurencia aldingensis, L. dendroidea and Laurenciella sp., significantly expanded our knowledge base concerning chemical diversity in the genus Laurencia and their biological-pharmaceutical potential.

**Keywords:** sphingosines, terpenes, halogenated compounds, anti schistosomiasis, antioxidant, cytotoxic activity

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Moléculas isoladas da espécie Laurencia dendroidea26
Figura 2. Substâncias isoladas de Laurencia catarinensis que apresentaram atividade
citotóxica frente a linhagens tumorais27
Figura 3. Bromo-alenos $C_{15}$ não terpenóides, marilzabicicloalenos A e B isolados de
Laurenciella marilzae27
Figura 4. Acetogeninas isoladas de Laurenciella marilzae
Figura 5. Acetogeninas C <sub>15</sub> cíclicas isoladas do extrato aquoso da espécie Laurencia sp.
Figura 6. Substâncias C <sub>15</sub> halogenados isolados de Laurencia venusta29
Figura 7. Exemplar da amostra da espécie Laurencia aldingensis coletada no litoral do
Espírito Santo. Apecto geral do talo (A). Detalhe do ramo (B). Vista superficial
das células corticais com presença de dois "corps in cerise" por célula (C). Corte
transversal do talo mostrando córtex e medula (D)
Figura 8. Estrutura das aldingeninas A-D extraídas de L. aldingensis
Figura 9. Exemplar da amostra da espécie Laurencia dentroidea no habitat natural na
Praia dos Castelhanos, litoral do Espírito Santo (A). Aspecto geral do talo (B).
Detalhe do ramo (C)
Figura 10. Exemplar da amostra da espécie Laurenciella sp. no habitat natural na Praia
de Meaípe, litoral sul do Espírito Santo (A). Detalhe do talo (B). Detalhe do ramo
(C). Vista superficial das células corticais apresentando um "corp in cerise" por
célula35
Figura 11. Localização do estado do Espírito Santo no Brasil e suas coordenadas
geográficas, com destaque para os municípios onde foram realizadas as coletas
(Guarapari e Anchieta) e a capital Vitória como referência geográfica37
Figura 12. Detalhe de um dos locais de coleta em Guarapari, Espírito Santo37
Figura 13. Esquema representativo das subunidades rbcL e rbcS da Rubisco e a
indicação dos principais primers usados dos estudos das espécies do complexo
Laurencia45
Figura 14. Árvore consenso enraizada de Neighbor-joining (NJ) inferida para
sequências do UPA de espécimes do complexo Laurencia. Chondria dangeardii

foi utilizada como grupo externo. Os valores de bootstrap (2.000 réplicas) referentes às análises de Neighbor-joining (NJ) e de Máxima Parcimônia (MP) e de Máxima Verossimilhança (ML) (100 réplicas) estão expressos nos ramos, nesta ordem. Sequências do Genbank estão indentificadas com os números de acesso entre parênteses. As análises foram realizadas no programa PAUP versão 4.0a146.

- Figura 15. Árvore consenso enraizada de Neighbor-joining (NJ) inferida para sequências do COI-5P de espécimes do complexo *Laurencia*. *Chondria dangeardii* foi utilizada como grupo externo. Os valores de bootstrap (2.000 réplicas) referentes às análises de Neighbor-joining (NJ) e de Máxima Parcimônia (MP) e de Máxima Verossimilhança (ML) (100 réplicas) estão expressos nos ramos, nesta ordem. \* indica valores de bootstrap = 100%. Sequências do Genbank estão identificadas com os números de acesso entre parênteses. As análises foram realizadas no programa PAUP versão 4.0a146. ......60

- Figura 19. Substâncias 1-9 isoladas do extrato diclorometano de L. aldingensis..........79

Figura 22. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância 1 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz). .....82

Figura 23. Espectro de RMN de NH HSQC da substância 1 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)8	32
Figura 24. Espectro de RMN de NH HMBC da substância 1 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)8	33
Figura 25. Espectro de RMN de HSQC da substância 1 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	33
Figura 26. Espectro de massas de alta resolução (ESI-QTOF) da substância 18	35
Figura 27. 2-acetamido-3-acetoxi-1-octadecanol (2) isolada do extrato diclorometar	10
de L. aldingensis	36
Figura 28. Espectro de massas da molécula 2-acetamido-3-acetoxi-1-octadecanol (2010)	2)
obtido por infusão direta em HRESIMS	37
Figura 29. Espectro de HSQC da substância 2 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	90
Figura 30. Correlação de HMBC e COSY na substância 2	<i>)</i> 1
Figura 31. Correlação de HMBC na substância 2 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	<i>)</i> 1
Figura 32. Correlação de COSY na substância 2 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	<i>)</i> 2
Figura 33. Espectro de massas da molécula <b>3</b> obtido por infusão direta espectrômetro o	le
massas Q-TOF de alta resolução (HRESIMS) em modo positivo	<i>•</i> 3
Figura 34. 2-acetamido-1,3- dihidroxioctadecanol (3) isolada do extrato diclorometar	10
de L. aldingensis	<i>•</i> 3
Figura 35. Correlação de HSQC na substância 3 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)	<i>•</i> 6
Figura 36. Correlação de HMBC na substância 3 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).	<b>)</b> 7
Figura 37. Mapa de contorno 2D de correlações de <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H (COSY ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MH	z)
da substância <b>3</b>	)7
Figura 38. Espectro de massas da molécula 4 apresentando o íon molecular $[M+H]^+ m$	/z,
342.3192	98
Figura 39. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância 1-hidroxi-2-acetamida-	3-
oxooctadecano (4) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)10	)()
Figura 40. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância 1-hidroxi-2-acetamida-	3-
oxooctadecano (4) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)10	)1
Figura 41. Espectro de RMN de HSQC da substância 4 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)10	)2
Figura 42. Espectro de RMN de HMBC da substância 4 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)10	)2
Figura 43. Espectro de RMN de NH HSQC da substância <b>4</b> em CDCl <sub>3</sub> a 400 MHz. 10	)3
Figura 44. Espectro de RMN de NH HMBC da substância 4 em CDCl3 a 40	)0
MHz10	)3
Figura 45. Mapa de contorno 2D de correlações de <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H (COSY ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MH	z)
da substância <b>4</b> 10	)4
Figura 46. Correlação de HMBC de C e N, e COSY na molécula 410	)4

Figura 47. 1-hidroxi-2-acetamida-3-oxooctadecano (4) isolada do extrato diclorometano
de L. aldingensis105
Figura 48. Aldingeninas isoladas de Laurencia aldingensis no Brasil (Carvalho et al.
2003 e 2006)
Figura 49. Espectro de massas do íon molecular [M+COOH] <sup>-</sup> da substância 5108
Figura 50. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>5</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)108
Figura 51. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>5</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)109
Figura 52. Correlação de HSQC na substância 5 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)110
Figura 53. Correlação de HSQC na substância 5 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)111
Figura 54. Caespitol113
Figura 55. Correlação de HMBC e <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY na molécula <b>5</b> 113
Figura 56. Correlação de HMBC na substância 5 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)114
Figura 57. Mapa de contorno 2D de correlações de $^{1}$ H, $^{1}$ H (COSY ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)
da substância <b>5</b> 115
Figura 58. Cromatograma obtido por CLAE da substância 6 representado pelo pico em
27.23 min (A) e espectro de massas dos picos dos íons moleculares [M-H] <sup>-</sup> (B) e
[M+COOH] <sup>-</sup> (C)116
Figura 59. Espectro de <sup>13</sup> C RMN da substância (6) (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz)117
Figura 60. Espectro de APT da susbtância 6 (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz)118
Figura 61. Espectro de <sup>1</sup> H RMN da substância 6 (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz)119
Figura 62. Espectro de Hetcorr da substância 6 (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz)120
Figura 63. Espectro de Hetcorr da substância 6 (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz)121
Figura 64. 5-hidroxicaespitol
Figura 65. Correlações de HMBC para a substância 6
Figura 66. Espectro de HMBC da substância 6 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)123
Figura 67. Espectro de massas de alta resolução da substância 7127
Figura 68. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da susbtância 7 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)128
Figura 69. Espectro de HSQC da substância 7 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)129
Figura 70. Espectro de HSQC da substância 7 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)130
Figura 71. Representação da correlação de HMBC e COSY na substância 7
Figura 72. Correlação de HMBC na substância 7(CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)131
Figura 73. Substância 8133
Figura 74. Espectro de massas da substância 8134
Figura 75. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>8</b> 135

Figura 76. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>8</b> 136
Figura 77. Espectro de RMN de HSQC de do composto 8 em CDCl <sub>3</sub> a 400 MHz136
Figura 78. Espectro de RMN de HMBC da substância 8 (CDCl <sub>3</sub> a 400 MHz)137
Figura 79. Mapa de contorno 2D de correlações de ${}^{1}H$ , ${}^{1}H$ (COSY ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)
da substância <b>8</b> 138
Figura 80. Correlação de HMBC e COSY na molécula 8139
Figura 81. Estrutura molecular da substância 9140
Figura 82. Espectro de massas de alta resolução da substância 9 obtido por CLAE-
APCI-EM141
Figura 83. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da susbtância 9142
Figura 84. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância 9143
Figura 85. Espectro de HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância 9144
Figura 86. Espectro de HMBC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância 9145
Figura 87. Mapa de contorno 2D de correlações de <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H (COSY ) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)
da substância <b>9</b> 146
Figura 88. Representação da correlação de HMBC e COSY na substância 9146
Figura 89. Esquema simplificado do processo de obtenção de duas substâncias de L.
dendroidea. Para detalhes dos procedimentos cromatográficos ver seção 8148
Figura 90. Substâncias isoladas de L. dendroidea
Figura 91. Elatol
Figura 92. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>10.</b> 150
Figura 93. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>10.</b> 151
Figura 94. Espectro de RMN de HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>10.</b> 151
Figura 95. Espectro de RMN de HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>10.</b> 152
Figura 96. Espectro de RMN de HMBC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância 10152
Figura 97. Representação da correlação de HMBC na substância 10153
Figura 98. Espectro de massa de alta resolução da substância 11 obtido por CLAE-
APCI-EM
Figura 99. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (em CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da susbtância <b>11</b> 157
Figura 100. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>11</b> 158
Figura 101. Espectro de HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância 11158
Figura 102. Espectro de HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da susbtância <b>11</b> 159
Figura 103. Espectro de RMN HMBC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>11</b> 160
Figura 104. Representação da correlação de HMBC na substância <b>11</b> 160

Figura 105. Estruturas do isoobtusol (11) e obtusol
Figura 106. Esquema simplificado do processo de fracionamento e isolamento das
susbtâncias 12-16 de Laurenciella sp. Para detalhes dos procedimentos
cromatográficos ver seção 8163
Figura 107. Substâncias isoladas da espécie Laurenciella sp164
Figura 108. Espectro de massas de alta resolução do íon molecular [2M-H] <sup>-</sup> da
substância 12 obtido por CLAE-APCI-EM, modo negativo165
Figura 109. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>12.</b> 166
Figura 110. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>12.</b> 166
Figura 111. Espectro de HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>12</b> 167
Figura 112. Mapa de contorno 2D de correlações de $^1\text{H},^1\text{H}$ (COSY ) (CDCl_3, 400 MHz)
da substância <b>12</b> 168
Figura 113. Estrutura da substância (+)-(3E,9E)-7-bromo-6-clorododeca-3,9-dien-1-ine
(12)
Figura 114. Espectro de massa de baixa resolução da substância 13 obtido por CLAE-
APCI-EM, modo negativo171
Figura 115. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>13</b> 171
Figura 116. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>13</b> 172
Figura 117. Espectro de HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância 13172
Figura 118. Espectro de HMBC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>13</b> 173
Figura 119. Mapa de contorno 2D de correlações de $^1\text{H},^1\text{H}$ (COSY ) (CDCl_3, 400 MHz)
da substância <b>12</b> 174
Figura 120. Representação das correlações de HMBC e COSY na molécula 13 175
Figura 121. Estrutura da molécula (+)-(3E,9E)-6-cloro-7-bromododeca-3,9-dien-1,11-
diino ( <b>13</b> )
Figura 122. Espectro de massas de alta resolução obtido por CLAE-APCI-EM, modo
negativo, dos íons da substância 14178
Figura 123. Análise de 14 por cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas
triplo quadrupolo (GCMS-7890A, Agilent, CA, US) equipado com célula de
colisão com controle eletrônico de pressão. Amostra a 0,1 mg/mL em MeOH.
Volume de injeção 1 µL178
Figura 124. Espectro de massas de baixa resolução de 14 analisado em GC-MS tipo
triplo quadrupolo, no modo positivo179

Figura 125. Esquema do perfil de fragmentação para gerar os íon majoritários $m/z$ 114,8
e 152,8 observados para o composto 14, modo positivo179
Figura 126. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>14.</b> 180
Figura 127. Espectro de HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância 14180
Figura 128. Espectro de HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância 14181
Figura 129. Espectro de HMBC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>14.</b> 181
Figura 130. Mapa de contorno 2D de correlações de 1H, 1H (COSY ) (CDCl3, 400
MHz) da substância <b>14</b>
Figura 131. Representação das correlações de HMBC e COSY na molécula 14183
Figura 132. Estrutura da molécula (3E,6Z,9E)-6-chlorododeca-3,6,9-trien-1,11-diino
(14)
Figura 133. Estrutura do ácido heptadecanóico (15)
Figura 134. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>15.</b>
Figura 135. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>15.</b> 187
Figura 136. Análise da substância 15 em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro
de massas triplo quadrupolo (GCMS-7890A, Agilent, CA, US), equipado com
célula de colisão com controle eletrônico de pressão. Amostra a 0,1 mg/mL em
MeOH. Volume de injeção 1 µL. Cromatograma (A) e perfil do espectro de
massas de baixa resolução com destaque para o íon molecular $[M]^+ m/z$ 270
(B)
Figura 137. Espectro de massa de alta resolução da substância 15 obtido por CLAE-
APCI-EM, modo negativo
Figura 138. Estrutura do colesterol (16)
Figura 139. Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>16</b> 190
Figura 140. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>16</b> 191
Figura 141. Espectro de HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância 16191
Figura 142. Espectro de HSQC (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância 16192
Figura 143. Reação de redução da molécula tripiridil-triazina férrica (Fe <sup>III</sup> -TPTZ) a
tripiridil-triazina ferrosa (Fe <sup>II</sup> -TPTZ)
Figura 144. Reação de redução da molécula de 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH). 198
Figura 145. Curva de calibração do Fe <sup>II</sup> . Aumento diretamente proporcional da
absorbância a 593 nm das concentrações das soluções de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (2-120
μΜ)199

- Figura 148. Fases do ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose. Fonte CVE (2005)......215
- Figura 149. Efeito das frações de *L. aldingensis* na sobrevivência de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Cinco casais de vermes foram incubados em poços contendo meio RPMI com adição de 100 µg/mL de extrato e avaliados em diferentes tempos de exposição (2 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h)......219
- Figura 150. Efeito das frações de *L. dendroidea* na sobrevivência de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Cinco casais de vermes foram incubados em poços contendo meio RPMI com adição de 100 μg/mL de extrato e avaliados em diferentes tempos de exposição (2 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h)......220
- Figura 152. Efeito do veículo de diluição DMSO (controle negativo) e do praziquantel (controle positivo) na sobrevivência de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Cinco casais de vermes foram incubados em poços contendo meio RPMI com adição de DMSO 1,5% e avaliados em diferentes tempos de exposição (2 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h).
- Figura 153. Efeito da fração hexânica de *Laurencia aldingensis* na sobrevivência de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Cinco casais de vermes foram incubados em poços contendo meio RPMI com concentrações crescentes de extrato (4, 20 e 100 μg/mL) e avaliados em diferentes tempos de exposição (2 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h).
- Figura 154. Efeito do extrato diclorometano de *Laurencia aldingensis* na sobrevivência de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Cinco casais de vermes foram

- Figura 155. Efeito da fração clorofórmica de *Laurenciella* sp. na sobrevivência de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Cinco casais de vermes foram incubados em poços contendo meio RPMI com concentrações crescentes de extrato (4, 20 e 100 μg/mL) e avaliados em diferentes tempos de exposição (2 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h).

Figura 160. Amino-alcoóis A-D sintéticos. Adaptado de del Olmo et al. (2002). ....243

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Espécies coletadas durante o período de maré baixa, com seus respectivos
locais, datas e números de acesso
Tabela 2. Relação de "primers" direto (f) e reverso (r) de UPA, COI-5P e <i>rbc</i> L utilizados
na PCR e sequenciamento47
Tabela 3. Ciclos de PCR utilizados para a amplificação dos marcadores
moleculares48
Tabela 4. Sequências obtidas no Genbank para as análises filogenéticas neste
estudo
Tabela 5. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos
divergentes (porção superior) entre as sequências do UPA de espécimes de
Laurencia aldingensis obtidos no programa BioEdit versão 3.3.19.056
Tabela 6. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos
divergentes (porção superior) entre as sequências do UPA de espécimes de
Laurencia dendroidea e táxons relacionados obtidos no programa BioEdit versão
3.3.19.0. Sequências do Genbank apresentam informações do local de coleta e estão
identificadas com os números de acesso entre parênteses
Tabela 7. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos
divergentes (porção superior) entre as sequências do UPA de espécimes de
Laurenciella sp. obtidos no programa BioEdit versão 3.3.19.059
Tabela 8. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos
divergentes (porção superior) entre as sequências do COI-5P de espécimes de
Laurencia aldingensis e Laurencia catarinensis obtidos no programa PAUP versão
4.0a146. Sequências do Genbank apresentam informações do local de coleta e estão
identificadas com os números de acesso entre parênteses62
Tabela 9. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos
divergentes (porção superior) entre as sequências do COI-5P de espécimes de
Laurencia dendroidea obtidos no programa PAUP versão 4.0a146. Sequências do
Genbank apresentam informações do local de coleta e estão identificadas com os
números de acesso entre parênteses63
Tabela 10. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos
divergentes (norção superior) entre es seguências de COL 5D de espécimes de

divergentes (porção superior) entre as sequências do COI-5P de espécimes de *Laurenciella* obtidos no programa PAUP versão 4.0a146. Sequências do Genbank 

 Tabela 14. Amplitude de variação da % de divergência entre as sequências dos marcadores estudados.
 70

 Tabela 18. Valores de absorção no espectro do infravermelho para os grupos funcionais

 dos compostos
 88

Tabela 17. Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H (δ em ppm, multiplicidade J em Hz) e <sup>13</sup>C (ppm) da substância 2 (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) do presente estudo e dados da literatura.
89
Tabela 19. Valores das frequências das bandas de absorção, no espectro do

Tabela 20. Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H (δ em ppm, multiplicidade *J* em Hz) e <sup>13</sup>C (ppm) da substância 3 (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)......95

Tabela 21. Valores de absorção no espectro do infravermelho para os grupos funcionais
da molécula <b>4.</b> 99
Tabela 22. Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup> H ( $\delta$ em ppm, multiplicidade $J$ em
Hz) e <sup>13</sup> C (ppm) da sunstância 4 (em CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz)105
Tabela 23. Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup> H ( $\delta$ em ppm, multiplicidade J em
Hz) e ${}^{13}$ C ( $\delta$ em ppm) (em CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>5</b> e comparação com a
literatura112
Tabela 24. Valores de absorção no espectro do infravermelho para os grupos funcionais
do composto <b>5.</b>
Tabela 25. Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup> H ( $\delta$ em ppm, multiplicidade $J$ em
Hz) e ${}^{13}$ C ( $\delta$ em ppm) (em CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>6</b> e comparação com a
literatura
Tabela 26. Valores de absorção no espectro do infravermelho para os grupos funcionais
da substância <b>6.</b> 126
Tabela 27. Valores de absorção no espectro do infravermelho para os grupos funcionais
do composto 7127
Tabela 28. Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup> H ( $\delta$ em ppm, multiplicidade J em
Hz) e ${}^{13}$ C ( $\delta$ em ppm) (em CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da susbtância <b>7</b> e comparação com a
Hz) e <sup>13</sup> C (δ em ppm) (em CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da susbtância 7 e comparação com a literatura
<ul> <li>Hz) e <sup>13</sup>C (δ em ppm) (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da susbtância 7 e comparação com a literatura</li></ul>
<ul> <li>Hz) e <sup>13</sup>C (δ em ppm) (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da susbtância 7 e comparação com a literatura</li></ul>
<ul> <li>Hz) e <sup>13</sup>C (δ em ppm) (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da susbtância 7 e comparação com a literatura</li></ul>
<ul> <li>Hz) e <sup>13</sup>C (δ em ppm) (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da susbtância 7 e comparação com a literatura</li></ul>
<ul> <li>Hz) e <sup>13</sup>C (δ em ppm) (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da susbtância 7 e comparação com a literatura</li></ul>
<ul> <li>Hz) e <sup>13</sup>C (δ em ppm) (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da susbtância 7 e comparação com a literatura</li></ul>
<ul> <li>Hz) e <sup>13</sup>C (δ em ppm) (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da susbtância 7 e comparação com a literatura</li></ul>
<ul> <li>Hz) e <sup>13</sup>C (δ em ppm) (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da susbtância 7 e comparação com a literatura</li></ul>
<ul> <li>Hz) e <sup>13</sup>C (δ em ppm) (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da susbtância 7 e comparação com a literatura</li></ul>
<ul> <li>Hz) e <sup>13</sup>C (δ em ppm) (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da susbtância 7 e comparação com a literatura</li></ul>
<ul> <li>Hz) e <sup>13</sup>C (δ em ppm) (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da susbtância 7 e comparação com a literatura</li></ul>
<ul> <li>Hz) e <sup>13</sup>C (δ em ppm) (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da susbtância 7 e comparação com a literatura</li></ul>

Tabela 35. Valores de absorção no espectro do infravermelho para os grupos funcionais
da substância <b>11.</b> 156
Tabela 36. Deslocamentos químicos de RMN $^{13}$ H ( $\delta$ em ppm, multiplicidade J em Hz)
e de $^{13}$ C ( $\delta$ em ppm) da substância <b>11</b> (em CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) e comparação com
dados da literatura162
Tabela 37. Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>12</b> 169
Tabela 38. Valores de absorção dos grupos funcionais da substância 12, obtidos por
espectroscopia de infravermelho170
Tabela 39. Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância <b>13</b> 176
Tabela 40. Valores de absorção dos grupos funcionais da substância 13, obtidos por
espectroscopia de infravermelho177
Tabela 41. Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (400 MHz) do composto <b>14</b> in CDCl <sub>3</sub> 184
Tabela 42. Valores de absorção dos grupos funcionais da substância 14, obtidos por
espectroscopia de infravermelho185
Tabela 43. Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) da substância <b>15</b> 187
Tabela 44. Valores de absorção dos grupos funcionais da substância 15, observados por
espectroscopia de infravermelho189
Tabela 45. Valores de absorção dos grupos funcionais da substância 16, obtidos por
espectroscopia de infravermelho192
Tabela 46. Dados de RMN de ${}^{1}$ H e ${}^{13}$ C (400 MHz) do colesterol (16), obtidos em CDCl <sub>3</sub>
e dados da literatura193
Tabela 47. Poder antioxidante de redução do ferro "Ferric Reducing Ability of Plasma"
(FRAP) e capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
(DPPH)Ferric dos extratos diclorometano bruto das espécies de Laurencia
aldingensis (LA-DCM), Laurencia dendroidea (LD-DCM) and Laurenciella sp.
(LI-DCM) a 100, 500 e 1000 µg/mL200
Tabela 48. Poder antioxidante de redução do ferro "Ferric Reducing Ability of Plasma"
(FRAP) e capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)
dos compostos a 50 µg/mL em MeOH201
Tabela 49. Citotoxicidade dos extratos DCM e MeOH das espécies de Laurencia
aldingensis, Laurencia dendroidea e Laurenciella sp., e de substâncias isoladas,
contra várias linhagens de tumores celulares no ensaio de disco-difusão em ágar
macio <sup><i>a</i></sup>

Tabela 50. Efeito dos extratos da alga L. aldingensis na atividade motora e acasalamento
de adultos de Schistosoma mansoni226
Tabela 51. Efeito dos extratos da alga L. dendroidea na atividade motora e acasalamento
de adultos de Schistosoma mansoni227
Tabela 52. Efeito dos extratos da alga Laurenciella sp. na atividade motora e
acasalamento de adultos de Schistosoma mansoni
Tabela 53. Efeito dos controles negativo e positivo na atividade motora e acasalamento
de adultos de Schistosoma mansoni
Tabela 54. Efeito da fração hexânica da alga L. aldingensis em diferentes concentrações
na atividade motora e acasalamento de adultos de Schistosoma mansoni230
Tabela 55. Efeito do extrato diclorometano da alga L. aldingensis em diferentes
concentrações na atividade motora e acasalamento de adultos de Schistosoma
mansoni
Tabela 56. Efeito da fração clorofórmica da alga Laurenciella sp. em diferentes
concentrações na atividade motora e acasalamento de adultos de Schistosoma
mansoni
Tabela 57. Efeito dos controles positivo (DMSO) e negativo (Praziquantel) na atividade
motora e acasalamento de adultos de Schistosoma mansoni
Tabela 58. Efeito das subtâncias 1-4 na atividade motora e acasalamento de adultos de
Schistosoma mansoni237
Tabela 59. Efeito das substâncias 5, 6, 8 e 9 na atividade motora e acasalamento de
adultos de Schistosoma mansoni
Tabela 60. Efeito das substâncias 10 e 11 na atividade motora e acasalamento de adultos
de Schistosoma mansoni
Tabela 61. Efeito das substâncias <b>12-16</b> na atividade motora e acasalamento de adultos
de Schistosoma mansoni241

## SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN = acetonitrila
ATCC = American Type Culture Collection
brd = broad doublet
Can = Ilhas Canárias
CCD = Cromatografia em camada delgada
Cer = Ceramidas
CI- Chemical ionization (Ionização Química)
CLAE-EM = Cromatografia líquida de alta eficiência-espectrometria de massas
CN = China
COI-5P = porção 5' do gene que codifica a subunidade I da enzima citocromo c oxidase
COX1 = gene que codifica a subunidade I da enzima citocromo $c$ oxidase
dCer = diidroceramidas
DCM = diclorometano
DMSO = dimetilsulfóxido
eV = elétron-volts
FC = Fração clorofórmica
FE = fase estacionária
FH = fração hexânica
Fl = Flórida
FM = Fração metanólica
$GI_{50} = Growth inhibition (inibição do crescimento)$
HBSS = Hank's balance salt solution
HI - Hawaii
$IC_{50} = inibição do crescimento$
LA = Laurencia aldingensis
LA-DCM = extrato diclorometano bruto de <i>Laurencia aldingensis</i>
LD = Laurecnia dendroidea
LD-DCM = extrato diclorometano bruto de Laurecnia dendroidea
LI = Laurenciella sp.
LI-DCM = extrato diclorometano bruto de <i>Laurenciella</i> sp.

LIT = Liver-infusion trytose

m/z = massa/carga

MDR = multidrug resistence

MeOH = metanol

MID = dose máxima tolerada

MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

 $NH_4OAc = Acetato de amônia$ 

nt = nucleotídeos

pb = pares de bases

P-gp = P-glicoproteína

*rbc*L = gene da ribulose-bifosfato carboxilase

RMN - Ressonância magnética nuclear

Rpm = rotações por minuto

UPA = Universal Plastid Amplicon

V = volts

Yuc = yucatán

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABELAS

#### SIGLAS, ABREVIATURAS E SIMBOLOS

INTRODUÇÃO - Ambiente marinho, algas do complexo Laurencia e seu potencial 1. 2. 3. 3.1. 3.2. 3.3. 3.4. 

**CAPITULO 1** - Barcode das espécies de algas marinhas *Laurencia aldingensis, L. dendroidea* e *Laurenciella* sp. (Rhodophyta) usando os marcadores moleculares UPA, COI-5P e *rbc*L

4.	IN	TRO	DUÇÃO	.41
4	4.1.	Sist	temática molecular e marcadores moleculares – UPA, COI-5P e <i>rbcL</i>	.41
4	4.2.	Ma	rcadores moleculares testados	.42
	4.2	.1.	UPA - "Universal Plastid Amplicon"	.42
	4.2	.2.	COI-5P	.43
	4.2	.3.	rbcL	.44
5.	MA	ATEI	RIAIS E MÉTODOS	.45
	5.1	.1.	Extração do DNA	.45
-	5.2.	Am	plificação e purificação dos marcadores moleculares	.47
5	5.3.	Seq	uenciamento dos marcadores moleculares	.48
4	5.4.	Ana	álise e alinhamento das sequências	.49

	5.5.	Ana	álises moleculares	53
	5.6.	Árv	ore de agrupamento	54
	5.6	5.1.	Análises do UPA	54
	5.6	5.2.	Análise do COI-5P	59
	5.6	5.3.	Análise de <i>rbc</i> L	64
	5.7.	Div	ergência entre as sequências dos marcadores estudados	69
6.	CO	ONSI	DERAÇÕES FINAIS	71
CA coi dei	APÍT mpos ndroi	<b>ULO</b> stos j idea e	<b>2</b> - Preparo dos extratos, fracionamento, isolamento e ca presente nas algas marinhas vermelhas <i>Laurencia</i> e <i>Laurenciella</i> sp.	racterização dos <i>aldingensis, L</i> .
7.	PF	REPA	RAÇÃO DOS EXTRATOS	73
8.	FF	RACI	ONAMENTO E ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS	73
9.	CA	ARAG	CTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS	76
(	9.1.	Sub	stância da espécie Laurencia aldingensis	78
	9.1	l.1.	Esfingosinas: dihidroceramidas (dCer)	79
	9.1	1.2.	Terpenos halogenados	107
	9.1	1.3.	Outras substâncias halogenadas	133
(	9.2.	Cor	npostos da espécie Laurencia dendroidea	148
	9.2	2.1.	Terpenos halogenados tipo chamigrano	149
(	9.3.	Sub	ostâncias da espécie <i>Laurenciella</i> sp	163
	9.3	3.1.	Alifáticos insaturados halogenados	165
	9.3	3.2.	Ácido graxo insaturado	
	9.3	3.3.	Esterol	190

CAPÍTULO 3 - Atividades Biológicas: atividade antioxidante, citotóxica e esquistossomicida

10.	ATIVII	DADE ANTIOXIDANTE	
10.1	Intr	oducão	106
10.1	. mu	ouuçao	

10.2. Material e métodos	96
10.2.1. Poder antioxidante de redução do ferro "Ferric Reducing Ability of	of
<i>Plasma</i> " (FRAP)19	96
10.2.2. Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPP)	Η
	98
10.3. Resultados e discussão19	)9
11. ATIVIDADE CITOTÓXICA20	)2
11.1. Introdução20	)2
11.2. Material e métodos20	)5
11.2.1. Preparação dos materiais para ensaio20	)6
11.2.2. Ensaio de disco-difusão in vitro20	)9
11.3. Resultados e discussão21	.1
12. ATIVIDADE ANTIESQUISTOSSOMOSE	.4
12.1. Introdução21	.4
12.2. Material e Métodos21	.6
12.2.1. Avaliação da viabilidade de Schistosoma mansoni em presença do	os
extratos de algas e compostos isolados das espécies de Laurencia aldingensis, l	L.
dendroidea e Laurenciella sp21	.6
12.3. Resultado e Discussão21	.8
12.3.1. Avaliação da viabilidade de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> en presença dos extratos de algas	m 8
12.3.2. Efeito dos extratos na atividade motora e no acasalamento de adultos d	le
Schistosoma mansoni22	24
12.3.3. Efeitos dos extratos na oviposição de <i>Schistosoma mansoni</i> 23	33
12.3.4. Avaliação da viabilidade de adultos de Schistosoma mansoni en	m
presença das substâncias isoladas23	\$5
12.3.5. Efeito dos compostos na atividade motora, no acasalamento dos verme adultos e na oviposição das fâmeas de <i>Schistosoma mansoni</i>	es Re
	טי ר ר
13. CUNSIDERAÇUES FINAIS24	Ð

14.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS24	7
	ANEXO 1 - Porcentagem de divergência e número de nucleotídeos divergente	s
	entre as sequências utilizadas para a análise do UPA, COI-5P e <i>rbc</i> L27	2
	ANEXO 2 - Valores de probabilidade posterior na árvore filogenética gerada n	a
	Análise Bayesiana	5
	ANEXO 3 - Alinhamento das sequência da UPA27	6
	ANEXO 4 - Alinhamento das sequência do COI-5P28	1
	ANEXO 5 - Alinhamento das sequência do <i>rbc</i> L	9
	ANEXO 6 - Espectros de IV das substâncias isoladas29	7
	ANEXO 7 - Artigo publicado 1	6
	ANEXO 8 - Artigo publicado 2	7

## Introdução

# Ambiente marinho, algas do complexo *Laurencia* e seu potencial biotecnológico.

O ambiente marinho, principalmente nas regiões tropicais, apresenta uma diversidade de espécies comparável àquela presente nas florestas tropicais. E o Brasil é um país que ocupa uma posição de destaque no mundo abrigando uma rica fonte de produtos naturais devido à sua enorme biodiversidade. Esta riqueza de espécies é capaz de produzir uma enorme variedade de estruturas químicas com um potencial elevado para descoberta de novos fármacos (Molinski *et al.*, 2009).

As algas são conhecidas por produzirem uma variedade enorme de compostos, sendo que o filo Rhodophyta é reconhecido como grande produtora de metabólitos secundários biologicamente ativos que podem pertencer a praticamente todas as classes químicas, predominantemente sesquiterpenos, diterpenos e acetogeninas (Fenical e Norris 1975, Erickson 1983, Blunt *et al.* 2005, Lhullier *et al.* 2010).

Dentre as espécies de Rhodophyta, *Laurencia* sensu lato, que é composta por 7 gêneros, *Laurencia* sensu stricto, *Osmundea* Stackhouse, *Chondrophycus* (Tokida & Y. Saito) Garbary & J.T. Harper, *Palisada* (Yamada) K.W. Nam, *Yuzurua* (K.W. Nam) Martin-Lescanne, *Laurenciella* V. Cassano *et al.*, e *Choronaphycus* Metti (Nam *et al.* 1994, Garbary e Harper 1998, Nam 1999, 2006, 2007, Martin-Lescanne 2010, Cassano *et al.* 2012*a*, Metti *et al.* 2015), é conhecida ser fonte extremamente rica de metabólitos secundários halogenados (König e Wright 1997*a*). Estes táxons podem produzir um grande número e variedade de esqueletos carbônicos, tais como sesquiterpenos halogenados ou não, diterpenos, triterpenos e acetogeninas (Martín e Darias 1978, Erickson 1983, Coll *et al.* 1989, Wright *et al.* 1991, Wright *et al.* 1993, König e Wright 1994, Faulkner 1996,

Pereira e Teixeira 1999, Faulkner 2000, Fujii *et al.* 2011) e têm estado na vanguarda da pesquisa por produtos naturais marinhos desde suas descobertas.

Em se tratando de Laurencia e Laurenciella, em comum, elas apresentam organelas denominadas "corps en cerise" ou em português, corpos em cereja, em suas células corticais e nos tricoblastos, facilmente visíveis em espécimes vivos, onde foram mostrados serem locais de armazenamento dos produtos do metabolismo (Fujii 1990). Os "corps en cerise" são corpúsculos reniformes com dupla membrana, preenchidos por conteúdo osmiofílico refringente, variando entre homogênio a granulado (Feldman e Feldman 1950). A membrana interna é própria dele e a externa é proveniente do vacúolo celular (Bodard 1968). O fato de seu conteúdo estar mantido em estruturas membranosas sugere que este possa ser tóxico para a célula, evitando assim a apoptose (Leal 2007). Foi observado por Feldman e Feldman (1950) a ligação dos "corps en cerise" com a parede celular por um canal de comunicação membranar (pedicelo) por onde o conteúdo é exsudado para a superfície do talo da alga. Depois, estas informações foram comprovadas por microscopia eletrônica (Salgado et al. 2008) sugerindo que, se estas estruturas estão conectadas à superfície de alguma maneira, então são essenciais para interações mediadas pela superfície, como inibição de bactérias epibiontes (Leal 2007), além desses metabólitos poderem ter o potencial de exercer alguma atividade biológica (Steinberg e De Nys 2002).

O complexo *Laurencia* está amplamente distribuído em águas tropicais e subtropicais do mundo (Guiry e Guiry 2015), onde a incidência e atividade dos herbívoros são mais intensas. Vários estudos mostram que os metabólitos secundários de *Laurencia* estão relacionados com minimizar a herbivoria (Paul 1992, Pereira 1993), mas também podem apresentar simultaneamente outras funções, tais como a proteção contra organismos incrustantes. Como resultado disso, pode-se inferir um aumento da capacidade adaptativa dos indivíduos nesses ambientes proporcionado pelos metabólitos produzidos (Pereira *et al.* 2003).

O grande interesse pelos metabólitos secundários das espécies do complexo *Laurencia* do Brasil fez de *Laurencia dendroidea* (conhecida anteriormente como *L. filiformis*, *L. microcladia*, *L. scoparia* e *L. obtusa*) a espécie mais estudada, também por ela ter uma ampla distribuição ao longo da costa. Dela foram isolados vários sesquiterpenos das classes triquinol, bisabolano, chamigrano, como por exemplo o elatol, que é hoje um composto clássico dessa espécie, do qual já foi reportado várias atividades ecológicas como anti-

herbivoria (Paul 1992, Pereira *et al.* 2003) e anti-incrustação (König e Wright 1997*b*, da Gama *et al.* 2002, Pereira *et al.* 2003), assim como atividades farmacológicas contra tripanossoma da doença de Chagas, (Veiga-Santos *et al.* 2010), leishmaniose (Santos *et al.* 2010; Machado *et al.* 2011) e helmintose (Davyt *et al.* 2001, 2006). Do óleo essencial de *L. dendroidea*, foram isolados dois álcool-triquinanos 7-epi-silfiperfolan-6β-ol e silfiperfolan-7β-ol (Coll e Wright 1989a, Wright *et al.* 1990, Davyt *et al.* 2006) que mostraram alguma atividade antioxidante mas nenhuma atividade bacteriana ou fungicida contra patógenos humanos (Gressler *et al.* 2011) (Figura 1). Estes resultados foram consistentes com aqueles previamente reportados, que mostraram não haver atividade bacteriana, apenas uma moderada atividade antialgal (König e Wright 1997*a*).



Figura 1. Moléculas isoladas da espécie Laurencia dendroidea.

De outra espécie de *Laurencia* do Brasil, *L. catarinensis* Cordeiro Marino & M.T. Fujii, foram isolados quatorze metabólitos halogenados com os quais foi testada atividade citotóxica contra linhagens celulares de tumor. Este trabalho mostrou que caespitol, acetilcaespitol, deoxicaespitol e (5*S*)-5-acetoxicaespitol (Figura 2) apresentaram atividade numa concentração menor que 20 µM contra todas as linhagens celulares testadas (HT29, MCF7 e A431), e sendo o caespitol, o mais ativo deles (Lhullier *et al.* 2010).



Figura 2. Substâncias isoladas de *Laurencia catarinensis* que apresentaram atividade citotóxica frente a linhagens tumorais.

O gênero *Laurenciella* Cassano, Gil-Rodríguez, Sentíes, Díaz-Larrea, M.C. Oliveira et M.T. Fujii inclui a espécie *L. marilzae* (Gil-Rodríguez, Sentíes, Díaz-Larrea, Cassano et M.T. Fujii) Gil-Rodríguez, Sentíes, Díaz-Larrea, Cassano et M.T. Fujii) Gil-Rodríguez, Sentíes, Díaz-Larrea, Cassano et M.T. Fujii, descrita originalmente para as Ilhas Canárias, Espanha (Gil-Rodríguez *et al.* 2009), mas depois foi reportada para o litoral do sudeste brasileiro (Rocha-Jorge *et al.* 2010) e para o Caribe Mexicano (Sentíes *et al.* 2011). A partir dessa espécie, dois bromo-alenos C<sub>15</sub> não terpenóides - marilzabicicloalenos A e B (Figura 3), foram isolados e avaliados quanto à atividade *in vitro* antiproliferativa contra seis linhagens de células tumorais humanas, incluindo de ovário, mama, cérvix, pulmão e colo do útero. Ambos os compostos mostraram atividade não significativa (GI<sub>50</sub>>10  $\mu$ g/mL) (Gutiérrez-Cepeda *et al.* 2011*a*).



Figura 3. Bromo-alenos  $C_{15}$  não terpenóides, marilzabicicloalenos A e B isolados de *Laurenciella marilzae*.

Outras acetogeninas  $C_{15}$  foram isoladas - 12-epoxiobtusaleno IV, obtusaleno IV, marilzaleno, (+)-4-acetoxymarilzaleno, Z-adrienina (Figura 4), e a atividade antiproliferativa *in vitro* foi testada, mas os efeitos não foram significativos (Gutiérrez-Cepeda *et al.* 2011b).



Figura 4. Acetogeninas isoladas de Laurenciella marilzae.

Abdel-Mageed e colaboradores (2010) isolaram acetogeninas C<sub>15</sub> cíclicas do extrato aquoso de *Laurencia* sp. (Figura 5) e avaliaram atividade citotóxica destes compostos. Laurefurenina A e B foram inativas contra as linhagens de tumores sólidos. Laurenfurenina F apresentou moderada atividade citotóxica contra tumores sólidos de cólo de camundongo (C38), de cólo humano (H116) e de pulmão humano (H125), contra células de leucemia (L1210) e células normais humanas (CFU-GM). Já o seu isômero laurenfurenina E mostrou uma fraca atividade apenas contra C38. Laurenfurenina C apresentou moderada atividade contra as células de leucemia e tumores sólidos, mas seu isômero laurenfurenina D mostrou fraca atividade contra C38. Mesmo aqueles que apresentaram alguma atividade, não se mostraram seletivos.



Figura 5. Acetogeninas C15 cíclicas isoladas do extrato aquoso da espécie Laurencia sp.

Estes resultados sugerem que outros ensaios devem ser realizados com estes compostos para ver qual o potencial de bioatividade deles, como por exemplo, ensaio antimicrobiano. Essa dedução é suportada pelo fato da principal atividade reportada para acetogeninas ser a atividade antimicrobiana (Faulkner 2000, Higgs 1981).

Além disso, uma série de outras substâncias C<sub>15</sub> halogenados encontrados em *Laurencia venusta* Yamada - (3Z)-epoxivenustina, (3Z)-venustina, (3Z)-venustineno (Figura 6), apresentaram alguma atividade antimicrobiana nos ensaios realizados (Suzuki e Kurosawa 1980, Suzuki *et al.* 1983).



(3Z)-epoxivenustina

(3Z)-venustina

(3Z)-venustineno

Figura 6. Substâncias C<sub>15</sub> halogenados isolados de Laurencia venusta.

#### 1. JUSTIFICATIVA

Apesar das espécies brasileiras do complexo Laurencia serem conhecidas por produzirem metabólitos secundários ativos, que apresentam elevado potencial farmacológico, bioensaios só foram conduzidos com substâncias isoladas de L. catarinensis e L. dendroidea (Davyt et al. 2001, da Gama et al., 2002, Pereira et al., 2003, Lhullier et al., 2010, Veiga-Santos et al., 2010, Santos et al., 2010, Machado et al., 2011, Gressler et al. 2011). Diante deste quadro apresentado, a busca por novos compostos naturais marinhos oriundos de espécies brasileiras do complexo Laurencia se tornam altamente atrativos. Laurencia aldingensis foi muito pouco estudada com relação aos seus constituintes químicos e, Laurenciella sp. nunca fora antes estudada nestes aspectos, o que as tornam alvos potenciais para ampliar o conhecimento da diversidade química tanto dentro do complexo Laurencia como no ambiente marinho. Laurencia dendroidea, apesar de ser amplamente estuda, apresenta maquinaria química fascinante que pode sempre proporcionar a descoberta de novos compostos por ela sintetizados. Além disso, o estudo dos caracteres químicos dessas espécies, pode contribuir na diferenciação de táxons morfologicamente relacionados já que há sérios problemas de delimitação de espécies nestes gêneros.
#### 2. OBJETIVOS

#### **OBJETIVO GERAL:**

O objetivo geral desta tese de doutorado é gerar uma etiqueta molecular para as espécies *Laurencia aldingensis*, *L. dendroidea*, *Laurenciella* sp. em estudo, fazer o isolamento guiado por RMN dos metabólitos majoritários, seguido de caracterização deles. Além disso, realizar testes de atividades biológicas com os extratos e os compostos.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

Os objetivos específicos deste trabalho consistem em:

- Certificar, por meio da técnica do DNA barcoding, que, para cada espécie, os materiais provenientes das diferentes coletas apresentam a mesma identidade taxonômica.
- b. Preparar, para cada espécie, extratos para serem fracionados e para terem suas atividades biológicas testadas.
- c. Realizar fracionamento monitorado por CCD e guiado por RMN.
- d. Isolar os compostos majoritários e caracteriza-los, usando diferentes técnicas espectroscópicas e espectrométricas.
- e. Realizar testes de atividades biológicas (antioxidante, citotóxica e esquistossomicida) com os extratos e compostos isolados.

# 3. ESPÉCIES SELECIONADAS PARA ESTUDO

# 3.1. Laurencia aldingensis Saito & Womersley



Figura 7. Exemplar da amostra da espécie *Laurencia aldingensis* coletada no litoral do Espírito Santo. Apecto geral do talo (A). Detalhe do ramo (B). Vista superficial das células corticais com presença de dois "*corps in cerise*" por célula (C). Corte transversal do talo mostrando córtex e medula (D).

*Laurencia aldingensis* (Figura 7) foi descrita a partir do material de Aldinga, Austrália (Saito & Womersley, 1974) e tem sido caracterizada por apresentar talo ereto em densos tufos de cor róseo-vinácea que se destacam pela presença de porções apicais róseas quando vivas. Apresentam até 10 cm de altura e crescem como epífitas sobre outras macroalgas (Fujii e Santíes 2005). Além da sua localidade-tipo, a espécie é encontrada somente no Brasil, ocorrendo no Espírito Santo (Carvalho *et al.* 2003, 2006) e norte do Rio de Janeiro (Cassano 2009).

A identificação de *L. aldingensis* foi feita pela primeira vez no Brasil por Carvalho e colaboradores (2003), que identificaram quatro novos sesquiterpenos cujos compostos pareceram estar restritos a esta espécie - as aldingeninas A, B, C e D (Figura 8) (Carvalho *et al.* 2003, 2006).



Aldingenina C

Aldingenina D

Figura 8. Estrutura das aldingeninas A-D extraídas de *L. aldingensis* (Carvalho et al. 2003, 2006) Os espécimes brasileiros se aproximam morfologicamente dos descritos para a localidadetipo pelo hábito, padrão de ramificação e ausência de espessamentos lenticulares. No entanto, diferem-se pelo talo relativamente mais robusto e pela falta de células corticais projetadas no ápice dos ramos. Mas a identificação dessa espécie para o Brasil é apenas uma tentativa, pois faltam análises de sequências de DNA de *L. aldingensis* da localidadetipo para a confirmação de sua ocorrência no litoral brasileiro (Cassano 2009). A comparação dos seus constituintes químicos aliada a dados morfológicos e de marcadores moleculares (UPA, COI-5P, *rbc*L) serão de grande importância para o esclarecimento da sua posição taxonômica. Mesmo que alguns de seus compostos majoritários tenham sido isolados, nada se sabe ainda sobre a atividade biológica dessas substâncias. Sendo este um espécime localmente abundante, com coloração e textura atrativas aos herbívoros, sugere-se possuir maquinaria bioquímica fascinante com grande potencial biotecnológico.

### 3.2. Laurencia dendroidea J. Agardh



Figura 9. Exemplar da amostra da espécie *Laurencia dentroidea* no habitat natural na Praia dos Castelhanos, litoral do Espírito Santo (A). Aspecto geral do talo (B). Detalhe do ramo (C).

*Laurencia dendroidea* (Figura 9) definitivamente é a espécie mais estudada do complexo *Laurencia*, tanto pela dificuldade na sua identificação taxonômica quanto pela riqueza de metabólitos secundários biologicamente ativos por ela produzidos.

Esta espécie foi primeiramente descrita como *Fucus obtusus* (Hudson) em 1778 e depois, oficialmente incorporada ao gênero *Laurencia*, como *Laurencia obtusa* (Hudson) J.V. Lamouroux, se tornando a espécie-tipo.

É uma espécie que adquiriu uma grande plasticidade fenotípica, possivelmente devido à sua característica cosmopolita. Ela vem sendo encontrada em águas tropicais, temperadas e frias (Cassano et al, 2012*b*) e, para diversos fenólipos encontrados, vários táxons infraespecíficos - 37, segundo Guiry e Guiry (2011), foram gerados.

Hoje, com estudos morfológicos e moleculares foi possível determinar que *Laurencia obtusa*, *L. microcladia*, *L. heteroclada*, *L. composita*, *L. arbuscula*, *L. scoparia*, *L. majuscula* e *L. filiformis* do Brasil e *L. majuscula* das Ilhas Canárias e Austrália são pertencentes à mesma entidade taxonômica (Cassano *et al.* 2012*b*; Metti *et al.* 2013) e, por fim, todas elas designadas como *Laurencia dendroidea* cuja localidade-tipo é o Brasil.

*Laurencia dendroidea* é uma planta que apresenta porte maior, com até 30 cm de altura (o que é importante para fins de bioprospecção), e o seu metabólito majoritário - elatol, já é conhecido por apresentar atividades anti-incrustante (da Gama *et al.* 2002) e antiherbivoria (Pereira *et al.*, 2003). É encontrada com abundância no litoral do ES, o que facilita na obtenção de biomassa para bioprospecção. No entanto, devido à grande plasticidade fenotípica já mencionada, a confirmação taxonômica a nível molecular se torna bastante relevante.

#### 3.3. Laurenciella sp.



Figura 10. Exemplar da amostra da espécie *Laurenciella* sp. no habitat natural na Praia de Meaípe, litoral sul do Espírito Santo (A). Detalhe do talo (B). Detalhe do ramo (C). Vista superficial das células corticais apresentando um "*corp in cerise*" por célula (D).

*Laurenciella* sp. (Figura 10) foi até recentemente identificada como *Laurencia intricata* Lamouroux com base no hábito e em caracteres morfológicos. A espécie foi caracterizada pela coloração rósea e hábito intricado entre as coralináceas articuladas (Taylor 1960). A primeira referência desta espécie para o Brasil foi feita por Fujii (1990) como *Laurencia implicata* e posteriormente revalidada como *Laurencia intricata* (Fujii & Sentíes 2005). Entretanto, resultados obtidos de dados moleculares mostraram que esta é uma espécie distinta da *L. intricata* encontrada na região Caraíbica, localidade-tipo da espécie (presente trabalho e Cassano 2009).

*Laurenciella* sp. (anteriormente tratada como *Laurencia intricata*) foi selecionada para o presente estudo baseando-se também em resultados preliminares. O extrato clorofórmico se mostrou mais ativo que o hexânico e metanólico contra fungos patogênicos humanos *Candida albicans, C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* (Stein *et al.* 2011). No ensaio antimicrobiano frente a bactérias patogênicas, o extrato hexânico se mostrou bacteriostático contra *Staphylococcus aureus, Salmonella typhi* e *Bacillus subtilis* e o extrato CHCl<sub>3</sub> contra *B. subtilis* (Stein 2011). As medidas do potencial antioxidante dos

extratos através da atividade sequestrante do radical DPPH mostraram que o extrato CHCl<sub>3</sub> na sua maior concentração testada foi mais eficiente que o extrato de *Ginkgo biloba* que é bem conhecido pelo seu potencial antioxidante (Goh & Barlow 2002, Kobus *et al.* 2009, Sati *et al.* 2013). Podemos citar ainda que os resultados de atividade anticolinesterásica, principalmente dos extratos hexano e CHCl<sub>3</sub> apresentaram ótimos resultados (Stein 2011). Esses resultados apontam que esta espécie apresente uma rica defesa química cujo potencial bioativo deve ser explorado a fim de denotar futuras moléculas com importância econômica.

Com sua identidade ainda em processo de avaliação, a caracterização química desta espécie se torna mais uma e importante ferramenta que auxiliará a biologia molecular na elucidação da questão, além de poder promover algum composto químico que traduza a unicidade da espécie, tornando-o um marcador químico.

Neste contexto, *Laurencia intricata*, que neste trabalho será chamada de *Laurenciella* sp. (baseado em dados moleculares obtidos no presente estudo), de ocorrência limitada a um pequeno trecho da costa sudeste brasileira, cuja determinação taxonômica ainda precisa ser validada e cujo potencial químico e biológico nunca antes fora estudado, torna-se assim uma alga em potencial para prospecção, além de além de poder contribuir para a filogenia do grupo.

#### 3.4. Obtenção do material biológico

As espécies *Laurencia aldingensis, Laurencia dendroidea* e *Laurenciella* sp. foram coletadas principalmente no litoral do Espírito Santo (Figura 11) durante a maré baixa nos períodos de 06/2007 a 05/2014. Após a coleta, o material foi triado em água do mar com o objetivo de eliminar as epífitas e a comunidade fital. Em seguida, alíquotas de cada espécie de macroalga foram fixadas em formol 4% para confecção dos *vouchers* e deposição em herbário. Regiões jovens de indivíduos foram separadas e desidratadas em sílica gel para análise molecular e o restante da biomassa algal foi inserido em sacos plásticos com fecho hermético, congelado em freezer -20 °C devidamente identificado.



Figura 11. Localização do estado do Espírito Santo no Brasil e suas coordenadas geográficas, com destaque para os municípios onde foram realizadas as coletas (Guarapari e Anchieta) e a capital Vitória como referência geográfica. Fonte: ArcMap, ArcView



Figura 12. Detalhe de um dos locais de coleta em Guarapari, Espírito Santo. (Foto: C.E.Stein) Todo o material usado no presente trabalho encontra-se discriminado na Tabela 1 com informações do local e data da coleta e número de depósito no Herbário Maria Eneida P. K. Fidalgo (SP).

Espécie	Sigla usada	Local e data da coleta	Número de acesso
Laurencia aldingensis	LA01	Ubu, Anchieta/ES 30/06/07	SP400.203
Laurencia aldingensis	LA05	Castelhanos, Anchieta/ES 04/06/08	SP400.211
Laurencia aldingensis	LA07	Ubu, Anchieta/ES 26/09/11	SP427.942
Laurencia aldingensis	LA08	Castelhanos, Anchieta/ES 27/09/11	SP 427.943
Laurencia aldingensis	LA09	Ilhote de Ubu, Anchieta/ES 12/11/12	SP 427.947
Laurencia aldingensis	LA06	Castelhanos, Anchieta/ES 13/11/12	SP 427.948
Laurencia aldingensis	LA03	Meaípe, Guarapari, ES 14/05/14	SP 428.717
Laurencia aldingensis	LA02	Castelhanos, Anchieta, ES 15/05/14	SP 428.730
Laurencia aldingensis	LA04	Padres, Guarapari, ES 16/05/14	SP 428.746
Laurenciella sp.	LI01	Meaípe, Guarapari/ES 04/06/08	SP400.893
Laurenciella sp.	LI03	Meaípe, Guarapari/ES 24/10/11	-
Laurenciella sp.	LI04	Meaípe, Guarapari/ES 14/05/14	SP 428.719
Laurenciella sp.	LI02	Padres, Guarapari, ES 16/05/14	SP 428.747
Laurencia dendroidea	LD01	Castelhanos, Anchieta/ES 05/10/06	SP 400.202
Laurencia dendroidea	LD03	Castelhanos, Anchieta/ES 01/07/07	SP 399.933
Laurencia dendroidea	LD04	Praia Brava, Ubatuba/SP 25/10/07	SP 401.375
Laurencia dendroidea	LD05	Castelhanos, Anchieta/ES 27/09/11	SP 427.944
Laurencia dendroidea	LD02	Castelhanos, Anchieta/ES 25/10/11	-

Tabela 1. Espécies coletadas durante o período de maré baixa, com seus respectivos locais, datas e números de acesso.

O símbolo (-) indica ausência do número de acesso para a amostra.

# **CAPÍTULO 1**

Barcode das espécies de algas marinhas *Laurencia aldingensis, L. dendroidea* e *Laurenciella* sp. (Rhodophyta) usando os marcadores moleculares UPA, COI-5P e *rbc*L

# 4. INTRODUÇÃO

# 4.1. Sistemática molecular e marcadores moleculares – UPA, COI-5P e *rbc*L

A identificação e delimitação de espécies de algas vermelhas (Rhodophyta) são notoriamente difíceis devido a uma morfologia e anatomia relativamente simples e em muitos casos convergentes, grande plasticidade fenotípica, e alternância de gerações heteromórficas no ciclo de vida (Saunders 2005). Por isso, estudos de sistemática molecular têm sido cada vez mais empregados para identificar e delimitar espécies, inferir afinidades e relações filogenéticas entre organismos.

Uma vez que as pesquisas em biodiversidade estão sustentadas na habilidade em dar nomes aos táxons, Hebert *et al.* (2003) propuseram a técnica do "DNA barcoding", isto é, o sequenciamento de um segmento diagnóstico curto, que permitisse a identificação da espécie de uma forma rápida e eficiente.

Diante deste conceito, a sistemática molecular avançou muito, levando ao desenvolvimento de vários marcadores, muitos deles voltados para abordagens filogenéticos em rodófitas (Lim *et al.* 2006). Genes de ribossomos nucleares como SSU e LSU (Saunders e Kraft 1994, Harper e Saunders 2001), mitocondriais como o gene da citocromomo *c* oxidase I (COI) (Saunders 2005) e região espaçadora cox2-3 (Zuccarello *et al.* 1999), plastidial como *rbc*L e espaçadores (Yang *et al.* 2008), tem sido extensivamente usados para filogenia e identificação de espécies (Destombe e Douglas 1991, Freshwater *et al.* 1994, Ragan *et al.* 1994, Lin *et al.* 2001).

Com este propósito, o gene mitocondrial da subunidade I da citocromo *c* oxidase tem sido muito usado para o sistema "barcoding". E, trabalhos têm mostrado resultados satisfatórios para a identificação acurada de rodofíceas através dessa técnica (Saunders 2005). Robba *et al.* (2006) demonstraram que em comparação com o gene plastidial *rbc*L, COI é uma marcador mais sensível para revelar estrutura de populações e a diversidade de espécies de algas vermelhas.

De acordo com Yang *et al.* (2007), o cox 1 pode ser usado para a identificação de espécies, filogeografia, resolução de estrutura de populações e em conservação de espécies.

No entanto, supõe-se que as baixas taxas de substituição de nucleotídeos no genoma mitocondrial de plantas (Wolfe *et al.* 1987) faz do barcoding de genomas plastidiais uma alternativa atraente nestas linhagens (Presting, 2006).

Neste intuito, o Universal Plastid Amplicon (UPA) (região 23 S do rRNA) tem sido proposto como marcador para "DNA barcoding" em eucariotos fotossintetizantes (Sherwood & Presting, 2007; Sherwood *et al.*, 2008). Para algumas linhagens de algas vermelhas tem funcionado tão bem quanto o gene mitocondrial COI-5P para distinguir espécies (Sherwood *et al.*, 2008; Clarkston & Saunders, 2010).

Já para inferir hipóteses filogenéticas em algas vermelhas e entre os táxons de *Laurencia* sensu lato, sequências do gene *rbc*L, que produz a ribulose-bifosfato carboxilase/oxigenase, tem sido bastante utilizados. Esta sequência de 1467 pb está localizada no cloroplasto. É um gene que não apresenta *indels*, o que evita ambiguidades no alinhamento das sequências e facilita, assim, o seu uso em análises filogenéticas (Freshwater & Rueness 1994, Freshwater *et al.* 1994).

Vários trabalhos, usando o *rbc*L, demonstraram que ele apresenta nível de variação suficiente para ser informativo em estudos intergenéricos, inter- e intraespecíficos e para categorias taxonômicas superiores (Lewis *et al.* 2008). Além de responder bem aos estudos da ordem Ceramiales (Sentíes e Díaz-Larrea 2008), gerando hipóteses filogenéticas confiáveis.

A aplicação dessas técnicas garantirá a identidade das espécies em estudo, trarão confiabilidade no que tange à inferência dos seus constituintes químicos e respostas biológicas, e permitirá que sejam reconhecidas através desta etiqueta molecular até que sejam taxonomicamente resolvidas.

#### 4.2. Marcadores moleculares testados

#### 4.2.1. UPA - "Universal Plastid Amplicon"

O UPA é uma porção de 410 pb do domínio V da subunidade maior do ribossomo plastidial, o 23S rRNA. Por ser uma região curta flanqueadas por regiões conservadas que podem ser usadas como primers universais, foi proposto como alternativa para DNA barcode para organismos eucariotos fotossintetizantes (Sherwood e Presting 2007,

Sherwood *et al.* 2008). A universalidade se tornou, assim, a maior vantagem do UPA. Com um único par de primers pode-se recuperar fielmente as sequências de uma ampla gama de táxons incluindo macroalgas verdes, vermelhas e marrons, diatomácias e até mesmo cianobactéria (Sherwood & Presting, 2007).

O UPA, apesar de ser uma ótima opção para as Rhodophyta de forma geral, também apresenta desvantagens. É possível que contaminantes epifíticos e endofíticos sejam preferencialmente amplificados no lugar dos organismos-alvo. E isso pode ocorrer devido a várias razões: a) os primers UPA se parearem melhor com os contaminantes do que com os organismos-alvo; b) a extração do DNA ser mais eficiente nos contaminantes que no organismo-alvo; c) efeitos estocásticos na PCR resultar em amplificação preferencial do contaminante, ou d) combinação dos fatores acima. Marcadores com iniciadores altamente universais tais como o UPA, são particularmente propensos a estes problemas e, um isolamento bastante criterioso e eficaz do DNA-alvo torna-se extremamente importante (Saunders & Kucera, 2010).

UPA ainda não é considerado um marcador para barcoding, mas estudos tem que continuar sendo realizados para que a proposta seja concretizada. O UPA foi usado para avaliar a variação intraespecífica e prover um banco de sequências de DNA das espécies de *Laurencia* em estudo.

#### 4.2.2. COI-5P

O gene mitocondrial COI codifica a subunidade I da enzima citocromo *c* oxidase sendo o COI-5P a porção 5' desse gene. Durante o desenvolvimento do DNA barcoding, muitos marcadores foram propostos para avaliar diferentes filos, incluindo o COI-5P, muito usado principalmente para animais, algas vermelhas e pardas pois provê a resolução dos táxons a nível de espécie para a maioria dos grupos testados. Tanto que é hoje considerado marcador para barcode e está sendo globalmente aplicado em estudos de biodiversidade e taxonomia (como por exemplo, Hebert *et al.* 2004, Saunders 2005, Ferri *et al.* 2009, McDevit e Saunders 2009).

O COI-5P é um segmento de DNA relativamente curto (670 pb), mas que se mostra informativo para identificação de espécies com uma taxa relativamente rápida de divergência. O gene é de herança haplóide, não contém introns que podem complicar a amplificação usando a técnica de PCR e apresenta poucos indels (Herbert *et al.* 2003,

Stoeckle 2003, Saunders 2005). O uso potencial desse gene para barcoding em algas vermelhas foi proposto por Saunders (2005) e por todas as questões supracitadas será usado neste trabalho.

#### 4.2.3. *rbc*L

Ribulose-1-5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) é um importante marcador bioquímico uma vez que esta enzima representa mais de 50% das proteínas totais solúveis das plantas, consequentemente a proteína mais abundante do mundo (Ellis 1979), sendo responsável pela produtividade das plantas por catalisar a primeira reação de assimilação do CO<sub>2</sub> na fotossíntese de oxidação do carbono na fotorrespiração (Raven *et al.* 2001).

A holoenzima cloroplastidial rubisco é composta por oito subunidades menores (SSU, 14-15-kDa) codificada por uma família de genes nucleares (*rbc*S) e oito subunidades maiores (LSUs, 52-kDa) codificadas por um único gene (*rbc*L) localizado no genoma do cloroplasto, o que significa um número de cópias (genes) centenas de vezes expressos por células do mesófilo. O mRNA que é codificado pelo gene rbcL é transcrito dentro da organela por ribossomos plastidiais (Wolter *et al.* 1988). Em contraste, a SSU é codificada no núcleo e o mRNA é transcrito no citoplasma por uma proteína precursora contendo uma extensão amino-terminal que media o transporte do polipeptídio para dentro do cloroplasto (Schmidt & Mishkind 1986). A SSU madura se une com a LSU, no estroma do cloroplasto para formar a holoenzima (Wolter *et al.* 1988).

O *rbc*L é um marcador plastidial da subunidade grande da ribulose-1-5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) e desde 1987 ele tem sido ferramenta alvo para reconstrução filogenética das plantas (Ritland & Clegg). Isso porque, sendo um gene do clorosplasto, o *rbc*L pode ser prontamente clonado e, diferentemente dos genes nucleares, existe uma única cópia por genoma, eliminando as preocupações que envolvem conversão gênica, ou comparações inapropriadas com loci parálogos (Doebley *et al.* 1990). Além disso, a taxa de evolução da sequência do *rbc*L é bem apropriado para estudos envolvendo táxons com divergência entre 10s milhões de anos e 100s milhões de anos (Zurawski *et al.* 1984). Essa informação foi depois corroborada por Doebley *et al.* (1990) que dizem a sequência de *rbc*L ser uma boa ferramenta para estudos filogenéticos entre espécies que divergem num período de 400 milhões de anos.

O gene *rbc*L apresenta 1467 pb e é separado do o *rbc*S, que apresenta 417 pb, por 100 pb (Valentin & Zetsche 1989, Kostrzewa *et al.* 1990). Esquema representativo foi montado (Figura 13) para mostrar os principais primers usados nos estudos moleculares de espécies do complexo *Laurencia* (Freshwater & Rueness, 1994; Cassano 2009, Rocha-Jorge *et al.* 2010, Cassano *et al.* 2012*c*, Machín-Sánchez *et al.* 2012).



#### Subunidades da RuBisCO

Figura 13. Esquema representativo das subunidades *rbc*L e *rbc*S da Rubisco e a indicação dos principais primers usados dos estudos das espécies do complexo *Laurencia*.

A combinação de marcadores para as análises de sistemática molecular e filogenia tem sido muito comumente usada. Isso traz confiabilidade nos resultados e contribui para distinguir os marcadores que representam mais adequadamente os táxons nos mais diferentes níveis.

#### 5. MATERIAIS E MÉTODOS

As espécies listadas na Tabela 1 também foram utilizadas para estudos moleculares. O material coletado foi triado no próprio local de coleta para remoção das algas epífitas. Posteriormente, as partes mais limpas e jovens das algas foram secas em papel toalha e desidratadas com sílica gel, sendo mantidas à temperatura ambiente.

#### 5.1.1. Extração do DNA

A extração de DNA total foi realizado com o Kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®, Hilden, Germany) seguindo-se as instruções do fabricante.

Para isso, primeiramente, foram selecionados, com auxílio de um estereomicrocópio Zeiss, os ápices mais limpos e livres de quaisquer contaminações. Triturou-se os talos desidratados das algas com auxílio de uma extrusora de tecidos de plantas (Precellys 24 lysis & homogenization. Bertin technologies, Bio America Inc.), até obter um pó fino num processo de 3 ciclo de 10 segundos.

O tecido em pó foi transferido para um tubo de tamanho apropriado onde adicionou-se 400  $\mu$ L de tampão AP1 e 4  $\mu$ L de RNase. Depois foi vortexado vigorosamente. A solução foi incubada por 10 minutos à 65°C e misturada 2-3 vezes durante a incubação, por inversão do tubo. Adicionou-se 130  $\mu$ l de Buffer AP2 no tubo, misturou-se e incubou-se por 5 min no gelo. Neste momento detergentes, proteínas e polissacarídeos são precipitados.

O lisado foi centrifugado por 5 min a 14000 rpm para intensificar a precipitação. Pipetouse o sobrenadante que foi transferido para um tubo com sistema de filtração presente no Kit. O precipitado foi descartado e o lisado foi aplicado no QIAshredder e depois centrifugado por 2 min a 14000 rpm. Centrifugou-se o tubo roxo acoplado ao tubo branco (este passo é necessário para remover os restos de células e precipitados, porém uma pequena quantidade de células irá passar e formar um pellet no tubo de coleta e coletouse o filtrado do tubo branco inferior.

A fração do sobrenadante foi transferida para outro tubo sem perturbar o pellet de células restantes (normalmente 450µl do lisado é recuperado) e adicionou-se 1.5X o volume de Buffer AP3/E no lisado clarificado e homogeneizou-se com auxílio de pipeta. (Ex: para 450 µl de lisado, adicionou-se 675 µl de Buffer AP3/E).

Aplicou-se 650 ml da mistura no tubo com filtro branco (Kit) incluindo qualquer precipitado que possa ter formado e depois centrifugou-se 1 min à 6000 g, descartando o sobrenadante. O DNA fica retido no filtro branco e descartou-se o líquido. O procedimento foi repetido para usar toda a fração de sobrenadante coletada contendo o DNA.

Adicionou-se 500µl do Buffer AW na coluna DNeasy (com o filtro branco) e centrifugouse por 1 min a  $\geq$  8000 rpm. O líquido que passou pelo filtro foi descartado e o tubo de coleta foi reutilizado. Adicionou-se 500 µl do Buffer AW na coluna DNeasy e centrifugou-se por 2min na velocidade máxima para secar a membrana (14000 rpm). É importante secar a membrana porque o resíduo de etanol pode interferir na seqüência de reações.

A coluna DNeasy foi transferida para um tubo de centrifuga de 1.5 ou 2 ml e pipetou-se 100  $\mu$ l do Buffer AE pré-aquecido diretamente na membrana do DNeasy. Incubou-se por 5 min a temperatura ambiente e então centrifugou-se por 1 min à  $\geq$  8000 rpm para eluição (para o DNA passar pelo filtro e ir para o fundo do tubo. O processo de eluição foi repetido mais uma vez. Após a extração, as amostras de DNA foram armazenadas em freezer a -20 °C.

#### 5.2. Amplificação e purificação dos marcadores moleculares

Os marcadores foram amplificados por reação em cadeia da polimerase "Polymerase Chain Reaction" (PCR) usando primers específicos conforme Tabela 2.

"Primer"	Marcador	Sequência (5'→3')	Posição	Referência
P23SrV_F1	UPA	GGA CAG AAA GAC CCT ATG AA	1	Sherwood & Presting (2007)
P23SrV_R1	UPA	TCA GCC TGT TAT CCC TAG AG	370	Sherwood & Presting (2007)
GAZF1	COI-5P	TCA ACA AAT CAT AAA GAT ATT GG	1	Saunders (2005)
GAZR1	COI-5P	ACT TCT GGA TGT CCA AAA AAY CA $(y=c/t)$	710	Saunders (2005)
F993	<i>rbc</i> L	-GGT ACT GTT GTA GGT AAA TTW GAA GG (w=a/t)	993	Freshwater & Rueness (1994)
RrbcS start	<i>rbc</i> L	TGT GTT GCG GCC GCC CTT GTG TTA GTC TCA C	Início do <i>rbc</i> S	Freshwater & Rueness (1994)
RrbcS start a	<i>rbc</i> L	-GTT CTT GTG TTA ATC TCA C	Início do <i>rbc</i> S	Freshwater & Rueness (1994) modificado

Tabela 2. Relação de "primers" direto (f) e reverso (r) de UPA, COI-5P e *rbc*L utilizados na PCR e sequenciamento.

Os "primers" P23SrV\_F1 e P23SrV\_R1 (Sherwood & Presting 2007) foram utilizados para a amplificação do marcador UPA; GAZF1 e GAZR1 (Saunders, 2005) foram utilizados para a amplificação do gene *COI-5P* e a última parte do marcador *rbcL* que, (Saunders e Moore 2013) foi amplificado com os primers F993 e RrbcS Start/RrbcS Start *a*, (Freshwater e Rueness 1994). Este último primer designado com a letra "*a*" foi modificado devido a variação de nucleotídeos na região dos primers encontrada nos espécimes estudados. A modificação do primer seguiu Cassano (2009).

Os marcadores foram amplificados utilizando-se o kit de reação PuReTaq<sup>™</sup> Ready-To-Go<sup>™</sup> PCR beads da Ge Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) em um volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram: 0,2 M (1uL) de cada "primer", 2 µL de DNA genômico e o volume completado com água ultra-pura. Fez-se uma agitação delicada dos vials com os dedos para solubilizar o bead que contém todo o material de amplificação.

As reações de PCR foram realizadas no termociclador Techne TC-512 (Staffordshire, UK). Os ciclos de PCR para cada marcador estão indicados na Tabela 3.

Marcadores	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Ciclos
UPA	94°C por 2'	94°C por 20''	55°C por 30''	72°C por 30''	72°C por 10'	35
COI-5P	94°C por 5'	94°C por 30"	45°C por 1'	72°C por 2"	72°C por 7'	34
rbcL	94°C por 4'	94°C por 1'	42°C por 1'	72°C por 1'30''	72°C por 10'	35

Tabela 3. Ciclos de PCR utilizados para a amplificação dos marcadores moleculares.

Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando a coluna MicroSpin<sup>™</sup> S-300 HR (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) de acordo com as instruções dos respectivos protocolos dos fabricantes. Através da eletroforese em gel de agarose 0,7%, O DNA purificado foi quantificado por comparação visual com a banda de 1,6 Kb do marcador "1Kb DNA ladder" (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante.

#### 5.3. Sequenciamento dos marcadores moleculares

As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit "BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, CA/EUA), conforme o protocolo do fornecedor, usando os "primers" especificados na Tabela 2.

Para cada reação de sequenciamento foram utilizados de 16-32 ng de DNA purificado. A reação de sequenciamento foi feita no termociclador Techne TC-512 (Staffordshire, UK) com 25 ciclos a 96 °C por 10 seg, 50 °C por 15 seg e 60 °C por 2 min. Após as reações, os fragmentos purificados foram precipitados em etanol 100%, acetato de sódio 3 M e EDTA 125 mM, centrifugados e lavados em etanol 70% para remoção de quaisquer

resíduos que possam afetar a qualidade das sequências obtidas. As amostras, então, foram diretamente sequenciadas no sequenciador automático ABI PRISM® 3130XL Genetic Analyzer/HITACHI (Applied Biosystems, CA/USA)

#### 5.4. Análise e alinhamento das sequências

As sequências geradas foram comparadas usando o algorítimo BlastN (Altschul *et al.* 1997) do banco de dados internacional GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). As sequências direta e reversa obtidas foram alinhadas manualmente usando o programa BioEdit versão 7.0.9.0 (Hall, 1999) para construção de uma sequência consenso para cada amostra. Todos os alinhamentos foram revistos manualmente utilizando o cromatograma das sequências. As sequências-consenso obtidas foram alinhadas no Clustal W (dentro do programa MEGA versão 6.0.6) ou programa Clustal X 2.1 (Larkin *et al.* 2007) para a construção de matrizes para as análises filogenéticas. Todos os alinhamentos foram inspecionados manualmente. As árvores filogenéticas foram construídas a partir dos alinhamentos das sequências obtidas neste estudo, sequências disponíveis no GenBank (Tabela 4) e de sequência gentilmente cedida pela Prof. Dra. Valéria Cassano (IB-USP).

En la la	Nº de acesso		I P.J. J. J	Nº pb usados nas	D-6
Especie	no GenBank	Sigia usada	Locandade da amostra	análises*	Keferencia
UPA					
Chondria dangeardii	HQ421169	Cd421169	Oahu, HI/US	370	Sherwood et al. (2010)
Palisada yamadana	HQ421478	Py421478	Oahu, HI/US	370	Sherwood et al. (2010)
Palisada parvipapillata	HQ421473	Pp421473	Oahu, HI/US	370	Sherwood et al. (2010)
Laurencia majuscula	HQ420941	Lmaj420941	Oahu, HI/US	370	Sherwood et al. (2010)
Laurencia majuscula	HQ421514	Lmaj421514	Oahu, HI/US	370	Sherwood et al. (2010)
Laurencia majuscula	HQ421529	Lmaj421529	Oahu, HI/US	370	Sherwood et al. (2010)
Laurencia mcdermidiae	HQ421155	Lmc421155	Oahu, HI/US	370	Sherwood et al. (2010)
Laurencia nidifica	HQ420935	Ln420935	Oahu, HI/US	370	Sherwood et al. (2010)
Laurencia obtusa	KC795895	Lo795895	Qingdao, Shandong /CN	370	Wu (2015)
<i>Laurencia</i> sp	HQ421537	Lsp421537	Oahu, HI/US	370	Sherwood et al. (2010)
Laurencia sp.	HQ421168	Lsp421168	Oahu, HI/US	370	Sherwood et al. (2010)
Laurencia sp.	HQ420951	Lsp420951	Oahu, HI/US	370	Sherwood et al. (2010)
Laurencia sp.	HQ421088	Lsp421088	Oahu, HI/US	370	Sherwood et al. (2010)
Laurencia sp.	HQ421516	Lsp421516	Oahu, HI/US	370	Sherwood et al. (2010)
Chondrophycus sp.	HQ421454	Csp421454	Oahu, HI/US	370	Sherwood et al. (2010)
Chondrophycus undulatus	HQ421531	Cu421531	Oahu, HI/US	370	Sherwood et al. (2010)

Tabela 4. Sequências obtidas no Genbank para as análises filogenéticas neste estudo.

# COI-5P

Chondria dangeardii	GU223879	Cd223879	Molokai, HI/US	664	Kurihara <i>et al.</i> (2010)
Chondrophycus cf. undulatus	GU223886	Cu223886	Maui, HI/US	664	Kurihara et al. (2010)
Chondrophycus undulatus	HQ423055	Cu423055	Oahu, HI/US	616	Sherwood et al. (2010)
Laurencia catarinensis	KF492719	Lc492719	Lanzarote, Ilhas Canárias /ES,	573	Machin-Sanchez et al. (2014)
Laurencia catarinensis	KF492722	Lc492722	Lanzarote, Ilhas Canárias /ES	573	Machin-Sanchez et al. (2014)
Laurencia catarinenses	KF492720	Lc492720	Lanzarote, Ilhas Canárias /ES	573	Machin-Sanchez et al. (2014)
Laurencia dendroidea	KF492724	Lc492724	Lanzarote, Ilhas Canárias /ES	573	Machin-Sanchez et al. (2014)
Laurencia dendroidea	KF492728	Ld492728	Lanzarote, Ilhas Canárias /ES	573	Machin-Sanchez et al. (2014)
Laurencia dendroidea	KF492725	Ld492725	La Gomera, Ilhas Canárias /ES	573	Machin-Sanchez et al. (2014)
Laurencia majuscula	HQ423051	Lmaj423051	Oahu, HI/US	616	Sherwood et al. (2010)
Laurenciella marilzae	KF492762	Lm492762	Lanzarote, Ilhas Canárias /ES	573	Machin-Sanchez et al. (2014)
Laurencia marilzae	KF270693	Lm270693	Santos, SP/BR	664	Machin-Sanchez et al. (2014)
Palisada flagellifera	KF492772	Pf492772	Tenerife, Ilhas Canárias /ES	573	Machin-Sanchez et al. (2014)
Palisada perforata	KF492773	Pp492773	Tenerife, Ilhas Canárias /ES	573	Machin-Sanchez et al. (2014)
rbcL					

Laurencia dendroidea	AF465810	Ld465810	Ubatuba, SP/BR	448	Fujii et al. (2006)
Laurencia scoparia	AY593971	Ls593071	Marataizes, ES/BR	448	Fujii et al. (2006)
Laurencia dendroidea	GU330237	Ld330237	Rio das Ostras, RJ/BR	448	Cassano et al. (2012a)
Laurencia dendroidea	GU330222	Ld330222	Arraial do Cabo, RJ/BR	448	Não publicado
Laurencia dendroidea	GU330228	Ld330228	Lauro de Freitas, BA/BR	448	Cassano et al. (2012a)

Laurencia dendroidea	EF686000	Ld686000	Tenerife, Ilhas Canárias /ES	448	Cassano et al. (2012a)
Laurencia intricata	GU330238	Li330238	Ciego de Avila, Cayo Coco/CU	448	Cassano et al. (2012a)
Laurencia intricata	AF465809	Li465809	Campeche Bay, YUC/MX	448	Fujii et al. (2006)
Laurencia intricata	AY588410	Li588410	Long Key, FL/US	448	Não publicado
Laurencia catarinensis	KF492781	Lc492781	Tenerife, Ilhas Canárias /ES	382	Machin-Sanchez et al. (2014)
Laurencia catarinensis	KF492779	Lc492779	Lanzarote, Ilhas Canárias /ES	382	Machin-Sanchez et al. (2014)
Laurencia catarinensis	KF492776	Lc492776	Tenerife, Ilhas Canárias /ES	382	Machin-Sanchez et al. (2014)
Laurencia aldingensis	JF810351	La810351	Rio de Janeiro, RJ/BR	448	Cassano et al. (2012b)
Palisada flagellifera	EF061647	Pf061647	Marataízes, ES/BR	542	Não publicado
Palisada flagellifera	GU330227	Pf330227	Rio das Ostras, RJ/BR	448	Cassano et al. (2012a)
Palisada perforata	EU256331	Pf256331	Parati, RJ/BR	448	Não publicado
Laurencia marilzae	EF686003	Lm686003	Tenerife, Ilhas Canárias/ES	448	Gil-Rodriguez et al. 2009
Laurencia marilzae	HQ115065	Lm115065	Isla Mujeres, ROO/MX	448	Não publicado
Laurencia marilzae	KF492798	Lm492798	Pico, Azores, PT	382	Machin-Sanchez et al. (2014)
Laurencia marilzae	GU938189	Lm938189	Santos, SP/BR	448	Rocha-Jorge et al. 2010
Chondria collinsiana	GU330225	Cc330225	Armação dos Búzios, RJ/BR	448	Cassano et al. (2012a)
Chondria littoralis	KF672853	C1672853	Beaufort, SC/US	448	Não publicado

\*Número de pares de bases usados nas análises de acordo com a gene sequenciado das amostras do presente estudo.

\*\* No Genbank, como Chondrophycus flagellifera

#### 5.5. Análises moleculares

Para todos os marcadores estudados foi realizada análises de distância (neighbor-joining, NJ), máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML).

Com o intuito de visualizar o agrupamento das espécies foi utilizado o algoritmo Neighbor-Joining (NJ) com o auxílio do programa PAUP versão 4.0a146 (Swofford, 2002) usando o teste maximum-likelihood com 2.000 réplicas de bootstrap (Felsenstein, 1985).

A análise de MP foi realizada através de busca heurística com caracteres não ordenados e com pesos iguais, via "stepwise addition" com o algoritmo "tree-bisection-reconection" (TBR) retendo uma árvore a cada passo, com opção MULTREES como efeito e adição simples de sequências, no programa PAUP versão 4.0a146 (Swofford, 2002). Os "gaps" foram tratados como dados perdidos. Os valores de bootstrap foram calculados a partir de 2.000 réplicas para estimar a robustez da topologia da árvore.

Os modelos evolutivos ótimos para as análises de ML e inferência bayesiana (BI) foram obtidos através do programa MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004) usando o Akaike Information Criterion (AIC). O modelo de substituição nucleotídica selecionado foi o "General Time Reversible" (GTR) (Lanave *et al.*, 1984) com sítios invariáveis e distribuição gama (GTR + I + G). Os "gaps" foram tratados como dados perdidos e os valores de bootstrap foram calculados com 100 réplicas para BI e 2.000 para ML.

As análises de ML foram realizadas através de busca heurística no programa MEGA 6.0.6 (Tamura *et al.*, 2013) e as análises filogenéticas de BI do gene *rbc*L foi feita usando o programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) com duas corridas com quatro cadeias de MCMC de 10x106 gerações e amostragem de 1 árvore a cada 100 gerações, começando com uma árvore aleatória. O período de "burn-in" foi identificado graficamente no programa Excel 2010 através da plotagem de um gráfico de dispersão do logaritmo das verossimilhanças contra o tempo de gerações e as árvores associadas ao "burn-in" foram descartadas. As árvores remanescentes foram usadas para inferir a probabilidade posterior (PP) Bayesiana e para a construção de uma árvore consenso.

## 5.6. Árvore de agrupamento

Neste trabalho foram obtidas sequências de 18 amostras com 3 diferentes marcadores (UPA, COI-5P e *rbc*L). Os genes UPA e COI-5P foram completamente sequenciados, e as análises das sequências deu-se com os primers trimados, sendo UPA com 370 pb, COI-5P com 664 pb. Com relação ao *rbc*L foi estudado a parte final do gene até o início do *rbc*S com 558 pb com os primers também trimados. A região espaçadora *rbc*L-S não foram aqui considerados.

#### 5.6.1. Análises do UPA

Para a análise filogenética baseada no UPA, foram geradas 35 sequências (370 pb). Destas sequências, 18 são do presente estudo, 16 do Genbank (sendo a *Chondria dangeardii* o grupo externo) e 1 sequência gentilmente cedida pela Profa. Dra. Valéria Cassano (IB/USP) que foi utilizada como sequência modelo (*Laurenciella intricata*). Para a matriz do UPA foram geradas árvores de distância (NJ), máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML) na qual 35 sítios foram filogeneticamente informativos para parsimônia.

A Figura 14 mostra a árvore consenso da análise de distância com valores de bootstrap para NJ, MP e ML representado nos ramos.

#### UPA



Figura 14. Árvore consenso enraizada de Neighbor-joining (NJ) inferida para sequências do UPA de espécimes do complexo *Laurencia*. *Chondria dangeardii* foi utilizada como grupo externo. Os valores de bootstrap (2.000 réplicas) referentes às análises de Neighbor-joining (NJ) e de Máxima Parcimônia (MP) e de Máxima Verossimilhança (ML) (100 réplicas) estão expressos nos ramos, nesta ordem. Sequências do Genbank estão indentificadas com os números de acesso entre parênteses. As análises foram realizadas no programa PAUP versão 4.0a146.

Essa análise mostrou que o complexo *Laurencia* é monofilético em relação ao táxon usado como grupo externo. Todos os gêneros tiveram uma separação muito bem definida – *Laurencia* stricto sensu no topo, seguido por *Palisada, Chondrophycus* e, o mais novo gênero incluído no complexo – *Laurenciella*, se mostrou o mais basal da topologia.

As nove amostras de *Laurencia aldingensis* do presente estudo foram agrupadas num mesmo ramo apresentando suporte alto de bootstrap para a análise de ML, moderado para NJ e MP. A amostra LA01 divergiu das outras em até 4 nucleotídeos (Tabela 1). Isso pode ser a resposta de um sequenciamento menos robusto por esta ser uma amostra mais antiga, o que pode ter comprometido a qualidade da análise nessa região do gene. No entanto, o agrupamento se mostrou muito claro, com separações muito bem definidas das outras espécies. Não existe no banco de dados, sequências de UPA de *Laurencia aldingensis* e nada verdadeiramente similar foi encontrado.

Tabela 5. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (porção superior) entre as sequências do UPA de espécimes de *Laurencia aldingensis* obtidos no programa BioEdit versão 3.3.19.0.

	Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	LA01	ID	3	4	3	3	3	3	3	3
2	LA02	0,9	ID	1	0	0	0	0	0	0
3	LA03	1,1	0,3	ID	1	1	1	1	1	1
4	LA04	0,9	0	0,3	ID	0	0	0	0	0
5	LA05	0,9	0	0,3	0	ID	0	0	0	0
6	LA06	0,9	0	0,3	0	0	ID	0	0	0
7	LA07	0,9	0	0,3	0	0	0	ID	0	0
8	LA08	0,9	0	0,3	0	0	0	0	ID	0
9	LA09	0,9	0	0,3	0	0	0	0	0	ID

Mais onze táxons relacionados às minhas amostras de *Laurencia dendroidea* foram inseridos para gerar a árvore de UPA. Estes táxons foram selecionados baseando-se no índice de similaridade obtido através do algotitmo BlastN dentro do site do NCBI.

Um grande ramo com várias sub-ramificações foi gerados nessa árvore, não deixando muito evidente as separações entre os táxons. Mas, mesmo nessas condições, consegue-se verificar o

agrupamento da *Laurencia mcdermidiae* com as amostras de *Laurencia* sp. do Hawaii e o agrupamento da *Laurencia nidica* com outra *Laurencia* sp. do Hawaii (HQ421168) mesmo que com suporte baixo a moderado de bootstrap.

Esses agrupamentos permitiram visualizar um ramo ascendente, no qual estão agrupados as amostras de *Laurencia dendroidea* em estudo e as amostras de *Laurencia majuscula* do Hawaii, que já foi comprovado pertencerem ao mesmo táxon juntamente com *Laurencia obtusa* e *Laurencia filiformis* (Cassano *et al.* 2012). Assim, a amostra de *Laurencia obtusa* do Hawaii (KC795895) separada deste ramo faz acreditar que a taxonomia desta ou das outras amostras da parte inferior do clado precisa ser revista pelos autores ou o UPA usado não conseguiu resolver muito claramente espécies filogeneticamente próximas.

As amostras LD em estudo variam entre si com no máximo 3 nucleotídeos (0,9% de divergência) e estas mesmas divergem dos espécimes de *Laurencia majuscula* com até 4 nucleotídeos (1,1%) como mostra na (Tabela 6).

O ramo de *Laurencia dendroidea* na árvore de UPA se mostrou confuso. E, se fôssemos fazer uma correlação entre todos os táxons ali presentes, a divergência seria de até 2,5%. O que é muito alto para uma variação intraespecífica de um gene conservado. Por isso acredita-se haver mais de uma espécie presente nesse grupo. No entanto, *L. majuscula*, juntamente com as amostras de *L. dendroidea* do presente estudo LD01-05 e *Laurencia* sp. (HQ421537), podem pertencer ao mesmo táxon.

	Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	L. majuscula HI (HQ420941)	ID	0	2	7	5	6	6	6	4	6	4	3	1	1	1	2
2	L. majuscula HI (HQ421514)	0	ID	2	7	5	6	6	6	4	6	4	3	1	1	1	2
3	L. majuscula HI (HQ421529)	0,6	0,6	ID	9	7	8	8	8	6	8	6	4	3	3	3	4
4	L. mcdermidiae HI (HQ421155)	1,9	1,9	2,5	ID	6	3	3	3	5	3	9	8	6	6	6	7
5	L. nidifica HI (HQ420935)	1,4	1,4	1,9	1,7	ID	3	5	5	1	5	7	6	4	4	4	5
6	L. obtusa HI (KC795895)	1,7	1,7	2,2	0,9	0,9	ID	2	2	2	2	8	7	5	5	5	6
7	Laurencia sp HI (HQ421088)	1,7	1,7	2,2	0,9	1,4	0,6	ID	2	4	0	8	7	5	5	5	6
8	Laurencia sp HI (HQ420951)	1,7	1,7	2,2	0,9	1,4	0,6	0,6	ID	4	2	8	7	5	5	5	6
9	Laurencia sp HI (HQ421168)	1,1	1,1	1,7	1,4	0,3	0,6	1,1	1,1	ID	4	6	5	3	3	3	4
10	Laurencia sp HI (HQ421516)	1,7	1,7	2,2	0,9	1,4	0,6	0	0,6	1,1	ID	8	7	5	5	5	6
11	Laurencia sp HI (HQ421537)	1,1	1,1	1,7	2,5	1,9	2,2	2,2	2,2	1,7	2,2	ID	6	4	4	4	5
12	LD01	0,9	0,9	1,1	2,2	1,7	1,9	1,9	1,9	1,4	1,9	1,7	ID	2	2	2	3
13	LD02	0,3	0,3	0,9	1,7	1,1	1,4	1,4	1,4	0,9	1,4	1,1	0,6	ID	0	0	1
14	LD03	0,3	0,3	0,9	1,7	1,1	1,4	1,4	1,4	0,9	1,4	1,1	0,6	0	ID	0	1
15	LD04	0,3	0,3	0,9	1,7	1,1	1,4	1,4	1,4	0,9	1,4	1,1	0,6	0	0	ID	1
16	LD05	0,6	0,6	1,1	1,9	1,4	1,7	1,7	1,7	1,1	1,7	1,4	0,9	0,3	0,3	0,3	ID

Tabela 6. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (porção superior) entre as sequências do UPA de espécimes de *Laurencia dendroidea* e táxons relacionados obtidos no programa BioEdit versão 3.3.19.0. Sequências do Genbank apresentam informações do local de coleta e estão identificadas com os números de acesso entre parênteses.

As amostras de *Laurenciella* desse trabalho foram agrupadas num mesmo ramo apresentando suporte alto de bootstrap para MP e ML (92%) e baixo para NJ (55%). Isso se deve ao fato da amostra LI04 ter tido 1 nucleotídeo divergente e 4 nucleotídeos ambíguos no cromatograma (entre 90 e 250 pb), que também foram computados pelo programa no percentual de divergência (1,4%). No entanto, todas as outras amostras, incluindo a sequência cedida pela Prof. Dra. Valéria Cassano, apresentaram 100% de identidade e nenhum nucleotídeo divergente (Tabela 7).

Tabela 7. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (porção superior) entre as sequências do UPA de espécimes de *Laurenciella* sp. obtidos no programa BioEdit versão 3.3.19.0.

	Sequências	1	2	3	4	5
1	Laurenciella intricataRJ_Vcassano	ID	0	0	0	5
2	LI01	0	ID	0	0	5
3	LI02	0	0	ID	0	5
4	LI03	0	0	0	ID	5
5	LI04	1,4	1,4	1,4	1,4	ID

Apesar da amostra LI04 não ter tido um sequenciamento tão bom quanto as outras amostras, isso não foi um impeditivo para demonstrar que todas são pertencentes à mesma espécie. O que também foi sustentado pelas análises dos outros marcadores.

O UPA, apresenta vantagens por ser um marcador pequeno, que pode ser sequenciado com apenas um par de primers. No presente estudo, apesar de ter conseguido separar muito bem os gêneros, não conseguiu fazer delimitações muito claras entre as espécies do gênero *Laurencia*. Essa baixa resolução para delimitar espécies próximas já foi reportada por outros autores (Clarkston e Saunders 2010, Sherwood *et al.* 2010, Costa *et al.* 2012, Milstein *et al.* 2012, Soares, 2015) e agora também no presente estudo.

#### 5.6.2. Análise do COI-5P

Para a matriz do COI-5P com 32 sequências foram geradas árvores de distância (NJ), máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML). Todas as 18 amostras foram sequenciadas e 14 sequências foram adicionadas do Genbank (sendo a *Chondria dangeardii* o grupo externo). Nessa análise 152 sítios foram parsimoniosamente informativos.

A Figura 15 mostra a árvore consenso da análise de distância com valores de bootstrap para NJ, MP e ML representado nos ramos.

#### COI-5P



0.005 substituições/sítio

Figura 15. Árvore consenso enraizada de Neighbor-joining (NJ) inferida para sequências do COI-5P de espécimes do complexo *Laurencia*. *Chondria dangeardii* foi utilizada como grupo externo. Os valores de bootstrap (2.000 réplicas) referentes às análises de Neighbor-joining (NJ) e de Máxima Parcimônia (MP) e de Máxima Verossimilhança (ML) (100 réplicas) estão expressos nos ramos, nesta ordem. \* indica valores de bootstrap = 100%. Sequências do Genbank estão identificadas com os números de acesso entre parênteses. As análises foram realizadas no programa PAUP versão 4.0a146.

Essa análise de COI-5P também mostrou que o complexo *Laurencia* é monofilético em relação ao táxon usado como grupo externo. Todos os gêneros tiveram uma separação muito bem definida, porém com uma organização na topologia da árvore um pouco diferente da árvore de UPA. *Chondrophycus* ficou no topo da árvore como grupo irmão do gênero *Laurencia*, e *Palisada* ficou na base como grupo irmão de *Laurenciella*.

As nove amostras de *Laurencia aldingensis* do presente estudo foram agrupadas num mesmo ramo apresentando suporte alto de bootstrap para todas as análises testadas.

A amostra LA04 divergiu das outras em até 0,6% (4 nt) (Tabela 8). Isso pode ser a resposta de um sequenciamento menos robusto, o que pode ter comprometido a qualidade da análise nessa região do gene. No entanto, o agrupamento se mostrou muito claro, com separações muito bem definidas das outras espécies. Não existe no banco de dados, sequências de COI-5P de *Laurencia aldingensis* e *Laurencia catarinensis* foi a espécie com índice de similaridade mais próximo encontrado usando o BlastN.

Mesmo sendo a amostra mais próxima, *Laurencia catarinensis* ficou claramente separada de *Laurencia aldingensis* num ramo único com suporte alto de bootstrap para NJ e MP (91) e moderado para ML (79). A taxa de divergência entre elas variou de 1,0 a 1,2% (7/8 nt) (Tabela 8). Este valor está dentro da faixa de variação intraespecífica encontrada que foi de 0,0 a 6,2% (Tabela 14). Isso mostra a afinidade filogenética entre as duas espécies, mas a clara separação dos ramos pode ser indicativo de que *Laurencia aldingensis* seja um caso de especiação recente. Isso poderia ser mais claramente observado se tivéssemos sequências de UPA ou da região espaçadora *rbcL-S* de *L. catarinensis* no banco de dados pois, é esperado que sequências de regiões não-codificantes do DNA, tenham uma taxa de mutação mais rápida do que regiões codificantes (Cassano, 2009). Uma taxa com valor aproximado de divergência (1,6 a 1,9%, 10 a 12 nt) entre as espécies de *L. aldingensis* e *L. catarinensis* foi encontrado por Cassano (2009). O material de *L. catarinensis* utilizado no referido trabalho, foi de espécimes do Brasil. Já no presente estudo, as sequências utilizadas são das Ilhas Canárias. Não havia sequências de espécimes brasileiras no banco de dados.

	Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	LA01	ID	0	0	3	1	0	1	0	1	7	7	7
2	LA02	0,0	ID	0	3	1	0	1	0	1	7	7	7
3	LA03	0,0	0,0	ID	3	1	0	1	0	1	7	7	7
4	LA04	0,5	0,5	0,5	ID	4	3	4	3	4	8	8	8
5	LA05	0,2	0,2	0,2	0,6	ID	1	0	1	0	8	8	8
6	LA06	0,0	0,0	0,0	0,5	0,2	ID	1	0	1	7	7	7
7	LA07	0,2	0,2	0,2	0,6	0,0	0,2	ID	1	0	8	8	8
8	LA08	0,0	0,0	0,0	0,5	0,2	0,0	0,2	ID	1	7	7	7
9	LA09	0,2	0,2	0,2	0,6	0,0	0,2	0,0	0,2	ID	8	8	8
10	LC Can (KF492719)	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,0	1,2	1,0	1,2	ID	0	0
11	LC Can (KF492720)	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,0	1,2	1,0	1,2	0,0	ID	0
12	LC Can (KF492722)	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,0	1,2	1,0	1,2	0,0	0,0	ID

Tabela 8. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (porção superior) entre as sequências do COI-5P de espécimes de *Laurencia aldingensis* e *Laurencia catarinensis* obtidos no programa PAUP versão 4.0a146. Sequências do Genbank apresentam informações do local de coleta e estão identificadas com os números de acesso entre parênteses.

LA01-09: amostras do presente estudo; LC: Laurencia catarinenses

Das nove amostras de *Laurencia dendroidea* analisadas, cinco foram sequenciadas no presente estudo e, quatro outras, de espécimes das Ilhas Canárias e Hawaii obtidas na base de dados do Genbank. Todas elas formaram um único clado com suporte de 100% de bootstrap. As amostras do presente estudo foram agrupadas num ramo, as sequências das Ilhas Canárias em outro e a do Hawaii separada delas. Todos os ramos com suporte alto de bootstrap (92-100%).

A taxa de divergência intraespecífica dentre estes nove táxons variou de 0,0 a 6,2% (0-41 nt) conforme pode ser observado na (Tabela 9). O que foi bem próximo do encontrado por Cassano (2009), no qual o maior percentual de divergência foi entre espécime brasileira e espécime irlandesa (6,1%)

Entretanto, apesar da alta taxa de divergência, o posicionamento filogenético dos nove táxons indica que todos estão intimamente relacionados. E, o mais importante, que todos os espécimes do presente estudo, são pertencentes à mesma entidade taxonômica, com até 0,8% de divergência (5 nt).

	Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	L. dendroidea Can (KF492724)	ID	1	0	31	16	15	15	13	15
2	L. dendroidea Can (KF492725)	0,2	ID	1	30	17	16	16	12	16
3	L. dendroidea Can (KF492728)	0,0	0,2	ID	31	16	15	15	13	15
4	L. majuscula HI (HQ423051)	4,7	4,5	4,7	ID	41	40	40	36	40
5	LD01	2,4	2,6	2,4	6,2	ID	1	1	5	1
6	LD02	2,3	2,4	2,3	6,0	0,2	ID	0	4	0
7	LD03	2,3	2,4	2,3	6,0	0,2	0,0	ID	4	0
8	LD04	1,9	1,7	1,9	5,4	0,8	0,6	0,6	ID	4
9	LD05	2,3	2,4	2,3	6,0	0,2	0,0	0,0	0,6	ID

Tabela 9. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (porção superior) entre as sequências do COI-5P de espécimes de *Laurencia dendroidea* obtidos no programa PAUP versão 4.0a146. Sequências do Genbank apresentam informações do local de coleta e estão identificadas com os números de acesso entre parênteses.

Ainda mais fiel que a árvore consenso de UPA, a árvore filogenética de COI-5P agrupou todas as amostras de *Laurenciella* sp. num único ramo, com 100% de bootstrap. E, comprovando a identidade do gênero, esses táxons mostraram afinidade filogenética com *Laurenciella marilzae*, descrita para o Brasil inicialmente como *Laurencia marilzae* (Rocha-Jorge *et al.*, 2010), e depois redefinida taxonomicamente e servindo de espécie-tipo para o novo gênero criado - *Laurenciella* (Cassano *et al.*, 2012).

As quatro amostras do presente estudo apresentaram 100% de identidade, e a variação interespecífica com as amostras de *L. marilzae* foi de 0,7% (4 nt) para o espécime brasileiro e de 5,6% (37 nt) para o espécime das Ilhas Canárias (Tabela 10).

Tabela 10. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (porção superior) entre as sequências do COI-5P de espécimes de *Laurenciella* obtidos no programa PAUP versão 4.0a146. Sequências do Genbank apresentam informações do local de coleta e estão identificadas com os números de acesso entre parênteses.

	Sequências	1	2	3	4	5	6
1	Laurenciella marilzae_Can (KF492762)	ID	12	37	37	37	37
2	Laurenciella marilzae_SP (KF270693)	1,7	ID	4	4	4	4
3	LI01	5,6	0,7	ID	0	0	0
4	LI02	5,6	0,7	0,0	ID	0	0
5	LI03	5,6	0,7	0,0	0,0	ID	0
6	LI04	5,6	0,7	0,0	0,0	0,0	ID

Todas as amostras do presente estudo tiveram o gene completo sequenciado (664 pb). No entanto, nem todas as amostras obtidas no Genbank apresentam o gene completo, muitas sequências eram 573 pb. Mas isso não foi impeditivo para que as análises ficassem claras. O COI-5P foi capaz de resolver taxonomicamente as amostras tanto a nível de espécie quanto de gêneros.

#### 5.6.3. Análise de *rbc*L

Para a matriz da porção final do *rbc*L (993-*rbc*S), as 18 amostras foram inteiramente sequenciadas, com 615 pb (usando o primer R*rbc*S original) ou 603 pb (com o primer R*rbc*S modificado). À estas amostras foram adicionadas 22 sequências do Genbank sendo *Chondria collinsiana* (GU330225) e *Chondria littoralis* (KF672853) os grupos externos. Árvores bayesiana, de distância (NJ), máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML) foram geradas a partir delas. Nessa análise 115 sítios foram filogeneticamente informativos para parsimônia.

A mostra a árvore consenso gerada de Neighbor-joining com valores de probabilidade posterior (PP) da inferência bayesiana (IB) e de bootstrap para NJ, MP e ML representado nos ramos.



└──── 0.01 substituições/sítio

Figura 16. Árvore consenso enraizada de Neighbor-joining inferida para sequências do *rbc*L de espécimes do complexo *Laurencia*. *Chondria collinsiana* e *Chondria littoralis* foram utilizadas como grupo externo. A espessura dos ramos representa os valores de probabilidade posterior (PP) da Análise Bayesiana onde, os ramos mais espessos representam valores entre 0,95 e 1,00; ramos de espessura intermediária representam valores entre 0,90 e 0,94 e, ramos de espessura normal representam valores abaixo de 0,94. Os valores de bootstrap (2000 réplicas) referentes às análises de Neighbor-joining (NJ) e Máxima Parcimônia (MP) e de Máxima Verossimilhança (ML) (100 réplicas) estão expressos nos ramos, nesta ordem. Sequências do Genbank estão identificadas com os números de acesso entre parênteses. As análises foram realizadas nos programas MrBayes versão 3.2.5 (IB), PAUP versão 4.0a146 (MP) e MEGA7 (NJ e ML).

A estatística bayesiana aplicada a análises filogenéticas se torna muito interessante, pois gera tanto uma árvore estimada quanto o grau de incerteza de cada grupo naquela árvore (Andrade *et al.*, 2007). E nesse estudo, como as duas principais finalidades foram, não fazer inferências filogenéticas mas, gerar um barcode para os táxons estudados e promover o correto agrupamento deles, a árvore escolhida foi a de NJ, até mesmo como forma de comparação com as árvores geradas com os outros genes estudados. Mas não deixando de obter os resultados de grau de incerteza de cada grupo naquela árvore, que são os dados de probabilidade posterior (PP).

A estatística bayesiana aplicada é um método estatístico altamente relacionado com a ML, em que a hipótese ótima é aquela com a máxima PP - que é dada pela verossimilhança multiplicada pela probabilidade a priori desta hipótese (Holder & Lewis, 2003). No presente estudo, apesar da árvore filogenética apresentar uma topologia um pouco diferente daquelas obtidas com os outros genes, também mostrou que o complexo *Laurencia* é monofilético com PP de 100% em relação aos táxons usados como grupos externos. Para todos os valores absolutos de PP obtidos na análise de IB, verificar anexo 2.

O gênero *Laurenciella* foi o mais basal com suporte alto de bootstrap para todas as análises (99 para NJ e ML e 100 para MP). As amostras LI do presente estudo ficaram agrupadas num único ramo (também com suporte alto de bootstrap) e separadas de *Laurecia marilzae* com uma divergência de 1,1 a 1,3% (Tabela 11). Pode-se notar também que o gênero *Palisada* se posicionou como grupo irmão de *Laurenciella*, assim como aconteceu nas análises de COI-5P.

Ao que se pensava anteriormente, que esta espécie LI era a *Laurencia intricata* devido às similaridades morfológicas, estes resultados vieram mais uma vez corroborar que definitivamente não o são. *Laurencia intricata* de Cuba, Mexico e USA divergiram com 9,5% (53 nt) das amostras LI, além de terem se agrupado ao gênero *Laurencia*, como grupo irmão de *Laurencia dendroidea* com suporte moderado de bootstrap e PP.

Tabela 11. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (porção superior) entre as sequências do *rbc*L de espécimes de *Laurenciella* sp., *Laurenciella marilzae* e *Laurencia intricata* obtidos no programa PAUP versão 4.0a146. Sequências do Genbank apresentam informações do local de coleta e estão identificadas com os números de acesso entre parênteses.

	Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	LI CU (GU330238)	ID	0	0	53	53	53	53	56	55	62	55
2	LI MX (AF465809)	0,0	ID	0	53	53	53	53	56	55	62	55
3	LI US (AY588410)	0,0	0,0	ID	53	53	53	53	56	55	62	55
4	LI01	9,5	9,5	9,5	ID	0	0	0	7	6	7	6
5	LI02	9,5	9,5	9,5	0,0	ID	0	0	7	6	7	6
6	LI03	9,5	9,5	9,5	0,0	0,0	ID	0	7	6	7	6
7	LI04	9,5	9,5	9,5	0,0	0,0	0,0	ID	7	6	7	6
8	LM Can (EF686003)	10,0	10,0	10,0	1,3	1,3	1,3	1,3	ID	1	0	1
9	LM MX (HQ115065)	9,8	9,8	9,8	1,1	1,1	1,1	1,1	0,2	ID	0	0
10	LM PT (KF492798)	11,1	11,1	11,1	1,2	1,2	1,2	1,2	0,0	0,0	ID	0
11	LM SP (GU938189)	9,8	9,8	9,8	1,1	1,1	1,1	1,1	0,2	0,0	0,0	ID

LI01-04: amostras do presente estudo; LI: Laurencia intricata; LM: Laurenciella marilzae

Na árvore filogenética do *rbc*L enraizada em NJ, as amostras LA01-09 do presente estudo foram fielmente agrupadas num único ramo com 100% de afinidade. Junto a elas, no mesmo ramo, agrupou-se *Laurencia aldingensis* do RJ, que não apresentou divergência alguma (Tabela 12).

Numa relação também próxima, com suporte alto de PP e bootstrap para todas as análises, vê-se *Laurencia catarinensis* num ramo vizinho, mas claramente separado de do ramo das LA01-09. A variação interespecífica de *Laurencia catarinensis* com as LA01-09 do presente estudo e *Laurencia aldingensis* do RJ foi de 0,5%, o que representa 3 nt divergentes.

O agrupamento num único ramo, associado à ausência de divergência entre as amostras de LA01-09 e *Laurencia aldingensis* do RJ, nos leva a concluir que elas são pertencentes ao mesmo táxon.
	Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	LA01	ID	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3
2	LA02	0,0	ID	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3
3	LA03	0,0	0,0	ID	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3
4	LA04	0,0	0,0	0,0	ID	0	0	0	0	0	0	3	3	3
5	LA05	0,0	0,0	0,0	0,0	ID	0	0	0	0	0	3	3	3
6	LA06	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ID	0	0	0	0	3	3	3
7	LA07	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ID	0	0	0	3	3	3
8	LA08	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ID	0	0	3	3	3
9	LA09	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ID	0	3	3	3
10	LA RJ (JF810351)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ID	3	3	3
11	LC Can (KF492776)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	ID	0	0
12	LC Can (KF492781)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	ID	0
13	LC Can (KF492779)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,0	ID

Tabela 12. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (porção superior) entre as sequências do *rbc*L de espécimes de *Laurencia aldingensis* e *Laurencia catarinensis* obtidos no programa PAUP versão 4.0a146. Sequências do Genbank apresentam informações do local de coleta e estão identificadas com os números de acesso entre parênteses.

LA01-09: amostras do presente estudo; LA: Laurencia aldingensis; LC: Laurencia catarinensis.

Todas as amostras de *L. dendroidea* foram agrupadas com suporte alto de PP e bootstrap nas análises testadas As amostras do presente estudo não tiveram divergência de nucleotídeos entre si em suas sequências. As maiores porcentagens de divergência ocorreu quando comparadas com as amostras das Ilhas Canárias (0,9%, 5 nt) e Bahia (0,7%, 4 nt). As variações com relação às amostras do RJ, SP e ES foram ausentes (Tabela 13).

	Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	LD01	ID	0	0	0	0	4	5	0	0	0	0
2	LD02	0,0	ID	0	0	0	4	5	0	0	0	0
3	LD03	0,0	0,0	ID	0	0	4	5	0	0	0	0
4	LD04	0,0	0,0	0,0	ID	0	4	5	0	0	0	0
5	LD05	0,0	0,0	0,0	0,0	ID	4	5	0	0	0	0
6	LD BA (GU330228)	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	ID	4	4	4	4	4
7	LD Can (EF686000)	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,7	ID	5	5	5	5
8	LD RJ (GU330222)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,9	ID	0	0	0
9	LD RJ (GU330237)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,9	0,0	ID	0	0
10	LD SP (AF465810)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,9	0,0	0,0	ID	0
11	LD ES (AY593971)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,9	0,0	0,0	0,0	ID

Tabela 13. Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (porção superior) entre as sequências do *rbc*L de espécimes de *Laurencia dendroidea* obtidos no programa BioEdit versão 3.3.19.0. Sequências do Genbank apresentam informações do local de coleta e estão identificadas com os números de acesso entre parênteses.

LD01-05: amostras do presente estudo; LD: Laurencia dendroidea

Pode-se verificar então, que as amostras LD01-05 do presente estudo, apesar de terem sido coletadas em épocas e lugares diferentes, são pertencentes ao mesmo táxon e estão intimamente agrupadas com *Laurencia dendroidea*, o que nos levar a inferir que são a mesma entidade taxonômica.

O gene *rbc*L, mesmo que não tenha sido sequenciado por inteiro, apenas a última porção dele, foi suficiente para separar táxons divergentes e agrupar amostras pertencente à mesma entidade taxonômica. É um gene difícil de trabalhar, até que os primers certos sejam ajustados para os organismos em estudo. Mas é um gene que traz bastante confiabilidade para avaliar as relações filogenéticas entre os organismos fotossintetizantes.

## 5.7. Divergência entre as sequências dos marcadores estudados

A comparação da amplitude de variação entre as sequências do UPA, COI-5P e *rbc*L está sumarizada na Tabela 14.

relação / % divergência		Marcadores	
relação / /o artergeneia =	UPA	COI-5P	rbcL
Grupo externo x grupo interno	3,3 - 6,0	10,8 - 12,8	10,6 - 14,3
Intergenérica	3,8 - 7,9	8,7 -13,9	4,9 - 15,4
Interespecífica	0,6 - 2,5	0,70 - 9,5	0,5 - 8,3
Intraespecífica	0,0 - 1,4	0,0 - 6,2	0,0 - 0,9

Tabela 14. Amplitude de variação da % de divergência entre as sequências dos marcadores estudados.

A alta taxa de variação intergenérica observada para o gene UPA se deu em virtude da correlação dos gêneros *Palisada* e *Chondrophycus*, ambos, amostras do Hawaii. E, no estudo de COI-5P, a divergência intraespecífica no valor de 6,2% foi proporcionada pela maior variação da sequência de *Laurencia majuscula* do Hawaii quando comparada com as outras sequência de *Laurencia dendroidea* que, entre si, variaram no máximo 2,6%.

As algas vermelhas do Hawaii representam umas das mais bem estudadas floras do mundo no aspecto morfológico e, com o projeto "Hawaiian Rhodophyta Biodiversity Survey (2006-2010)" fez delas também uma das mais bem estudas no âmbito da caracterização molecular. A presença de um grande banco de dados facilita o acesso as sequências dos genes de uma grande quantidade de táxons, aumentando o poder comparativo das amostras e enriquecendo as análises.

No entanto, devido ao isolamento geográfico do arquipélago, estima-se que o endemismo da flora marinha chegue a 19,5% e isso pode ser motivo para o grande percentual de divergência entre as amostras brasileiras e havaianas.

Com relação ao gene *rbc*L, a variação intergenérica foi de 4,9 a 15,4% uma amplitude maior do que aquela encontrada por Machín-Sánchez *et al.* (2012) (6,8 a 11.3 %) ao comparar *Laurencia* x *Chondrophycus* x *Palisada*. No trabalho de Cassano (2009) essa divergência foi de 5,6 a 11,4% e, variação intergenérica de 6 a 13% foi encontrada por outros autores (Gil-Rodrigues *et al.* 2009). O valor de 15,4% corresponde à divergência encontrada entre *Palisada flagellifera* do ES e as amostras LD01-LD05 do presente estudo.

A amplitude de variação interespecífica no gene *rbc*L foi de 0,5 a 8,3%. O máximo dessa divergência foi equiparável ao encontrado por Diaz-Larrea *et al.* (2007) (6 a 8%).

A variação intraespecífica entre os gêneros do complexo *Laurencia* variou de 0,0 a 0,9%, proporcionado pela amostra de *L. dendroidea* das Ilhas Canárias quando comprada com as outras. E a variação genética entre as amostras de *Laurencia aldingensis* e *Laurenciella* sp. foi de 0%, enquanto a variação entre as amostras do Genbank de *Laurenciella marilzae* foi de 0 a 0,2%, bem similar ao encontrado por Gil-Rodrigues *et al.* (2009) (0,06 a 0,2%). E, as amostras de *Laurenciella* sp. variaram geneticamente das amostras de *Laurenciella marilzae* de 1,1 a 1,3%

# 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

DNA barcoding provou ser uma ferramenta fundamental que tem ajudado na identificação das espécies, descoberta de espécies crípticas ou novas ocorrências tanto para algas vermelhas, pardas quanto verdes (Saunders 2005, Robba *et al.* 2006, Kucera e Saunders 2008, Saunders 2008, Mc Devit e Saunders 2009, Saunders 2009, Walker et al 2009, Le Gall e Saunders 2010, Saunders e Kucera 2010). Tem sua importância não só para pesquisas de biodiversidade, mas também para todo e qualquer trabalho que envolva um organismo, para torna-lo mais informativo, uma vez que se possa ter uma caracterização taxonômica definida.

Todos os genes testados no presente trabalho, foram importantes para verificar a consistência do agrupamento dos espécimes em análise. Para todas as análises o complexo *Laurencia* se mostrou monofilético com relação aos táxons usados como grupo externo. Com os dados aqui apresentados podemos inferir que o gene UPA conseguiu fazer delimitações entre os gêneros, mas apresenta baixa resolução para delimitar espécies próximas. Já o COI-5P e a porção final do *rbcL* conseguiram resolver muito bem as distribuições dos táxons com suporte alto de bootstrap, o que só veio corroborar com dados de literatura.

Por fim, pudemos confirmar então que, as diferentes amostras de *Laurencia aldingensis*, são de fato pertencentes ao mesmo táxon, fazendo com que pudéssemos reunir todas elas e formar um pool de biomassa algal para as extrações e isolamentos de seus respectivos constituintes químicos. O mesmo procedeu-se para *Laurencia dendroidea* e *Laurenciella* sp.

# Capítulo 2

Preparo dos extratos, fracionamento, isolamento e caracterização dos compostos presente nas algas marinhas vermelhas *Laurencia aldingensis*, *L. dendroidea* e *Laurenciella* sp. Após nos certificarmos pela técnica da biologia molecular - DNA barcode, de que as amostras procedente das diferentes coletas foram devidamente identificadas em campo, elas puderam então ser reunidas para formar um pool de biomassa algal, a fim de aumentar a quantidade de material para o processo de extração, cujo procedimento está descrito a seguir.

# 7. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Para a preparação dos extratos fracionados cada uma das espécies de algas foram retiradas do freezer e liofilizadas. Cerca de 30 g da massa seca da alga foram trituradas em nitrogênio líquido até obter um pó. Em seguida foram adicionados 300 mL de hexano, colocado no sonicador por 30 min e depois deixado macerando overnight. No dia seguinte, o extrato resultante foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, filtrado em papel Whatman e em seguida concentrado no rotaevaporador. A massa algal foi novamente eluída com hexano recuperado do rotaevaporador e o volume necessário completado com solvente virgem, repetindo-se o procedimento até três vezes. O mesmo foi adotado para os demais solventes: clorofórmio e metanol. Durante a passagem de um solvente para outro, a massa algal foi deixada em estufa com ventilação em temperatura ambiente para permitir que o solvente precedente evaporasse e diminuísse a interferência na extração do subseqüente. Assim, foram obtidas as frações hexânica (FH), fração clorofórmica (FC) e fração metanólica (FM). O processo se deu igualmente para todas as espécies, *L. aldingensis, L. dendroidea* e *Laurenciella* sp.

Para obtenção do extrato bruto diclorometano o procedimento seguiu conforme mencionado acima, no entanto com apenas um solvente, gerando ao fim do processo os extratos LA-DCM, LD-DCM e LI-DCM cujos rendimentos foram 1,94, 7,10 e 1,15%, respectivamente.

## 8. FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS

Os extratos preparados através do pool de biomassa algal foram submetidos a fracionamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em sistema preparativo, cujas frações resultantes foram monitoradas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e <sup>1</sup>H RMN para se fazer a seleção das frações que seriam refracionadas. Um esquema representativo desses processo encontra-se na Figura 17.



Figura 17. Esquema representativo do processo de fracionamento e isolamento das substâncias dos extratos diclorometano de *Laurencia* (LA-DCM, LD-DCM) e *Laurenciella* (LI-DCM).

*Fracionamento por CLAE preparativo*. O fracionamento para isolamento dos compostos se deu em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em um sistema de cromatografia preparativa LC-8A (Shimadzu, Kyoto, Japan) composto por duas bombas, pelo software Class-VP (Shimadzu).

No equipamento acoplamos uma coluna de fase normal de sílica Ultra column (250 x 21.2 mm - 5  $\mu$ m diâmetro da partícula, 100 Å tamanho médio dos poros) (Restek, Pennsylvania, US) com pré-coluna de silica gel ultrapura (60-200  $\mu$ m, 60 Å tamanho médio dos poros) (Acrōs Organics).

A fase móvel, para a maioria dos extratos e frações, consistiu em éter de petróleo:acetona com gradientes que variaram conforme discriminados abaixo em fluxo de 3 mL/min, detecção UV em 210 e 254 nm, injeção manual e coleta semi-automática.

Gradien	te 1	Gradien	te 2	Gradien	Gradiente 3		
Tempo (min)	[B] %	Tempo (min)	[B] %	Tempo (min)	[B] %		
0.02	100	0.02	100	0.02	85		
60.00	70	40.00	70	60.00	85		
100.00	70	45.00	70	90.00	50		
		50.00	100	100.00	50		
Gradien	te 4	Gradien	te 5	Gradiente 6			
Tempo (min)	[B] %	Tempo (min)	[B] %	Tempo (min)	[B] %		
0.02	95	0.02	95	0.02	95		
20.00	85	30.00	85	30.00	70		
30.00	85	50.00	85	40.00	70		
35.00	70	70.00	70	45.00	95		
40.00	70	80.00	70	50.00	95		
45.00	95	90.00	95				
50.00	95	100.00	95	_			

Para uma das frações usamos coluna de fase reversa C18 Restek UltraII (150 x 10 mm - 5  $\mu$ m diâmetro da partícula), tendo como fase móvel ACN: H<sub>2</sub>O num gradiente de eluição 30-70% em 20 min, permanecendo em 70% por 20 min, 70-100% em 5 min, permanecendo em 100% por 5 min, 100-30% em 5 min, permanecendo em 30% por 5 min, num fluxo de 2 mL/min.

As frações, depois de coletadas foram evaporadas em speed-vac e/ou rotaevaporador.

*Monitoramento das frações por CCD*. Dos extratos brutos ou frações bem impuras, as subfrações coletadas das corridas cromatográficas em HPLC preparativo eram monitoradas por CCD para se ter um perfil de cada uma das amostras obtidas. Permitindo assim, comparação de uma amostra de interesse com outra vizinha. A CCD se deu em placa de fase normal com indicador de UV (254 nm) e solvente de eluição éter de petróleo:acetona (85:15). Após eluição, as placas de CCD foram reveladas com o reagente de Komarowsky (mistura de 1 mL de ác. sulfúrico 50% com 10 mL de p-hidroxi-benzaldeído em etanol (2%) (Waksmundzka-Hajnos et al, 2008).

*Isolamento guiado por RMN <sup>1</sup>H.* As amostras resultantes do fracionamento que se mostravam interessantes, seja pela quantidade de material obtido, seja pelas características indicadas na CCD, eram submetidas a RMN <sup>1</sup>H (400 MHz). Sinais característicos de grupos funcionais interessantes e em boa intensidade, eram separados para serem refracionados. Isso garantiu um isolamento mais rápido dos compostos e em quantidade suficiente para a caracterização dos mesmos.

# 9. CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

As substâncias isoladas foram submetidos a várias análises para caracterização e elucidação estrutural.

*Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear - RMN*. Os compostos puros foram submetidos <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, 1D e 2D RMN (HSQC, HMBC, COSY, NOESY). Os experimentos de RMN foram realizados num espectrômetro Bruker Avance DRX 400 MHz equipado com diferentes sondas e um software TopSpin 2.1 (Bruker BioSpin). As amostras foram solubilizadas em solventes deuterados (CDCl<sub>3</sub> ou MeOD, Aldrich).

*CG-EM.* As substâncias foram analisadas por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas do tipo triplo quadruplo (GCMS-7890A, Agilent, CA, US) equipado com controle de pressão eltrônica (QQQ Collision Cell EPC). Para separação cromatográfica foi usado coluna Agilent 19091S-433 (30 m x 250 μm x 0.25 μm) tendo o helio como gás de arraste num fluxo de 2.25 mL/min e N2 como gás de colisão num fluxo de 1.5 ml/min. Temperatura do formo a 60 °C por 1 min., com aumento de 15 °C/min de 60 a 300 °C, e mantivemos esta temperatura por 4 min. Temperatura de injeção de 250 °C. A detecção se deu em modo de scan completo de 50-900 uma.

Ionização por impacto de elétrons se deu por enegia de colisão a 70 eV, ion source mantido a 240 °C.

*CLAE-ICPA-EM.* A cromatografia líquida de alta eficiência com ionização química à pressão atmosférica acoplada a espectrômetro de massas foi realizada em espectrômetro de massas Bruker micrOTOF-QII que operou no modo positivo ou negativo com gás N<sub>2</sub> de nebulização e secagem a 4 Bar e 8 L/min, respectivamente. A temperatura de secagem estava programada em 200 °C e a energia de colisão e do quadrupolo em 12 e 6 eV, respectivamente. Os funis RF1 e RF2 foram programadas para 200 Vpp e a faixa de massas monitorada foi de 100 a 800 kDa.

*CLAE-ESI-EM.* A cromatografia líquida de alta eficiência com ionização por eletrospray acoplada a espectrômetro de massas foi realizada em HPLC (Agilent, QTOF-MS) equipado com detector DAD e ESI-MS.

*Espectroscopia de infravermelho (IV)*. Os espectros de infravermelho das amostras sólidas foram medidos usando espectrofotômetro Thermo Scientific Nicolet iS10 FTIR com um Smart iTR.

# 9.1. Substância da espécie Laurencia aldingensis

O processo de fracionamento esquematizado na Figura 19, possibilitou o isolamento e identificação de 9 substâncias (Tabela 19).



Figura 18. Esquema simplificado do processo de fracionamento e isolamento dos 9 compostos de *L. aldingensis*. Para detalhes cromatográficos ver seção 8.



Esfingosinas: diidroceramidas (dCer)



9.1.1. Esfingosinas: dihidroceramidas (dCer)

O fracionamento guiado por RMN permitiu identificar nas últimas frações do extrato diclorometano de *Laurencia aldingensis*, uma classe de compostos conhecidas como esfingosinas. As esfingosinas são conhecidas desde 1882 por comporem os hidrolisados de tecidos animais (Thudichum 1901), mas só teve sua estrutura conhecida 65 anos depois (Carter *et al.* 1987). Hoje, as esfingosinas são muito bem caracterizadas. São aminodióis de cadeia linear insaturada com 18

carbonos, naturalmente encontradas em esfingolipídios, ceramidas e outros metabólitos lipídicos (Rebollo et al, 2008). E também são bastante estudadas, assim como seus metabólitos e derivados, por serem consideradas moléculas-alvo para a concepção de potenciais candidatos ao desenvolvimento de novas drogas (Kester e Kolesnick 2003). Vários trabalhos descrevem as propriedades antimicrobiana, antiparasitária e farmacológica desses aminoalcoóis de cadeia linear ou com agrupamentos aminodióis e diaminas substituídos (Lauer *et al.* 1995, Howarth e Lloid 2000, Calas *et al.* 2000).

No organismo vivo, a esfingosina, quando fosforilada, resulta na formação da esfingosina-1fosfato que atua como um potente lipídio de sinalização com múltiplas funções fisiológicas, como na regulação da cardiogênese, formação do sistema vascular, sobrevivência dos oócitos e tráfico de células imunes, além de regular as vias de sinalização celular determinando a sobrevivência e apoptose das células (Spiegel e Milstein 2000, Hla 2003, Rebollo *et al.* 2008, Hannun e Obeid, 2011).

Apesar de muito comuns em animais, as esfingosinas (e/ou seus derivados) já foram encontradas em plantas terrestres (Lynch e Dunn 2004, Worrall *et al.* 2008, Islam *et al.* 2012), fungos (Reindel 1930, Choi *et al.* 2013), e em organismos marinhos (Garg *et al.* 1992). No presente trabalho foi possível o isolamento e caracterização das moléculas 1,2-diacetilesingosina (1), 1-hidroxi-3-oxooctadecan-2-il-acetamida (2), 2-acetamido-1-hidroxioctadecan-3-il acetato (3) e 1,3-dihidroxioctadecan-2-il-acetamida (4) (Figura 19). Tratam-se especificamente de esfingosinas tipo dihidroceramida (dCer) por não conterem dupla ligação no carbono 4, que caracteriza uma ceramida (Cer) (Skolová *et al.* 2014).

## 9.1.1.1. Substância 1: 1,2-diacetilesfingosina

Durante a secagem da fração LADCM\_43-49, em rotaevaporador, houve a formação de pó branco, em mistura com pigmento ocre, que foi eliminado por lavagem com ACN. A substância isolada remanescente (1) (Figura 20), com massa de 8,5 mg, foi analisada por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C uni e bidimensionais (HMBC e HSQC). Uma primeira análise dos resultados desses espectros permitiu classificar essa substância como pertencente ao grupo das esfingosinas e, mais especificamente, semelhante à 1,2-diacetilesfingosina, isolada por Choi et al. (2013) do fungo *Grifola gargal*.



Figura 20. 1,2-diacetilesfingosina (1).

Os dados obtidos em nossos estudos estão descritos a seguir.



Figura 21. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância 1,2-diacetilesfingosina (1) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

No espectro do RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (Figura 21) são observados dois duplos dubletos em  $\delta$  4,35 (J 11,6 e 6,3 Hz) e  $\delta$  4,20 (J 11,6 e 3,7 Hz) atribuíveis aos dois hidrogênios ligados ao C-1; dois multipletos em  $\delta$  4,12 e  $\delta$  3,64 (1H, H-2 e 1H, H-3, respectivamente), dois singletos em  $\delta$  2,02 (3H) e  $\delta$  2,08 (3H) devidos aos grupos metílicos ligados aos carbonos quaternários C-1' ( $\delta$  170,5) e C-1" ( $\delta$  171,4) (Figura 22) . O grupo metilênico ligado ao C-4 aparece em  $\delta$  1,49, como um multipleto; a grande cadeia metilênica aparece em  $\delta$  1,22-1,32 e o grupo metílico terminal (3H, C-18) é visto como um tripleto, em  $\delta$  0,88 (t 6,6 Hz).



Figura 22. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância 1 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

O sinal no espectro de RMN de <sup>1</sup>H que aparece em  $\delta$  5,97 (d *J* 8,4 Hz) não apresentou correlação com outros carbonos nas análises de HSQC e HMBC e está situado em campo baixo. Entretanto, nos experimentos de HSQC de N-H (Figura 23) e HMBC de NH (NH-C1, NH-C2') (Figura 24) esse hidrogênio aparece ligado a um nitrogênio.



Figura 23. Espectro de RMN de NH HSQC da substância 1 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).



Figura 24. Espectro de RMN de NH HMBC da substância 1 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).



Figura 25. Espectro de RMN de HSQC da substância 1 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

Os grupos metilênicos da molécula estão representados por sinais azuis na análise de RMN de HSQC (Figura 25) e, no caso da cadeia metilênica, os sinais relativos a estes carbonos (C-5 a C-17) aparecem entre  $\delta$  31.9 e 22.6 ppm (Figura 22). A observação detalhada dos espectros de Ressonância de <sup>13</sup>C (Figura 22) e o de HSQC (Figura 25) permite a associação do sinal em  $\delta$  31.9

ao C-5, o menos protegido dos carbonos deste grupo de sinais, e o sinal em  $\delta$  22,6 ao C-17, o mais protegido dos grupos metilênicos. Seguindo o mesmo raciocínio, o sinal em  $\delta$  25,9 pode ser atribuído ao C-16 e o em  $\delta$  29.3, ao C-15. Os demais sinais entre  $\delta$  29,7 e  $\delta$  29,3, puderam ser atribuídos a nove carbono (C-6 a C 14) após o estudo do espectro de massas de alta resolução, (HRESIMS) realizada em Q-TOF (Agilent), no modo positivo, com ionização por electrospray.

Os deslocamento químicos de RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H obtidos no presente estudo estão dispostos na Tabela 15, juntamente com os valores obtidos por Choi et al. (2013).

	substância1 (j	presente estudo)	1,2-diacetilesfingosina <sup>a</sup>		
Nº C	δ <sup>13</sup> C (ppm)	δ <sup>1</sup> H (ppm, J em Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)	$\delta^{1}$ H (ppm, J em Hz)	
1	63.0	4.20 (dd, 11.6, 3.7) 4.35 (dd 11.6, 6.3)	63.1	4.18 (dd, 11.6, 3.7) 4.33 (dd, 11.6, 6.4)	
2	53.0	4.12 (m)	53.0	4.11 (m)	
3	72.5	3.64 (m)	72.6	3.62 (m)	
4	33.9	1.49 (m)	34.0	1.48 (m)	
5	31.9	1.22-1.32 (m)			
6-14	29.32, 29.51, 29.53, 29.55, 29.61, 29.64, 29.65, 29.66, 29.7	1.22-1.32 (m)	22.7, 26.0, 29.3, 29.5, 29.6,	1.23-1.29 (m)	
15	29.27	1.22-1.32 (m)	29.7 <sup>b</sup> , 31.9		
16	25.9	1.22-1.32 (m)			
17	22.6	1.22-1.32 (m)			
18	14.1	0.88 (t, 6.6)	14.1	0.86 (t, 6.9)	
1'	170.5	-	170.2	-	
2'	23.3	2.02 (s)	23.4	2.00 (s)	
1"	171.4	-	171.3	-	
2"	21.0	2.08 (s)	20.9	2.06 (s)	

Tabela 15. Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H ( $\delta$  em ppm, multiplicidade *J* em Hz) <sup>13</sup>C (ppm da substância **1** (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) e dados da literatura.

<sup>a</sup>Choi *et al.* 2013. <sup>b</sup>Sinal mais largo e intenso que os outros.

O espectro de massas apresentou um íon em m/z 408,3087 (M+Na)<sup>+</sup> e o íon molecular [M+H]<sup>+</sup> em m/z 386,3481; o valor de m/z calculado é de 386,3265, indicando dois graus de insaturação e o valor calculado da massa para este composto é 385,3192 (Figura 26).



Figura 26. Espectro de massas de alta resolução (ESI-QTOF) da substância 1.

As bandas de absorção observadas no espectro de infravermelho foram 3269, 2915, 2848, 1737, 1651, 1557, 1466, 1371, 1269, 1100, 1045 e 720 cm<sup>-1</sup>, compatíveis com as encontradas por Choi *et al.* (2013) que foram: 3269, 2915, 2848, 1738, 1649, 1557, e 1466 cm<sup>-1</sup>. Na Tabela 16, estão listadas essas frequências e os grupos funcionais a que correspondem. São relevantes a banda na frequência de 3269 cm<sup>-1</sup>, atribuível aos estiramentos -OH e -NH da molécula; as em 1737 e 1651 cm<sup>-1</sup>, devidas aos estiramentos C=O de éster e C=O de amida, respectivamente. As frequências em 1100 e 1045 cm<sup>-1</sup>, não mencionadas por Choi *et al.* (2013), podem ser atribuídas aos estiramentos C-N e C-O, respectivamente, e o pico de absorção em 720 cm<sup>-1</sup>, à deformação angular da longa cadeia metilênica.

O conjunto resultante da análise dos espectros de RMN, dos dados espectrométricos e espectroscópicos e das informações da literatura permitiu que se concluisse que a substância 1 é 1,2-diacetilesfiingosina (1) cuja fórmula molecular é  $C_{22}H_{43}NO_{4}$ . Este é o primeiro relato do isolamento desta substâncias de organismos marinhos.

A substância 1 já fora testada quanto ao potencial de supressão de formação de osteoclastos, e apresentou melhor atividade que seus análogos sem causar citotoxididade em experimentos de

dose-resposta. Isso mostra o grande potencial das esfingosinas, que muito ainda deve ser explorado.

Frequência dos grupos (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais/atribuição
3269	estiramento -OH, -NH
2915	estiramento -CH assimétrico
2848	estiramento -CH simétrico
1737	estiramento C=O de éster
1651	estiramento C=O de amida
1557	deformação angular de amida secundária
1466	deformação angular do CH <sub>2</sub> adjacente a carbonila
1371	deformação angular do grupo metila
1269	estiramento C-C
1100	estiramento C-N
1045	estiramento C-O
720	deformação angular da cadeia (CH <sub>2</sub> )n, n>3

Tabela 16. Valores de absorção no espectro do infravermelho para os grupos funcionais da substância 1.

9.1.1.2. Substância 2: 2-acetamido-3-acetoxi-1-octadecanol



Figura 27. 2-acetamido-3-acetoxi-1-octadecanol (2) isolada do extrato diclorometano de L. aldingensis.

A substância **2**, que foi obtida na forma de cristal (3,17 mg), tem massa molecular [M] 385,3192 e fórmula molecular C<sub>22</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>3</sub>. A análise para confirmação dessa massa foi feita por infusão direta em espectrômetro de massas Q-TOF (Agilent) de alta resolução (HRESIMS), em modo positivo, com ionização por electrospray. Foram observadas 3 espécies iônicas que correspondem a [M+H]+ m/z 386.3329 [calc. m/z 386.3265, lit. m/e 386.324979 (Cardellina e Moore 1978)], [M+Na]+m/z 408.3083 (calc. m/z 408.3084) e [M+K]+m/z 424.2754 (calc. m/z 424.2824) (Figura 28).



Figura 28. Espectro de massas da molécula 2-acetamido-3-acetoxi-1-octadecanol (2) obtido por infusão direta em HRESIMS

Na tabela 17 estão apontados os valores das bandas de absorção de intensidade média e alta, observadas no espectro de infravermelho de **2**, correlacionados aos respectivos grupos funcionais. Cardellina e Moore (1978) também apontam as bandas em 3380, 3280, 3060, 1729, 1642, 1540, 1235 cm<sup>-1</sup>. Na presente análise, a banda em 3060 cm<sup>-1</sup>, que pode ser atribuída ao agrupamento - OH, ainda que presente, aparece em intensidade muito baixa, quando comparada com outras bandas.

Frequência dos grupos (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais/atribuição
3300	estiramento -OH, -NH
2917	estiramento -CH assimétrico
2849	estiramento -CH simétrico
1730	estiramento C=O de éster
1645	estiramento C=O de amida
1538	deformação angular de amina
1369	deformação angular do grupo metila
1241	estiramento C-C
1071	estiramento C-N
1050	estiramento C-O
719	deformação angular da cadeia (CH <sub>2</sub> )n, n>3

Tabela 17. Valores de absorção no espectro do infravermelho para os grupos funcionais dos compostos

A observação preliminar dos espectros obtidos mostrou que esta substância, que tem massa molecular coincidente com a da substância 1, já havia sido descrita por Cardellina e Moore (1978), cujos dados para comparação estão dispostos na Tabela 18.

A substância 2 difere da substância 1 pela posição dos grupos acetato e hidroxila, localizados nos carbonos C-1 e C-3: na substância 1, a hidroxila encontra-se ligada ao C-3 enquanto na susbtância 2 encontra-se ligada ao carbono C-1. Consideração inversa deve ser feita com relação à posição do grupo acetato. Esta afirmação tem respaldo nos espectros de RMN de próton, pois na substância 2 o sinal devido ao hidrogênio ligado ao C-3 aparece em  $\delta$  4,81 ppm como um multipleto e os hidrogênio ligados ao C-1, como um dubleto largo em  $\delta$  3,60 ppm. Já na substância 1, o hidrogênio ligado ao C-3 aparece em  $\delta$  4,20 e  $\delta$  4,35 ppm, respectivamente. A substância 2 é, portanto, o diacetato de dihidroesfingosina, descrito por Cardellina e Moore (1978).

	Subst	ância 2	2-acetamido-3-acetoxi-1-octadecanola		
Nº C	δ <sup>13</sup> C (ppm)	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm, J em Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm, J em Hz)	
1	61.7	3.60 (br d, 3.00)	61.7	3.58 (bd)	
2	53.4	4.03 (m)	53.5	4.02 (m)	
3	74.0	4.81 (m)	74.0	4.86 (bq)	
4	31.3	1.64 (m)	31.3	1.60 (m)	
5	25.6				
6-14	29.3, 29.4, 29.5, 29.61, 29.64, 29.67 <sup>b</sup>		<b>22</b> 4 <b>25 7 2 0</b>		
15	29.2	1.23-1.26 (m)	23.4, 25.7, 29.8, 32.0	1.23 (br s)	
16	31.9				
17	23.4				
18	14.1	0.88 (t, 6.8)	14.1	0.85 (br t)	
1'	172.6	-	172.1	-	
2'	22.7	2.02 (s)	22.8	1.99 (s)	
1"	170.4	-	170.3	-	
2"	21.0	2.12 (s)	21.1	2.09 (s)	

Tabela 18. Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H ( $\delta$  em ppm, multiplicidade *J* em Hz) e <sup>13</sup>C (ppm) da substância **2** (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) do presente estudo e dados da literatura.

<sup>a</sup>Cardellina e Moore 1978 (100 MHz). <sup>b</sup>Sinal mais intenso que os outros.



Figura 29. Espectro de HSQC da substância 2 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

Entretanto, uma observação mais acurada dos espectros da substância 2 permitem constatar que, os sinais de RMN de <sup>13</sup>C em  $\delta$  61,65 ppm e em  $\delta$  53,46 ppm, que Cardellina e Moore (1978) atribuiram a um grupo metínico (CH) e a um grupo metilênico (CH<sub>2</sub>), respectivamente, são de fato devidas aos carbonos C-1 e C-2, ou seja, a um carbono metilênico e outro metínico.

Incluimos em nosso estudo os primeiros dados de RMN 2D da substância **2** (Figura 29), bem como HMBC (Figura 31 e Figura 32) e COSY que estão esquematizados na Figura 30.



Figura 30. Correlação de HMBC e COSY na substância 2.



Figura 31. Correlação de HMBC na substância 2 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).



Figura 32. Correlação de COSY na substância 2 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

Este amino-álcool insaturado, que é o 2-acetamido-3-acetoxi-1-octadecanol (**2**) foi o primeiro relato de derivados de esfingosinas em plantas, isolado de uma espécie de *Laurencia* do Hawaii, *Laurencia nidifica* (Cardellina e Moore 1978). E agora, na espécie *L. aldingensis* do presente estudo.

### 9.1.1.3. Substância 3: 1,3-dihidroxioctadecan-2-il-acetamida

A substância 3, que foi isolada como um cristal branco (1,71 mg), teve sua massa molecular determinada em análise por infusão direta, em espectrômetro de massas Q-TOF (Agilent) de alta resolução (HRESIMS), em modo positivo, com ionização por electrospray que mostrou os íons  $[M+H]^+ m/z$  344.3240 (calc. m/z 344.3159) e  $[M+Na]^+ m/z$  366.3009 (calc. m/z 366.2909) (Figura 33); a correspondente fórmula molecular é C<sub>20</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>3</sub>.



Figura 33. Espectro de massas da molécula **3** obtido por infusão direta espectrômetro de massas Q-TOF de alta resolução (HRESIMS) em modo positivo

O estudo preliminar dos espectros obtidos com amostra desta substância permitiu que se atribuísse a ela a estrutura mostrada na Figura 34.



Figura 34. 2-acetamido-1,3- dihidroxioctadecanol (3) isolada do extrato diclorometano de L. aldingensis.

O espectro de infravermelho (Tabela 19) mostrou bandas em comprimento de onda 3300 cm<sup>-1</sup>, que indicam a sobreposição de estiramentos dos grupos -OH e -NH e bandas em 1650 e 1550 cm<sup>-1</sup> atribuíveis à carbonila de grupo amida e à deformação angular de amina secundária, respectivamente. As bandas em 1100 e 1050 cm<sup>-1</sup> sugerem grupos C-O de alcoóis secundário e primário, respectivamente. Neste espectro, nota-se a ausência de bandas entre 1700 e 1730 cm<sup>-1</sup> o que elimina a possibilidade da presença de grupos carbonila (C=O) das funções cetona e éster, na molécula.

Frequência dos grupos (cm-1)	Grupos funcionais/atribuição
3300	estiramento -OH, -NH
2917	estiramento -CH assimétrico
2850	estiramento -CH simétrico
1700	estiramento C=O de cetona
1651	estiramento C=O de amida
1550	deformação angular de amida secundária
1371	deformação angular do grupo metila
1240	estiramento C-C
1100	estiramento C-N
1047	estiramento C-O
721	deformação angular da cadeia (CH2)n, n>3

Tabela 19. Valores das frequências das bandas de absorção, no espectro do infravermelho da substância 3.

Foram realizados, com amostra da substância **3**, estudos espectroscópicos, que incluíram experimentos de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN e 2D. A tabela 20 mostra os deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (ppm) desta substância.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H podem ser observados sinais relativos a dois grupos metílicos [em  $\delta$  0,88 ppm (t) e  $\delta$  2,05 ppm (s)], o primeiro correspondente a grupo terminal de cadeia carbônica alifática e o segundo, atribuível a grupo metílico ligado à carbonila. Também são vistos dois duplos dubletos centrados em  $\delta$  3,75 ppm e 4,03 ppm que podem estar ligados a grupos oximetínicos ou a carbono adjacente a nitrogênio de grupo amino. O multipleto em  $\delta$  1,25 ppm mostra a presença de grupos metilênicos de cadeia hidrocarbônica saturada.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C corrobora a presença do grupo metílico terminal de cadeia carbônica saturada (sinal em  $\delta$  14,1 ppm), de um grupo carbonílico (em  $\delta$  170,4 ppm) e da cadeia hidrocarbônica saturada (sinais entre  $\delta$  25,9 ppm e 29,7 ppm).

Nº C	δ <sup>13</sup> C (ppm)	δ <sup>1</sup> H (ppm, J em Hz)
1	62.5	4.03 (dd, 3.0, 11.3) 3.75 (dd, 3.0, 11.3)
2	53.6	3.83 (m)
3	74.4	3.78 (m)
4	34.5	1.65 (m)
5-15	25.9, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7 <sup>b</sup>	
16	31.9	1.25 (s)
17	22.7	
18	14.1	0.88 (t, 6.69)
1'	170.4	-
2'	23.5	2.05 (s)

Tabela 20. Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H ( $\delta$  em ppm, multiplicidade *J* em Hz) e <sup>13</sup>C (ppm) da substância 3 (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

<sup>b</sup>Sinal mais intenso que os outros.

As figuras 35, 36 e 37 correspondem às análises bidimensionais que permitiram fazer as atribuições dos demais carbonos e oxigênios.

No experimento de HSQC (Figura 35), os sinais dos hidrogênios ligados ao carbono cujo sinal aparece em  $\delta$  62,5 ppm (C-1), marcado em azul, cor que indica grupos metilênicos, aparecem como dois duplos dubletos, centrados em  $\delta$  4,03 ppm e  $\delta$  3,75 ppm. O carbono em  $\delta$  74,4 ppm (CH) (C-3) pertence a grupo oximetínico, cujo correspondente hidrogênio aparece como um multipleto centrado em  $\delta$  3,78 ppm. O carbono em  $\delta$  53,6 ppm (C-2) está ligado a grupo amino e os hidrogênios a ele ligados, por se encontrarem mais protegidos do que os hidrogênios dos carbonos C-1 e C-3 (respectivamente em  $\delta$  62,5 ppm e  $\delta$  74,4 ppm), aparecem como o duplo dubleto em  $\delta$  3,58 ppm (dd) e  $\delta$  3,66 ppm (dd).

Também puderam ser feitas as seguintes correlações: os hidrogênios que aparecem como um singleto em  $\delta$  2,05 ppm estão ligados ao C-2', cujo sinal aparece em  $\delta$  23,5 ppm; os hidrogênios que aparecem como um multipleto em  $\delta$  1,65 ppm estão ligados ao carbono em  $\delta$  34,5 ppm (C-4).



Figura 35. Correlação de HSQC na substância 3 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

O espectro HMBC (Figura 36) mostra as correlações que permitem posicionar os dois grupos metílicos: o primeiro deles, que aparece como um tripleto em  $\delta$  0,88 ppm (t) mostra proximidade com os carbonos C-17 ( $\delta$  22,7 ppm) e C-16 ( $\delta$  31,9 ppm). O segundo, que aparece como um singleto em  $\delta$  2,05 ppm, é vizinho do carbono em  $\delta$  170,4 ppm (carbonila). Também permitiram situar o multipleto em  $\delta$  1,25 ppm como vizinhos dos carbonos C-17 e C-16 ( $\delta$  22,7 e 31,9 ppm, respectivamente).

O espectro COSY (Figura 37) corrobora as interrrelações entre os hidrogênios metílicos ligados ao C-18 e os hidrogênios do grupo metilênico adjacente (C-17), que aparece em  $\delta$  22,7 ppm, como participante do cluster de sinais relativos à cadeia hidrocarbônica da molécula.



Figura 36. Correlação de HMBC na substância 3 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).



Também mostra a proximidade dos hidrogênios metilênicos ligados a C-1 ao hidrogênio metínico ligado à C-2, e a proximidade do hidrogênio metínico ligado a C-3 ao hidrogênio metínico de C-2

e aos metilênicos de C-4.

Esses dados levam à conclusão de que a molécula da substância **3** tem a estrutura a ela atribuída na Figura 34.

Esta substância foi sintetizada por Bielawska et al. (1993) que apresentou, em seu estudo, apenas o espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtido em CD<sub>3</sub>OD, o que não permitiu comparação com nossos dados.

#### 9.1.1.4. Substância 4: 1-hidroxi-2-acetamida-3-oxooctadecano

A substância **4** foi obtida na forma de cristal branco (11,4 mg), da fração LA-DCM\_50-54. A massa molecular desta substância foi obtida em espectrômetro de massas de alta resolução (HRESIMS) do tipo Q-TOF (Agilent), modo positivo, com ionização por electrospray (Figura 38); o valor observado para o íon molecular  $[M+H]^+$  foi *m/z* 342,3192 sendo, portanto, *m/z* 341,2930 o valor da massa molecular [M] e *m/z* 342.3003, o valor calculado do íon  $[M+H]^+$ .



Figura 38. Espectro de massas da molécula 4 apresentando o íon molecular  $[M+H]^+ m/z$  342.3192.

No espectro de infravermelho, foram observadas: banda larga em 3300 cm<sup>-1</sup> atribuída a estiramentos –OH e –NH; bandas em 1713 cm<sup>-1</sup> e 1652 cm<sup>-1</sup> que podem ser atribuídos a estiramentos C=O de cetona e amida, respectivamente; pico em 1500 cm<sup>-1</sup> relativo à deformação angular de amida secundária; pico em 1400 cm<sup>-1</sup>, devido à deformação angular do CH<sub>2</sub> adjacente a carbonila e picos em 1100 e 1067 cm<sup>-1</sup> atribuíveis aos estiramentos C-N e C-O, respectivamente. Na Tabela 21 estão discriminados os valores das bandas observadas no espectro de infravermelho e os respectivos grupos funcionais, a elas relacionados.

Frequência dos grupos (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais/atribuição
3300	estiramento -OH, -NH
2917	estiramento -CH assimétrico
2849	estiramento -CH simétrico
1713	estiramento C=O de cetona
1652	estiramento C=O de amida
1500	deformação angular de amida secundária
1400	deformação angular do CH2 adjacente a carbonila
1370	deformação angular do grupo metila
1250	estiramento C-C
1100	estiramento C-N
1067	estiramento C-O
720	deformação angular da cadeia (CH <sub>2</sub> )n, n>3

Tabela 21. Valores de absorção no espectro do infravermelho para os grupos funcionais da molécula 4.

Em seu espectro RMN de <sup>13</sup>C (Figura 39) puderam ser contados 20 carbonos: 15 carbonos com deslocamentos semelhantes aos apresentados por cadeias hidrocarbônicas isto é, entre  $\delta$  31,90 ppm e  $\delta$  14,10 ppm; 01 carbono em  $\delta$  40,02 ppm; 02 carbonos quaternários, cujos sinais aparecem em  $\delta$  207,16 ppm e  $\delta$  170,96 ppm, atribuíveis a grupamentos carbonila e 02 carbonos cujos sinais aparecem em  $\delta$  61,1 ppm e  $\delta$  63,3 ppm que podem estar ligados a carbonos oximetilênicos ou vizinhos a grupo carbonila.



Figura 39. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância 1-hidroxi-2-acetamida-3-oxooctadecano (**4**) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância 4 (Figura 40), o tripleto em  $\delta$  0,88 ppm é atribuível aos hidrogênios de um grupo metílico vizinho de um grupo metilênico; o pico largo em  $\delta$  1,05 ppm corresponde aos hidrogênios dos grupos metilênicos de uma cadeia hidrocarbônica e o singleto em  $\delta$  2,07 ppm a hidrogênios ligados a carbono vizinho à carbono quaternário pois não estão acoplados a outros hidrogênios. Os hidrogênios em  $\delta$  4,6 ppm e  $\delta$  3,9 ppm estão mais desblindados e portanto ligados a carbono portando um grupo hidroxila ou ainda vizinho a um grupo amina.



Figura 40. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância 1-hidroxi-2-acetamida-3-oxooctadecano (**4**) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

No espectro de HSQC foram determinadas as correlações diretas entre os carbonos e seus respectivos hidrogênios (Figura 41), entretanto não houve correlação para o hidrogênio cujo sinal aparece em  $\delta$  6.68 ppm (d *J* 6,0 Hz). Também não foram observadas correlações para esse hidrogênio no espectro de HMBC (Figura 42). Os experimentos NH HSQC e NH HMBC comprovaram a presença de nitrogênio na molécula (Figura 43 e Figura 44). A Figura 46 mostra as correlações de HMBC de H-C e de H-N representadas por flechas, e inter-relações observadas no espectro COSY (Figura 45) representadas por traços largos.



Figura 41. Espectro de RMN de HSQC da substância 4 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).



Figura 42. Espectro de RMN de HMBC da substância 4 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).



Figura 43. Espectro de RMN de NH HSQC da substância 4 em CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.



Figura 44. Espectro de RMN de NH HMBC da substância 4 em CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz.


Figura 45. Mapa de contorno 2D de correlações de <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H (COSY ) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 4.



Figura 46. Correlação de HMBC de C e N, e COSY na molécula 4.

As informações obtidas desses espectros permitiram associar inequivocamente hidrogênios a carbonos e determinar as vizinhanças dos grupos assim formados; estes dados estão compiladas na Tabela 22.

Substância 4					
Nº C	δ <sup>13</sup> C (ppm)	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm, J em Hz)			
1	63.3	3.94 (dd, 1.32, 3.54)			
2	61.1	4.62 (tt, 3.92, 6.39)			
3	207.2	-			
4	40.0	2.57 (dt, 7.33, 15.01, 17.30)			
5	23.5	1.60 (t, 7.00)			
6-17	22.7, 29.1, 29.3ª, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 31.9	1.22-1.32 (m)			
18	14.1	0.87 (t, 7.00)			
1'	171.0	-			
2'	23.2	2.06 (s)			

Tabela 22. Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H ( $\delta$  em ppm, multiplicidade *J* em Hz) e <sup>13</sup>C (ppm) da sunstância **4** (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

<sup>a</sup>Sinal mais intenso que os outros.

Todas essas informações permitiram também propor para esta substância, de fórmula molecular  $C_{20}H_{39}NO_3$ , a estrutura representada pela Figura 47.



Figura 47. 1-hidroxi-2-acetamida-3-oxooctadecano (4) isolada do extrato diclorometano de L. aldingensis.

Os espectros de infravermelho das substâncias 1-4 apresentaram aspecto bastante semelhante, pois alguns grupos funcionais estão presentes em todas elas. A banda larga entre 3200 e 3400, que corresponde à sobreposição dos estiramentos dos grupos -OH e –NH aparecem em todos os espectros, assim como as bandas (fortes) que correspondem aos estiramentos C-H simétrico e assimétrico (2850 e 2917 cm<sup>-1</sup>, respectivamente). Também a deformação angular da cadeia (CH<sub>2</sub>)n, em 720 cm<sup>-1</sup> (para n>3) e a banda de estiramento da carbonila de amida em 1650 cm<sup>-1</sup>,

são característicos deste conjunto de moléculas. Entretanto, ainda assim é possível distingui-las umas das outras pelos seus espectros de infravermelho, devido a características individuais como a banda de estiramento C=O de cetona em 1713 cm<sup>-1</sup> apresentada pela substância **4**, da banda de estiramento C=O de éster em 1730 cm<sup>-1</sup> para **1** e **2**, e a presença de CH<sub>2</sub> adjacente a carbonila em **4** que resulta em deformação angular em 1400 cm<sup>-1</sup>.

Os esfingolipídeos devem sua importância ao fato de serem componentes estruturais das células eucarióticas (Simon e Vaz 2004). No entanto, suas funções específicas em plantas ainda não estão totalmente esclarecidas, atribuindo-lhes a organização da membrana plasmática (Mongrand *et al.* 2004), a interação em processos de sinalização celular (Ng *et al.* 2001, Nakagawa *et al.*, 2011), a regulação do conteúdo iônico das folhas (Chao *et al.*, 2011), a morte celular programada (Ternes *et al.*, 2011) e a viabilidade dos gametófitos e esporófitos (Dietrich *et al.*, 2008). Quanto ao seu papel no metabolismo de organismos marinhos, ainda é desconhecido.

As ceramidas, que são variantes de esfingolipídeos, têm como função, juntamente com o colesterol e os ácidos graxos livres, formar lamelas que preenchem os espaços intercelulares na camada mais superficial da pele, o extrato córneo. Estes lipídios constituem a camada da pele que impede a perda de água pelo corpo humano, função de máxima importância. As dCer são precursoras das Cer em sua biossíntese de novo promovida pela L-serina e a dupla ligação em sua cadeia carbônica é introduzida pela enzima dCer desaturase (Des). Também suas funções são pouco conhecidas o que as tem tornado alvos de relevantes e numerosos estudos nos últimos anos: as dCer inibem a formação de canais induzidos pelas Cer das membranas mitocondriais, promove a mitigação da morte de células apoptóticas (Stiban e Fistere 2006) e, seu acúmulo nas células pode induzir a autofagia sem que haja sinalização para morte celular (Signorelli *et al.* 2009).

De um modo geral, para o estudo sobre suas funções, são utilizadas dCer sintetizadas a partir de precursores disponíveis comercialmente. Entretanto, nesses trabalhos envolvendo síntese, para a identificação das esfingosinas, foram apresentados dados de análise elementar, espectrometria de massas, ponto de fusão e, para distinção entre os isômeros sintetizados, dados de rotação óptica (Gaver e Sweeley 1966, Weiss e Stiller 1970, Sticht *et al.* 1972).

Em nosso estudo, as esfingosinas foram extraídas de algas, ou seja, são produtos naturais cuja determinação das estruturas foi embasada, também, em experimentos realizados por Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C, informações que até o momento não existiam na literatura.

#### 9.1.2. Terpenos halogenados

A diversidade química encontrada nos terpenos de *Laurencia* tem mantido, por décadas, o interesse de pesquisadores de todo o mundo que buscam novas moléculas. Estas substâncias têmse mostrado, muitas vezes, detentoras de importantes atividades biológicas e de funções ecológicas fundamentais para a sobrevivência dessas macroalgas, no ambiente marinho. Além do mais, muitas das múltiplas atividades que apresentam são de grande interesse para a indústria (Paul 1992, Pereira *et al.* 2003, König e Wright 1997b, da Gama *et al.* 2002).

Também no Brasil, onde diversas espécies do Complexo *Laurencia* são encontradas ao longo da costa, o estudo químico deste grupo de organismos tem-se mostrado promissor. De *L. aldingensis* foram isoladas novas substâncias: a aldingenina A (Carvalho *et al.* 2003) seguida de outras três aldingeninas (B, C e D) (Carvalho *et al.* 2006) (Figura 48). Estes sesquiterpenos tipo-bisabolano tornaram-se marcadores químicos desta espécie brasileira, uma vez que não haviam sido encontrados em outras espécies do complexo *Laurencia*.

O material estudado por Carvalho *et al.* (2003, 2006) foi coletado na Praia dos Castelhanos, ES/Brasil, um dos pontos de coleta também do material do presente estudo, que tem como interesse maior a busca de possíveis atividades biológicas, nesses sesquiterpenos.



Figura 48. Aldingeninas isoladas de Laurencia aldingensis no Brasil (Carvalho et al. 2003 e 2006).

# 9.1.2.1. Substância 5: caespitol

A substância **5** foi isolada como cristal (12,61 mg) e seu espectro de alta resolução foi obtido por CLAE-EM, no modo negativo; nele, foram observados, no íon  $[M+COOH]^-$  os picos de massas m/z 474.9875 / 476.9873 / 478.9871 / 480.9801, com proporção isotópica 7:15:10:2, característicos da presença de halogênios na molécula ou, mais especificamente, de ClBr<sub>2</sub> (Figura 44). A massa calculada para o íon  $[M+COOH]^-$  é m/z 474.9892 (Figura 49).



Figura 49. Espectro de massas do íon molecular [M+COOH]<sup>-</sup> da substância 5.



Figura 50. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância **5** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

A observação do espectro de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 50) permite inferir a presença de três carbonos quaternários ( $\delta$  77,2, 75,5 e 71,8 ppm), quatro carbonos metínicos ( $\delta$  70,9, 63,5, 52,9 e 45,9 ppm), quatro carbonos metilênicos ( $\delta$  42,9, 36.3, 36,2 e 22,7 ppm) e quatro carbonos metílicos ( $\delta$  31,1, 24,2, 24,1 e 19,9 ppm).



Figura 51. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância 5 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

O experimento de RMN de HSQC (Figura 52) permite concluir que os duplos dubletos em  $\delta$  4,37 ppm (dd 12,4, 4,5) e  $\delta$  4,29 ppm (dd 13,2, 4,2) (Figura 51) são gerados pelos hidrogênios ligados aos carbonos metínicos C-2 ( $\delta$  63,5 ppm) e C-10 ( $\delta$  52,9 ppm), carbonos esses pertencentes à função -CHBr. O hidrogênio ligado ao carbono C-8 ( $\delta$  70,9 ppm), mais desblindado por estar, por sua vez, ligado a uma hidroxila, também se desdobra em um duplo dubleto que pode ser observado em  $\delta$  3.57 ppm (dd 3,7, 2,4) (Figura 51).

Neste mesmo espectro, é possível determinar que o carbono quaternário C-1 (δ 71,8 ppm) está ligado ao cloro e os carbonos quaternários mais desprotegidos C-11 (δ 75,5 ppm) e C-7 (δ 77,2 ppm) estão ligados ao grupo funcional éter.



Figura 52. Correlação de HSQC na substância 5 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

Ainda com relação aos dados obtidos por RMN de HSQC (Figura 53), observa-se que os hidrogênios ligados aos carbonos metilênicos C-3 ( $\delta$  36,3 ppm), C-5 ( $\delta$  42,9 ppm), C-6 ( $\delta$  22,7 ppm) e C-9 ( $\delta$  36,2) apresentam sempre dois sinais desdobrados (Tabela 23) e que os sinais dos hidrogênios dos grupos metílicos C-12 ( $\delta$  31,1 ppm), C-13 ( $\delta$  24,1 ppm), C-14 ( $\delta$  19,9 ppm) e C-15 ( $\delta$  24,2 ppm) aparecem mais protegidos e como singletos, em campo mais alto.



Figura 53. Correlação de HSQC na substância 5 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

Na Tabela 23, os resultados dos experimentos de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C aqui observados foram comparados aos obtidos por Carvalho et al. (2006) para a aldingenina C e por Brito et al. (2006) para o caespitol, isolado de *Aplysia dactilomela*.

	substânci	a 5 (presente estudo)	A	Aldingenina C <sup>a</sup>		Caespitol <sup>c</sup>
Nº C	δ <sup>13</sup> C (ppm)	$\delta^{1}$ H (ppm, J em Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm, J em Hz) <sup>b</sup>	δ <sup>13</sup> C (ppm)	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm, J em Hz)
1	71.8	-	71.8	-	72.0	-
2	63.5	4.37 (dd, 12.4, 4.5)	63.5	4.37 (dd, 12.4, 4.5)	63.7	4.34 (dd, 12.4, 4.5)
3	36.3	1.62 (m) 2.28 (m)	36.4	1.66 (m) 2.28 (m)	36.3	1.57 (ddd, 12.6, 12.6, 12.6) 2.21 (m)
4	45.9	1.89 (m)	45.9	1.86 (m)	45.8	1.85 (m)
5	22.7	1.25 (m) 1.85 (m)	22.7	1.22 (m) 1.99 (m)	22.7	1.18 (m) 1.82 (m)
6	42.9	2.04 (ddd, 13.6, 3.7) 2.40 (dt, 13.6, 3.4)	42.9	2.03 (td, 13.4, 3.3) 2.40 (dt, 13.4, 3.3)	42.9	2.00 (ddd, 13.5, 13.5, 3.8) 2.35 (ddd, 13.5, 3.3, 3.3)
7	77.2	-	77.2	-	77.2	-
8	70.9	3.57 (dd, 3.7, 2.4)	70.9	3.57 (dd, 4.0, 2.5)	70.8	3.52 (dd, 3.3, 2.3)
9	36.2	2.23 (dt, 14.2, 4.1) 2.51 (ddd, 13.3, 2.4)	36.3	2.22 (dt, 13.7, 4.0) 2.51 (dt, 13.7, 2.5)	36.2	2.17 (m) 2.46 (ddd, 13.4, 13.4, 2.3)
10	52.9	4.29 (dd, 13.2, 4.2)	52.9	4.29 (dd, 13.7, 4.0)	53.2	4.28 (dd, 13.2, 4.2)
11	75.5	-	75.6	-	75.4	-
12	31.1	1.31 (s)	31.1	1.32 (s)	31.0	1.26 (s)
13	24.1	1.38 (s)	24.1	1.38 (s)	24.0	1.32 (s)
14	19.9	1.14 (s)	19.9	1.14 (s)	19.9	1.08 (s)
15	24.2	1.70 (s)	24.2	1.69 (s)	24.3	1.63 (s)

Tabela 23. Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H ( $\delta$  em ppm, multiplicidade *J* em Hz) e <sup>13</sup>C ( $\delta$  em ppm) (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância **5** e comparação com a literatura.

<sup>a</sup>Carvalho *et al.* 2006 (em CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz). <sup>b</sup>Carvalho *et al.* 2006 (em CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz). <sup>c</sup>Brito *et al.* 2006 (em CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

A comparação entre eles leva à conclusão de que a substância **5** (Figura 54), de fórmula molecular  $C_{15}H_{25}Br_2ClO_2$ , é o caespitol, extraído de *Laurencia caespitosa*, em 1973, por González e colaboradores.



#### Figura 54. Caespitol

Muitos outros sesquiterpenos halogenados, com o mesmo esqueleto carbônico, foram isolados de *Laurencia caespitosa* (Gonzáles *et al.* 1973, 1974, 1979) e da espécie brasileira *Laurencia catarinensis* (Lhullier *et al.* 2010); o caespitol também foi encontrado no molusco conhecido como lesma-do-mar *Aplysia dactilomela* (Wessels *et al.* 2000 e Brito *et al.* 2006).

No presente estudo, aos dados de espectros do caespitol existentes na literatura, acrescentamos as descrições das correlações de HMBC e <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, observadas nos espectros mostrados nas Figura 56 e Figura 57 e esquematizadas na Figura 55.



Figura 55. Correlação de HMBC e <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY na molécula **5**.

As correlações de HMBC observadas entre os grupos de hidrogênios H-12 e H-13 e os carbonos C-10 e C-11 comprovam a posição dos dois grupos metílicos ligados a carbono metínico. As correlações entre o grupo de hidrogênios H-14 e os carbonos C-4, C-7 e C-8 indicam que o carbono C-7 está ligado ao C-4, C-8 e C-14. As correlações entre os hidrogênios metilênicos H-15 com os carbonos C-1, C-2 e C-6 determina a posição do carbono C-1 e a formação do primeiro anel da molécula. O deslocamento químico de C-1 ( $\delta$  71,8 ppm) é indicativo de que o átomo de cloro está ligado a ele. Os deslocamentos químicos de C-7 e C-11 são compatíveis com o efeito de desproteção devida à proximidade de átomo de oxigênio, levando a conclusão de que, um oxigênio está posicionado entre esses carbonos, fechando o segundo anel da molécula.

O espectro de <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY mostra a correlação entre os hidrogênio H-2 com H-3 e H-4 com H-5 em um dos anéis e a correlação entre os hidrogênios H-8 com H-9 e entre os hidrogênios H-9 com H-10, no outro anel.



Figura 56. Correlação de HMBC na substância 5 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).



Figura 57. Mapa de contorno 2D de correlações de <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H (COSY ) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância **5**. Tabela 24. Valores de absorção no espectro do infravermelho para os grupos funcionais do composto **5**.

Frequência dos grupos (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais/atribuição
3500	estiramento -OH
2849-2917	estiramento C-H alifáticos simétricos e assimétricos
1381	deformação angular do CH <sub>3</sub>
1100	estiramento C-O de álcool secundário
1122/1070	estiramento C-O de éter (duas bandas)
1058	deformação axial de álcool secundário
972	deformação angular de -OH fora do plano
732	estiramento C-Cl
654	estiramento C-Br

No espectro de infravermelho (Tabela 24), a presença das duas bandas em 1122/1070 cm<sup>-1</sup> atribuídas ao C-O de éter, das bandas 732 e 654 cm<sup>-1</sup> devidas a estiramentos C-Cl e C-Br, respectivamente, confirmam as presenças de grupo éter e de halogênio na molécula. González *et* 

*al.* (1973) também atribuíram as bandas em  $v_{\text{Max}}^{\text{KBr}}$  3540, 3320, 1460, 1220, 970 e 785 cm<sup>-1</sup>, valores semelhantes aos por nós encontrados.

A aldingenina C, que é na realidade é o caespitol, foi sintetizada por Takahashi *et al.* (2014), que retificou a estereoquímica de hidrogênios, na estrutura apresentada por Carvalho *et al.* (2006). No presente estudo, confirmamos a presença do caespitol em *L. aldingensis* do Brasil.

## 9.1.2.2. Substância 6: 5-hidroxicaespitol

A substância **6**, que foi isolada como pó branco (3,47 mg), em análise por CLAE-EM, apresentou pico em 17.23 min (Figura 58-A).



Figura 58. Cromatograma obtido por CLAE da substância **6** representado pelo pico em 27.23 min (A) e espectro de massas dos picos dos íons moleculares  $[M-H]^-(B) e [M+COOH]^-(C)$ .

Experimento em espectrômetro de massas de alta resolução (HRESIMS) Q-TOF (Agilent), operando em modo negativo e com ionização por electrospray forneceu os picos do íon moleculares  $[M-H]^-$  m/z 444.9776 / 446.9757 / 448.9734 / 450.9715 (B) e picos do íon molecular  $[M+COOH]^-$  m/z 490.9833 / 492.9814 / 494.9790 / 496.9768, nas proporções isotópicas de ClBr<sub>2</sub> (7:15:10:2) (Figura 58-C e B). A massa molecular calculada para essa molécula é 448,6182.

A análise conjunta dos espectros de <sup>13</sup>C RMN e de APT permitiu estabelecer a presença de 15 picos, correspondentes a três carbonos quaternários ( $\delta$  78,1, 76,0 e 71,8 ppm), cinco carbonos pertencentes a grupos metínicos ( $\delta$  72,3, 67,7, 64,1, 52,3 e 50,2 ppm), três carbonos de grupos metilênicos ( $\delta$  50,0, 36,1 e 32,0 ppm) e quatro carbonos de grupos metílicos ( $\delta$  30,8, 28,1, 24,2 e 24,1 ppm).



Figura 59. Espectro de <sup>13</sup>C RMN da substância (6) (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).



Figura 60. Espectro de APT da susbtância 6 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

De um modo geral, os valores dos deslocamentos químicos relativos aos sinais observados para a substância **6**, tanto no espectro de <sup>13</sup>C quanto no de <sup>1</sup>H, são bastante semelhantes aos vistos nos espectros correspondentes da substância **5**, o caespitol. Porém, na substância **5**, o carbono C-5 participa de um grupo metilênico (CH<sub>2</sub>) cujos hidrogênios aparecem como dois multipletos, em campo mais alto ( $\delta$  1,25 e 1,85 ppm) e o sinal do C-5 é visto em  $\delta$  22,7 ppm, enquanto que na substância **6** este mesmo carbono aparece em  $\delta$  67,7 ppm. O deslocamento do sinal deste carbono para campo mais baixo condiz com o fato de um de seus ligantes ser uma hidroxila; devido a isso, o único hidrogênio deste grupo metínico (CH), mais desblindado devido à proximidade da hidroxila, dá origem a um duplo dubleto largo, em  $\delta$  4,51 ppm ( $\delta$  3,1, 2,7 Hz) (Figura 61).



Figura 61. Espectro de <sup>1</sup>H RMN da substância 6 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

O experimento de Hetcorr, realizado com a substância **6**, mostra a correlação entre o C-5 e o hidrogênio a ele ligado (Figura 62).



Figura 62. Espectro de Hetcorr da substância 6 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

Todas as correlações diretas entre carbonos e hidrogênios da molécula da substância **6** (espectro Hetcorr) podem ser observadas nas Figura 62 e Figura 63.



Figura 63. Espectro de Hetcorr da substância 6 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz).

A substância **6** foi isolada de *L. aldingensis* por Carvalho e colaboradores (2003), que a denominaram aldingenina A; entretanto, este sesquiterpeno teve sua estrutura retificada por técnicas computacionais, por Mukhina e colaboradores (2015), que concluíram ser ele o já conhecido 5-hidrocaespitol, cuja fórmula molecular é  $C_{15}H_{25}Br_2ClO_3$  (Figura 64).



Figura 64. 5-hidroxicaespitol

As constantes de acoplamento do H-2 (*J* 11.6, 5.2 Hz) e os deslocamento químicos de RMN <sup>13</sup>C dos carbonos C-1, C-2 e C-15 estão de acordo com a regioquímica e com a configuração de sistemas di-haleto vicinais cloro-bromo presentes em anéis ciclohexânicos em conformação em cadeira, observado também no 5-hidroxicaespitol (**6**). Esse mesmo sistema ocorre no caespitol (**5**) e na substância **7**, que será descrita a seguir.

Os dados dos deslocamentos químicos de hidrogênio e de carbono da substância **6** foram comparados aos obtidos por análise computacional por Mukhina *et al.* 2015 e aos apresentados por Carvalho *et al.* (2003). Entretanto, as análises de RMN desses últimos autores foram realizadas em benzeno-*d*6, o que explica as diferenças existentes entre os valores dos deslocamentos químicos, principalmente os de RMN de <sup>1</sup>H, por nós e por eles encontrados (Tabela 25).

Neste trabalho, estão sendo apresentadas as primeiras informações sobre as correlações de HMBC (Figura 65), levando-se em consideração a estrutura da substância **6** retificada.



Figura 65. Correlações de HMBC para a substância 6.



Figura 66. Espectro de HMBC da substância 6 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

As correlações observadas no espectro de HMBC da substância **6** são bastante similares àqueles da substância **5**. As correlações entre os hidrogênios H-12 e H-13 e os carbonos C-10 e C-11 confirmam a presença de dois grupos metilícos ligados ao C-11. As correlações entre os hidrogênios H-14 e os carbonos C-4, C-7 e C-8 indicam que o carbono C-7 está ligado ao C-4, C-8 e C-14 (Figura 66), o que é corroborado pela correlação entre o hidrogênio H-8 e os carbonos C-7, C-9, C-10 e C-14. As correlações entre os hidrogênios metilênicos H-15 e os carbonos C-1, C-2 e C-6 confirmam a posição do carbono C-1 e também a formação do primeiro anel da molécula. O átomo de cloro está ligado ao carbono C-1, desblindando-o e fazendo com que seu sinal apareça em campo mais baixo ( $\delta$  71,8 ppm), situação idêntica à observada na substância **5**. Os átomos de bromo estão ligados aos carbonos C-2 ( $\delta$  63,5 ppm) e C-10 ( $\delta$  52,3 ppm), cujos deslocamentos químicos são bastante semelhantes aos deslocamentos correspondentes apresentados pela substância **5** ( $\delta$  63,5 e 52,9 ppm, respectivamente). O átomo de oxigênio está entre os carbonos C-7 e C-11, fechando o segundo anel da molécula.

A hidroxila ligada ao carbono C-5 ( $\delta$  67,7 ppm) desblinda também os carbonos vizinhos C-4 ( $\delta$  50,2 ppm) e C-6 ( $\delta$  50,0 ppm), que aparecem em campo mais baixo do que os carbonos correspondentes, na substância **5**, que, por estarem mais protegidos, apresentam deslocamentos químicos cujos valores são respectivamente  $\delta$  45,9 e 42,9 ppm.

	substânci	a 6 (presente estudo)		Aldingenina A <sup>a</sup>	<i>DU8</i> -calc 5-(S)-hidroxicaespitol <sup>b</sup>
Nº C	δ <sup>13</sup> C (ppm)	δ <sup>1</sup> H (ppm, J em Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm, <i>J</i> em Hz)	$\delta$ <sup>1</sup> H ( <i>J</i> em Hz)
1	71.8	-	72.2	-	
2	64.1	4.37 (dd, 11.6, 5.2)	64.0	4.26 (dd, 12.9, 4.2)	12.9, 4.4
3	32.0	2.36 (dd, 13.4, 12.3) 2.58 (14.5, 3.2)	33.4	2.05 (dddd, 12.9, 4.2, 2.6, 1.5) 2.21 (q, 12.9)	13.3, 4.4, 2.9, 1.6 13.3, 13.2, 12.9
4	50.2	1.94 (dt, 13.5, 2.1)	49.9	1.59 (dt, 12.9, 2.7)	13.2, 2.9
5	67.7	4.51 (br dd, 3.1, 2.7)	67.1	3.88 (m)	3.5, 2.7
6	50.0	2.30 (dt, 14.3, 2.6) 2.56 (dd, 14.1, 2.6)	51.5	1.74 (dd, 14.5, 2.7) 2.10 (dd, 14.5, 3.1)	14.3, 2.7 14.3, 3.5
7	78.1	-	77.3	-	
8	72.3	3.66 (t, 3.2)	72.7	2.77 (t, 3.0)	3.2, 2.9
9	36.1	2.22 (br dt, 14.1, 3.8) 2.51 (d, 2.7)	37.3	1.84 (dt (14.1, 13.2, 3.0) 2.13 (ddd, 14.1, 13.2, 3.0)	14.2, 4.1, 3.2 14.2, 13.6, 2.9
10	52.3	4.34 (dd, 13.2, 4.1)	52.9	4.31 (dd, 13.2, 4.1)	13.6, 14.1
11	76.0	-	75.0	-	
12	30.8	1.42 (s)	31.4	1.28 (s)	
13	24.1	1.37 (s)	24.2	1.25 (s)	
14	24.2	1.29 (s)	23.3	0.80 (s)	
15	28.1	1.91 (s)	28.6	1.93 (s)	

Tabela 25. Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H ( $\delta$  em ppm, multiplicidade *J* em Hz) e <sup>13</sup>C ( $\delta$  em ppm) (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância **6** e comparação com a literatura.

<sup>a</sup>Carvalho et al. 2003 (benzeno-d6, 500 MHz). <sup>b</sup>Mukhina et al. 2015 (dados computacionais, J's em Hz, calculados).

Frequência dos grupos (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais/atribuição
3500	estiramento -OH
2941	estiramento C-H alifáticos simétricos e assimétricos
1716	carbonila do acetato
1381	deformação angular do CH <sub>3</sub>
1280	estiramento C-O de éster
1100	estiramento C-O de álcool secundário
1120/1070	estiramento C-O de éter
1058	deformação axial de álcool secundário
982	deformação angular de -OH fora do plano
744	estiramento C-Cl
643	estiramento C-Br

Tabela 26. Valores de absorção no espectro do infravermelho para os grupos funcionais da substância 6.

No espectro de infravermelho, as bandas intensas em 3500 e 982 cm<sup>-1</sup>, devidas ao estiramento e deformação angular fora do plano, respectivamente, podem ser atribuídas às hidroxilas; as bandas intensas em 1058 cm<sup>-1</sup>, à deformação axial do C-O de álcool secundário. As presenças do cloro e dos bromos em posição equatorial e axial na molécula têm confirmação nas bandas em 744 e 643 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. (Tabela 26).

## 9.1.2.3. Substância 7: 5-acetoxicaespitol

A substância **7** foi isolada como um óleo incolor (6,42 mg) cujo espectro de massas de alta resolução (HRESIMS), obtido no modo positivo, exibiu picos em m/z 532.9962 / 534.9942 / 536.9922 / 538.8806, na proporção isotópica de 7:15:10:2, característica da presença de um átomo de cloro e dois átomos de bromo, na molécula (Figura 67).



Figura 67. Espectro de massas de alta resolução da substância 7.

Na Tabela 27 estão reunidos os dados de infravermelho da substâ	ncia <b>7.</b>
---	----------------

Frequência dos grupos (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais/atribuição
3500	estiramento -OH
2934	estiramento C-H alifáticos simétricos e assimétricos
1716	carbonila do acetato
1385	deformação angular do CH <sub>3</sub>
1238	estiramento C-O de éster
1127	estiramento C-O de álcool secundário
1156/1073	estiramento C-O de éter
1058	deformação axial de álcool secundário
975	deformação angular de -OH fora do plano
749	estiramento C-Cl
640	estiramento C-Br

Tabela 27. Valores de absorção no espectro do infravermelho para os grupos funcionais do composto 7.

No espectro de infravermelho, foram observadas bandas em 1716 e 1238 cm<sup>-1</sup> que, em conjunto, indicam, respectivamente, as presenças da carbonila e do grupo C-O de éster. Estas bandas não foram vistas nos espectros das substâncias **5** e **6**, constituindo, portanto, uma marcante diferença entre a estrutura destas substâncias e a da substância **7**.

Perfil semelhante ao observado no espectro de IR de **7**, foi obtido de substância isolada de *L. catarinensis* (bandas IV $\nu_{max}$  3502, 2986, 1734, 1458, 1384, 1239, 1071, 739 cm<sup>-1)</sup> por Lhullier et al. (2010).

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C foram contados 17 picos sendo quatro atribuíveis a carbonos quaternários ( $\delta$  169,4, 76,4, 75,7 e 70,7 ppm), cinco a carbonos pertencentes a grupos metínicos ( $\delta$  70,6, 69,2, 62,7, 52,3 e 46,4 ppm), três a carbonos de grupos metilênicos ( $\delta$  46,5, 35,8, 32,5 ppm) e cinco a carbonos de grupos metílicos ( $\delta$  30,9, 27,5, 24,0, 21,5 e 21, 4 ppm) (Figura 68).



Figura 68. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da susbtância 7 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

Os sinais de ressonância que aparecem em campo mais baixo e cujos deslocamento químico são  $\delta$  52,3, 62,7, 69,2, são devidos aos carbonos ligados diretamente a átomos de halogênio e os sinais em  $\delta$  70,6, 70,7, 75,7 e 76,4 ppm correspondem aos carbonos ligados a átomos de oxigênio.

Os espectros da substância **7** são bastante semelhantes aos das substâncias **5** e **6**, delas diferindo principalmente pela presença de grupo acetóxi ligado ao carbono C-5; este grupo foi identificado pelos sinais em  $\delta$  169,4 ppm característico de carbonila e em  $\delta$  21,4 ppm, devido a carbono pertencente a grupo metílico (Figura 70), cujos hidrogênios aparecem como um singleto em  $\delta$  2,05 (s) ppm.

Os dados dos experimentos de RMN 1D e 2D, juntamente com informações da literatura, mostraram que a substância 7 é o 5-hidroxicaespitol, isolado por Lhullier *et al.* (2010) da alga marinha brasileira *Laurencia catarinensis* e por Carvalho *et al.* (2006), da espécie *L. aldingensis*, tendo sido denominado previamente, por estes últimos autores, como aldingenina D.

Neste estudo, dados moleculares atestam a proximidade filogenética entre as espécies *L. catarinensis* e *L. aldingensis*. Proximidade esta corroborada pela coincidência da síntese do 5-hidroxicaespitol por ambas as espécies; essa substância não foi encontrada em nenhuma outra espécie do complexo *Laurencia*, até o presente momento.



Figura 69. Espectro de HSQC da substância 7 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).



Figura 70. Espectro de HSQC da substância 7 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

Nos experimentos de HSQC (Figura 69 e Figura 70), constatou-se que o sinal do hidrogênio em  $\delta$  3,57 ppm (t, 3.0) está correlacionado ao sinal do carbono C-8, cujo pico aparece em  $\delta$  70.6 ppm, um pouco mais protegido do que o C-1 ( $\delta$  70,7 ppm). A maior blindagem de C-8 é explicada pela menor eletronegatividade do átomo de oxigênio do grupo hidroxila, ligado ao carbono C-8, em comparação com a eletronegatividade do átomo de cloro ligado ao carbono C-1. Os dados de HMBC (Figura 72) mostram a correlação entre os hidrogênios H-14 e os carbonos C-4, C-7 e C-8. Ainda no espectro HMBC, as correlações entre os hidrogênios H-12 e H-13 e os carbonos C-10 e C-11 confirmam a posição do C-11 ( $\delta$  75,7 ppm) na molécula (Figura 71). Estas correlações permitem retificar dados da literatura, que apresentam os sinais dos deslocamentos químicos dos carbonos C-1 ( $\delta$  70,4 ppm) e C-8 ( $\delta$  70,7) permutados entre si, assim como os de C7 ( $\delta$  75,5 ppm) e de C-11 ( $\delta$  76,4 ppm) (Lhullier *et* al.,2010) (Tabela 28).



Figura 71. Representação da correlação de HMBC e COSY na substância 7.



Figura 72. Correlação de HMBC na substância 7(CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

	substância 7 (presente estudo)		Aldingenina D <sup>a</sup>		(5S)-5-acetoxicaespitol	
Nº C	δ <sup>13</sup> C (ppm)	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm, <i>J</i> em Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm)	δ <sup>1</sup> H (ppm, J em Hz)	δ <sup>13</sup> C (ppm) <sup>b</sup>	δ <sup>1</sup> H (ppm, J em Hz) <sup>c</sup>
1	70.7	-	70.7	-	70.4	-
2	62.7	4.44 (dd, 11.4, 5.1)	62.7	4.44 (dd, 11.7, 4.9)	62.7	4.41 (dd, 11.3, 5.0)
3	32.5	2.10 (m), 2.1 (s)	32.5	1.42 (m), 2.30 (dt, 11.7, 2.8)	32.4	2.07 (m), 2.05 (m)
4	46.4	2.30 (brd, 12.4)	46.4	2.34 (m)	46.2	2.29 (brd, 11.4)
5	69.2	5.44 (brdd, 5.4, 2.7)	69.3	5.44 (d, 2.6)	69.4	5.40 (brs)
6	46.5	2.21 (m) 2.74 (dd, 15.0, 3.0)	46.4	2.20 (m) 2.74 (dd, 15.0, 3.1)	46.4	2.20 (m) 2.69 (dd, 15.0, 2.9)
7	76.4	-	76.6	-	75.5	-
8	70.6	3.57 (t, 3.0)	70.6	3.58 (t, 3.3)	70.7	3.53 (brs)
9	35.8	2.21 (m), 2.56 (m)	35.9	2.19 (m) 2.56 (td, 13.3, 2.4)	35.7	2.16 (m) 2.51 (ddd, 13.9, 13.2, 2.3)
10	52.3	4.27 (dd, 13.3, 4.1)	52.3	4.27 (dd, 13.3, 4.1)	52.4	4.25 (dd, 13.2, 3.8)
11	75.7	-	75.7	-	76.4	-
12	30.9	1.31 (s)	30.9	1.31 (s)	30.8	1.26 (s)
13	24.0	1.34 (s)	24.0	1.34 (s)	23.9	1.29 (s)
14	21.5	1.18 (s)	21.5	1.18 (s)	21.4	1.12 (s)
15	27.5	1.77 (s)	27.5	1.78 (s)	27.3	1.73 (s)
5-OAc	169.4 (C)	-	169.3	-	169.6	-
5-OAc	21.4 (CH <sub>3</sub> )	2.05 (s)	21.4	2.05 (s)	21.3	2.02 (s)

Tabela 28. Deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H ( $\delta$  em ppm, multiplicidade *J* em Hz) e <sup>13</sup>C ( $\delta$  em ppm) (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da susbtância 7 e comparação com a literatura

<sup>a</sup>Carvalho et al. 2006 (em CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) <sup>b</sup>Lhullier et al. 2010 (em CDCl<sub>3</sub>, 50.3 MHz). <sup>c</sup>Lhullier et al. 2010 (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

No presente estudo, podemos assegurar que a aldingenina D de *L. adingensis* do Brasil é 5acetoxicaespitol de formula molecular  $C_{17}H_{27}Br_2ClO_4$  e massa molecular 490,6549.

No ensaio com as linhagens de células tumorais HT29, MCF7 e A431 apresentado por Lhulier *et al.* (2010) a substância **5**, o (*S*), 5-acetoxicaespitol, apresentou-se como uma das duas substâncias mais ativas (IC<sub>50</sub> 12  $\mu$ M), embora sua atividade não tenha sido atribuída à presença de quaisquer dos grupos funcionais da molécula.

No presente estudo, das quatro aldingeninas (A-D) isoladas por Carvalho e colaboradores (2003, 2006) da espécie *L. aldingensis* brasileira, três delas também o foram por nós; além disso, tiveram suas estruturas revisadas, de modo que podemos concluir que a aldingenina A é o 5-hidroxicaespitol, a aldingenina C é o caespitol, e a aldingenina D é o 5-acetoxicaespitol.

A presença compartilhada por *L. aldingensis* e *L. catarinensis*, do 5-acetoxicaespitol sustenta a relação filogenética próxima entre estes dois táxons, mostrada nas árvores filogenéticas de COI-5P e *rbc*L enraizadas em NJ (ver seções 5.6.2 e 5.6.3).

Outras substâncias halogenadas, diferente dos terpenos tipo chamigranos e novos para a literatura foram isolados de *L. aldingensis* e estão descritos s seguir.

### 9.1.3. Outras substâncias halogenadas

9.1.3.1.Substância 8



Figura 73. Substância 8.

A substância **8** foi isolada na forma de um pó branco (1,4 mg) e seu espectro de massas de alta resolução, que foi obtido por CLAE-EM, Q-TOF (Agilent), no modo negativo, com ionização por electrospray, mostrou a série de picos  $[M-H]^-$  m/z 320,9883 / 322,9863 / 324,9837; cujas proporções indicam a presença de um cloro e um bromo na molécula (Figura 74). A massa calculada para o íon  $[M-H]^-$  é m/z 320,9899.



Figura 74. Espectro de massas da substância 8.

A observação do espectro de RMN de <sup>13</sup>C permite inferir a presença de 12 carbonos, sendo quatro carbonos quaternários ( $\delta$  170,6, 153,9, 143,1, 70,5 ppm), três metínicos ( $\delta$  120,4, 61,1, 36,0 ppm), quatro metilênicos ( $\delta$  94,5, 42,4, 41,2, 29,7 ppm) e um metílico ( $\delta$  24,0 ppm) (Figura 75).

O carbono C-1, em  $\delta$  61,1 ppm tem deslocamento característico de C ligado a átomo de bromo e o hidrogênio ligado a este carbono aparece como duplo dubleto em  $\delta$  4,42 ppm (*J* 4.3, 12.6 Hz) (Figura 76).

O deslocamento de C-2 ( $\delta$  70,5 ppm) indica que este carbono está ligado á átomo de cloro, o que mais desprotegido. O C-2 é um carbono quaternário, observação comprovada pela ausência de correlação direta com hidrogênios, no espectro de HSQC (Figura 77) e está ligado ao grupo metílico com centro em C-12 ( $\delta$  24.00 ppm). No espectro de HMBC, os hidrogênios H-12, que

aparecem como um singleto em  $\delta$  1,76 ppm, estão correlacionados aos carbonos C-1, C-2 e C-3, determinando a posição do C-12 na molécula.

Cada um dos hidrogênios ligados aos carbonos de grupos metilênicos C-3, C-4 e C-6 apresentam dois sinais de ressonância: H-3 aparece como um duplo duplo dupleto largo em  $\delta$  2,20 ppm (*J* 4.3, 12.6 Hz) e como um multipleto em  $\delta$  2,51 ppm; H-4, como um multipleto em  $\delta$  1,61 ppm e como um duplo multipleto em  $\delta$  1,93 ppm e H-6, como um duplo duplo dupleto em  $\delta$  2,02 ppm e como um multipleto em  $\delta$  2,46 ppm.

O hidrogênio H-5, ligado o carbono metínico, é mais desprotegido que H-3, H-4 e H-6 e aparece pode ser observado em  $\delta$  2,67 ppm (ttt, *J* 3.6, 12.3 Hz).

No espectro de HMBC, os hidrogênios H-3 apresentam correlação com C-1, C-2, C-4, C-5 e C-12, assim como os hidrogênios H-6 estão relacionados aos C-1 e C-5, mostrando que estes carbonos pertecem a um anel de 6 membros (Figura 78).



Figura 75. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância 8.



Figura 76. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância 8.





Os sinais em  $\delta$  170.6 a  $\delta$  94,5 ppm são devidos a carbonos sp<sup>2</sup> (C-7,C-8, C-9, C-10 e C-11), sendo o C-11 o centro de um grupo metilidênico cujos hidrogênios são responsáveis pelo tripleto em  $\delta$  4,95 ppm (*J* 2,0 Hz) e pelo dupleto largo em  $\delta$  4,90 ppm (*J* 2,2 Hz) (Figura 76). O C-10 apresenta deslocamento  $\delta$  153,9 ppm, que é indicativo de alceno com substituinte polar (-OH). O C-9

aparece em  $\delta$  170,6 ppm, deslocamento característico de grupamento éster com carbonos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados (-C=C-COOH) (Silverstein, 1994). O carbono metínico C-8 ( $\delta$  120,4 ppm) está ligado ao hidrogênio mais desblindado de todos, que aparece como um multipleto em  $\delta$  5,94 ppm.

No espectro HMBC, são observadas correlações entre o hidrogênio H-8 e os carbonos C-7, C-9 e C-10 que determinam a posição do C-8 (δ 75,7 ppm), na molécula. Neste mesmo espectro, a posição do C-11 é determinada pelas correlações encontradas entre o H-11 e os carbonos C-7 e C-10 (Figura 78 e Figura 80).



Figura 78. Espectro de RMN de HMBC da substância 8 (CDCl<sub>3</sub> a 400 MHz).

Nos espectros de ressonância de <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY são observadas as correlações entre H-1 e H-6, H-6 e H-5 assim como entre H-3 e H-4, que fazem parte do anel da molécula. Na cadeia lateral, temse a correlação entre H-8 e H-11, passando pelos carbonos quaternários C-7 e C-10 que, por não apresentarem hidrogênios diretamente ligados a eles, não apresentam sinais de correlação de <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (Figura 79 e Figura 80).



Figura 79. Mapa de contorno 2D de correlações de <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H (COSY ) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 8.



Figura 80. Correlação de HMBC e COSY na molécula 8.

A Tabela 29 mostra os dados dos deslocamentos químicos de RMN de <sup>13</sup>C e de <sup>1</sup>H obtidos na análise da molécula **8**.

Tabela 29. Deslocamentos químicos de RMN de ${}^{13}$ C ( $\delta$ em ppm) de ${}^{1}$ H ( $\delta$ em ppm, multiplicidade .	J em
Hz) da molécula 8 (em CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).	

N° C	$\delta^{13}$ C (ppm)	$\delta^{1}$ H (ppm, J em Hz)
1	61.1	4.42 (dd, 4.3, 12.6)
2	70.5	-
3	42.4	2.20 (br ddd 3.9, 13.8); 2.51 (m)
4	29.7	1.93 (dm, 14.2), 1.61 (m)
5	36.0	2.67 (ttt, 3.6, 12.3)
6	41.2	2.02 (ddd 12.3, 12.3, 13.8); 2.46 (m)
7	143.3	-
8	120.4	5.94 (m)
9	171.0	-
10	154.2	-
11	94.5	4.89 (br d 2.3); 4.95 (dd, 1.9, 2.3)
12	24.0	1.76 (s)

No espectro de infravermelho (Tabela 30) foram observadas: banda em  $v_{max}$  em 3300 cm<sup>-1</sup> devida ao estiramento –OH; banda intensa em 1710 cm<sup>-1</sup> atribuída ao estiramento de carbonila de ácido carboxílico; banda de média intensidade, em 1051 cm<sup>-1</sup>, que corresponde aos estiramentos de C-O; e as bandas em 710 e 650 cm<sup>-1</sup> devidas aos estiramentos de C-Cl e C-Br, respectivamente.
Frequência dos grupos (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais/atribuição
3200 - 3400	estiramento -OH
2860-2980	estiramento -CH para carbono sp3
1710	estiramento C=O de ácido carboxílico
1450	deformação angular do CH <sub>2</sub>
1390	deformação angular do CH3
1051	estiramento C-O
710	estiramento C-Cl
653	estiramento C-Br

Tabela 30. Valores de absorção dos grupos funcionais da substância **8**, obtidas por espectroscopia de infravermelho.

A substância **8** de massa molecular 321,9971 e cuja fórmula molecular é  $C_{12}H_{16}BrClO_3$ , está sendo descrita pela primeira vez no presente trabalho.

## 9.1.3.2. Substância 9



Figura 81. Estrutura molecular da substância 9.

A substância **9** (Figura 81) foi isolada como um óleo (3,43 mg) e seu espectro de massas de alta resolução, obtido por CLAE-APCI-EM, no modo negativo, exibiu picos em m/z 323.0228 / 324.0249 / 325.0213 / 326.0231 cujas proporções eram características da presença de 1 átomo de bromo na molécula (Figura 82).



Figura 82. Espectro de massas de alta resolução da substância 9 obtido por CLAE-APCI-EM.

No espectro de infravermelho, foram observadas duas bandas bem intensas em 1130 e 804 cm<sup>-1</sup> a primeira devida aos estiramentos C-O e a última, ao anel aromático para- e meta- substituído além de banda em 1250 cm<sup>-1</sup> devida ao estiramento C-O de fenol (Tabela 31).

Tabela 31.	Bandas de absorçã	io, observadas no	o espectro do	o infravermelho.	atribuídas aos	grupos funcionai
da substân	cia <b>9</b> .					

Frequência dos grupos (cm <sup>-</sup> 1)	Grupos funcionais/atribuição
3400 - 3200	estiramento -OH
2980-2850	estiramento -CH para carbono sp3
1710-1640	combinação de bandas do anel aromático
1475, 1600	estiramento C=C do anél
1450	deformação angular do CH2
1390	deformação angular do CH3
1250	estiramento C-O de fenol
1130	estiramento C-O
950	estiramento -CH=CH-
850	Estiramento –C-O-O-C-
804	anél aromático para- e meta- substituído
660	estiramento C-Br

A baixa intensidade da banda em  $3200-3400 \text{ cm}^{-1}$ , que corresponde às vibrações de estiramento da ligação O-H do grupo hidroxila, sugere a presença de uma única hidroxila na molécula. No presente caso, este grupo está ligado a anel aromático, pois é possível observar absorção devida ao estiramento de C-O de fenol em 1250 cm<sup>-1</sup>.

Também foram assinaladas bandas de estiramento de peróxidos em 850 cm<sup>-1</sup> que são geralmente muito fracas e por isso menos empregadas na resolução de espectros de infravermelho; essas bandas são mais visíveis no espectro Raman (Coates, 2000). Essas absorções sugerem que dois outros oxigênios da molécula possam formar um grupo peróxido.

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C foram detectados 15 picos sendo seis devidos a carbonos quaternários ( $\delta$  154,3, 149,7, 133,9, 127,7, 112,0, 72,4 ppm), quatro a carbonos pertencentes a grupos metínicos ( $\delta$  123,5, 118,6, 111,0, 66,8 ppm), um a carbono de grupo metilênico ( $\delta$  30,5 ppm) e quatro a carbonos de grupos metílicos ( $\delta$  27,3, 26,1, 21,7, 8,1 ppm) (Figura 83).

Os carbonos mais desprotegidos, com deslocamentos químicos em  $\delta$  154,3 (C-1') e 149,7 (C-3) ppm, correspondem aos carbonos quaternários insaturados e ligados a átomos de oxigênio.



Figura 83. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da susbtância 9.

Os sinais dos outros carbonos do anel aromático e do carbono insaturado ligado diretamente a ele aparecem na região entre  $\delta$  111,0 e 134,0 ppm: particularmente, os relativos aos outros carbonos quaternários do anel surgem em  $\delta$  133,8 ppm (C-3') e  $\delta$  127,7 ppm (C-6').

Os carbonos metínicos desse anel apresentam os sinais de hidrogênio mais desprotegidos (Figura 85). O pico que corresponde ao carbono C-2' pode ser visto em  $\delta$  111,0 ppm; o hidrogênio a ele ligado aparece como um multipleto em  $\delta$  7,19 ppm. O carbono C-4' é responsável pelo sinal em  $\delta$  123,5 ppm e o hidrogênio a ele ligado, pelo duplo multipleto em  $\delta$  7,04 ppm (7,8 Hz). O pico devido ao C-5' aparece em  $\delta$  118,6 ppm e o hidrogênio a ele ligado, como um dubleto em  $\delta$  7,33 ppm (7,8 Hz) (Figura 84). Estes carbonos, juntamente com o C-1' ( $\delta$  154,3 ), formam o anel aromático da molécula.



Figura 84. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 9.



Figura 85. Espectro de HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 9.

O sinal devido ao único carbono metilênico da molécula (C-4) pode ser visto em  $\delta$  31,6 ppm, e os sinais de seus dois hidrogênios, em  $\delta$  3,20 ppm (dd 11,1, 15,5 Hz) e  $\delta$  3,41 ppm (ddm 3,1, 15,5 Hz), os quais aparecem marcados em verde, no espectro de HSQC (Figura 85).

Os quatro simpletos observados no espectro de <sup>1</sup>H RMN, nos deslocamentos  $\delta$  1,46 ppm,  $\delta$  1,47 ppm,  $\delta$  2,17 ppm e  $\delta$  2,45 ppm correspondem, respectivamente, aos carbonos metílicos C-8 ( $\delta$  26,1 ppm), C-7 ( $\delta$  27,3 ppm), C-1 ( $\delta$  8,14 ppm) e C-7'( $\delta$  21,7 ppm).

O carbono metínico C-5 ( $\delta$  66,8 ppm) apresenta deslocamento químico característico de átomo ligado a bromo. A presença de um átomo de bromo na molécula é corroborada com dados observados nos espectros de IV (Tabela 31No espectro de infravermelho, foram observadas duas bandas bem intensas em 1130 e 804 cm-1 a primeira devida aos estiramentos C-O e a última, ao anel aromático para- e meta- substituído além de banda em 1250 cm-1 devida ao estiramento C-O de fenol (Tabela 31).

Tabela 31) e de massas (Figura 82). Os hidrogênios ligados ao carbono C-5 aparecem como um duplo dupleto em  $\delta$  4,49 ppm (3,1, 11,1 Hz).



Figura 86. Espectro de HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 9.

As correlações de HMBC observadas entre os hidrogênios H-7' e os carbonos C-2', C-3' e C-4' confirmam a localização desse grupo metílico no anel aromático. A posição do grupo metílico C-1 foi confirmada também pela correlação existente, neste mesmo espectro de HMBC, entre os hidrogênios H-1 e os carbonos C-2, C-3 e C-6' (Figura 86).

Já as correlações de HMBC observadas entre o grupo de hidrogênios H-7 e o carbono C-8 e o dos hidrogênios H-8 e o carbono C-7, juntamente com a correlação entre ambos os grupos com os carbonos C-6 e C-5 comprovam o posicionamento destes dois grupos metílicos como ligantes do carbono metínico C-6 (Figura 86).

O espectro de <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (Figura 87) mostra a correlação entre os hidrogênios H-4 e H-5; no espectro de HMBC, as correlações entre o H-4 e os carbonos C-5, C3, C-2 e C-6, posicionam o carbono metilênico (C-4), na molécula. Os valores do deslocamento químico do carbono quaternário insaturado C-3 (δ 149,7 ppm) e do carbono quaternário saturado C-6 (δ 72,4 ppm) mostram que os mesmos estão ligados a átomos de oxigênio. A reunião desses dados sugere fortemente que os carbonos C-3, C-4, C-5 e C-6 formam um heterociclo oxigenado (Figura 88),

parte integrante de um sesquiterpeno com esqueleto semelhante ao yingzhaosu C, isolado de *Artabotrys unciatus* (L.) *Meer.*, cujo extrato possui atividade anti-malárica (Zhang et al. 1988).



Figura 87. Mapa de contorno 2D de correlações de <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H (COSY ) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância **9**. Não há dados, na literatura, sobre isolamento anterior deste sesquiterpeno (substância 9), presente em macroalga marinha; os dados relativos aos seus estudos espectroscópicos (RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H) encontram-se compilados na Tabela 32.



Figura 88. Representação da correlação de HMBC e COSY na substância 9.

N° C	$\delta^{13}$ C (ppm)	$\delta^{1}$ H (ppm, J em Hz)
1	8.1	2.18 (d 0.9)
2	112.0	-
3	149.7	-
4	31.6	3.20 (dd 11.1, 15.5), 3.41 (ddm 3.1, 15.5)
5	66.8	4.49 (dd 3.1, 11.1)
6	72.4	-
7	27.32	1.47 (s)
8	26.1	1.46 (s)
1'	154.3	-
2'	111.0	7.19 (m)
3'	133.8	-
4'	123.5	7.04 (dm 7.8)
5'	118.6	7.33 (d 7.8)
6'	127.7	-
7'	21.6	2.45 (s)

Tabela 32. Deslocamentos químicos de RMN de <sup>13</sup>C ( $\delta$  em ppm) de <sup>1</sup>H ( $\delta$  em ppm, multiplicidade *J* em Hz) da substância **9** (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

# 9.2. Compostos da espécie Laurencia dendroidea

O processo de fracionamento esquematizado na Figura 89 possibilitou o isolamento e a identificação de 2 substâncias do extrato de *L. dendroidea* (Figura 90).



Figura 89. Esquema simplificado do processo de obtenção de duas substâncias de *L. dendroidea*. Para detalhes dos procedimentos cromatográficos ver seção 8.



Figura 90. Substâncias isoladas de L. dendroidea.

### 9.2.1. Terpenos halogenados tipo chamigrano

O estudo dos constituintes químicos de *Laurencia* teve início em 1953, quando Obata e Fukuzi identificaram sesquiterpenos como componentes majoritários do óleo essencial de *L. glandulifera*. A este, seguiu-se a série de trabalhos sobre isolamento e caracterização de metabólitos elaborados por espécies deste gênero, realizada por Irie e colaboradores (Irie et al. 1965, 1966, 1967, 1968a, 1968b, 1969a, 1969b, 1969c, 1970). Os resultados obtidos despertaram interesse que se difundiu e se perpetua até os dias de hoje, quando ainda são descobertas novas espécies pertencentes ao Complexo *Laurencia* e consequentemente, novas estruturas moleculares. De fato, Laurencia pode ser considerado, o gênero de alga marinha mais estudado no mundo (Teixeira e Kelecom 1991, Pereira e Teixeira 1998).

No Brasil, a espécie de *Laurencia* mais estudada é a *L. dendroidea* (denominada anteriormente *L. scoparia, L. majuscula, L. obtusa, L. filiformis*). O elatol, metabolito presente nesta espécie, é a substância que foi submetidada ao maior número de experimentos pois, além de ser um dos componentes majoritários da espécie, tem grande importância ecológica exercendo funções anti-herbivoria e antiepibiôntica (Hay et al. 1987, Pereira e Teixeira 1998).

De *Laurencia dendroidea* são isolados sesquiterpenos tipo chamigrano os quais têm como principal característica a presença de ligações duplas exocíclicas em que o bromo pode ser um dos ligantes (Sims et al. 1974, Pereira e Teixeira 1999).

Do material de *L. dendroidea*, foram isoladas, por nós, as duas substâncias majoritárias que estão descritas abaixo.

9.2.1.1. Substância 10: Elatol



Figura 91. Elatol

A substância **10** (Figura 91), que é representada pela fórmula molecular  $C_{15}H_{22}BrClO$  e tem massa molecular 333.6916 D, foi isolada como um óleo de coloração muito clara (4,48 mg). No espectro de RMN de <sup>13</sup>C, foram contados 15 picos sendo cinco atribuíveis a carbonos quaternários ( $\delta$  140,7, 128,1, 124,1, 49,1 e 43,1 ppm), dois a carbonos pertencentes a grupos metínicos ( $\delta$  72,1 e 70,9 ppm), a quatro carbonos de grupos metilênicos ( $\delta$  38,6, 38,0, 29,3 e 25,6 ppm), um carbono de grupo metilidênico ( $\delta$  115,9 ppm), e três a carbonos de grupos metílicos ( $\delta$  24,2, 20,7 e 19,4 ppm) (Figura 92). Destes 15, quatro são carbonos sp<sup>2</sup> (C2, 128,1 ppm; C3, 124,1 ppm; C7, 140,7 ppm; C14, 115,9 ppm).



Figura 92. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 10.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 93) foram observados dois simpletos ( $\delta$  1,07 ppm e  $\delta$  1,08 ppm) correspondentes aos prótons dos carbonos metílicos C-12 ( $\delta$  20,7 ppm) e C-13 ( $\delta$  24,2 ppm), respectivamente; um simpleto largo ( $\delta$  1,70 ppm) correspondente a um grupo metílico ligado ao carbono pertencente à ligação dupla endocíclica (C-15,  $\delta$  19,4 ppm) (Figura 95); um sinal quadrupleto em  $\delta$  5,15 ppm (3,0, 6,3 Hz) de hidrogênio ligado a carbono terciário portando hidroxila (C-9,  $\delta$  72,1 ppm); um dupleto em  $\delta$  4,61 ppm (2,9 Hz) de hidrogênio ligado a carbono terciário portando bromo (C-10,  $\delta$  70,9 ppm); dois simpletos largos ( $\delta$  4,80 e 5,13 ppm) referentes aos hidrogênios de grupo metilidênico exocíclico (C-14,  $\delta$  115,9 ppm) (Figura 94).

Os outros sinais na região entre  $\delta$  1,64 e 2,63 ppm correspondem aos hidrogênios dos grupos metilênicos restantes: o dupleto largo em  $\delta$  2.36 ppm (17,7 Hz) e o multipleto em  $\delta$  2,56 ppm correspondem aos hidrogênios do C-1 ( $\delta$  38,1 ppm), e os multipletos em  $\delta$  1.84 e 1.96 ppm referem-se aos do C-4 ( $\delta$  29,3 ppm). Já os multipletos em  $\delta$  1,64 e 1,81 ppm estão relacionados aos hidrogênios do C-5 ( $\delta$  25,6 ppm) e os sinais em  $\delta$  2,50 (dd 2,7, 14,5 Hz) e  $\delta$  2.63 (dm 14,5 Hz) correspondem aos hidrogênios do C-8 ( $\delta$  38,0 ppm) (Figura 95).



Figura 93. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 10.



Figura 94. Espectro de RMN de HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 10.



Figura 95. Espectro de RMN de HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 10.



Figura 96. Espectro de RMN de HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 10

No espectro de HMBC, as correlações entre H-14 e C-7, C-6 e C-8 permitem posicionar o grupo metílico na dupla ligação exocíclica da molécula. Os hidrogênios metilênicos H-8 apresentam correlação com C-7, C-9, C-10 e C-14 e a posição do carbono quaternário C-11 (δ 43,1 ppm) é

confirmada pela sua correlação com os hidrogênios H-9, H-10, H-12 e H-13 neste anel. Já o carbono quaternário C-6 ( $\delta$  49,1 ppm) pode ter sua posição confirmada entre os dois anéis pela sua correlação com os hidrogênios H-1, H-5, H-4, H-8, H-13 e H-14. As correlações dos hidrogênios H-15 com os carbonos C-3, C-2 e C-4 também posicionam o grupo metílico neste anel (Figura 96 e Figura 97).



Figura 97. Representação da correlação de HMBC na substância 10.

Para fins de comparação, os dados espectrográficos aqui obtidos foram contrapostos aos de König e Wright (1997), já ajustados aos de Kennedy *et al.* (1988) e aos de Lhullier et al. (2009), bem mais recentes (Tabela 33).

Há controvérsias, entre esses autores, no que tange aos deslocamentos químicos dos carbonos C-2 e C-3. Lhullier et al. (2009) atribuem o sinal em δ 124,2 ppm ao C-2 e o em δ 128,1 ppm ao C-3, conclusões idênticas às de Vairappan et al. (2001) (C-2, δ124,86 ppm; C-3, δ 128,76 ppm).

Já Kennedy et al. (1988) e König e Wright (1997) atribuem o sinal em  $\delta$  128,61 / 128,0 ppm ao C-2 e o sinal em  $\delta$  124,81 / 124,1 ppm ao C-3. Nossos dados, que corroboram estes dois últimos autores (C-2,  $\delta$  128,1 ppm; C-3,  $\delta$  124,1 ppm), têm como base o fato de que o átomo de cloro ligado ao C-2 diminuiria a densidade eletrônica ao redor deste carbono, desblindando-o e deslocando seu sinal para campo mais baixo.

O elatol é encontrado em várias espécies do gênero, como *L. elata* (Sims et al. 1974), *L. dendroidea* (como *L. scoparia, L. obtusa, L. majuscula*) (Kennedy *et al.* 1988, Coll e Wright 1989a), *L. implicata* (Coll e Wright 1989b), *L. rigida* (König e Wright, 1997).

	<sup>13</sup> C (ppm)	<sup>13</sup> C <sup>a</sup> (ppm)	<sup>13</sup> C <sup>b</sup> (ppm)	<sup>1</sup> H ( <i>J</i> , Hz)	$^{1}\mathrm{H^{c}}\left(J,\mathrm{Hz}\right)$	$^{1}\mathrm{H^{b}}\left( J,\mathrm{Hz}\right)$
1	38.1	38.6	38.6	2.36 (br d 17.7) 2.56 (m)	2.08 (br d, 17.5) 2.19 (br d, 17.5)	2.38 (br d 17.0) 2.59 (br d 17.0)
2	128.1	128.0	124.2	-	-	-
3	124.1	124.1	128.1	-	-	-
4	29.3	29.3	29.4	1.84 (m), 1.96 (m)	1.82 (m), 1.96 (m)	1.81 (m), 1.95 (m)
5	25.6	25.6	25.6	1.64 (m), 1.81 (m)	1.62 (m), 1.80 (m)	1.63 (m), 1.82 (m)
6	49.1	49.1	49.2	-	-	-
7	140.7	140.7	140.8	-	-	-
8	38.0	38.0	38.0	2.50 (dd 2.7, 14.5) 2.63 (dm 14.5)	2.19 (dm, 14.4) 2.49 (dd, 2.8, 14.4)	2.50 (dd 14.6, 2.5) 2.63 (d 17.0)
9	72.1	72.1	72.2	4.15 (q, 3.0, 6.3)	4.14 (m)	4.14 (br d 3.4)
10	70.9	70.8	70.9	4.61 (d, 2.9)	4.61 (d, 2.9)	4.61 (d 2.6)
11	43.1	43.1	43.1	-	-	-
12	20.7	20.7	20.8	1.07 (s)	1.06 (s)	1.07 (s)
13	24.2	24.2	24.3	1.08 (s)	1.07 (s)	1.08 (s)
14	115.9	115.8	115.9	4.80 (br s) 5.13 (br s)	4.79 (br s) 5.12 (br s)	4.79 (br s) 5.12 (br s)
15	19.4	19.4	19.5	1.70 (br s)	1.70 (br s)	1.70 (br s)

Tabela 33. Deslocamentos químicos de RMN de <sup>13</sup>C ( $\delta$  em ppm) e <sup>13</sup>H ( $\delta$  em ppm, multiplicidade *J* em Hz) do elatol (**10**) (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) e comparação com a literatura.

<sup>a</sup>König e Wright 1997 (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>). <sup>b</sup>Lhullier et al. 2009 (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>), <sup>c</sup>König e Wright 1997 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Frequência dos grupos (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais/atribuição
3400 - 3600	estiramento -OH
3100	estiramento -CH para carbono sp2
2946	estiramento -CH simétrico e assimétrico
1641	estiramento C=C
1429	deformação angular do CH2
1338	deformação angular do CH3
1085	estiramento -OH secundário saturado
896	estiramento $R_2C = CH_2$
810	aromático trissubstituído
762	estiramento C-Cl
620	estiramento C-Br

Tabela 34. Valores de absorção no espectro do infravermelho para os grupos funcionais da substância 10.

Os grupos funcionais do elatol foram também observados no espectro de IV (Tabela 34): a banda em  $v_{max}$  3500 cm<sup>-1</sup> é devida ao estiramento do grupo hidroxila; as em 1641 cm<sup>-1</sup>, ao estiramento de carbono sp2; as em 896 cm<sup>-1</sup>, ao estiramento do grupo metil vinil; as em 762 cm<sup>-1</sup>, ao estiramento de carbono ligado a átomo de cloro e as em 620 cm<sup>-1</sup>, ao estiramento de carbono ligado a átomo de cloro e as em 620 cm<sup>-1</sup>, ao estiramento de carbono ligado a átomo de cloro e as em 620 cm<sup>-1</sup>, ao estiramento de carbono ligado a 1989, apontam v<sub>max</sub> (filme) 3550, 3450, 3080, 1635, 1430, 1369, 1199, 1094, 1027, 906 cm<sup>-1</sup>.

## 9.2.1.2. Substância 11: Isoobtusol

O isoobtusol [1-cloro-2,8-dibromochamigr-11(12)-en-9-ol], que foi isolado na forma de um óleo de coloração amarela bem clara (26,35 mg) e cuja massa é [M] 414,6035, tem fórmula molecular  $C_{15}H_{23}Br_2CIO$ .

Em seu espectro de massas de alta resolução, obtido por CLAE-APCI-EM, no modo negativo, foram observados picos em m/z 410,9662 / 412,9665 / 414.9648 / 416.6670, com proporções caracterísiticas da presença de 1 átomo de cloro e 2 de bromo, na molécula (Figura 98). O valor [M-H]<sup>-</sup> calculado para esta substância é m/z 412,9710.



Figura 98. Espectro de massa de alta resolução da substância 11 obtido por CLAE-APCI-EM.

Os grupos funcionais da substância **11** foram identificados pelo espectro de IV, que mostrou bandas em  $v_{max}$  3500, 3100, 1641, 1085, 896, 762 e 620 cm<sup>-1</sup> (Tabela 36). Os autores Coll e Wright (1989a) apontam bandas em  $v_{max}$  (filme) 3550, 3450, 3080, 1635, 1430, 1369, 1199, 1094, 1027, 906 cm<sup>-1</sup>.

Frequência dos grupos (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais/atribuição
3400 - 3600	estiramento -OH
3100	estiramento -CH para carbono sp2
2946	estiramento -CH simétrico e assimétrico
1650	estiramento C=C
1434	deformação angular do CH2
1380	deformação angular do CH3
1093	estiramento -OH secundário saturado
905	estiramento $R_2C = CH_2$
815	aromático trissubstituído
736	estiramento C-Cl
618	estiramento C-Br

Tabela 35. Valores de absorção no espectro do infravermelho para os grupos funcionais da substância 11.

São relevantes as bandas intensas em 620, 762, 896 e 1090 cm<sup>-1</sup> devidas aos estiramentos C-Br, C-Cl,  $R_2C=CH_2$  e -OH secundário saturado, respectivamente, que correspondem aos principais grupos funcionais desse terpeno halogenado.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C mostra 15 picos: cinco são atribuíveis a carbonos quaternários dos quais três são carbonos sp3 ( $\delta$  71,7, 50,9, 44,1 ppm) e dois são carbonos sp2 ( $\delta$  141,0, 117,7 ppm). Três carbonos pertencem a grupos metínicos ( $\delta$  71,9, 70,1, 61,0 ppm), quatro a grupos metilênicos ( $\delta$  38,7, 38,5, 38,4 e 25,5 ppm) e três a grupos metílicos ( $\delta$  24,1, 23,9, 20,6 ppm) (Figura 98).



Figura 99. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da susbtância **11**.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 100) foram observados, em campo baixo, dois simpletos ( $\delta$  5,58 e 5.04 ppm) que correspondem aos dois hidrogênios do grupo metilidênico exocíclico C-12 ( $\delta$  117,7 ppm); um dupleto largo em  $\delta$  4,71 ppm e outro dupleto em  $\delta$  4,46 ppm que correspondem a hidrogênios ligados a carbonos portando átomos de bromo; e um simpleto largo em  $\delta$  4,11 ppm, referente a hidrogênio ligado a carbono terciário C-9 ( $\delta$  71,9 ppm) portando grupo hidroxila (Figura 101).

Em campo mais alto, são observados três simpletos em  $\delta$  1,07, 1,08 e 1,69 ppm, que correspondem aos hidrogênios dos grupos metílicos C-14 ( $\delta$  20,6 ppm), C-13 ( $\delta$  23,9 ppm) e C-15 (24,1 ppm), respectivamente.



Figura 100. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 11.



Figura 101. Espectro de HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 11.

Os sinais entre  $\delta$  1,75 e 2,61 ppm são devidos aos três grupos metilênicos e ao grupo metilidênico, presentes na molécula. Os hidrogênios ligados ao C-10 ( $\delta$  38,4 ppm) aparecem como um duplo dupleto em  $\delta$  2,48 ppm (J 2,8, 14,2 Hz) e um dupleto largo em  $\delta$  2,61 ppm (J 14,2 Hz). O hidrogênio equatorial ligado ao C-6 ( $\delta$  38,5 ppm) aparece como um duplo tripleto em  $\delta$  2,18 ppm (J 3,2, 13,4

Hz); o hidrogênio axial ligado ao C-3 ( $\delta$  38,7 ppm) apresenta- se como um duplo dupleto em  $\delta$  2,09 ppm (J 12,9, 14,4 Hz) e o hidrogênio axial ligado ao C-5 ( $\delta$  25,5 ppm) aparece como duplo duplo dupleto em  $\delta$  1,75 ppm (J 3,2, 14,2, 14,3 Hz). Já o multipleto em  $\delta$  1,93 ppm está relacionado aos outros hidrogênios que estão ligados a esses mesmos carbonos (C-3, C-5 e C-6) (Figura 102).



Figura 102. Espectro de HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da susbtância 11.

As correlações entre o hidrogênio H-12 e os carbonos C-4, C-5, C-10 e C-11, no espectro de HMBC, permitem situar o grupo metilidênico na molécula. Os grupos metílicos têm as suas posições confirmadas pelas correlações entre os hidrogênios de grupos metílicos H-13 e H-14 e os carbonos C-4, C-7 e C-8 e entre si. Os hidrogênios de grupo metílico H-15 apresentam correlação com os carbonos C-1, C-2 e C-6. A posição do carbono quaternário C-4 (δ 50,9 ppm) que liga os dois anéis da molécula é confirmada pela sua correlação com os hidrogênios H-3, H-5, H-6, H-8, H-10, H-12, H-13 e H-14 (Figura 103).



Figura 103. Espectro de RMN HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 11.

O isoobtusol foi isolado pela primeira vez por Coll e Wright (1989a) da espécie de *L. dendroidea* (como *L. majuscula*) da Austrália; entretanto, as correlações de HMBC, esquematizadas na Figura 104, ainda não haviam sido determinadas até o momento, lacuna preenchida no presente trabalho.



Figura 104. Representação da correlação de HMBC na substância 11.

Diante de vários trabalhos na literatura, percebemos que existia uma grande confusão entre obtusol, isoobtusol, *allo*-isoobtusol, rogiolol. Era mostrado diferentes nomes para uma mesma estrutura ou, um mesmo nome para estruturas com alteração na posição do cloro e bromo, como é o casso do isoobtusol e obtusol (Figura 105). Então, uma comparação mais detalhada precisava ser feita para garantir a identidade da substância isolada. Para isso, o deslocamento químico destes carbonos foram cuidadosamente avaliados e dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram adicionados para fins de comparação e eliminar ambiguidades (Tabela 36).



isoobtusol (11)



Figura 105. Estruturas do isoobtusol (11) e obtusol.

O metabólito **11** (isoobtusol) que apresenta apenas 2 átomos de carbono sp2 (C-12, 117.7 ppm; C-11, 141.2 ppm) em sua estrutura é facilmente confundido com o obtusol pois ambos são isômeros constitucionais. A comparação entre os dados de <sup>13</sup>C RMN dessas duas substâncias mostra que a única diferença significativa está no C-1 e C-2. Essa diferença é explicada pela alternância da posição dos halogênios substituintes nessas posições. Assim, em **11**, o C-1 tem o cloro como substituinte (71.7 ppm, contra 68.0 ppm para obtusol) e o C-2 tem o bromo (61.0 ppm, contra 67.6 ppm para obtusol). Para todos os outros carbonos, os deslocamentos químicos são semelhantes.

Nº C	${}^{1}\mathrm{H}$	$^{1}\mathrm{H}^{\mathrm{a}}$	<sup>13</sup> C Substância (11)	<sup>13</sup> C Isoobtusol <sup>b</sup>	<sup>13</sup> C Isoobtusol <sup>a</sup>	<sup>13</sup> C Obtusol <sup>a</sup>
1	-	-	71.7	71.6	71.6	68.0
2	4.71 (br d, 8.0)	4.72 (br d, 9.1)	61.0	60.9	60.9	67.6
3	1.93 (m) 2.09 (dd, 12.9, 14.2)	eq 1.94 (m) ax 2.09 (dd, 12.9, 14.2)	38.7	33.8	38.8	40.6
4	-	-	50.9	50.9	50.9	50.3
5	1.75 (ddd, 3.2, 14.2, 14.3) 1.93 (m)	ax 1.74 (ddd, 3.2, 14.2, 14.3) eq 1.94 (m)	25.5	25.5	25.5	25.6
6	1.93 (m) 2.18 (dt, 3.2, 13.4)	ax 1.94 (m) eq 2.18 (ddd, 3.2, 3.4, 13.12)	38.6	38.6	38.6	37.2
7	-	-	44.1	44.1	44.1	44.3
8	4.46 (d, 3.1)	4.46 (d, 3.1)	70.1	70.4	70.4	70.4
9	4.11 (br s)	4.09 (br s)	71.9	71.8	71.8	71.8
10	2.48 (dd, 2.8, 14.2) 2.61 (br d, 14.2)	ax 2.48 (dd, 2.9, 14.2) eq 2.61 (br d, 14.2)	38.5	38.6	38.6	38.6
11	-	-	141.2	141.5	141.5	141.4
12	5.04 (s) 5.38 (s)	5.04 (s) 5.37 (s)	117.7	117.6	117.6	117.7
13	1.08 (s)	1.08 (s)	24.1	24.1	24.1	24.2
14	1.07 (s)	1.07 (s)	20.6	20.8	20.8	20.8
15	1.69 (s)	1.69 (s)	23.9	24.1	24.1	23.9

Tabela 36. Deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup>H ( $\delta$  em ppm, multiplicidade *J* em Hz) e de <sup>13</sup>C ( $\delta$  em ppm) da substância **11** (em CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) e comparação com dados da literatura.

<sup>a</sup>Coll e Wright 1989a (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz); <sup>b</sup>Juagdan et al. 1997 (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)

# 9.3. Substâncias da espécie Laurenciella sp.

O isolamento de substâncias de *Laurenciella* sp. foi um processo bastante desafiador uma vez que foram obtidos 1,4 g de extrato, em um processo de extração com rendimento de 1,15%.

O fracionamento, que possibilitou o isolamento e a identificação de cinco substâncias de *Laurenciella* sp. (Figura 107), três das quais (**12-14**) são novas para a literatura, está esquematizado na Figura 106.



Figura 106. Esquema simplificado do processo de fracionamento e isolamento das susbtâncias **12-16** de *Laurenciella* sp. Para detalhes dos procedimentos cromatográficos ver seção 8.

163



Figura 107. Substâncias isoladas da espécie Laurenciella sp.

### 9.3.1. Alifáticos insaturados halogenados

### 9.3.1.1. Substância 12: (+)-(3E,9E)-6-cloro-7-bromododeca-3,9-dien-1-ino

A substância **12** foi isolada na forma de um óleo incolor (2,46 mg) e seu espectro de massas de alta resolução, obtido por CLAE-APCI-EM no modo negativo, permitiu a determinação da massa do íon  $[2M-H]^-$  m/z 549.0133. O valor de  $[2M-H]^-$  calculado para este composto é m/z 549.0153 (erro = -3.64 ppm). A proporção dos picos 547.0152 / 549.0133 / 551.0093 / 553.0104 (4:10:9:3) do íon 2M é compatível com a presença de ClBr, na molécula (Figura 108).



Figura 108. Espectro de massas de alta resolução do íon molecular [2M-H]<sup>-</sup> da substância **12** obtido por CLAE-APCI-EM, modo negativo.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C mostra 12 picos: um referente ao carbono de grupo metílico ( $\delta$  14,0 ppm), três a carbonos de grupos metilênicos ( $\delta$  20,9, 33,7, 39,7 ppm), dois a carbonos sp3 ligados a halogênio ( $\delta$  57,4 e 62, 5 ppm), quatro a carbonos sp2 ( $\delta$  112,7, 123,9, 135,8, 140,3 ppm) o que atesta a presença de duas ligações duplas na molécula, um a carbono secundário com ligação sp ( $\delta$  81,5 ppm) e outro a carbono primário com ligação sp ( $\delta$  77,4 ppm) (Figura 109).

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 110) foram observados, em campo baixo, os hidrogênios ligados a cada um dos quatro carbonos sp2 que compõem as duplas ligações da molécula. São eles: o duplo tripleto em 6,19 ppm (7,2, 15,5 Hz) devido a hidrogênio ligado ao C-4 ( $\delta$  140,3 ppm); o sinal em  $\delta$  5,66 ppm desdobrado num dddd (1,4, 2,3, 3,0, 15,5) atribuído a hidrogênio ligado ao C-3 ( $\delta$  112,7 ppm); o ddd em  $\delta$  5,57 ppm (1,4, 1,8, 3,0 8,8 Hz) correspondente ao hidrogênio ligado

ao C-10 ( $\delta$  135,8 ppm) e o multipleto em  $\delta$  5,31 ppm, devido ao hidrogênio ligado ao C-9 ( $\delta$  123,9 ppm) (Figura 111).



Figura 109. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 12.



Figura 110. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 12.

Os hidrogênios dos carbonos sp3 C-6 e C-7 que estão, por sua vez, ligados a halogênio aparecem em  $\delta$  4,01 (dddd, 2,3, 5,6, 8,2, 13,9 ppm) e  $\delta$  4,13 ppm (dddd 2,3, 6,4, 8,5 e 14,4 Hz), respectivamente. O C-6 ( $\delta$  62,5 ppm), mais desblindado que o C-7 ( $\delta$  57,4 ppm), está ligado ao átomo de cloro, enquanto que este último está ligado ao átomo de bromo.



Figura 111. Espectro de HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 12.

O duplo dupleto em  $\delta$  2,87 ppm (0,5, 2,3 Hz) relaciona-se ao hidrogênio ligado ao carbono sp C-1 ( $\delta$  77,4 ppm). Já os sinais devidos aos hidrogênios dos carbonos metilênicos da molécula aparecem na região entre  $\delta$  2,09 e 2,83 ppm. Os multipletos em  $\delta$  2,83 e 2,67 ppm referem-se aos hidrogênios do C-5 ( $\delta$  33,7 ppm); os sinais triplo tripleto em  $\delta$  2,76 ppm (1,7, 7,6, 14,5 Hz) e multipleto  $\delta$  2,67 ppm, são devidos aos hidrogênios ligados ao C-8 ( $\delta$  39,7 ppm). Os sinais dos hidrogênios ligados ao C-11 ( $\delta$  20,9 ppm) são observados em  $\delta$  2,09 ppm (tt, 0,8, 7,5, 15,0 Hz), (Figura 111).

Em campo mais alto, observa-se o tripleto em  $\delta$  0,98 ppm (7,5 Hz), que corresponde aos hidrogênios do grupo metílico C-12 ( $\delta$  14,0 ppm).

No mapa de contorno no experimento de COSY, são observáveis correlações entre a maioria dos hidrogênios. As correlações entre H3-H4, H4-H5, H5-H6, H7-H8, H-8-H9, H10-H11 e H11-H12 indicam suas posições, na molécula (Figura 112).



Figura 112. Mapa de contorno 2D de correlações de <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H (COSY ) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância **12**.

Substância 12					
N° C	$\delta^{13}$ C (ppm)	Mult	$\delta^{1}$ H (ppm) multiplicidade, J in Hz		
1	77.4	СН	2.87 (dd, 0.5, 2.3)		
2	81.5	С	-		
3	112.7	СН	5.66 (dddd 1.4, 2.3, 3.0, 15.5)		
4	140.3	СН	6.19 (dddd 7.2, 15.5)		
5	33.7	$CH_2$	2.67 (m), 2.83 (m)		
6	62.5	СН	4.01 (dddd 2.3, 5.6, 8.2, 13.9)		
7	57.4	СН	4.13 (dddd 2.3, 6.4, 8.5, 14.4)		
8	39.7	$CH_2$	2.67 (m), 2.76 (ttt, 1.7, 7.6, 14.5)		
9	123.9	СН	5.31 (m)		
10	135.8	СН	5.57 (dddd 1.4, 3.0, 4.9, 8.8)		
11	20.9	CH <sub>2</sub>	2.09 (ttt, 0.8, 7.5, 15.0)		
12	14.0	CH <sub>3</sub>	0.98 (t, 7.5)		

Tabela 37. Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância **12**.

Os resultados apresentados levam à conclusão de que a molécula **12** tem fórmula molecular  $C_{12}H_{16}BrCl$  e massa molecular [M] 275.6123. O experimento de rotação óptica da substância (0,06886 g/100 mL, em metanol) forneceu  $[\alpha]_D^{20 \ \circ C} = +31,95$ . Esses dados reunidos conduzem à fórmula (+)-(3*E*,9*E*)-7-bromo-6-clorododeca-3,9-dien-1-ine (Figura 113), que representa uma molécula halogenada de cadeia aberta, com três insaturações em sua estrutura, descrita agora pela primeira vez na literatura.



Figura 113. Estrutura da substância (+)-(3E,9E)-7-bromo-6-clorododeca-3,9-dien-1-ine (12).

A espectroscopia de IV também foi utilizada para determinação dos grupos funcionais presentes na molécula (Tabela 38).

Frequência dos grupos (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais/atribuição
3300	estiramento CH de alcino
2933	estiramento C-H de alifáticos
2100	estiramento C≡C
1716	estiramento C=C
1250	estiramento C-C
960	estiramento -CH=CH-
800	estiramento C-Cl
660	estiramento C-Br

Tabela 38. Valores de absorção dos grupos funcionais da substância 12, obtidos por espectroscopia de infravermelho.

As bandas em 3300 e 2100 cm<sup>-1</sup> são devidas ao estiramento CH de alcino. Outras insaturações também são confirmadas pelas bandas em 1716 e 960 cm<sup>-1</sup>; as bandas em 800 e 660 cm<sup>-1</sup> confirmam a presença dos halogênios cloro e bromo pois correspondem aos estiramento C-Cl e C-Br, respectivamente.

9.3.1.2. Substância 13: (+)-(3E,9E)-6-cloro-7-bromododeca-3,9-dien-1,11-diino

A substância **13**, um dos componentes majoritários de *Laurenciella* sp., apresenta-se na forma de um óleo levemente amarelado (9,3 mg) que, quando não está em solução, torna-se insolúvel devido à processo que se assemelha à polimerização.

É uma molécula de difícil ionização, porém seu espectro de massas de baixa resolução foi obtido por CLAE-APCI-EM, no modo negativo, permitindo a determinação da massa do íon  $[M-H]^- m/z$  269.6. A proporção dos picos 267.5 / 269.6 / 271.6 do íon são compatíveis com o padrão da presença de um cloro e um bromo na molécula (7:10:3) (Figura 114).



Figura 114. Espectro de massa de baixa resolução da substância **13** obtido por CLAE-APCI-EM, modo negativo.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C mostra 12 picos: dois referente a carbonos de grupos metilênicos ( $\delta$  35,9 e 39,3 ppm), dois a carbonos sp3 ligados a halogênio ( $\delta$  56,1 e 62,9 ppm), quatro a carbonos sp2 ( $\delta$  111,7, 112,8, 140,1 e 140,2 ppm) o que determina a presença de duas ligações duplas na molécula, dois a carbonos secundários com ligação sp ( $\delta$  79,5 e 81,5 ppm) e outros dois a carbono primário com ligação sp ( $\delta$  77,5 e 83,2 ppm) (Figura 115).



Figura 115. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 13.



Figura 116. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 13.



Figura 117. Espectro de HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 13

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 116) foram observados, em campo baixo, os picos relacionados aos hidrogênios ligados a cada um dos quatro carbonos sp2 que formam as duplas ligações da molécula. São eles: o duplo tripleto em 6,20 ppm (7,1, 15,3 Hz), relativo ao hidrogênio ligado ao C-9 ( $\delta$  140,1 ppm); o sinal em  $\delta$  6,06 ppm (ddt 1,4, 2,3, 3,0, 15,5) devido ao hidrogênio ligado ao

C-4 ( $\delta$  140,2 ppm); o ddd em  $\delta$  5,67 ppm (1,4, 2,2, 2,9, 4,7 Hz) relacionado ao hidrogênio ligado ao C-10 ( $\delta$  112,8 ppm) e o multipleto em  $\delta$  5,63 ppm, devido ao hidrogênio ligado ao C-3 ( $\delta$  111,7 ppm) (Figura 117).

Os hidrogênios dos carbonos sp3 C-6 e C-7 ligados a carbono portando halogênio aparecem em  $\delta$  4,01 (dddd, 2,7, 5,3, 8,4 Hz) e  $\delta$  4,24 ppm (dddd 2,7, 5,0, 7,7, 9,2 Hz), respectivamente. O C-6 ( $\delta$  62,9 ppm), mais desblindado que o C-7 ( $\delta$  56,1 ppm), está ligado ao átomo de cloro, enquanto este último está ligado ao átomo de bromo.

Os dupletos largos em  $\delta$  3,18 (2,3 Hz) e 2,88 ppm (2,3 Hz) referem-se aos hidrogênios ligados ao carbonos sp C-1 ( $\delta$  83,2 ppm) e C-12 ( $\delta$  77,5 ppm), respectivamente. Quanto aos grupos metilênicos, os hidrogênios ligados ao C-5 ( $\delta$  35,9 ppm) aparecem como um multipleto em  $\delta$  2,95 ppm e em 3,09 ppm (ddddd 1,3, 5,1, 6,8, 12,3, 15,2 Hz), enquanto os hidrogênios ligados ao C-8 ( $\delta$  39,3 ppm) aparecem como multipleto em  $\delta$  2,67 ppm e em 2,80 ppm (ddddd 1,3, 5,2, 7,2, 12,8, 14,5 Hz) (Figura 117).



Figura 118. Espectro de HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 13

A estrutura da substância **13** possui as extremidades simétricas o que foi observado no espectro HMBC, cujas correlações contribuíram para a distinção dos carbonos funcionalmente semelhantes, listados a seguir: C-9 e C-4; C-3 e C-10; C-2 e C-11; C-1 e C-12; C-5 e C-12. Este espectro também permitiu o posicionamento dos carbonos C-6 e C-7, na molécula (Figura 118). Foram também observadas correlações entre o hidrogênio H-9 e os carbonos C-8, C-6, C-11 e C-10 e entre o hidrogênio H-4 e os carbonos C-5, C-7, C-2 e C-3. Igualmente foram observadas correlações entre o hidrogênio H-10 e os carbonos C-8, C-12 e C-9 e entre o hidrogênio H-3 e os carbonos C-5, C-1 e C-4.

Os hidrogênios ligados aos carbonos C-7 e C-6 apresentam correlação entre si e também com H-5 e H-8. Já o hidrogênio H-7 apresenta correlação com o H4 enquanto o H-6 está correlacionado ao H-9. Os hidrogênios terminais H-1 e H12 também apresentam correlação entre si e o H-1, com o H3 e o H-12 com o H-10. Os hidrogênios ligados ao C-5 apresentam correlação com o H-7 e o H-6, e os hidrogênios ligados ao C-8 estão correlacionados ao H-9, H-10 e H-11. Os hidrogênios correlacionados ao H-5 são o H-2, o H-3 e o H4.



Figura 119. Mapa de contorno 2D de correlações de <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H (COSY ) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância **12**.

No mapa de contorno obtido no experimento de COSY, são facilmente observáveis as correlações entre a maioria dos hidrogênios. As correlações entre H-1 e H-3, H-3 e H-4, H-4 e H-5, H-6 e H-7, H-8 e H-9, H-9 e H-10 e H10 e H-12 definem as posições de cada um destes hidrogênios na molécula (Figura 119). As correlações observadas nos espectros de HMBC e COSY estão representadas na Figura 120.



Figura 120. Representação das correlações de HMBC e COSY na molécula 13.

O análise do conjunto de resultados apresentados permite atribuir à substância **13** a fórmula molecular C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>BrCl, condizente com a massa molecular [M] 271.5807. O experimento de rotação óptica da substância (0,4 g/100 mL, em acetona) forneceu  $[\alpha]_D^{20 \circ C} = +40,44$ . Todos esses dados nos levaram à fórmula (+)-(3*E*,9*E*)-6-cloro-7-bromododeca-3,9-dien-1,11-diino (Figura 121), que descreve uma molécula halogenada de cadeia aberta, semelhante à substância 12, com quatro insaturações em sua estrutura e também ainda não descrita na literatura.


Figura 121. Estrutura da molécula (+)-(3E,9E)-6-cloro-7-bromododeca-3,9-dien-1,11-diino (13).

Os dados de deslocamento químico de <sup>13</sup>C RMN e <sup>1</sup>H RMN assim como a multiplicidade dos sinais estão compilados na Tabela 39.

Substância 13					
No	δ <sup>13</sup> C (ppm)	Mult	$\delta^{1}$ H (ppm) multiplicidade, J em Hz		
1	83.2	СН	3.18 (br d 2.3)		
2	79.5	С	-		
3	111.7	СН	5.63 (m)		
4	140.2	СН	6.06 (ddt 0.8, 7.1, 10.9)		
5	35.9	$CH_2$	2.95 (m), 3.09 (ddddd 1.3, 5.1, 6.8, 12.3, 15.2)		
6	62.9	СН	4.01 (dddd 2.7, 5.3, 8.4)		
7	56.1	СН	4.24 (dddd 2.7, 5.0, 7.7, 9.2)		
8	39.3	$CH_2$	2.67 (m), 2.80 (ddddd 1.3, 5.2, 7.2, 12.8, 14.5)		
9	140.1	СН	6.20 (dt 7.1, 15.3)		
10	112.8	СН	5.67 (dddd 1.4, 2.2, 2.9, 4.7)		
11	81.5	С	-		
12	77.5	СН	2.88 (br d 2.3)		

Tabela 39. Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **13**.

A presença dos grupos funcionais da substância 13 também foi avaliada por espectroscopia de IV (Tabela 40).

A banda em 3287 cm<sup>-1</sup> atribuída ao CH de alcino é mais intensa no composto **13** que no composto **12** o que pode ser indicativo da presença das duas ligações triplas em **13**. A presença dos grupos alcinos também é confirmada pela banda em 2100 cm<sup>-1</sup>. As outras insaturações na molécula são confirmadas pelas bandas em 1693 e 962 cm<sup>-1</sup>. São observadas, também a presença dos picos que contemplam a presença dos halogênios cloro e bromo em 800 e 650 cm<sup>-1</sup>, e que correspondem aos estiramento C-Cl e C-Br, respectivamente.

Tabela 40. Valores de absorção dos grupos funcionais da substância 13, obtidos por espectroscopia de infravermelho.

Frequência dos grupos (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais/atribuição
3287	estiramento CH de alcino
2900	estiramento C-H de alifáticos
2100	estiramento C≡C
1693	estiramento C=C
1200	estiramento C-C
962	estiramento -CH=CH-
800	estiramento C-Cl
650	estiramento C-Br

9.3.1.3. Substância 14: (3E,6Z,9E)-6-chlorododeca-3,6,9-trien-1,11-diino

A substância **14**, da qual foram isolados 1,57 mg na forma de óleo, pertence à mesma classe das substâncias **12** e **13**.

É uma molécula de difícil ionização e seu espectro de massas de alta resolução, obtido por CLAE-APCI-EM no modo negativo, mostra as massas dos íons majoritários m/z 255,2249 e 283,2572, resultantes, possivelmente de polimerização da molécula ionizada [2M].



Figura 122. Espectro de massas de alta resolução obtido por CLAE-APCI-EM, modo negativo, dos íons da substância 14.

Na análise de **14** por cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas triplo quadrupolo observamos um único pico no cromatograma (Figura 123) cujo espectro de massas de baixa resolução mostra as massas dos íons majoritários m/z152,8 e 114,8 (Figura 124) com os quais fizemos uma tentativa de fragmentação (Figura 126).



Figura 123. Análise de **14** por cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas triplo quadrupolo (GCMS-7890A, Agilent, CA, US) equipado com célula de colisão com controle eletrônico de pressão. Amostra a 0,1 mg/mL em MeOH. Volume de injeção 1 µL.



Figura 124. Espectro de massas de baixa resolução de **14** analisado em GC-MS tipo triplo quadrupolo, no modo positivo .



C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>Cl MM: 190,6687 C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>Cl<sup>••</sup> MM teórica: 152,6208 MM experimental: 152,8 Chemical Formula: C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>Cl<sup>••••</sup> MM teórica: 114,5728 MM experimental 114,8

Figura 125. Esquema do perfil de fragmentação para gerar os íon majoritários m/z 114,8 e 152,8 observados para o composto **14**, modo positivo.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 126) foram observados também nessa molécula, em campo baixo, os hidrogênios ligados a cada um dos carbonos sp2, em número de seis, que formam as duplas ligações da molécula. São eles: H-9 em 6,23 ppm (ddt 0,6, 6,9, 13,9, 15,9 Hz), H-4 em  $\delta$  4,94 ppm (ddt 0,8, 7,4, 10,7, 14,8 Hz), H-10 em 5,55 ppm (m) e 5,59 pmm (dt 1,6, 2,3 Hz), H-3 em 5,51 ppm (m) e 5,53 ppm (m) e também o H-7 como multipleto em 5,53 ppm.



Figura 126. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 14.

Devido ao pouco material isolado, não foi possível obter bons resultados nos experimentos de RMN de <sup>13</sup>C. No entanto, os carbonos secundários (CH<sub>2</sub>) e terciários (CH) puderam ser identificados no espectro de HSQC, enquanto que os carbonos quaternários (C) puderam ser identificados no espectro de HMBC.



Figura 127. Espectro de HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 14.



Figura 128. Espectro de HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 14.



Figura 129. Espectro de HMBC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 14.

Nas análises de HSQC, os carbonos secundários sp2 foram localizados em campo mais baixo, no espectro. O carbono ligado ao H-4 é o mais desblindado, sendo que seu correspondente pico aparece em  $\delta$  141,7 ppm, seguido pelo C-9 ( $\delta$  140, 9 ppm). O carbono ligado ao H-7 se encontra em  $\delta$  123,9 ppm enquanto os outros 2 carbonos sp2, C-10 e C-3, têm deslocamentos químicos de  $\delta$  111,9 e 109,6 ppm, respectivamente (Figura 127).

Os carbonos metilêncios C-5 e C-8 são os mais desblindados da molécula, aparecendo em  $\delta$  29,9 e 42,8 ppm, respectivamente. Já os carbonos primários sp terminais se encontram em  $\delta$  82,5 ppm (C-1) e  $\delta$  77,3 ppm (C-12) (Figura 128).

No espectro de HMBC foram observadas as correlações entre H-9 e os carbonos C-8, C-11 e C-6 assim como as correlações entre C-4 e C-5, C-2 e, C-3 e C-7. confirmando os deslocamentos químicos dos carbonos quaternários C-2 e C-11 em  $\delta$  80,1 e 81,8 ppm, respectivamente.



Figura 130. Mapa de contorno 2D de correlações de 1H, 1H (COSY) (CDCl3, 400 MHz) da substância **14**. Ainda no espectro de HMBC, são visíveis as correlações entre H-3 e C4- e C-5 e entre H-7 e C-6 e C-8. Os hidrogênios H-5 apresentam correlação com C-3 e C-4 enquanto os hidrogênios H-8,

com C-19 e C-10, mas ambos apresentam correlação com C-6 e C-7. Já o H-1 apresenta uma fraca, mas existente correlação com C-3 enquanto H-12 apresenta correlação com C-9 e C-10 (Figura 129).

No mapa de contorno no experimento de COSY, são observadas correlações entre a maioria dos hidrogênios. As correlações entre H-1 e H-3, H-3 e H-4, H-4 e H-5, H-8 e H-9, H-9 e H-10 e H10 e H-12 corroboram a posição de cada um desses hidrogênios, na molécula (Figura 130). As correlações observadas nos espectros de HMBC e COSY estão representadas na Figura 131.



Figura 131. Representação das correlações de HMBC e COSY na molécula 14

Dos resultados apresentados, podemos inferir que a substância **14** apresenta fórmula molecular  $C_{12}H_{11}Cl$  e massa molecular [M] 190.66874. O experimento de rotação óptica da substância (0,045 g/100 mL, em acetona) forneceu  $[\alpha]_D^{20 \circ C} = 0$ , mostrando que a molécula não tem quiralidade. Esses dados permitem atribuir à substância **14** a fórmula (*3E*,6*Z*,9*E*)-6-chlorododeca-3,6,9-trien-1,11-diino (Figura 132), uma molécula halogenada, que possui cadeia aberta semelhante as das substâncias **12** e **13**, porém com cinco insaturações. Esta substância possui estrutura não descrita até o momento, na literatura.



Figura 132. Estrutura da molécula (3E,6Z,9E)-6-chlorododeca-3,6,9-trien-1,11-diino (14).

Os dados de deslocamento químico de <sup>13</sup>C RMN e <sup>1</sup>H RMN assim como a multiplicidade dos sinais estão organizados na Tabela 41.

Substância 14					
No	δ <sup>13</sup> C (ppm)	Mult	$\delta^{1}$ H (ppm) multiplicidade, J em Hz		
1	82.5	СН	3.14 (br d 2.3)		
2	80.1	С	-		
3	109.6	СН	5.51 (m), 5.53 (m)		
4	141.7	СН	5.94 (ddt 0.8, 7.4, 10.7, 14.8)		
5	29.9	$CH_2$	3.22 (dt, 1.0, 7.4)		
6	133.0	С	-		
7	123.9	СН	5.53 (m)		
8	42.8	$CH_2$	3.11 (br s), 3.12 (br s)		
9	140.9	СН	6.23 (ddt, 0.6, 6.9, 13.9, 15.9)		
10	111.9	СН	5.55 (m), 5.59 (dt 1.6, 2.3)		
11	81.8	С	-		
12	77.3	СН	2.86 (dd 0.5, 2.3)		

Tabela 41. Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) do composto **14**.

Espectroscopia de IV também foi utilizada para avaliação da presença dos grupos funcionais (Tabela 42).

Frequência dos grupos (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais/atribuição	
3292	estiramento CH de alcino	
2900	estiramento C-H de alifáticos	
2100	estiramento C≡C	
1680	estiramento C=C	
1430	estiramento CH <sub>2</sub>	
1200	estiramento C-C	
957	estiramento -CH=CH-	
800	estiramento C-Cl	

Tabela 42. Valores de absorção dos grupos funcionais da substância 14, obtidos por espectroscopia de infravermelho.

A banda em 3292 cm<sup>-1</sup>, bastante intensa nesta molécula, é atribuída ao CH terminal de alcino, corroborando a presença das duas triplas ligações. A presença dos grupos alcinos também pode ser confirmada pela banda em 2100 cm<sup>-1</sup>. As outras insaturações na molécula são confirmadas pelas bandas em 1680 e 957 cm<sup>-1</sup>. A banda em 800 cm<sup>-1</sup> contempla o estiramento C-Cl e confirma, em conjunto com os dados de espectrometria de massas já apresentados, a presença do cloro na molécula.

#### 9.3.2. Ácido graxo insaturado

#### 9.3.2.1. Substância 15: Ácido heptadecanóico (ácido margárico)

O ácido heptadecanóico (Figura 133) é um ácido graxo saturado com dezessete carbonos (17:0) comumente encontrado em animais, plantas terrestres e marinhas tais como a macrófita *Syringodium isoetifolium* (Jeevitha *et al.* 2013) e em algas, como *Gelidiella acerosa* e *Sargassum wightii* (Syad, 2013). No presente estudo, este ácido foi isolado na forma de um sólido branco (18,25 mg).



Figura 133. Estrutura do ácido heptadecanóico (15).



Figura 134. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 15.

Nos experimentos de <sup>1</sup>H RMN (Figura 134), em campo alto, são observados um tripleto ( $\delta$  0,87 ppm) que corresponde ao sinal dos hidrogênios ligados ao carbono do grupo metílico C-17 ( $\delta$  14,1 ppm), outro tripleto em  $\delta$  2,34 ppm devido aos hidrogênios ligados ao carbono do grupo metilênico C-2 ( $\delta$  33,8 ppm)que por sua vez está ligado ao carbono do grupo carboxílico (C-1,  $\delta$  207,1 ppm). O quintupleto em  $\delta$  1,63 corresponde aos hidrogênios ligados a carbono secundário (C-3,  $\delta$  24,7 ppm) que está ligado a outros dois carbonos metilênicos, justificando portanto, a multilicidade do sinal. O largo sinal em  $\delta$  1,25 ppm são indicação da presença de uma longa cadeia metilênica saturada, dado corroborado pelos sinais dos diversos carbonos na região entre  $\delta$  22-32 ppm (Figura 135). A medida de integração indica a presença de 13 grupos metílicos (26 hidrogênios), presença

essa confirmada por espectrometria de massas. Os dados dos espectros de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H encontram-se dispostos na Tabela 43.



Figura	135.	Espectro	de RM	N de <sup>13</sup>	C (CDCl <sub>3</sub>	, 400	MHz)	da	substância	15.
--------	------	----------	-------	--------------------	----------------------	-------	------	----	------------	-----

Substância 15					
Nº C	δ <sup>13</sup> C (ppm)	$\delta^{1}$ H (ppm) multiplicidade, J em Hz			
1	207.1	-			
2	33.8	2.37 (t, 7.4)			
3	24.7	1.63 (quint, 7.4)			
4	29.0	1.32 (s)			
5	29.2	1.28 (s)			
6	29.4	1.28 (s)			
7-11	29.6	1.28 (s)			
12	30.9	1.28 (s)			
13	29.6	1.28 (s)			
14	29.3	1.28 (s)			
15	31.9	1.28 (s)			
16	22.7	1.28 (s)			
17	14.1	0.87 (t, 7.0)			



Figura 136. Análise da substância **15** em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas triplo quadrupolo (GCMS-7890A, Agilent, CA, US), equipado com célula de colisão com controle eletrônico de pressão. Amostra a 0,1 mg/mL em MeOH. Volume de injeção 1  $\mu$ L. Cromatograma (A) e perfil do espectro de massas de baixa resolução com destaque para o íon molecular [M]<sup>+</sup> m/z 270 (B).

A análise por cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas triplo quadrupolo teve por objetivo a obtenção do íon molecular na amostra em estudo. No cromatograma, o pico majoritário apresenta tempo de retenção de 12,2 min e seu espectro de massas de baixa resolução mostra o íon molecular  $[M]^+ m/z$  270 (Figura 136).

Para confirmação dos dados obtidos por CG-EM, foi realizado experimento em CLAE-APCI-EM, com espectrômetro de massas de alta resolução. no modo negativo (Figura 137).



Figura 137. Espectro de massa de alta resolução da substância 15 obtido por CLAE-APCI-EM, modo negativo.

Nesse experimento, o íon  $[M-H]^-$  apresentou m/z 269,2408 (100%) e o íon molecular, m/z 270,2446 (18,84%). A reunião do conjunto de dados aqui apresentados, permite concluir que, a molécula que apresenta fórmula molecular C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> (massa calculada [M] 270,4513 e [M-H]<sup>-</sup> m/z 269.2486), é o ácido heptadecanóico, também conhecido como ácido margárico.

Os grupos funcionais desta molécula foram determinados por espectroscopia de IV e os resultados desta análise encontram-se dispostos na Tabela 44.

Frequência dos grupos (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais/atribuição	
2922	estiramento CH assimétrico	
2852	estiramento CH simétrico	
1739	estiramento C=C de ácido carboxílico	
1465	deformação angular -(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	
1400 e 1193	estiramento C-O de ácido carboxílico (2 bandas)	
1090	estiramento C-O	
720	deformação angular de cadeia -(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> (n>3)	

Tabela 44. Valores de absorção dos grupos funcionais da substância **15**, observados por espectroscopia de infravermelho.

As bandas intensas em 2922 e 2852 cm<sup>-1</sup> são atribuídas ao estiramento CH assimétrico e simétrico, respectivamente. A banda também intensa em 1793 cm<sup>-1</sup> corresponde ao estiramento C=O de ácido carboxílico; o estiramento C-O de ácido carboxílico aparece em duas bandas (1400 e 1193 cm<sup>-1</sup>) a primeira devida ao acoplamento da deformação angular no plano de ligação -OH e a segunda, à deformação axial de C-O. A deformação angular -(CH2)<sub>n</sub> aparece nas bandas 1465 e 720 cm<sup>-1</sup>, sendo esta última, caracteristica de cadeias longas.

#### 9.3.3. Esterol

9.3.3.1. Colesterol



Figura 138. Estrutura do colesterol (16).



Figura 139. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 16.

A molécula foi isolada na forma de um pó branco (aproximadamente 5,30 mg). No espectro de RMN de <sup>13</sup>C foi detectada a presença de 27 carbonos, sendo 2 carbonos quaternários sp3: C-10 ( $\delta$  36,5 ppm) e C-13 ( $\delta$  42,2 ppm), 1 carbono terciário sp2: C-5 ( $\delta$  140,7 ppm), 6 carbonos terciários sp3 (C-8, C-9, C-14, C-17, C-20 e C-25), 1 secundário sp3 (C-3), 1 secundário sp2 (C-6), 11 carbonos pertencentes a grupos metilênicos (C-1, C-2, C-4, C-7, C-11, C-12, C-15, C-16, C-22, C-23, C-24) e 5 pertencentes a grupos metílicos (C-18, C-19, C-21, C-26 e C-27) (Figura 139).

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 140) observam-se dois sinais devidos a hidrogênios mais desblindados: um duplo tripleto em  $\delta$  5,37 ppm (2,0, 5,3 Hz) referente ao hidrogênio ligado ao carbono secundário sp2 C-6 ( $\delta$  121,7 ppm) e um triplo tripleto em  $\delta$  3,55 ppm (4,5, 11,2 Hz) referente ao hidrogênio ligado ao carbono secundário sp3 C-3 ( $\delta$  71,8 ppm) ligado, por sua vez, à hidroxila (Figura 141).



Figura 140. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 16.



Figura 141. Espectro de HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 16.

Ainda no espectro de <sup>1</sup>H, em campo mais alto, são observados o simpleto em  $\delta$  0,67 ppm devido aos hidrogênios pertencentes ao grupo metílico C-18 ( $\delta$  11,4 ppm); o simpleto em  $\delta$  1,00 ppm

atribuidos aos hidrogênios do grupo metílico C-19 ( $\delta$  19,4); o dupleto em  $\delta$  0,91 ppm (6,6 Hz) relativo ao grupo metílico C-21 ( $\delta$  18,7 ppm); o duplo dupleto em  $\delta$  0,86 ppm (1,8, 6,6 Hz) devido aos grupos metílicos C-26 ( $\delta$  22,8 ppm) e C-27 ( $\delta$  22,5 ppm).

Os dados correspondentes a todos os sinais devidos a carbonos e a hidrogênios de grupos CH e CH<sub>2</sub> da substância 16, estão dispostos na



Figura 142. Espectro de HSQC (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) da substância 16.

Tabela 45. Valores de absorção dos grupos funcionais da substância 16, obtidos por espectroscopia de infravermelho.

Frequência dos grupos (cm <sup>-1</sup> )	Grupos funcionais/atribuição
3400	estiramento -OH
2933	estiramento CH simétrico e assimétrico
1680	alqueno trissubstituído
1463	deformação angular CH <sub>2</sub>
1381	deformação angular CH <sub>3</sub>
1038	C-O de álcool secundário

		presente estudo	Literatura		
Nº C	δ <sup>13</sup> C (ppm)	δ <sup>1</sup> H (ppm) multiplicidade, <i>J</i> em Hz	δ <sup>13</sup> C (ppm) <sup>a</sup>	δ <sup>1</sup> H (ppm) <sup>b</sup>	
1	36.2	0.99 (m), 1.32 (s)	37.5	1.049, 1.764	
2	31.6	1.82 (m), 1.85 (m)	31.6	1.688, 1.977	
3	71.8	3.55 (tt, 4.5, 11.2)	71.3	3.736	
4	42.3	2.23 (m), 2.30 (dddd, 2.2, 5.0, 7.6 )	42.4	2.491, 2.517	
5	140.7	-	141.2	-	
6	121.7	5.37 (dt, 2.0, 5.3)	121.3	5.326	
7	31.87	1.52 (m)	32.0	1.492, 1.871	
8	31.89	1.43 (d, 4.6)	32.3	1.382	
9	50.1	0.92 (m)	50.5	0.879	
10	36.5	-	36.5	-	
11	21.1	1.42 (d, 4.60), 1.48 (m)	21.2	0.372, 1.429	
12	28.2	1.26 (m), 1.83 (m)	28.3	1.075, 1.933	
13	42.2	-	42.4	-	
14	56.7	0.98 (m)	56.9	0.864	
15	24.3	1.06 (m), 1.57 (m)	24.3	0.994, 1.477	
16	39.7	1.15 (m), 2.00 (ddd, 3.2)	40.0	1.190, 1.751	
17	56.1	1.08 (m)	56.5	1.019	
18	11.4	0.67 (s)	12.0	0.594	
19	19.4	1.00 (s)	19.4	0.971	
20	35.8	1.37 (m)	35.8	1.315	
21	18.7	0.91 (d, 6.6)	18.8	0.886	
22	37.2	1.04 (m), 1.84 (m),	36.4	0.952, 0.970	
23	23.8	1.13 (m), 1.34 (m)	24.1	1.112, 1.314	
24	39.5	1.11 (m), 2.02 (t, 3.7)	39.6	1.032, 1.032	
25	28.0	1.50 (m)	28.0	1.452	
26	22.8	0.86 (dd, 1.8, 6.6)	22.8	0.798	
27	22.5	0.86 (dd, 1.8, 6.6)	22.5	0.797	

Tabela 46. Dados de RMN de  ${}^{1}$ H e  ${}^{13}$ C (400 MHz) do colesterol (16), obtidos em CDCl<sub>3</sub> e dados da literatura.

<sup>a</sup>Silverstein 1994. <sup>b</sup>Muhr et al. 1996.

Os dados de espectroscopia obtidos na região do infravermelho coincidem com as indicações provenientes das outras análises espectrográficas pois são observadas bandas de absorção em:  $3400 \text{ cm}^{-1}$  - atribuída a estiramento –OH; em 2933 cm<sup>-1-</sup> referente a estiramento de alceno trissubstituído; em 1463 e 1381 cm<sup>-1</sup> – correspondente à deformação angular de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, respectivamente; e em 1038 cm<sup>-1</sup> - atribuída à presença de C-O de álcool secundário (

#### Tabela 46).

A substância **16** apresenta fórmula molecular  $C_{27}H_{46}O$  e massa [M] 386,65. Foram feitas várias tentativas para obtenção da massa exata deste composto sem sucesso. Em seu livro, Silverstein (1994) sugere que, para esteróides poli-hidroxilados, a melhor opção é o espectro de dessorção por campo (FD), já que espectros de EI exibem picos do íon molecular fracos ou inexistentes, devido à fácil desidratação da molécula. A ionização química também não é conveniente, visto que o íon molecular protonado desidrata prontamente. Embora o esterol em questão não seja poli-hidroxilado, não foi possível obter espectro de massas com as diversas técnicas utilizadas que foram EI, APCI, CI, NCI. Durante nosso estudo, não pudemos utilizar espectroscopia por dessorção de campo.

# Capítulo 3

Atividades Biológicas:

atividade antioxidante, citotóxica e esquistossomicida

## **10.ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

### 10.1. Introdução

A atividade antioxidante ganha importância uma vez que, mesmo tendo o O<sub>2</sub> como elemento fundamental para os organismos aeróbicos (Fleschin *et al.*, 2000), nas reações biológicas, os radicais livres e outros derivados ativos do oxigênio são inevitavelmente co-produzidos. Esses radicais livres exercem papel fisiológico importante, mas também estão envolvidos em vários processos deletérios ao organismo humano como câncer, aterosclerose, *Diabetes mellitus*, artrite reumática, distrofia muscular, catarata, desordens neurológicas e o processo de envelhecimento (Nordbert & Arnér, 2001).

Contra os efeitos das espécies reativas do oxigênio (EROs), todos os organismos aeróbicos desenvolveram mecanismos fisiológicos e biomoleculares, entretanto, nas células de organismos fotossintetizantes esses mecanismos estão mais fortemente desenvolvidos devido aos tilacóides, que são alvo primário dos efeitos deletérios oxidativos, por conterem lipídios saturados como componentes majoritários. Por esse motivo as algas possuem numerosas substâncias antioxidantes, mas também para aguentar as rápidas variações de intensidade de luz e concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> ao longo da coluna d'água. Razão pelas quais elas podem representar uma importante fonte de substâncias antioxidantes naturais tanto para a indústria alimentícia quanto para a farmacêutica (Matsukawa *et al.*, 1997).

### **10.2.** Material e métodos

## 10.2.1. Poder antioxidante de redução do ferro *"Ferric Reducing Ability of Plasma"* (FRAP)

Esse método foi modificado de Benzie e Strain (1996, 1999) e Griffin e Bhagooli (2004). Quando em pH baixo, o complexo tripiridil-triazina férrica (Fe<sup>III</sup>-TPTZ) é reduzido à tripiridil-triazina ferrosa (Fe<sup>II</sup>) obtendo uma coloração azul-escuro intensa que pode ser monitorada a 593 nm. A reação é não específica e qualquer meia-reação que tenha o mínimo de potencial redox, dentro das condições reacionais, o Fe<sup>III</sup>/Fe<sup>II</sup>-TPTZ vai conduzir a redução do FE<sup>III</sup>-TPTZ (Benzie e Strain 1996) (Figura 143).



Figura 143. Reação de redução da molécula tripiridil-triazina férrica (Fe<sup>III</sup>-TPTZ) a tripiridil-triazina ferrosa (Fe<sup>II</sup>-TPTZ).

 $FeCl_{3.6}H_{2}O$  foi usado como fonte de  $Fe^{+3}$  e a vitamina C (ácido ascórbico) como padrão antioxidante. Os resultados do ensaio FRAP são apresentados seguindo-se os valores de referência da reação cinética e da relação dose-resposta entre eles.

*Preparação dos reagentes*. A lista dos reagentes inclui 300 mM de tampão acetato, pH 3.6 (3.1 g acetato de sódio tri-hidratado ( $C_2H_3NaO_2*3H_2O$ ) e 16 mL ácido acético glacial em 1 L ddH<sub>2</sub>O); solução 10 mM 2,4,6-tripiridil-5-triazina (TPTZ) em 40 mM HCl; 20 mM FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (0.2703g/50 mL ddH2O). A solução para o ensaio é feita misturando-se 15mL de tampão acetato, 1,5 mL da solução de TPTZ e 1,5 mL da solução de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (10:1:1) e aquecendo-se a 37°C logo antes de usar.

*Preparação das amostras*. As amostras foram ressuspensas em MeOH nas concentrações finais de 100, 500 e 1000 µg/mL para os extratos e 50 µg/mL para os compostos puros.

*Curva de calibração*. A acurva de calibração foi feita partindo-se de uma solução aquosa de  $Fe^{II}$  em concentração conhecida para obtenção das concentrações finais de 2-120  $\mu$ M (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O).

*Amostra padrão*. Concentrações crescentes de ácido ascórbico (2,5, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 200 µg/mL) em MeOH foram usadas como padrão antioxidante.

*Ensaio FRAP*. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços. O reagente FRAP, preparado fresco, foi aquecido a 37 °C e 150  $\mu$ L foi adicionado aos poços usando uma pipeta multicanal seguido de 20  $\mu$ L do extrato/composto em MeOH. O branco da amostra foi feito usando-se 150  $\mu$ L de tampão e 20  $\mu$ L de amostra. E o branco do FRAP foi 150  $\mu$ L do reagente FRAP e 20  $\mu$ L de MeOH. Após

8 min de incubação a temperatura ambiente e no escuro, a placa foi lida a 593 nm. Os valores foram obtidos comparando as leituras encontradas com a curva padrão de sulfato ferroso. O valor final foi expresso em  $\mu$ M sulfato ferroso/g de extrato (ou composto). O experimento foi realizado em triplicata.

#### 10.2.2. Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

A capacidade de sequestro dos extratos e compostos do presente estudo contra o radical estável DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) foi determinado espectrofotometricamente de acordo com Yen e Chan (1995) com algumas pequenas modificações. O decréscimo da absorbância foi medida espectrofotometricamente a 517 nm num espectrofotômetro de UV-Visível (Infinit M200, TECAN).

Solução das amostras foram preparadas em MeOH. A solução de DPPH em MeOH (1 mM) foi preparada no dia. 10  $\mu$ L dessa solução foi misturada a 100  $\mu$ L da solução da amostra na concentração final de 50  $\mu$ g/mL/poço numa placa de 96 poços. As placas foram mantidas no escuro, a temperatura ambiente por 2 h até que fosse obtido o decréscimo das absorção. Observase a mudança da coloração roxa para amarela clara (Figura 144). As amostras do branco contendo MeOH e DPPH também foram medidas nas mesmas condições. Vitamine E (Trolox, Sigma-Aldrich) foi usada como controle positivo nas concentrações de 0,1, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu$ M. o experimento foi realizado em triplicata.



Figura 144. Reação de redução da molécula de 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH).

A capacidade de sequestro do radical foi calculado usando-se a fórmula:

% inhibition = 
$$\frac{Abs_{DPPH} - Abs_{sample}}{Abs_{DPPH}} \times 100$$

Onde:

Abs<sub>DPPH</sub> é a absorçãod o branco da amostra (MeOH + DPPH) e Abs<sub>sample</sub> é a absorção da soluçãoteste + DPPH.

## 10.3. Resultados e discussão

A avaliação do poder antioxidante de redução do ferro "*Ferric Reducing Ability of Plasma*" (FRAP) e capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) estão dispostos a seguir.

No ensaio com FRAP os resultados das amostras foram baseados na curva de calibração mostrada na Figura 145.



Figura 145. Curva de calibração do Fe<sup>II</sup>. Aumento diretamente proporcional da absorbância a 593 nm das concentrações das soluções de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (2-120  $\mu$ M).

Uma vez que as amostras dos extratos diclorometano bruto das 3 espécies trabalhadas no presente estudo foram as selecionadas para fracionamento e obtenção dos compostos isolados, delas também foram testadas as atividades antioxidantes. Os resultados encontram-se na Tabela 47.

Tabela 47. Poder antioxidante de redução do ferro "Ferric Reducing Ability of Plasma" (FRAP) e capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)Ferric dos extratos diclorometano bruto das espécies de *Laurencia aldingensis* (LA-DCM), *Laurencia dendroidea* (LD-DCM) and *Laurenciella* sp. (LI-DCM) a 100, 500 e 1000 µg/mL.

Amo	stra	<b>FRAP</b> ( $\mu$ M FeSO <sub>4</sub> ) ±	DDDU (0/ inibiaño)	
ID	[µg/mL]	SD	DFFH (% IIIDIçao)	
LA-DCM	100	$3 \pm 1$	$14 \pm 1$	
	500	$19 \pm 5$	$36 \pm 3$	
	1000	ND	$59 \pm 1$	
LD-DCM	100	$11 \pm 1$	$8\pm 2$	
	500	$54 \pm 10$	$28 \pm 4$	
	1000	$97 \pm 5$	$48 \pm 2$	
LI-DCM	100	$9 \pm 1$	$19 \pm 3$	
	500	$19 \pm 2$	$55 \pm 4$	
	1000	$21 \pm 3$	$82\pm 6$	

ND- não determinado

Os extratos testados quando ao potencial antioxidante não se mostraram muito ativos. No ensaio com FRAP a amostra LD-DCM a uma concentração de 1 mg/mL foi capaz de reduzir 54  $\mu$ M de sulfato ferroso. O que representa 1/3 do que o ácido ascórbico reduziu a uma concentração de 50  $\mu$ g/mL (Tabela 9). Os outros extratos foram ainda menos ativos.

Com relação ao ensaio com DDPH, LI-DCM foi o extrato mais ativo. A uma concentração de 1 mg/mL foi de reduzir mais de 80% do radical.

Já as substâncias isoladas não apresentaram nenhuma atividade antioxidante usando os métodos aqui utilizados (Tabela 48).

Substância	FRAP (µM FeSO4) ± DP	DPPH (% inibição) ± DP
1	$1\pm 0$	$1 \pm 1$
2	$1\pm 0$	$3\pm 5$
3	0	$8\pm8$
4	$1 \pm 0$	$4\pm7$
5	$10 \pm 00$	-1 ± 5
6	$2\pm0$	$0 \pm 4$
7	$1 \pm 0$	$-2 \pm 3$
8	$1 \pm 0$	$4\pm 5$
9	$1 \pm 0$	$-2 \pm 3$
12	$2\pm0$	$10 \pm 1$
13	$2\pm0$	$11 \pm 2$
15	$3 \pm 1$	$2 \pm 4$
16	$9 \pm 1$	$4 \pm 3$
Ácido ascórbico	$304 \pm 3$	NT
Trolox (25 µg/mL)	NT	93 ± 2

Tabela 48. Poder antioxidante de redução do ferro "Ferric Reducing Ability of Plasma" (FRAP) e capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) dos compostos a 50  $\mu$ g/mL em MeOH.

NT: não testado

# **11.ATIVIDADE CITOTÓXICA**

## 11.1. Introdução

Pesquisas por substâncias naturais com atividade antitumoral como alternativa viável na produção dos medicamentos têm sido intensificadas nos últimos anos com incentivo da OMS. Até os dias de hoje, bactérias e planta são as maiores fontes de drogas anticâncer, sendo doxorrubicina (nome comercial, adriamicina) e paclitaxel os exemplos mais importantes, respectivamente (Valeriote *et al.* 202, Subramanian *et al.* 2006, Valeriote *et al.* 2012).

Na busca por fontes alternativas de produtos naturais com atividade citotóxica, o ambiente marinho se tornou um alvo muito interessante, tanto pela riqueza de espécies quanto pela diversidade química produzida por eles. E, dentre os organismos marinhos, esponjas e algas deram origem à cerca de 65% das patentes em antitumorais e antivirais, além de fornecer o maior número de produtos naturais conhecidos.

Exemplos de triterpenos - deidrotirsiferol, deidrovenustatriol, isodeidrotirsiferol e tirsenol B - extraídos de *Laurencia* coletada nas Ilhas Canárias, Espanha, apresentaram forte atividade citotóxica contra células cancerígenas mamárias P-388 com  $IC_{50} = 0,01 \mu g/mL$  (Manriquez *et al.* 2001).

O extrato lipídico de *Laurencia intricata* de uma população da Jamaica apresentou atividade inibidora do fator transcricional HIF-1, responsável pela ativação da expressão gênica em condições de hipóxia (supressão de oxigênio e nutrientes). Nestas condições as células tumorais se adaptam e tornam-se mais resistentes ao tratamento por radio e quimioterapias. O fracionamento guiado por bioensaio deste extrato levou ao isolamento do diterpeno laurediterpineol (Mohammed *et al.*, 2004) que, em células T47D (linhagem tumoral de mama), inibiu os fatores HIF-1 e suprimiu a sobrevivência de células tumorais nestas condições. Devendo ser estudado como possível agente antitumoral. Da mesma alga também foram isolados outros poliéteres com atividade citotóxica (Fernàndez, *et al.* 1998).

Sesquiterpenos isolados de *Laurencia obtusa* (7-hidroxilaurano) e *L. microcladia* (laurinterol e bromolaurenisol), coletadas na Grécia apresentaram atividade citotóxica contra linhagens K562

(células de leucemia crônica mielogênica), MCF7 (derivadas de adenocarcinoma mamário), HeLa (adenocarcinoma de cérvice) e A431 (carcinoma epidermóide). Em todas as linhagens de células testadas, o 7-hidroxilaurano apresentou maior potência citotóxica (Machado *et al.*, 2010).

Recentemente verificou-se a atividade citotóxica de 14 sesquiterpenos obtidos de espécimes de *L. catarinensis* do litoral brasileiro contra as linhagens de células HT-29, MCF7 e A431. Dentre eles o (5S)-5-acetoxycaespitol, caespitol, acetylcaespitol, deoxycaespitol, caespitenone foram considerados os mais ativos, apresentando valores de IC<sub>50</sub> menores que 20  $\mu$ M (Lhulier *et al.* 2010).

Mesmo diante de todos estes exemplos supracitados, o maior dos desafios a ser superado é a descoberta e desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de tumores sólidos em humanos, especialmente nos casos de cancros metastáticos. Diante desta realidade, foi realizado ensaio citotóxico usando uma plataforma de difusão em disco para triagem seletiva de tumores sólidos.

Os procedimentos de atividade citotóxica foram desenvolvidos em parceria com o laboratório do Professor Frederick A. Valeriote PhD no Josephine Ford Cancer Center situado do Ford Health System (Detroit, US) por meio de um protocolo desenvolvido neste instituto como resultado da compilação da experiência e estudos ali realizados desde 1987.

O princípio se baseia na ideia de que a seletividade celular é a chave para o primeiro passo na descoberta de um novo agente antitumoral. E é sabido que ensaios com culturas celulares vão gerar uma porcentagem de falso-positivos, mas muito pouco falso-negativos se o experimento for bem desenhado. E os falso-positivos acorrem porque, quando o ensaio é estendido para *in vivo*, verifica-se que as células tumorais não são alcançadas pela droga nas mesmas proporções em todo o animal, ou porque alguma célula normal (que não é monitorada *in vitro*) tem alguma vulnerabilidade ao agente de forma similar ao tumor.

Assim, o ensaio *in vitro* de disco difusão em ágar macio (soft-agar disk-diffusion assay) é dependente de proliferação celular pois, é necessário que ocorra as múltiplas divisões celulares para visualização das colônias. A essência do ensaio baseia-se na comparação da atividade citotóxica da droga contra a leucemia, e insensibilidade da mesma contra tumores sólidos e células normais ao mesmo tempo, por exemplo. Isso definiria a seletividade celular das drogas em teste.

Esse procedimento foi validado e seus princípios são aplicados até hoje. No entanto, em 2006 sofreu algumas modificações por Subramanian *et al.* (2006) objetivando a realização de grandes *screenings*, tornando-se hoje um novo modelo para o desenvolvimento de agentes anticâncer provindos de produtos naturais. Esse modelo foi uma forma também de descentralizar as investigações dos anticancerígenos por indústrias farmacêuticas, levando-as a recorrer à academia e empresas de inovação biotecnológica.



Figura 146. Estratégia de estudos em extratos para descoberta de compostos que apresentam atividade seletiva para tumores sólidos (Ponto de Decisão 1), seguido pelas outras etapas do desenvolvimento (Ponto de Decisão 2), e seguindo até a avaliação terapêutica in vivo (Ponto de Decisão 3). Adaptado de Subramanian *et al.* 2006 e Valeriote *et al.* 2012.

O novo modelo está sumarizado de forma esquemática na Figura 146. A primeira etapa é constituída de um *screening* para obtenção de uma substância que seja seletiva e potente contra células de tumores sólidos. Nessa etapa (Ponto de Decisão 1 - PD1) a substância será caracterizada quimicamente e passará para o próxima etapa que requer aproximadamente 15 mg da droga, e onde será avaliado o IC<sub>50</sub> dessa substância, realizado ensaio clonogênico para definir a escala e concentração requerida para a sua efetividade, onde será definida a dose máxima tolerada (MTD) para a escala fornecida, e o estabelecimento de ensaios analíticos para subsequentes estudos farmacocinéticos tanto em plasma quanto em tumores de ratos tratados na MTD. Essas informações são então correlacionadas para determinar se o efeito terapêutico é possível. Se sim, então a droga passa para do Ponto de Decisão 2 (PD2) e, a partir daí, requer de 100-200 mg para seguir com testes terapêuticos. A droga deve mostrar eficácia *in vivo* para passar o Ponto de Decisão 3 (PD3) e seguir com os estudos direcionados de investigação da aplicação de novas drogas (INDA directed-studies). Para estes estudos finais requer que as drogas já sejam preparadas sinteticamente nas quantidade de gramas a quilos.

O esquema da Figura 146 representa o modelo proposto por Subramanian et al. (2006). No entanto, o procedimento usado no presente trabalho foi baseado em "grind-and-find" que significa o isolamento e identificação de todo e qualquer composto presente no organismo. E, isso se deu por alguns motivos. São eles: 1 - Grandes chances de escassez de material. Os extratos resultaram de um "pool" de biomassa algal proveniente de várias coletas, o que demonstra a dificuldade na obtenção de material suficiente para seus preparos. Além do rendimento de extração ser bem baixo, uma vez que aproximadamente 80% do talo da alga é constituído de água. Certamente, ensaios consecutivos com as frações e subfrações resultaria em extinção da matéria-prima, o que potencializaria as chances de não se chegar a composto algum, ou se chegar, não haver material suficiente para a caracterização química. 2 - duas das espécies de algas aqui estudadas (Laurencia aldingensis e Laurenciella sp.) são táxons novos cujos compostos químicos nunca foram estudados ou nunca foram estudados a fundo. Portanto, o conhecimento de seus constituintes majoritários já seria de grande importância no âmbito do estudo de produtos naturais marinhos e também de uma possível quimiotaxonomia. 3 - A colaboração selada com o Prof. Frederick Valeriote se deu numa etapa mais tardia do desenvolvimento do projeto, momento em que a maior parte dos compostos descritos nesta tese já havia sido isolada.

Vale ainda colocar como exemplo que, os laboratório grandes que trabalham com *screening* para obtenção de compostos ativos contra células de câncer iniciam com uma amostragem de aproximadamente 2000 extratos. Desses, em torno de 59% será inativo, 38% será pouco ativo e sem potencial para seletividade, em torno de 2% será tumor sólido-seletivo e, menos de 1% será seletivos para tumores humanos (Valeriote *et al.* 2002, Valeriote *et al.* 2012). Assim, o percentual de amostras que passam para outra etapa do processo de desenvolvimento de outras drogas é muito pequeno. Com isso podemos inferir que este seja um processo nãoaplicado a este trabalho.

#### **11.2.** Material e métodos

Os procedimentos básicos seguiu o modelo desenvolvido no laboratório do Professor Frederick A. Valeriote PhD no Josephine Ford Cancer Center que estão compilados num capítulo do livro Cytotoxic Anticancer Drugs (Corbett *et al.* 1992), onde ele coloca também a importância da padronização de todos os parâmetros como, quantidade e qualidade do ágar, tamanho do inóculo,

comportamento de difusão da droga, que possam de alguma forma acarretar em variabilidade experimental.

O que preferencialmente se espera de um candidato a fármaco anticâncer é que ele seja capaz de formar uma grande zona de inibição na placa ou total eliminação das colônias de tumores sólidos e pouca ou nenhuma toxicidade às células leucêmicas ou normais.

## 11.2.1. Preparação dos materiais para ensaio

## Meio Fisher's

- 400 mL de d-H20 estéril (Autoclavada)
- 50 mL de meio Fisher's 10X concentrado (Gibco)
- 7,5 ml de 7,5% NaHCO<sub>3</sub> (filtrado)
- Ajustar o pH para 7.1 a 7.2
- Ajustar o volume para 500 mL com d-H20
- 0,05 mL Garamicina (80 mg/2 mL, Schering)
- 55 mL soro de cavalo (ou soro fetal bovino, para alguns tumores)

## Meio CMRL-1066 enriquecido

- 400 mL d-H20 estéril (Autoclavada)
- 50 mL CMRL-1066 10X Concentrado (Gibco)
- 15 mL de 7,5% NaHCO<sub>3</sub> estéril Adicionar lentamente
- Ajustar o pH para 7,2 a 7,3
- Ajustar o volume até 500 mL com d-H20
- 20 mL CaCl<sub>2</sub> (100 mM) (1,47 g/100 mL, Gibco )
- 0,25 mL Penicilina-Streptomicina (10.000 unidades PNC/ml/10.000 µg strep, Gibco)
- 10 mL de L-Glutamina 100X (200 mM, Gibco) (manter congelado)
- 0,05 mL Garamicina (80 mg/2 mL, Schering)
- 75 mL soro de cavalo (ou soro fetal bovino, para alguns tumores)

## HBSS (Solução salina Balanceada de meio Hank's modificado para preparação das células)

- 50 mL (10x) de Hanks (Gibco)
- 400 mL DH20 estéril
- 50 mL de soro de cavalo
- 0,5 mL Pen-Strep (10.000 unidades PCN/mL, 10.000 µg strep, Gibco)
- 4 mL de NaHCO<sub>3</sub> (solução a 7,5%)

#### Para preparo da camada inferior do meio de cultura

- a. Aquecer 3.6% de ágar nobre (Difco) em água destilada até levantar fervura e dissolver.
- b. Colocar a garrafa com 160 mL de meio meio Fisher's/CMRL 1066 (1:1) já com o soro e antibióticos requeridos em banho-maria a 37 °C.
- c. Adicionar 40 mL de TSB 5% (Caldo Soja Tripticaseína, Sigma) autoclavado.
- d. Adicionar uma barra magnética estéril para manter a mistura homogênea.
- e. Adicionar 55 mL de ágar nobre e misture com a pipeta algumas vezes.
- f. Manter a mistura a 50 °C.
- g. Adicionar 3 mL da solução em placas de 60 mm, distribuir a solução por toda a placa , evitar a formação de bolhas e deixar secar por 30 min a temperatura ambiente e mantê-las em incubadora até o momento do uso.
- h. 1 garrafa de solução faz aproximadamente 80 placas.

*Calculo do número de células para serem usadas no preparo da camada superior* - A eficiência de plaqueamento dos tumores a ser usado é determinada (em agar mole), e os títulos ajustados para produzir aproximadamente 400 colônias da leucemia e 400 colônias ou maior (até 800) para o tumor sólido (por placa de 60 mm). Outros tipos de células (por exemplo, CFU-GM, tumores humanos) podem ser preparados em pratos separados e executados em paralelo

*Para preparo da camada superior do meio de cultura* - A camada superior é feita através da adição de 1,2 ml de ágar nobre 3,6% (mantido de 46 a 48 °C, nunca superior a 50 °C) para um tubo contendo 8 mL de solução de suspensão células na concentração ajustada para produzir aproximadamente 400 colônias de leucemia e 400 colônias ou mais (até 800) de tumor sólido (por placa de 60 mm) em meio de cultura. Homogeneizar com pipeta e, em seguida, pipetar 3 mL nas placas, por cima da camadas previamente preparadas. Deixar as placas a temperatura ambiente por 30 min. Adicionar 0,2 mL de meio de cultura em cada placa (repetir o procedimento a cada 2 dias para evitar ressecamento) e mantê-las em incubadora a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

*Discos* - Filtros de papel Whatman #1 furados em tamanho padrão - 6,5 mm. Os filtros são lavado com água ultrapura 3 vezes e depois com etanol, e em seguida autoclavados.

*Amostras* - Nos discos são aplicados 15  $\mu$ L de amostra. Os extratos são inicialmente avaliados a 250  $\mu$ g solubilizados em DMSO. Depois de evaporado o veículo de diluição, os discos são aplicados nas placas que foram previamente preparadas no dia anterior. Compostos puros são avaliados com 20  $\mu$ g.

*Preparação das células e condições de tratamento* - A maioria dos tumores de camundongo fornecem um número razoável de células em suspensão quando obtidos por ruptura mecânica. A solução em suspensão de células livres não é apenas impossível, mas desnecessária num ensaio de difusão em disco. Colônia são obtidas em número variado de células (1-20). Tumores cujas rupturas falham através de processos mecânicos, são digeridos com colagenase tipo II (1%) e DNAse (0,005%). A qualidade das células em suspensão é monitorada microscopicamente para avaliar o grau de desmembramento.

*Técnica de ruptura mecânica para tumores de camundongos de fácil desmembramento* - O tumor (1000-1500 mg) é cortado em fragmentos de 200-300 mg em 10-15 mL de solução salina gelada. O material é peneirado em peneira de malha 100, e o material residual é forçado a passar través dela usando a ponta dos dedos (com as mãos protegidas com 2 luvas estéreis) e a peneira é então lavada 2x com HBSS gelado. A suspensão é centrifugada a 150 x g/5 min, ressuspensa em 15 mL de HBSS e, novamente centrifugada. Por fim, as células são ressuspensas em 10 mL de meio CMRL/Fisher's (1:1) gelado.

As células leucêmicas também são mantidas em camundongos e são preparadas conforme os tumores sólidos.

*Técnica de ruptura mecânica para tumores de camundongos de difícil desmembramento* - O tumor (800-1400 mg) é cortado em fragmentos de 200-300 mg em 10-15 mL se solução salina gelada e desmembrado usando um Stomacher-80 por 20 seg. O material é peneirado em peneira de malha 45, e o material residual é forçado a passar través dela usando a ponta dos dedos (com as mãos protegidas com 2 luvas estéreis) e a peneira é então lavada 2x com HBSS. A solução de células é então passada mais 10X pela peneira malha 100 (sem forçar) com auxílio de uma seringa de vidro 5 cc sem agulha, onde a suspensão é sugada rapidamente e dispensada bem devagar. A peneira é lavada 2x com HBSS e a solução novamente centrifugada. Por fim, as células são ressuspensas em 10 mL de meio CMRL/Fisher's (1:1) gelado.

*CFU-GM da medula óssea como células controle normais* - Os fêmures de 3-5 camundongos foram removidos e limpos com gaze estéril. As articulações foram cortadas em ambas as extremidades. A medula foi lavada com 1 mL de meio CMRL/ Fisher's (1:1) usando uma seringa de 3 ml com uma agulha de calibre 23. A agulha foi removida e a medula foi homogeneizada para

dispersar as células que em seguida são contadas e o volume ajustado com o meio suplementado com 15% de meio condicionado com Dunn Osteogenic Sarcoma ou meio a-MEM suplementado condicionado com 10% de células L para dar  $3x10^6$  células/disco.

*Preparação das linhagens de células humanas* - Células tumorogênicas humanas são mantidas em cultura. E a obtenção das células pode se dar de forma mecânica ou enzimática. É preferido o método mecânico uma vez que este pode impor menos pressão seletiva sobre as células. Para tripsinização, as células devem ser removidas da superfície dos frascos antes de atingir a densidade de saturação. O seguinte método é usado: Remova a meio de cultura e adicione tripsina (0,25%) a 37 °C preparada em 0,02% de EDTA em tampão fosfato salino. Deixar repousar por 1 min. Remover a solução de tripsina e permitir que a garrafa repouse por 5 a 10 minutos adicionais até que as células se desprendam (pode-se observar sob microscópio óptico as células se tornando arredondadas). Adicionar meio fresco e pipetar as células em suspensão. Fazer a contagem das células conforme instruções abaixo e plaquear as células na concentração de 2 x  $10^5$ /placa (60 mm) para se obter 300 a 1000 colônias/placa.

Para o método mecânico, o meio antigo é removido da garrafa de cultura (75 cm<sup>2</sup>). 10 mL de meio fresco é adicionado e as células raspadas da superfície. As células junto com o meio são colocados em placa de petri de 10 mm e homogeneizado com a pipeta repetidamente (10 vezes) para desprender as células e facilitar a contagem.

*Contagem das célula (hemocitômetro)* - Foi adicionado à 100  $\mu$ L de suspensão de células em HBSS 10  $\mu$ L solução de trypan blue 0,4% (w/v) em PBS. A contagem celular se baseia na exclusão por corante, no qual as células mortas ou inviáveis se apresentam na coloração azul. A contagem celular no hemocitômetro seguiu Hansen (2000).

#### 11.2.2. Ensaio de disco-difusão in vitro

O ensaio de disco-difusão é ilustrado esquematicamente na Figura 147 e usado para fazer a diferenciação de morte celular entre os tipos de linhagens humanas testadas: uma linhagem de leucemia (CCRF-CEM), sete linhagens de tumores humanos sólidos (colo de útero H116, pulmão H125, mama MCF-7, próstata LNCaP, ovário OVC-5, cérebro U251N e pâncreas PANC-1) e células normais (células progenitoras hematopoiéticas CFU-GM).

#### Ensaio citotóxico por disco-difusão



Figura 147. Ensaio citotóxico por avaliação da formação de colônias em ensaio de disco-difusão em ágae macio. Adaptado de Valeriote *et al.* 2002.

Para a realização do ensaio, 15 µL de amostra foi adicionado no disco de papel de filtro, que foram deixados secar *overnight* e então colocados na borda da matriz das placas de petri contendo as células (preparada conforme descrito acima). Após 7 a 10 dias da incubação (dependendo do tipo de célula), a placas foram examinadas em estereomicroscópio invertido (10X) para medida da zona de inibição da colônia que é definida desde o começo da borda do filtro até o início da formação de colônias. O diâmetro do disco é de 6,5 mm, e que arbitrariamente assumiu-se ser 200 unidades de medida. Uma zona menor que 300 unidades é tida como sendo insuficientemente ativa. Os compostos em que a diferença (em zonas) entre células de tumores sólidos e células normais ou células leucêmicas for maior ou igual a 250 unidades, é tido como "seletivo para tumores sólidos". Se o composto em teste for excessivamente toxico para a células, faz-se a diluição de 1:4, e assim sucessivamente. Se for necessário diluir a amostra 16 ou mais vezes para obter uma zona de 500 unidades ou mais, ela é considerada "potente".

A primeira etapa do *screening* consiste em avaliar a toxicidade frente as células de tumores sólidos. Se o extrato/fração/composto apresentar atividade, o ensaio é prosseguido com a avaliação em células de leucemia e normais . Etapa em que se avalia a seletividade das amostras em teste.

## 11.3. Resultados e discussão

Uma tabela com os resultados do ensaio citotóxico por disco-difusão em ágar macio com os extratos brutos e compostos isolados estão dispostos na Tabela 49.

Com relação aos extratos testados LA-DCM, LD-DCM e LD-MeOH apresentaram certa toxicidade. LA-DCM foi igualmente ativo contra o tumor sólido de ovário OVC-5 e leucemia CEM (400 unidades de zona). Além de não se mostrar seletivo, também foi tóxico para células normais quase na mesma proporção (350 unid.). Extratos de *Laurencia dendroidea* foram os que apresentaram maiores zonas de inibição. LD-DCM chegou a apresentar zona >1000 unidades para a linhagem OVC-5 e de 300 a 500 unidades para todas as outras linhagens de câncer. No entanto, foi igualmente tóxico para a célula normal (500 unid.). E o extrato LD-MeOH se tornou o mais interessante pois apresentou zonas de tamanho que variaram de 300 a 650 unidades para todas as linhagens de câncer, tumores sólidos e leucemia. Além de não apresentar toxicidade às células normais. Isso mostra que o extrato é ativo para células de câncer, mas não seletivo.
Extrato	Linhagem celular								
Extrato/ Substânsis			Tu	imores sólio	los			Leucêmica	Normal
Substancia	H116	H125	MCF-7	LNCaP	OVC-5	U251N	PANC-1	CCRF-CEM	CFU-GM
DMSO	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LA-DCM	300	300	200	350	400	200	300	400	350
LA-MeOH	100	250	0	100	100	100	100	NT	NT
LD-DCM	300	350	400	500	>1000	400	450	400	500
LD-MeOH	400	600	300	500	650	400	400	400	0
LI-DCM	300	100	200	200	250	200	200	NT	NT
LI-MeOH	100	300	0	0	100	50	100	NT	NT
1	100	200	200	200	100	100	100	NT	NT
2	0	50	0	150	100	0	0	NT	NT
3	0	0	0	0	0	0	0	NT	NT
4	100	200	200	200	200	100	150	200	350
5	0	50	0	100	0	0	50	NT	NT
6	50	100	100	200	100	100	150	NT	NT
7	100	100	100	200	100	100	150	NT	NT
8	300	400	300	200	250	100	150	200	350
9	200	200	200	200	150	100	200	NT	NT
12	200	150	150	100	100	100	50	NT	NT
13	150	100	100	100	100	50	50	NT	NT
15	50	0	0	0	0	50	0	NT	NT
16	100	150	100	100	100	100	100	NT	NT

Tabela 49. Citotoxicidade dos extratos DCM e MeOH das espécies de *Laurencia aldingensis, Laurencia dendroidea* e *Laurenciella* sp., e de substâncias isoladas, contra várias linhagens de tumores celulares no ensaio de disco-difusão em ágar macio<sup>a</sup>.

<sup>*a*</sup> medida em unidade de zona: 200 unidades de zona = 6,5 mm. Tumores humanos sólidos (colo de útero H116, pulmão H125, mama MCF-7, próstata LNCaP, ovário OVC-5, cérebro U251N e pâncreas PANC-1), linhagem leucêmica (CCRM-CEM) e células normais (células progenitoras hematopoiéticas de camundongos CFU-GM). NT: Não testado.

Das substâncias testadas, **8** apresentou alguma atividade na concentração testada (H116 e MCF-7 com 300 unid. e H125 com 400 unid.). Mas ele, no entanto, também foi tóxico para a célula normal. Todos os outros compostos não se mostraram citotóxicos.

O diferencial do presente estudo em relação a outros métodos que são testados é a capacidade de avaliação da seletividade de um compostos quando ele inibe ou impede o crescimento das células de tumores sólidos ou leucêmicas, mas não das células normais. Infelizmente nenhum resultado verdadeiramente promissor foi encontrado com as substâncias isoladas neste tabalho para que os estudos pudessem avançar.

#### **12. ATIVIDADE ANTIESQUISTOSSOMOSE**

#### 12.1. Introdução

A esquistossomose é uma doença parasitária de grande impacto social causada pelo trematódeo do gênero *Schistosoma* Weinland, que permanece como grave problema de saúde pública em muitos países em desenvolvimento (Steinmamm *et al.* 2006). Enquanto a maioria das parasitoses humanas vai diminuindo de importância em função do desenvolvimento econômico e dos métodos de controle disponíveis, a esquistossomose encontra-se ainda em expansão em muitas regiões do mundo. No Brasil, a esquistossomose mansônica é endêmica em 19 estados apresentando entre 6 a 8 milhões de infectados e 26 milhões em risco de infecção (Rollinson *et al.* 2013).

Com surgimento do praziquantel em 1970, uma redução significativa da morbidade e da mortalidade devido à esquistossomose foi observada. No entanto, inúmeros relatos mostram o crescente surgimento de linhagens de *Schistosoma mansoni* resistentes a esta droga, que atualmente é o único quimioterápico para tratamento da esquistossomose (Doenhoff *et al.* 2008). Além disso, este fármaco é eficiente somente contra as formas adultas do esquistossomo (Utzinger *et al.* 2003). Desta forma, o desenvolvimento de novas drogas que possam atuar no combate desta parasitose não só na forma adulta, mas também nas formas jovens, se faz necessário.

*Schistosoma mansoni* é um organismo que passa por diversas fases e vive em hospedeiros e ambientes diversificados, com grande capacidade de adaptação, multiplicação e resistência. As fases do ciclo biológico do *S. mansoni* (Figura 148) compreendem dois estágios parasitários: um no hospedeiro intermediário (nos caramujos do gênero Biomphalaria de água doce, no qual realizam o ciclo assexuado) e outro no hospedeiro definitivo (mamíferos das ordens Primata, Rodentia, Artiodactyla e Carnivora, nos quais realizam a fase sexuada). E, entre as fases parasitárias há dois estágios de vida livre em meio aquático: as fases de miracídio e cercária (Gryseels et *al.* 2006).



Figura 148. Fases do ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose. Fonte CVE (2005).

No hospedeiro definitivo, os vermes adultos de *S. mansoni* se alojam no intestino e ali depositam cerca de 300 ovos por dia, dos quais um terço a um meio chegam a ser eliminados pelas fezes do hospedeiro. O verme ali, pode chegar a viver 30 anos eliminando ovos (Gryseels *et al.* 2006).

Quando as fezes entram em contato com a água, os ovos eclodem e liberam os miracídios, forma larvária do helminto que penetra no caramujo. No caramujos, os parasitas se multiplicam dando origem às cercárias, que são liberadas na água após cerca de 30 dias. Quando os mamíferos entram em contato com água, as cercárias penetram a pele, perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos. E ganham a circulação sistêmica alojando-se nas veias mesentéricas através do sistema porta-hepático. Após 5 semanas, quando atingem a maturidade sexual, os parasitas dão início a postura de ovos, que começam a aparecer nas fezes 40 dias após a infecção, permitindo o recomeço do ciclo (Ross *et al.* 2002, Blanchard 2004, Gryseels *et al.* 2006).

#### 12.2. Material e Métodos

Os ensaios de avaliação da atividade esquistossomicida foram realizados no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan em colaboração com a Profa. Dra. Eliana Nakano e equipe.

# 12.2.1. Avaliação da viabilidade de *Schistosoma mansoni* em presença dos extratos de algas e compostos isolados das espécies de *Laurencia aldingensis*, *L. dendroidea* e *Laurenciella* sp.

Para o experimento, se faz necessário manter o ciclo do helminto trematódeo causador da esquistossomose, *Schistosoma mansoni* (Sambon 1907). Para isso, caramujos hospedeiros *Biomphalaria glabrata* (Say 1818) infectados foram cultivados em aquários de polietileno (22 x 55 x 17 cm) com cerca de 20 litros de água filtrada com aeração em temperatura ambiente e alimentados com alface fresca. Os caramujos são provenientes de Belo Horizonte, Minas Gerais e já são mantidos há mais de 20 anos no Instituto Butantan. E os hamsters (*Mesocricetus auratus*), fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan, SP, foram mantidos em caixas de polipropileno (40 x 34 x 16 cm) com tampa metálica e alimentados com ração e água *ad libitum*. Os roedores são recémdesmamados, do sexo feminino, pesando aproximadamente 40 g.

Os hamsters foram infectados subcutaneamente com aproximadamente 250 a 300 cercárias. Após cerca de 42 dias, os hamsters foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> para a retirada do fígado e obtenção dos miracídios.

Os moluscos sexualmente maduros foram colocados, individualmente, em placas de cultura de células com 24 poços contendo água filtrada e 10 miracídios. A exposição dos moluscos aos miracídios foi realizada sob luz artificial de lâmpada incandescente de 60 W durante 4 horas. Após 30 dias, os moluscos foram colocados sob a luz artificial durante 30 minutos para a eliminação das cercárias, que foram então utilizadas na infecção dos hamsters.

Os adultos de *S. mansoni* com 42 dias de idade foram recuperados dos hamsters por perfusão do sistema porta hepático como descrito por Smithers e Terry (1965). A perfusão foi realizada com meio RPMI 1640 contendo L-glutamina, vermelho de fenol e heparina sódica 5 UI/ml. Os hamsters foram sacrificados por inalação de CO<sub>2</sub> e, posteriormente,

fez-se uma secção longitudinal na região ventral, expondo-se os órgãos internos. A veia porta é cortada e, com o auxílio de uma agulha acoplada a uma bomba peristáltica, injetase meio de cultura diretamente no coração do animal para coleta dos vermes adultos (Smithers e Terry 1965).

Os ensaios *in vitro* com vermes adultos foram realizados com machos e fêmeas acasalados. Os pares de vermes obtidos dos hamsters por perfusão foram lavados 2 vezes com o meio RPMI 1640 esterilizado por filtração, contendo penicilina 200 U/mL, estreptomicina 200  $\mu$ g/mL e anfotericina B 2  $\mu$ g/ml em placa de Petri. Posteriormente, os parasitas acasalados foram transferidos para placas de cultura de células com 24 poços contendo, por poço, 1 casal de vermes em 2 ml do meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e tamponado com HEPES 25 mM (Xiao e Catto 1989, Ramirez *et al.* 2007, Xiao *et al.* 2007, El Ridi *et al.* 2010, Moraes *et al.* 2009, Moraes 2011, Moraes *et al.* 2011a).

Os compostos foram diluídos no meio de cultura antes da adição dos parasitas em concentração final de DMSO 1,5%. Praziquantel 1500 ng/mL foi utilizado como controle positivo e poços contendo somente meio de cultura ou meio com DMSO 1,5%, como controle negativo. As culturas foram mantidas a 37 °C, em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% e monitoradas diariamente por 5 dias, com o auxílio de um microscópio invertido e um estereomicroscópio.

As culturas de vermes adultos foram monitoradas diariamente por meio de microscópio estereoscópico. Foram analisadas a atividade motora, morte e a capacidade reprodutiva. A morte foi estabelecida pela ausência total de movimentos e a capacidade reprodutiva foi avaliada pelo acasalamento e oviposição das fêmeas. O número de ovos foi contado com o auxílio de um estereomicroscópio.

Um primeiro screening foi realizado usando os extratos fracionados e diclorometano bruto de *L. aldingensis* (LA-EH, LA-EC, LA-EM e LA-DCM), de *Laurencia dendroidea* (LD-EH, LD-EC, LD-EM e LD-DCM), e de *Laurenciella* sp. (LI-EH, LI-EC, LI-EM e LI-DCM) na concentração de 100 µg/mL para a atividade *in vitro* com *S. mansoni*.

Dos resultados obtidos, aqueles mais interessantes, foram novamente estudados em outras concentrações (4, 20 e  $100 \,\mu$ g/mL).

Os resultados de atividade biológica dos extratos, juntamente com dados cromatográficos, foram de extrema importância para direcionar a escolha daquele que seria fracionado. O fracionamento se deu conforme descrito na seção 8.

Conforme também relatado no capítulo de ensaio citotóxico o procedimento usado no presente trabalho foi baseado em "grind-and-find" que significa o isolamento e identificação de todo e qualquer composto presente no organismo. O motivo para isso foi o fato da biomassa algal ter em torno de 80% de água na sua composição, o que reduz consideravelmente o material de estudo após desidratação. Os extratos partiram de um *pool* de amostras resultante de várias coletas em épocas e locais diferentes, e o fracionamento bioguiado teria que se dar do começo ao fim a partir de um mesmo extrato, o que não seria garantido com os extratos preparados. O que não seria garantido, também, seria a certeza de encontrar essas espécies na época que precisasse, já que a ocorrência delas é sazonal e este comportamento vem sendo mudado brutalmente devido aos impactos ambientais na zona costeira do ES.

Outro aspecto que direcionou a escolha do "grind-and-find" ao invés do fracionamento bioguiado foi o fato de duas das espécies de algas aqui estudadas (*Laurencia aldingensis* e *Laurenciella* sp.) serem táxons novos cujos compostos químicos nunca foram estudados ou nunca foram estudados a fundo. Portanto, o conhecimento de seus constituintes majoritários já seria de grande importância no âmbito do estudo de produtos naturais marinhos.

Dezesseis compostos foram isolados e quinze deles foram estudados quanto à atividade esquistossomicida. Os resultados encontram-se descritos e discutidos abaixo.

### 12.3. Resultado e Discussão

# 12.3.1. Avaliação da viabilidade de adultos de *Schistosoma mansoni* em presença dos extratos de algas

Em uma primeira fase de testes, foi feito um screening com todos as amostras, que foram testadas quanto à viabilidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* a uma concentração 100  $\mu$ g/mL em diferentes tempos de incubação. Os compostos presentes nestes extratos reduziram a motilidade e causaram morte dos parasitas de forma diretamente dependente do tempo de incubação.

O resultado da atividade dos extratos fracionados e diclorometano bruto de *L. aldingensis* (LA- EH, LA-EC, LA-EM e LA-DCM) está representado abaixo:



Figura 149. Efeito das frações de *L. aldingensis* na sobrevivência de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Cinco casais de vermes foram incubados em poços contendo meio RPMI com adição de 100  $\mu$ g/mL de extrato e avaliados em diferentes tempos de exposição (2 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h).

Com relação aos extratos de *L. aldingensis*, LA-FH causou morte nas fêmeas de *Schistosoma* a partir das primeiras 24 h e, em 120 h de incubação provocou morte em todos os indivíduos. LA-FC, em 120 h de incubação, ocasionou morte em 40% dos vermes machos. Enquanto LA-FM não provocou morte alguma após o fim do período de incubação. O extrato bruto LA-DCM se mostrou bastante interessante uma vez que em 24 h já causou 80% de morte nas fêmeas e em 48 h já não havia mais fêmeas vivas. E, ao fim de 72 h de incubação nenhum verme sobreviveu.





Figura 150. Efeito das frações de *L. dendroidea* na sobrevivência de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Cinco casais de vermes foram incubados em poços contendo meio RPMI com adição de 100  $\mu$ g/mL de extrato e avaliados em diferentes tempos de exposição (2 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h).

O extrato LD-FM e LD-DCM não apresentou qualquer sinal de toxicidade frente aos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em até 120 h de exposição. Já os extrato LD-FH e LD-FC apresentaram alguma atividade. Sendo que LD-FH promoveu a morte de 40% das fêmeas em 48 h. O mesmo percentual de mortes em machos se deu em 96 h de exposição, mas em 120 h de exposição, 100% dos casais estavam mortos. LD-FC começou a mostrar atividade em 96 h de exposição, onde 20% dos machos e 40% das fêmeas permanciam vivos, mas em 120 h houve 100% de morte dos casais.

Os resultados da atividade dos extratos fracionados de *Laurenciella* sp. (LI-EH, LI-EC e LI-EM) estão representados abaixo:



Figura 151. Efeito dos extratos LI-FH, LI-FC, LI-FM e LI-DCM de *Laurenciella* sp. na sobrevivência de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Cinco casais de vermes foram incubados em poços contendo meio RPMI com adição de 100  $\mu$ g/mL de extrato e avaliados em diferentes tempos de exposição (2 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h). ND: não determinado.

*Laurenciella* sp. teve resultados interessantes com o extrato LI-FC, no qual as fêmeas tiveram baixa taxa de sobrevivência (20%) em 72 h de exposição ao extrato. E, com 96 h de incubação houve mortalidade de 100% dos indivíduos. Já o extrato LI-DCM, em 96 h de incubação, a taxa de sobrevivência para machos e fêmeas foi de 20% e 40%, respectivamente. No entanto, LI-FH, LI-FM não interferiram na taxa de sobrevivência do parasito.

O veículo de diluição dos extratos DMSO foi usado como controle negativo, bem como o Praziquantel como controle positivo (Figura 152). Ao fazermos uma análise das substâncias das algas, vemos que, de forma geral, as fêmeas são mais suscetíveis que os machos. O que pode ser bastante promissor principalmente quando se compara com o

praziquantel, cujo efeito na mortalidade dos machos já é de 100% nas primeiras 24h enquanto 70% das fêmeas permanecem vivas.



Figura 152. Efeito do veículo de diluição DMSO (controle negativo) e do praziquantel (controle positivo) na sobrevivência de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Cinco casais de vermes foram incubados em poços contendo meio RPMI com adição de DMSO 1,5% e avaliados em diferentes tempos de exposição (2 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h).

Os extratos identificados como ativos no screening inicial, LA-FH, LA-DCM e LI-FC, foram avaliados com concentrações mais baixas (4, 20 e 100 µg/mL) a fim de explorar o potencial destes extratos com relação a taxa de sobrevivência dos indivíduos adultos (Figura 153Figura 154, Figura 155).



Figura 153. Efeito da fração hexânica de *Laurencia aldingensis* na sobrevivência de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Cinco casais de vermes foram incubados em poços contendo meio RPMI com concentrações crescentes de extrato (4, 20 e 100  $\mu$ g/mL) e avaliados em diferentes tempos de exposição (2 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h).

#### LA-DCM



Figura 154. Efeito do extrato diclorometano de *Laurencia aldingensis* na sobrevivência de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Cinco casais de vermes foram incubados em poços contendo meio RPMI com concentrações crescentes de extrato (4, 20 e 100  $\mu$ g/mL) e avaliados em diferentes tempos de exposição (2 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h).

#### LI-FC



Figura 155. Efeito da fração clorofórmica de *Laurenciella* sp. na sobrevivência de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Cinco casais de vermes foram incubados em poços contendo meio RPMI com concentrações crescentes de extrato (4, 20 e 100  $\mu$ g/mL) e avaliados em diferentes tempos de exposição (2 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h).

Os resultados deste segundo experimento divergiram um pouco do primeiro. Nenhuma fração foi ativa com concentrações de 4  $\mu$ g/mL e 20  $\mu$ g/mL. Com 100  $\mu$ g/mL, foi detectada atividade do LA-DCM.

### 12.3.2. Efeito dos extratos na atividade motora e no acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*

O *Schistosoma mansoni* adulto é tipicamente um helminto delgado e longo e apresentam uma variedade de movimentos como encurtamento e alongamento do corpo e, movimentos peristálticos e ondulatório (da Silva e Noel 1995). Por observação visual com auxílio de um estereomicroscópio é possível detectar alterações na atividade motora dos vermes em estudo.

Apesar de subjetivo, esse critério qualitativo é comumente empregado nos ensaios *in vitro* (Xiao *et al.* 2007, Magalhães *et al.* 2009, Parreira *et al.* 2010, Moraes *et al.* 2011b) e a alteração definida como "leve" ou "significativa". As Tabela 50, Tabela 51 Tabela 52 mostram a influência dos extratos das algas na motilidade e acasalamento dos adultos de *S. mansoni.* Nelas, a redução da atividade motora e mortalidade devem ser avaliadas como sendo o conjunto total de indivíduos (100% dos 5 casais de vermes).

O acasalamento é fundamental para proteção da fêmea e, principalmente para maturidade sexual, sendo assim um parâmetro muito importante na avaliação dos efeitos sobre a reprodução.

Desde as primeiras horas de exposição já há interferência de LA-FH no acasalamento dos vermes adultos e, em 24 h já se tem índice expressivo na redução da atividade motora e também morte. Na exposição a LA-FC, a partir de 24 h se observa interferência no acasalamento e, com 96 h de exposição tem-se 100% de redução de atividade motora, sendo 90% dessa redução, significativa. LA-FM não interfere no acasalamento e, apenas em longo tempo de exposição observa-se uma leve alteração na atividade motora. Já com LA-DCM, nas primeiras 2 h de exposição já se tem 80% dos casais separados e em 72 h, 100% de morte (Tabela 50).

LD-FH não promove a separação total dos indivíduos, mas já nas primeiras horas observa-se redução da atividade motora. A partir de 48 h inicia-se a interferência na sobrevivência dos vermes, sendo que, em 120 h a taxa de mortalidade chega a 100%. Com LD-FC, 100% dos casais estão separados em 48 h de exposição. Momento também em que a atividade motora dos indivíduos é reduzida expressivamente até que, em 120 h, 100% deles estão mortos. Já com o extrato LD-FM pouco efeito é observado na atividade motora dos vermes. Nota-se apenas, nos maiores tempos de incubação, alguma

interferência no acasalamento. LD-DCM, apesar de causar 100% da separação dos casais já nas primeiras horas de incubação, nenhuma morte dos vermes se efetiva. No entanto, há interferência da atividade motora seja de forma leve ou significativa (Tabela 51).

Nas duas primeiras horas de exposição ao extrato LI-FH já temos 80% de separação dos casais. Mas não se observa nenhuma morte, apenas uma alteração leva na motilidade em 50% dos indivíduos . Em 48 h, mais da metade dos casais se separam quando expostos a LI-FC. Em 72 h observa-se que 100% dos casais estão separados, 50% dos indivíduos mortos e outros 50% dos indivíduos sofreram alguma alteração na motilidade. Já LI-FM causa poucos efeitos nos vermes. Após longo período de exposição (96 h), 20% dos casais se separam e, em 120 h 20% dos indivíduos apresentam alteração leve na motilidade (Tabela 52).

Extratos	Tempo de	Vermes	Redução da atividade motora (%) <sup>a</sup>		Mortalidade
$(100 \ \mu g/mL)^b$	incubação (h)	separados (%)	Leve	Significativa	(%) <sup>a</sup>
LA-FH	2 h	20	0	0	0
	24 h	60	30	40	30
	48 h	80	0	40	60
	72 h	80	0	10	90
	96 h	80	0	10	90
	120 h	80	0	0	100
LA-FC	2 h	0	0	0	0
	24 h	20	0	0	0
	48 h	100	0	0	0
	72 h	100	60	0	0
	96 h	100	10	90	0
	120 h	100	10	90	0
LA-FM	2 h	0	0	0	0
	24 h	0	0	0	0
	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	0	0	0
	96 h	0	20	0	0
	120 h	0	20	0	0
LA-DCM	2 h	80	0	0	0
	24 h	100	40	20	40
	48 h	100	0	50	50
	72 h	100	0	0	100
	96 h	100	0	0	100
	120 h	100	0	0	100

Tabela 50. Efeito dos extratos da alga *L. aldingensis* na atividade motora e acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*.

<sup>a</sup> Porcentagem em relação ao número total de indivíduos. <sup>b</sup> Em DMSO 1,5% no meio RPMI. A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente. O experimento se deu com 5 casais de vermes.

Extratos	Tempo de	Vermes	Redução da atividade motora (%) <sup>a</sup>		Mortalidade
$(100 \ \mu g/mL)^b$	incubação (h)	separados (%)	Leve	Significativa	(%) <sup>a</sup>
LD-FH	2 h	40	80	20	0
	24 h	40	30	70	0
	48 h	80	30	50	20
	72 h	80	20	60	20
	96 h	60	0	50	50
	120 h	80	0	0	100
LD-FC	2 h	0	0	0	0
	24 h	60	0	0	0
	48 h	100	10	70	0
	72 h	100	0	70	10
	96 h	100	10	20	70
	120 h	100	0	0	100
LD-FM	2 h	20	0	0	0
	24 h	0	0	0	0
	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	0	0	0
	96 h	40	0	0	0
	120 h	60	30	0	0
LD-DCM	2 h	100	50	0	0
	24 h	100	100	50	0
	48 h	100	80	20	0
	72 h	100	50	50	0
	96 h	100	60	20	0

Tabela 51. Efeito dos extratos da alga *L. dendroidea* na atividade motora e acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*.

<sup>a</sup> Porcentagem em relação ao número total de indivíduos. <sup>b</sup> Em DMSO 1,5% no meio RPMI. A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente. O experimento se deu com 5 casais de vermes

Extratos	Tempo de	Vermes	Redução da atividade motora (%) <sup>a</sup>		Mortalidade
$(100 \ \mu g/mL)^b$	incubação (h)	separados (%)	Leve	Significativa	(%) <sup>a</sup>
LI-FH	2 h	80	0	0	0
	24 h	100	0	0	0
	48 h	100	0	0	0
	72 h	100	0	0	0
	96 h	100	0	0	0
	120 h	100	50	10	0
LI-FC	2 h	0	0	0	0
	24 h	0	0	0	0
	48 h	60	20	0	0
	72 h	100	20	30	50
	96 h	100	0	0	100
	120 h	100	0	0	100
LI-FM	2 h	0	0	0	0
	24 h	0	0	0	0
	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	0	0	0
	96 h	20	0	0	0
	120 h	20	20	0	0
LI-DCM	2 h	100	0	0	0
	24 h	100	60	0	0
	48 h	100	50	0	0
	72 h	100	50	30	0
	96 h	100	0	30	70
	120	ND	ND	ND	ND

Tabela 52. Efeito dos extratos da alga *Laurenciella* sp. na atividade motora e acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*.

<sup>a</sup> Porcentagem em relação aos indivíduos. <sup>b</sup> Em DMSO 1,5% no meio RPMI. A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente.O experimento se deu com 5 casais de vermes.

Amostra	Tempo de	Vermes	Redução da atividade motora (%) <sup>a</sup>		Mortalidade
controle	incubação (h)	separados (%)	Leve	Significativa	(%) <sup>a</sup>
DMSO <sup>b</sup>	2 h	0	0	0	0
	24 h	0	0	0	0
	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0
	120 h	0	0	0	0
PZQ <sup>b,c</sup>	2 h	0	0	100	0
	24 h	0	0	43	57
	48 h	0	0	36	64
	72 h	0	0	29	71
	96 h	0	0	21	79
	120 h	0	0	21	79

Tabela 53. Efeito dos controles negativo e positivo na atividade motora e acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*.

<sup>a</sup> Porcentagem em relação aos indivíduos. <sup>b</sup> DMSO 1,5% no meio RPMI.<sup>c</sup> Controle positivo: Praziquantel (PQZ 1500 ng/mL). A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente.O experimento se deu com 7 casais de vermes.

O controle negativo utilizado como veículo de diluição para solubilizar as amostras nos mostra que o DMSO 1,5% em meio RPMI não interfere na sobrevivência dos indivíduos. Com o controle positivo utilizado, praziquantel, nas primeiras 2 h já se observa que 100% dos vermes tem alteração significativa na motilidade e, a partir de 24 h tem-se quase 60% de morte dos indivíduos (Tabela 53).

Diante dos resultados apresentados por LA-FH, LA-DCM e LI-FC, novo experimento foi realizado usando concentrações mais baixas (4, 20 e 100  $\mu$ g/mL) a fim de explorar o potencial destes extratos com relação a atividade motora e acasalamento (Tabela 54).

LA-FH	Tempo de	Vermes	Redução da ativ	Redução da atividade motora (%) <sup>a</sup>	
$(\mu g/mL)^b$	incubação (h)	separados (%)	Leve	Significativa	(%) <sup>a</sup>
Δ	2 h	0	0	0	0
т	24 h	0	0	0	0
	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0
	120 h	0	0	0	0
20	2 h	0	0	0	0
	24 h	0	0	0	0
	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0
	120 h	0	0	0	0
100	2 h	0	0	0	0
	24 h	80	0	100	0
	48 h	0	0	80	20
	72 h	0	0	80	20
	96 h	0	0	0	100
	120 h	0	0	0	100

Tabela 54. Efeito da fração hexânica da alga *L. aldingensis* em diferentes concentrações na atividade motora e acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*.

<sup>a</sup> Porcentagem em relação aos indivíduos. <sup>b</sup> Em DMSO 1,5% no meio RPMI. A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente. O experimento se deu com 5 casais de vermes.

LA-DCM	Tempo de	Vermes	Redução da ativ	vidade motora (%) <sup>a</sup>	Mortalidade
$(\mu g/mL)^{b}$	incubação (h)	separados (%)	Leve	Significativa	(%) <sup>a</sup>
4	2 h	0	0	0	0
4	24 h	0	0	0	0
	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0
	120 h	20	0	0	0
20	2 h	0	0	0	0
	24 h	0	0	0	0
	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0
	120 h	0	0	0	0
100	2 h	40	0	0	0
	24 h	80	30	70	0
	48 h	100	10	90	0
	72 h	100	0	50	50
	96 h	100	0	40	60
	120 h	100	0	0	100

Tabela 55. Efeito do extrato diclorometano da alga *L. aldingensis* em diferentes concentrações na atividade motora e acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*.

<sup>a</sup>Porcentagem em relação aos indivíduos. <sup>b</sup>Em DMSO 1,5% no meio RPMI. A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente. O experimento se deu com 5 casais de vermes.

LI-EC	Tempo de	Vermes	Redução da ati	vidade motora (%) <sup>a</sup>	Mortalidade
(µg/mL) <sup>b</sup>	incubação (h)	separados (%)	Leve	Significativa	(%) <sup>a</sup>
4	2 h	0	0	0	0
т	24 h	0	0	0	0
	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0
	120 h	20	0	0	0
20	2 h	0	0	0	0
	24 h	0	0	0	0
	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0
	120 h	0	20	0	0
100	2 h	20	0	0	0
	24 h	0	0	0	0
	48 h	80	0	0	0
	72 h	100	0	40	10
	96 h	100	0	40	30
	120 h	100	0	0	100

Tabela 56. Efeito da fração clorofórmica da alga *Laurenciella* sp. em diferentes concentrações na atividade motora e acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*.

<sup>a</sup> Porcentagem em relação aos indivíduos. <sup>b</sup> Em DMSO 1,5% no meio RPMI. A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente. O experimento se deu com 5 casais de vermes.

Controlog	Tempo de	Vermes	Redução da ati	vidade motora (%) <sup>a</sup>	Mortalidade
Controles	incubação (h)	separados (%)	Leve	Significativa	(%) <sup>a</sup>
DMSO	2 h	0	0	0	0
(1.5%)	24 h	0	0	0	0
(1,570)	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0
	120 h	0	0	0	0
PZQ	2 h	0	0	100	0
(1500 ng/mL)	24 h	0	0	43	57
	48 h	0	0	36	64
	72 h	0	0	29	71
	96 h	0	0	21	79
	120 h	0	0	21	79

Tabela 57. Efeito dos controles positivo (DMSO) e negativo (Praziquantel) na atividade motora e acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*.

<sup>a</sup> Porcentagem em relação aos indivíduos. A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente. O experimento se deu com 7 casais de vermes.

Neste segundo experimento, concentrações mais baixas dos extratos,  $4 \mu g/mL e 20 \mu g/mL$  não interferiram no acasalamento e motilidade dos indivíduos. Os resultados de 100  $\mu g/mL$ , apesar de não terem reproduzido de forma tão fiel ao primeiro experimento (o que é totalmente plausível uma vez que estamos tratando de organismos vivos e indivíduos separados), corroboraram com os resultados interiores. Estes resultados continuam sendo bastante interessantes e, compostos majoritários presentes nestes extratos precisam ser também investigados.

#### 12.3.3. Efeitos dos extratos na oviposição de Schistosoma mansoni

A capacidade reprodutiva também foi avaliada pela oviposição das fêmeas, uma vez que são os ovos no tecido do hospedeiro os principais responsáveis pela patologia da esquistossomose (Gryssels *et al.* 2006). Assim, na busca por novos compostos para a terapêutica experimental, deve-se considerar drogas supressoras, que acabem com a oviposição das fêmeas e eliminem o principal agente patogênico. Além de interromper a transmissão da helmintose (Katz 2008). Nos ensaios, os ovos foram contados ao fim do experimento com auxílio de um estereomicroscópio. Quanto a oviposição, os extratos

metanólicos foram os únicos que não causaram efeito. Todos os outros interferiram fortemente na postura, 100% , ou bem próximo a isso (Figura 156)



Figura 156. Efeito dos extratos de *Laurencia aldingensis*, *L. dendroidea* e *Laurenciella* sp. na oviposição de fêmeas de *Schistosoma mansoni*. Os casais de vermes foram incubados em meio RPMI contendo 100  $\mu$ g/mL de extrato. A contagem dos ovos foi realizada após o tempo final de incubação.Os valores são as médias das unidades de postura de 5 casais e as barras representam o desvio padrão da média. Controle positico (DMSO 1,5%) e negativo (Praziquantel - PZQ 1500 ng/mL) também estão representados.

Baseando-se nos resultados de mortalidade, acasalamento e motilidade, com os três extratos LA-FH, LA-DCM e LI-FC, os ovos foram contados a fim de avaliarmos a interferência deles, em concentrações mais baixas (4, 20 e 100 µg/mL), também na oviposição.

Os resultados nas concentrações mais baixas de LI-FC (4 e 20  $\mu$ g/mL) foram da mesma ordem do controle negativo. No entanto, os resultados de LA-FH e LA-DCM foram bastante pronunciados na concentração de 20  $\mu$ g/mL, principalmente a fração hexânica de *L. aldingensis*. Além de investigar a possibilidade dos compostos majoritários estarem atuando efetivamente na reprodução, será interessante avaliar se a inibição na postura das fêmeas é um processo reversível ou não. Se for um processo irreversível, combater a helmintose através dos eu foco, torna-se muito relevante (Figura 157).



Figura 157. Efeito das diferentes concentrações dos extratos mais ativos de *Laurencia aldingensis* e *Laurenciella* sp. na oviposição de fêmeas de *Schistossoma mansoni*. A contagem dos ovos foi realizada após o tempo final de incubação. Os valores são as médias das unidades de postura de 5 casais e as barras representam o desvio padrão da média.

# 12.3.4. Avaliação da viabilidade de adultos de *Schistosoma mansoni* em presença das substâncias isoladas

No primeiro *screening* com as substâncias majoritárias isoladas provenientes dos extratos LA-DCM, LD-DCM e LI-DCM, foram testadas diferentes tempos de incubação na concentração de 50  $\mu$ g/mL ou 20  $\mu$ g/mL (dependendo da quantidade de material disponível para o ensaio) quanto à viabilidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Das substâncias que foram ativas, novo ensaio com curva de concentrações (50, 10, 5, 1, 0,1  $\mu$ g/mL) foi feito.

Das substâncias testadas, a substância 4 teve atividade expressiva a uma concentração de 50  $\mu$ g/mL com 24 h de incubação, onde 100% dos machos e 60% das fêmeas morreram. E, a partir de 48 h, a taxa de sobrevivência foi zero. Na segunda etapa do experimento, onde fez-se a curva de concentrações, os resultados com 10  $\mu$ g/mL mostram que a ação do composto cai expressivamente. Após 96 h de incubação apenas 20% dos machos morreram. E, em concentrações mais baixas não observa-se alteração alguma na mortalidade dos indivíduos. Por isso, os dados não estão aqui mostrados.

Já a substância **11,** teve atividade a 50  $\mu$ g/mL em que, após 72 h de incubação, observouse 100% de morte dos vermes. Nas outras concentrações testadas não houve morte de indivíduos (Figura 158).



Figura 158. Efeito de **4** e **11** na sobrevivência de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Cinco casais de vermes foram incubados em poços contendo os compostos dissolvidos em meio RPMI e avaliados em diferentes tempos de exposição (2 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h).

# 12.3.5. Efeito dos compostos na atividade motora, no acasalamento dos vermes adultos e na oviposição das fêmeas de *Schistosoma mansoni*

As substâncias isoladas no presente trabalho foram testadas também quanto à sua ação na atividade motora e acasalamento de vermes adultos de *S. mansoni*.

Na Tabela 58, temos os resultados das esfingosinas e podemos chamar atenção para a substância 4, que foi ativa na concentração de 50  $\mu$ g/mL testada. Nas primeiras 2 h, 60% dos vermes haviam se separado. E, em 48 h a taxa de mortalidade atingiu 100%. Diante deste resultado, novo experimento prosseguiu-se com uma curva de concentrações (50, 10, 5, 1 e 0,5  $\mu$ g/mL).

Os resultados com **4** a 10 µg/mL também estão mostrados na Tabela 58. Com 48 h de incubação, 80% dos casais estavam separados. Redução na atividade motora também foi observada em 90% dos indivíduos, mesmo que ainda leve. Já com 96 h de incubação 100% dos casais estavam separados, a mortalidade atingiu 10% dos indivíduos e, 80% deles apresentou alguma alteração na motilidade. E ainda houve efeito na oviposição, que foi bem expressivo quando comparado com o controle negativo (DMSO) (Figura 159).

Compostos /	Tempo de	Vermes	Redução da ativ	Mortalidade	
concentração <sup>b</sup>	incubação (h)	separados (%)	Leve	Significativa	(%) <sup>a</sup>
1	2 h	0	20	0	0
	24 h	80	60	0	0
(50 μg/mL)	48 h	100	100	0	0
	72 h	100	40	60	0
	96 h	100	30	70	0
2	2 h	20	20	0	0
(50  ug/ml)	24 h	100	80	0	0
(30 µg/mL)	48 h	100	100	0	0
	72 h	100	10	90	0
	96 h	100	100	0	0
3	2 h	20	0	0	0
(50  ug/m)	24 h	20	0	0	0
(30 µg/mL)	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	40	0	0
	96 h	0	0	0	0
4	2 h	60	0	0	0
(50  ug/ml)	24 h	100	10	10	80
(50 µg/mL)	48 h	100	0	0	100
	72 h	100	0	0	100
	96 h	100	0	0	100
4	2 h	60	20	10	0
(10 µg/mt)	24 h	0	0	0	0
(10 µg/IIIL)	48 h	80	90	0	0
	72 h	100	90	0	0
	96 h	100	40	40	10

Tabela 58. Efeito das subtâncias 1-4 na atividade motora e acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*.

<sup>a</sup> Porcentagem em relação ao número total de indivíduos. <sup>b</sup> Com DMSO 1,5% em meio RPMI. A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente. O experimento se deu com 5 casais de vermes.

As substâncias 1 e 2 não causaram mortalidade dos vermes. No entanto, ao longo do tempo de incubação, interferiram no acasalamento de todos os casais e promoveram uma redução significativa na motilidade. Já os vermes incubados em presença da substância

**3**, além de não interferir na atividade motora e acasalamento dos vermes, permitiu a oviposição das fêmeas tanto quanto no controle negativo (Figura 159).

Substâncias /	Tempo de	Vermes	Redução da a	Mortalidade	
concentração <sup>b</sup>	incubação (h)	separados (%)	Leve	Significativa	(%) <sup>a</sup>
5	2 h	100	0	0	0
(50	24 h	100	80	20	0
(50 µg/mL)	48 h	100	70	30	0
	72 h	100	60	40	0
	96 h	100	100	0	0
6	2 h	80	0	100	0
(50	24 h	100	40	60	0
(50 µg/mL)	48 h	100	80	20	0
	72 h	100	100	0	0
	96 h	100	50	0	0
8	2 h	20	20	0	0
(20	24 h	0	0	0	0
(20 µg/mL)	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	40	0	0
	96 h	0	0	0	0
9	2 h	40	40	0	0
(50  ug/mI)	24 h	20	0	0	0
(30 µg/IIIL)	48 h	0	40	0	0
	72 h	0	20	0	0
	96 h	0	40	0	0

Tabela 59. Efeito das substâncias **5**, **6**, **8** e **9** na atividade motora e acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*.

<sup>a</sup> Porcentagem em relação ao número total de indivíduos. <sup>b</sup> Com DMSO 1,5% em meio RPMI. A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente. O experimento se deu com 5 casais de vermes.

Na Tabela 59 estão discriminados os resultados da atividade motora e acasalamento dos vermes sob ação das substâncias halogenadas de *L. aldingenis* **5**, **6**, **8** e **9**. A substância **8**, numa concentração de 20  $\mu$ g/mL, não foi capaz de ser ativo nos parâmetros avaliados, além de permitir uma alta taxa de oviposição. A substância **5** agiu fortemente sobre a taxa de oviposição, alcançando valores bem próximos de zero, conforme pode ser observado na Figura 159. A uma concentração de 50  $\mu$ g/mL promoveu 100% da separação dos casais

e reduziu levemente a atividade motora, sem proporcionar alterações na taxa de sobrevivência.

A substância **6** evitou 100% da oviposição das fêmeas ao final do período de exposição. Nas primeiras 24 h provocou a separação de 100% dos vermes e alguma redução na atividade motora, mas não foi capaz de provocar morte nos indivíduos.

A substância **9** não causou mortalidade dos vermes, apenas alguma redução da atividade motora. O mesmo se deu para as substâncias **10** (Tabela 60) e **13** (Tabela 61). Este último não interferiu na reprodução, diferentemente de **9** e **10**, que impediram a oviposição em 100%.

Substância /	Tempo de	Vermes	Redução da a	– Mortalidade	
concentração <sup>D</sup>	incubação (h)	separados (%)	Leve	Significativa	(%) <sup>a</sup>
10	2 h	80	30	50	0
(50 / 1)	24 h	80	90	0	0
(50 µg/mL)	48 h	80	40	60	0
	72 h	80	20	80	0
	96 h	80	100	0	0
11	2 h	80	60	0	0
(50	24 h	100	90	0	0
(50 µg/mL)	48 h	100	0	100	0
	72 h	100	0	10	90
	96 h	100	0	0	100
11	2 h	100	0	0	0
	24 h	100	0	100	0
(20 µg/mL)	48 h	100	70	30	0
	72 h	100	100	0	0
	96 h	100	90	0	0

Tabela 60. Efeito das substâncias **10** e **11** na atividade motora e acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*.

<sup>a</sup> Porcentagem em relação ao número total de indivíduos. <sup>b</sup>Com DMSO 1,5% em meio RPMI. A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente. O experimento se deu com 5 casais de vermes.

Com a substância **10** (elatol) outros estudos de ação antiparasitária foram realizados. Contra *Leishmania amazonensis* após 72h de incubação, apresentou IC<sub>50</sub> de 4,0  $\mu$ M e 0,45  $\mu$ M para as formas promastigosta e amastigota intracelular, respectivamente. Compartivamente, o controle positivo anfotericina B apresentou IC<sub>50</sub> de 0,06  $\mu$ M e 0,31  $\mu$ M para as formas promastigosta e amastigota intracelular, respectivamente (Santos *et al.* 2010). Já no trabalho de Machado *et al.* (2011) econtraram valores de IC<sub>50</sub> um pouco diferentes. Para 72h de incubação, o elatol apresentou IC<sub>50</sub> de 18,6  $\mu$ M para as formas promastigostas e 11,7  $\mu$ M para as amastigostas.

O etatol também foi testado quanto ao seu potencial anti-tripanossoma contra *Trypanossoma cruzi*, causador da doença de Chagas. Ele apresentou efeito contra as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas com valores de IC<sub>50</sub> de 45,4  $\mu$ M, 1,38  $\mu$ M e 1,01  $\mu$ M, respectivamente.

Mesmo diante de relatos de atividade antiparasitária do elatol, o composto, no presente estudo, não mostrou atividade esquistossomicida com o modelo usado.

Já a substância **11**, numa concentração de 50 μg/mL, interferiu no acasalamento de 100% dos casais nas primeiras 24 h. E, ao fim do período de incubação, 100% dos indivíduos estavam mortos.

Diante destes resultados, a substância **11** foi testada na concentração de 20 µg/mL e passou a não mais interferir na sobrevivência e nem mesmo na reprodução dos vermes. Os ovos depositados foram em número tão altos quanto no controle positivo. E, ainda que tivesse causado a separação de todos os casais nas primeiras horas, a redução na atividade motora dos indivíduos se mostrou leve.

Quanto aos resultados da atividade motora e acasalamento referente aos compostos **12**, **14**, **15** e **16** (Tabela 61), infelizmente os mesmos não apresentaram qualquer atividade frente a estes parâmetros, como também na oviposição.

Substância /	Tempo de	Vermes	Redução da atividade motora (%) <sup>a</sup>		Mortalidade
concentração <sup>b</sup>	incubação (h)	separados (%)	Leve	Significativa	(%) <sup>a</sup>
12	2 h	10	0	0	0
(20 µg/mL)	24 h	0	0	0	0
	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	40	0	0
	96 h	0	0	0	0
13	2 h	20	20	0	0
	24 h	20	20	0	0
(50 µg/mL)	48 h	0	20	0	0
	72 h	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0
14	2 h	40	10	0	0
	24 h	0	0	0	0
(50 µg/mL)	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	0	0	0
	96 h	0	0	0	0
15	2 h	20	0	0	0
	24 h	0	0	0	0
(20 µg/mL)	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	60	0	0
	96 h	0	20	0	0
16	2 h	0	0	0	0
	24 h	0	0	0	0
(20 µg/mL)	48 h	0	0	0	0
	72 h	0	20	0	0
	96 h	0	0	0	0

Tabela 61. Efeito das substâncias **12-16** na atividade motora e acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*.

<sup>a</sup> Porcentagem em relação ao número total de indivíduos. <sup>b</sup> Com DMSO 1,5% em meio RPMI. A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente. O experimento se deu com 5 casais de vermes.

Quanto aos efeitos da substâncias isoladas na oviposição de *Schistosoma mansoni*, a média dos valores depositados pelas fêmeas de cada casal foram representados na Figura 159.



Figura 159. Efeito dos compostos isolados na oviposição de fêmeas de *Schistosoma mansoni*. Os casais de vermes foram incubados em meio RPMI contendo 20  $\mu$ g/mL para **3**, **8**, **11**a, **12**, **15** e **16** ou 50  $\mu$ g/mL para os outros compostos. **2**b: concentração de 10  $\mu$ g/mL. A contagem dos ovos foi realizada após o tempo final de incubação. Os valores são médias de 5 casais e as barras representam o desvio padrão da média. Controle positico (DMSO 1,5%) e negativo (Praziquantel - PZQ 1500 ng/mL) também estão representados. ND: Não determinados.

A esquistossomose, doença parasitária que atinge 19 unidades federativas do Brasil e outros 54 países do mundo, é negligenciada pelos Estados e ainda continua sendo um dos principais problemas mundiais de saúde pública, que é agravado ainda mais pelos processos migratórios (Ministério da Saúde, 2014). Por isso a busca incessante, não das indústrias farmacêuticas, mas dos centros de pesquisa e academia de todo o mundo, por novas drogas com potencial antiparasitário. Seja ela de origem natural ou sintética, o importante é que seja mais potente e seletiva.

Dentre os compostos majoritários isolados no presente estudo e testados quanto à ação esquistossomicida, podemos destacar a substância **4** que, com 50  $\mu$ g/mL, após exposição de 48 h, causou mortalidade de 100% dos vermes adultos. E, reduzindo-se esta concentração em 5X, num tempo de exposição de 96 h, afetou o acasalamento de 100% dos casais e a taxa de oviposição das fêmeas, que chegou próximo a zero.

A substância **4** é uma esfingosina com seu primeiro relato para a literatura. As esfingosinas são amino-alcoóis de cadeia longa e são constituintes dos esfingolipídeos, ceramidas e outros metabólitos lipídicos. Apesar das esfingosinas serem conhecidas desde 1882 (Thudichum 1901) por estarem amplamente presentes no reino animal, foi

relatada em plantas pela primeira vez em 1978 por Cardellina e Moore em extratos das algas vermelhas *Laurencia nidifica* e *Amansia glomerata* do Hawaii.

Estudos posteriores mostraram que estes compostos, por apresentarem ligações covalentes e cadeia de ácidos graxos ligados a fragmentos de etanolamina, e serem não hidrolisáveis, potencialmente interagem com a membrana lipídica, consequentemente podem ser transportados para o citoplasma, podem interferir no transporte de lipídios ou poliaminas, ou até mesmo no metabolismo. Isso daria um excelente antiparasitário desde que não tóxico às células de mamíferos.

Por isso, vários estudos vem sendo realizados nesse âmbito. Um exemplo foi o estudo de amino-alcoóis e diaminas alifáticas sintéticos realizados contra *Leishmania* spp. (del Olmo *et al.* 2002) no qual os amino-alcoóis da Figura 160 se mostraram muito interessantes quando comparados com os outros compostos sintetizados, sendo que a substância **A** se destacou por provocar lise total dos promastigotas a uma concentração de 25  $\mu$ g/mL e de 80% a 10  $\mu$ g/mL.



Figura 160. Amino-alcoóis A-D sintéticos. Adaptado de del Olmo et al. (2002).

A hidroxila livre destes compostos foi um indício apontado para a atividade contra a forma promastigota da *Leishmania*. E a substituição alquila de menor tamanho presente no composto **A** foi o indicativo de sua maior atividade.

Baseando-se neste parâmetros as substâncias 3 e 4 do presente trabalho são as esfingosinas com os menores radicais dentre as quatro isoladas. No entanto, 3 apresenta duas hidroxilas livres enquanto a 4 apresenta uma hidroxila e uma cetona. Isso pode ser de grande relevância para a presença de atividade da substância 4 frente ao parasita *S. mansoni* e ausência de atividade da substância 3.

Uma vez que os esquistossomos são incapazes de sintetizar ácidos graxos e esteróis de novo, eles adquirem estes compostos dos seus hospedeiros (Furlog 1991). Após a absorção, estes ácidos graxos são então alongados e incorporados aos fosfolipídios e triacilgliceróis (Furlog e Caulfield 1989, Brouwers *et al.* 1997) do verme.

Vários trabalhos vem sendo reportados sobre a influência dos lipídios (ácidos graxos, fosfolipídeos, esteróis, glicolipídeos, esfingomielinas) no metabolismo, composição das membranas celulares e tegumentares, respostas humoral e celular imune, formação de antígenos, defesa contra a imunidade dos hospedeiros dos parasitas (Rumjanek e Simpson 1980, Parra *et al.* 1986, Allan *et al.* 1987, Furlong e Caufield 1988, Samir e Strand 1990, Furlong 1991) entanto, as esfingosinas por si só, também podem operar como inibidores, que bloqueiam a fosforilação tanto da proteína quinase C (PKC) quanto da proteína quinase dependente de cálcio Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (CaMK), que por fim, influencia na transformação das cercárias em esquistossômulos de *S. mansoni* dentro do hospedeiro (Wiest *et al.* 1991).

Sobre o aspecto supracitado, a síntese de análogos da esfingosina **4** que tivesse uma ação no metabolismo do parasita, sem que acarretassem a viabilidade das células do hospedeiro seria de alta relevância. A substância **4** deste trabalho não apresentou atividade citotóxica contra tumores sólidos nem células leucêmicas, mas causou algum distúrbio, mesmo que pequeno, nas células normais (350 unidades de zona - ver seção 11). Por isso a síntese de análogos deve ser estudada e cuidadosamente avaliada, considerando-se os benefícios e riscos (Guidoni *et al.* 1999).

O sesquiterpeno **11**, também foi interessante na concentração de 50 µg/mL testada contra o parasita *S. mansoni*. Nas primeiras 24h de incubação interferiu em 100% no acasalamento dos casais de vermes e, ao fim do período de incubação 100% dos indivíduos estavam mortos. Podemos acrescentar também que, este composto não apresentou atividade citotóxica. É uma molécula conhecida desde 1989 (Coll e Wright) extraída de *L. majuscula*, mas cuja atividade biológica nunca havia sido testada antes.

### **13. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A técnica do DNA barcode foi muito útil no diagnóstico de similaridade entre as amostras de cada espécie. Com a técnica foi possível a confirmação de que as amostras coletadas em diferentes época e locais pudessem ser reunidas para formar um "pool" e aumentar a biomassa disponível para preparo dos extratos. No entanto, com relação aos genes usados, *rbcL* e COI-5P se mostram muito similares e eficientes na separação de espécies próximas, já o UPA mostrou resultados bem confusos quando se tratava de espécies próximas. O uso de três marcadores foi importante para garantir a confiabilidade dos resultados.

O uso de fracionamento monitorado por CCD e guiado por RMN foram estratégias que muito contribuíram para o isolamento e identificação dessas dezesseis substâncias, principalmente porque a maioria delas não tem regiões com cromóforos que absorvem na região do UV. Isso dificultaria por exemplo, o fracionamento por HPLC-DAD.

O extrato DCM de *Laurencia aldingensis* se mostrou muito promissor, nos revelando quatro diferentes esfingosinas, sendo os compostos 1 e 3 com primeira ocorrência em plantas e o 4 como primeira ocorrência natural. Com os sesquiterpenos tipo chamigrano pudemos ver a proximidade também bioquímica entre *L. aldingensis* e *L. catarinensis*. A substância 6 trata-se de um novo produto natural e as aldingeninas (A, C e D) foram encontradas neste estudo, porém com a estrutura química revisada (6, 5 e 7). Outras duas novas substâncias halogenadas foram isoladas (8 e 9), contribuindo assim, para ampliar o conhecimento da diversidade de produtos naturais marinhos.

Do extrato de *Laurencia dendroidea*, dois compostos clássicos foram isolados, o elatol e o isoobtusol. São substância majoritárias e isso explica o grande volume de estudos com os mesmos.

*Laurenciella* sp. apresentou compostos inéditos na literatura, mas de difícil estudo. A substância **13** de cadeia alifática insaturada, aparenta ser majoritária, mas muitas amostras foram perdidas por se tornarem insolúveis após evaporação do solvente, talvez devido a sua polimerização quando em contato com o oxigênio. Com estrutura muito semelhante, foram isolados outras duas substâncias (**12** e **14**), além de um ácido graxo saturado e um esterol.

Quanto à ação antioxidante, as substâncias isoladas não apresentaram atividade e tampouco se mostraram citotóxicas. A substância **8** mostrou toxicidade contra as células, mas não seletividade.

Em se tratando do ensaio esquistossomicida, a esfingosina **4** se mostrou tóxica para 100% dos indivíduos em 48 h de exposição (50  $\mu$ g/mL) e o isoobtusol (**11**) foi ativo com 72 h de exposição (50  $\mu$ g/mL). Estes dois compostos continuam sendo avaliados para esta atividade.

Por fim, podemos dizer que, *Laurencia aldingensis* e *Laurenciella* sp. são espécies que agregaram para o aumento da diversidade química no ambiente marinho e outras atividades biológicas devem ser testadas com suas novas moléculas.

## 14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAN, D.; PAYARES, G.; EVANS, W.H. 1987. The phospholipid and fatty acid composition of *Schistosoma mansoni* and of its purified tegumental membranes. Molecular and Biochemical Parasitology 23: 123-128.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25: 3389-3402.
- AMARAL, R.; TAUIL, P.L.; LIMA, D.D.; ENGELS, D. 2006. An analysis of the impacto f the schistosomiasis control programme in Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 101:79-85. Suppl. 1.
  - ANDRADE, B.S.; NETO, A.G.; ROSSLE, S.S.; SCHNADELBACH, A.S.; PEREIRA, G.A.G. 2007. Análise filogenética por inferência bayesiana de plasmídeos mitocondriais de fungos. Revista Brasileira de Biociências 5: 153-155.
  - BANSEMIR, A.; JUST, N.; MICHALIK, M.; LINDEQUIST, U.; LALK, M. 2004. Extracts and sesquiterpene derivatives from the red alga *Laurencia chondrioides* with antibacterial activity against fish and human pathogenic bacteria. Chemistry & Biodiversity 1: 463-467.
  - BELOSTOTSKY, I.; DA SILVA, S. M.; PAEZ, M. G.; INDIG, G. L. 2010. Mitochondrial Targeting for Photochemotherapy. Can Selective Tumor Cell Kill be Predicted Based on n-octanol/water Distribution Coefficients? Biotechnic and Histochemistry, DOI:10.3109/10520295.2010.483656
  - BERNATOWICZ, A. 1961. Marine Algae of the Eastern Tropical and Subtropical Coasts of the Americas, Wiley Online Library.
- BHATTACHARYA, G.; HERMAN, J.; DELFÍN, D.; SALEM, M.M.; BARSZCZ, T.; MOLLET, M.;, RICCIO, G.; BRUN, R.; WERBOVETZ, K.A. 2004. Synthesis and antitubulin activity of N<sub>1</sub>- and N<sub>4</sub>-substituted 3,5-dinitro sulfanilamides against African trypanosomes and *Leishmania*. Journal of Medicinal Chemistry 47:1823–1832.
- BLANCHARD, T.J. 2004. Schistosomiasis. Travel Medicine and Infectious Disease 2: 5-11.
- BODARD, M. 1968. L'infrastructure des "corps en cerise" des Laurencia (Rhodomelacees, Ceramiales). Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. 266: 2393-2396.
- BRITO, I.; DIAS, T.; DÍAZ-MARRERO, A.R.; DARIAS, J.; CUETO, M. 2006. 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.
- BROUWERS, J.F.; SMEENK, I.M.; VAN GOLDE, L.M.; TIELENS, A.G. 1997. The incorporation, modification and turnover of fatty acids in adult *Schistosoma mansoni*. Molecular and Biochemical Parasitology 88: 175-185.
- CALAS, M.; ANCELIN, M.L.; CORDINA, G.; PORTEFAIX, P.; PIQUET, G.; VIDAL-SAILHAN, V.; VIAL, H. 2000. Antimalarial activity of compounds interfering with Plasmodium falciparum phospholipid metabolism: comparison between mono- and bisquaternary ammonium salts. Journal of Medicinal Chemistry 43: 505-516.
- CALENDINI, F.; MARTIN, J.F. 2005. PaupUP v1. 0. 3. 1: A free graphical frontend for Paup. Dos software.
- CARTER, H.E., GLICK, F.J., NORRIS, W.P; PHILLIPS, G.E. 1947 The Journal of Biological Chemistry. 170-285.
- CARVALHO, L. R.; FUJII, M.T; ROQUE, N. F; KATO, M.J.; LAGO, J. H. G. 2003. Aldingenin A, new brominated sesquiterpene from red algae *Laurencia aldingensis*. Tetrahedron Letters 44: 2637-2640.
  - CARVALHO, L. R.; FUJII, M.T; ROQUE, N. F; LAGO, J. H. G. 2006. Aldingenin derivatives from the red alga *Laurencia aldingensis*. Phytochemistry 67: 1331–1335.

- CASSANO, V. 2009. Taxonomia e filogenia do complexo *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) com ênfase no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Tese de Doutorado.
  Instituto de Botânica de São Paulo-Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 271p.
- CASSANO, V.; METTI, Y.; MILLAR, A.J.K.; GIL-RODRÍGUEZ, M.C.; SENTÍES, A.; DÍAZ-LARREA, J.; OLIVEIRA, M.C.; FUJII, M.T. 2012. Redefining the taxonomic status of *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil and the Canary Islands. European Journal of Phycology 47: 67-81.
- CASSANO, V.; OLIVEIRA, M.C.; GIL-RODRÍGUEZ, M.C.; SENTÍES, A.; DÍAZ-LARREA, J.; FUJII, M.T. 2012. Molecular support for the establishment of the new genus *Laurenciella* within the *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta). Botanica Marina 55: 349-357.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC 24/7: Saving Lives. Protecting People. Leishmaniasis - Bology. http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html. Acesso em: 14/07/2014.
- CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE SÃO PAULO. 2005. Divisão de doenças de transmissão hídrica e alimentar: dados estatísticos. São Paulo: CVE. http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IFN\_Esquisto.htm. Acesso em: 14/07/2014.
- CHAO, D.Y.; GABLE, K.; CHEN, M.; BAXTER, I.; DIETRICH, C.R.; CAHOON, E.B.;
  GUERINOT, M.L.; LAHNER, B.; LU, S.; MARKHAM, J.E.; MORRISSEY, J.;
  HAN, G.; GUPTA, S.D.; HARMON, J.M.; JAWORSKI, J.G.; DUNN, T.M.;
  SALT, D.E. 2011. Sphingolipids in the root play an important role in regulating
  the leaf ionome in Arabidopsis thaliana. Plant Cell 23: 1061-1081.
- CHEN Y, WANG B, CHEN J, WANG X, WANG R, PENG S, CHEN L, MA L, LUO J. 2015. Identification of Rubisco rbcL and rbcS in *Camellia oleifera* and their potential as molecular markers for selection of high tea oil cultivars. Frontiers in Plant Science 6:189.

- COATES, J. 2006. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, Ltd: 1-23.
- COATES, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry R.A. Meyers (Ed.) © John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000, pp. 10815–10837.
- COLL, J.; WRIGHT, A. 1989. Tropical Marine Algae. III. New Sesquiterpenes from *Laurencia majuscula* (Rhodophyta, Rhodophyceae, Ceramiales, Rhodomelaceae). Australian Journal of Chemistry 42: 1591-1603.
- COLL, J.; WRIGHT, A. 1989. Tropical Marine Algae. IV. Novel Metabolites From the Red Alga *Laurencia implicata* (Rhodophyta, Rhodophyceae, Ceramiales, Rhodomelaceae). Australian Journal of Chemistry 42: 1685-1693.
- CORBETT, T.H.; VALERIOTE, F.A.; POLIN, L.; PANCHAPOR, C.; PUGH, S.; WHITE, K.; LOWICHIK, N.; KNIGHT, J.; BISSERY, M.-C.; WOZNIAK, A. 1992. Discovery of solid tumor active agents using a soft-agar-colony-formation disk-diffusion-assay. Cytotoxic anticancer drugs: Models and concepts for drug discovery and development, Springer: 35-87.
- CUNNINGHAM, A.C. 2002. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. Experimental and molecular pathology 72: 132-141.
- CYSNE-FINKELSTEIN, L.; TEMPORAL, R.M.; ALVES, F.A.; LEON, L.L. 1998. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. Experimental Parasitology 89: 58-62.
- DA SILVA, S.P.; NOËL, F. 1995. Time course of the effect of praziquantel on Schistosoma mansoni attachment in vitro: comparison with its effects on worm length and motility. Parasitology Research 81: 543-548.
  - DAWSON RJP, LOCKER KP 2006. Structure of a multidrug ABC transporter. Nature 443: 180-185.

- DESTOMBE, C.; DOUGLAS, S.E. 1991. Rubisco spacer sequence divergence in the rhodophyte alga Gracilaria verrucosa and closely related species. Current Genetics 19: 395-398.
- DÍAZ-LARREA, J.; SENTÍES, A.; FUJII, M.T.; PEDROCHE, F.F.; OLIVEIRA, M.C. 2007. Molecular evidence for *Chondrophycus poiteaui* var. gemmiferus comb. et stat. nov. (Ceramiales, Rhodophyta) from the Mexican Caribbean Sea: implications for the taxonomy of the Laurencia complex. Botanica Marina 50: 250-256.
- DIETRICH, C.R.; HAN, G.; CHEN, M.; BERG, R.H.; DUNN, T.M.; CAHOON, E.B. 2008. Loss-of-function mutations and inducible RNAi suppression of Arabidopsis LCB2 genes reveal the critical role of sphingolipids in gametophytic and sporophytic cell viability. Plant J 54: 284-298.
- DOEBLEY, J.; DURBIN, M.; GOLENBERG, E.M.; CLEGG, M.T.; MA, D.P. 1990. Evolutionary analysis of the large subunit of carboxylase (rbcL) nucleotide sequence among the grasses (Gramineae). Evolution: 1097-1108.
- DOENHOFF, M.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. 2008. Praziquantel: mecanisms of action, resistance and new derivates for schistosomiasis. Current Opinion in Infectious Diseases 21: 659-667.
- EL RIDI, R., ABOUELDAHAB, M.; TALLIMA, H.; SALAH, M.; MAHANA, N.; FAWZI, S.; MOHAMED, S.H.; FAHMY, O.M. 2010. In vitro and in vivo activities of arachidonic acid against Schistosoma mansoni and Schistosoma haematobium. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54:3383-3389.
- ELLIS, R.J. 1979. Most abundant protein in the world. TrendsBiochem. Sci. 4: 241–244.
  - ERICKSON, K. L. 1983. Constituints of *Laurencia*. Vol. 5. Cap 4. In: Marine Natural Products. (P. J. Scheur ed.), pp. 131-257, Academic Press, New. York.

FAULKNER, D. J. 1996. Marine Natural Products. Natural Product Reports 13: 75-125

- FELDMAN, J.; FELDMAN, G. 1950. Les "corps en cerise" du Laurencia obtusa (Huds.) Lamour. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Serie D:: 1335-1337.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-91.
- FENICAL, W.; NORRIS, J. N. 1975. Chemotaxonomy in maribe algae: chemical separation of some *Laurencia species* (Rhodophyta) from the Gulf of California. Journal of Phycology 11: 104-108.
- FERNÀNDEZ J. J., SOUTO, M. L., GIL, L.V.; NORTE, M. 1998. Evaluation of the cytotoxic activity of the polyethers isolated from *Laurencia*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 6: 2237-2243.
- FERRI, E.; BARBUTO, M.; BAIN, O.; GALIMBERTI, A.; UNI, S.; GUERRERO, R.; FERTÉ, H.; BANDI, C.; MARTIN, C.; CASIRAGHI, M. 2009. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). Front Zool 6.
- FIGUEROA, F.L; ESCASSI, L.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, E.; KORBEE, N.; GILES, A. D.; JOHNSEN, G. 2003. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 69: 21–30
- FLESCHIM, S.; FLESCHIM, M.; NITA, S.; PAVEL E.; MEGEARU, V. 2000. Free radicals mediated protein oxidation in biochemistry. Roumanian Biotechnological Letters 5: 479-495
- FRANKLIN ,L.A. 1994. The effects of temperature acclimation on the photoinhibitory responses of *Ulva rotundata*, Blid. Planta 192: 324–331.
- FRANKLIN, L.A; LEVAVASSEUR ,G.; OSMOND ,C.B.; HENLEY ,W.J.; RAMLIS J. 1992. Two components of onset and recovery during photo inhibition of *Ulva rotundata*, Planta 186: 399–408.

- FRESHNEY, R. I. 2010. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. Sixth edition.v Wiley-Blackwell. A John Wiley & Sons, Inc., Publication . ISBN 978-0-470-52812-9. United States of America 732 p.
- FRESHWATER DW, FREDERICQ S, BUTLERt BS, HOMMERSANDt MH, CHASE MW. 1994. A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid rbcL. Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAs) 91: 7281-7285
  - FRESHWATER, D. W.; FREDERIC, Q. S.; BRADLEY, S. B.; HOMMERSAND, M. H.; CHASE, M. W. 1994. A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) base don rbcrbcL. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America 91: 7281-7285.
  - FRESHWATER, D.W.; FREDERICQ, S.; BUTLER, B.S.; HOMMERSAND, M.H.; CHASE, M.W. 1994. A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid rbcL. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 91: 7281-7285.
  - FRESHWATER, D.W.; RUENESS, J. 1994. Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on rbcL nucleotide sequence analysis. Phycologia 33: 187-194.
  - FUJII M.T., CASSANO V., STEIN E.M. & CARVALHO L.R. 2011. Overview of the taxonomy and of the major secondary metabolites and their biological activities related to human health of the *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil. Revista Brasileira de Farmacognosia 21: 268-282.
  - FUJII, M. T. 1990. Gênero Laurencia (Rhodomelaceae, Rhodophyta) no Estado de São Paulo: aspectos biológicos e taxonômicos. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 145p.
  - FUJII, M. T. 1998. Estudos morfológicos, quimiotaxonômicos e citogenéticos em quatro espécies selecionadas de *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) do litoral brasileiro. Tese de Doutorado. Universidade Federal Paulista, Rio Claro, 176p.

- FUJII, M. T.; Sentíes, A. 2005. Taxonomia do complexo *Laurencia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) do Brasil, com ênfase nas espécies de São Paulo e Espírito Santo. Monografias Ficológicas 2: 69-135.
- FURLONG, S. T. 1991. Unique roles for lipids in *Schistosoma mansoni*. Parasitology Today 7(2): 59-62.
- FURLONG, S.T.; CAULFIELD, J.P. 1988. Schistosoma mansoni: sterol and phospholipid composition of cercariae, schistosomula, and adults. Experimental Parasitology 65: 222-231.
- FURLONG, S.T.; CAULFIELD, J.P. 1989. Schistosoma mansoni: synthesis and release of phospholipids, lysophospholipids, and neutral lipids by schistosomula. Experimental Parasitology 69: 65-77.
- GARCÍA-PEREZ, M.; ROYER, M.; DUQUE-FERNADEZ, A.; DIOUF, P. N.; STEVANOVIC, T.; POULIOT, R. 2010. Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes. Journal of Ethnopharmacology 132: 251-258.
- GARG, H.S.; SHARMA, M.; BHAKUNI, D.S.; PRAMANIK, B.N.; BOSE, A.K. 1992. An antiviral sphingosine derivative from the green alga *Ulva Fasciata*. Tetrahedron Letters 33: 1641-1644.
- GAVER, R.C.; SWEELEY, C.C. 1966. Chemistry and metabolism of sphingolipids. 3-Oxo derivatives of N-acetylsphingosine and N-acetyldihydrosphingosine. Journal of the American Chemical Society 88: 3643-3647.
- GHIDONI, R.; SALA, G.; GIULIANI, A. 1999. Use of sphingolipid analogs: benefits and risks1. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1439: 17-39.
- GONZÁLEZ, AG; DARIAS, J; MARTÍN, JD. 1973. Caespitol, a new halogenated sesquiterpene from *Laurencia caespitosa*. Tetrahedron 26: 2381-2384.
- GONZÁLEZ, AG; DARIAS, J; MARTÍN, JD. 1974. Revised structure of caespitol and its correlation with isocaespitol. Tetrahedron 14: 1249-1250.

- GONZÁLEZ, AG; MARTÍN, JD; MARTÍN, VS; NORTE, M. 1979. Carbon-13 NMR application to *Laurencia* polyhalogenated sesquiterpenes. Tetrahedron Letters 23: 2713 - 2722.
  - GRÖNIGER, R.P. SINHA, M. KLISCH, D.P. HÄDER 2000. Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae a database A. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 58: 115–122
- GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. 2006. Human schistosomiasis. Lancet 368: 1106-1118.
  - GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. 2010. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. http://www.algaebase.org, acesso em: Maio de 2011.
  - HAMSHER, S.E.; EVANS, K.M.; MANN, D.G.; POULIČKOVÁ, A.; SAUNDERS,G.W. 2011. Barcoding diatoms: exploring alternatives to COI-5P. Protist 162: 405-422.
- HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. *In* Advances in Parasitology John Baker; Ralph Muller; David Rollinson, v. 44, Academic Press, 2000.
- HANNUN, Y.A.; OBEID, L.M. 2011. Many ceramides. Journal of Biological Chemistry 286: 27855-27862.
- HARPER, J.T.; SAUNDERS, G.W. 2001. 2. The application of sequences of the ribosomal cistron to the systematics and classification of the florideophyte red algae (Florideophyceae, Rhodophyta). Cahiers de Biologie Marine 42: 25-38.
- HAY, M.E.; DUFFY, J.E.; PFISTER, C.A.; FENICAL, W. 1987. Chemical Defense Against Different Marine Herbivores: Are Amphipods Insect Equivalents Ecology 68: 1567-1580.
  - HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcoding. Proceedings of the Royal Society of London, B, 270: 313-322.

- HEBERT, P.D.; STOECKLE, M.Y.; ZEMLAK, T.S.; FRANCIS, C.M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. PLOS biology 2: 1657-1663.
- HIGGINS, C. F. 2007. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. Nature 446, 749-757.
- HLA, T. 2003. Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate. Pharmacological Research 47: 401-407.
- HOLDER, M.; LEWIS, P.O. 2003. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. Nature Reviews Genetics 4: 275-284.
- HOWARTH, J.; LLOYD, D.G. 2000. Simple 1,2-aminoalcohols as strain-specific antimalarial agents. Journal Antimicrobial Chemotherapy 46: 625-628.
- IRIE, T.; SUZUKI, M.; HAYAKAWA, Y. 1969. Isolation of aplysin, debromoaplysin, and aplysinol from *Laurencia okamurai* Yamada. Bulletin of the Chemical Society of Japan 42: 843-844.
- IRIE, T.; SUZUKI, M.; KUROSAWA, E.; MASAMUNE, T. 1970. Laurinterol, debromolaurinterol and isolaurinterol, constituents of *Laurencia intermedia* Yamada. Tetrahedron 26: 3271-3277.
- IRIE, T.; SUZUKI, T.; YASUNARI, Y.; KUROSAWA, E.; MASAMUNE, T. 1969. Laurene, a sesquiterpene hydrocarbon from *Laurencia* species. Tetrahedron 25: 459-468.
- ISLAM, M.N.; JACQUEMOT, M.P.; COURSOL, S.; NG, C.K. 2012. Sphingosine in plants--more riddles from the Sphinx. New Phytologist 193: 51-57.

JEEVITHA, M.; ATHIPERUMALSAMI, T.; KUMAR, V. 2013. Dietary fibre, mineral, vitamin, amino acid and fatty acid content of seagrasses from Tuticorin Bay, Southeast coast of India. Phytochemistry 90: 135-146.

KANDELA, I. K.; BARTLETT, J. A.; INDIG, G. L. (2002). Effect of Molecular Structure on the Selective Phototoxicity of Triarylmethane Dyes Towards Tumor Cells. Photochemical and Photobiological Sciences 1: 309-314.

- KARENTZ D.; MC EUEN F.S, LAND M.C; DUNLAP, W.C. 1991. Survey of mycosporine-like amino acids compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. Marine Biology 108: 157–166.
- KARSTEN, U.; SAWALL T.; HANELT D.; BISHOP, K.; FLORES-MOYA, A.; FIGUEROA, F.L.; WIENCKE, C. 1998. Contents of UV absorbing mycosporinelike amino acids in macroalgae from polar to warm-temperate regions, Botanica Marina 41:443–453.
- KATZ, N.Terapêutica experimental da esquistossomose mansoni. 2008. In: Carvalho, O.S.; Coelho, P.M.Z.; Lenzi, H.L. Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão interdisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 823-847.
- KENNEDY, D.J., SELBY, I.A., THOMSON, R.H., 1988. Chamigrane metabolites from *Laurencia obtusa* and *L. scoparia*. Phytochemistry 27: 1761–1766.
- KENNEDY, D.J.; SELBY, I.A.; THOMSON, R.H. 1988. Chamigrane metabolites from *Laurencia obtusa* and *L. scoparia*. Phytochemistry 27: 1761-1766.
- KESTER, M.; KOLESNICK, R. 2003. Sphingolipids as therapeutics. Pharmacological Research 47: 365-371.
- KONIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; STICHER, O.; ANGERHOFER, C. K.; PEZZUTO, J.
   M. 1994. Biological-activities of selected marine natural-products. Planta Medica 60: 532-537
- KÖNIG, G.M., WRIGHT, A.D., 1997a. *Laurencia rigida*: chemical investigations of its antifouling dichloromethane extract. Journal of Natural Products 60: 967–970.
- KÖNIG, G.M., WRIGHT, A.D., 1997b. Sesquiterpene content of the antibacterial dichloromethane extract of the marine red alga *Laurencia obtusa*. Planta Medica 63: 186-187.
- KOSTRZEWA M, VALENTIN K, MAID U, RADETZKY R, ZETSCHE K. 1990. Structure of the rubisco operon from the multicellular red alga *Antithamnion spec*. Current Genetics 18:465-469.

- KRAUSE, G.H.; WEISS, E. 1991. Chlorophyll flourescence and photosynthesis: the basics. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42: 313–349.
- Laboratory Procedures, PJ Hansen Laboratory University of Florida 1 | Hemacytometer Use of a Hemacytometer P. J. Hansen1 1Dept of Animal Sciences, University of Florida. http://animal. ifas. ufl. edu/hansen/lab\_protocol\_docs/hemacytometer. Pdf
- LACERDA, S. H. D.; ABRAHAM, B.; STRINGFELLOW, T. C.; INDIG, G. L. 2005. Photophysical, Photochemical, and Tumor-Selectivity Properties of Bromine Derivatives of Triarylmethanes and Rhodamine-123. Photochemistry and Photobiology, 81: 1430-1438.
- LANAVE, C.; PREPARATA, G.; SACCONE, C.; SERIO, G. 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. Journal of Molecular Evolution 20: 86-93.
- LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.P.; CHENNA, R.;
  MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.M.;
  WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; HIGGINS, D.G.
  2007. Clustal W and Clustal X version 2. 0. Bioinformatics 23: 2947-2948.
- LAUER, S.A.; GHORI, N.; HALDAR, K. 1995. Sphingolipid synthesis as a target for chemotherapy against malaria parasites. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92: 9181-9185.
- LEAL, R.N. Localização celular de metabólitos halogenados em *Laurencia obtusa* (Ceramiales, Rhodophyta). Dissertacao de Mestrado. Universidade Federal Fluminense, Niteroi. 32 p.
  - LEWIS, S. H.; GACESA, P.; GIL-RODRÍGUEZ, M. C.; VALDÉS, F.; FRÍAS, I. 2008. Molecular systematics of the genus *Laurencia*, *Osmundea* and *Palisada* (Rhodophyta) from the Canary Islands - Analysis of rDNA and RUBISCO spacer sequences. Anales Del Jardín Botánico de Madrid 65: 97-109.

- LHULLIER, C.; FALKENBERG, M.; IOANNOU, E.; QUESADA, A.; PAPAZAFIRI,
   P.; HORTA, P. A. 2010. Cytotoxic Halogenated Metabolites from the Brazilian
   Red Alga *Laurencia catarinensis*. Journal of Natural Products 73: 27-32
- LIM, P-E.; WONG, C-L.; PHANG, S-M. 2006. Molecular taxonomy of seaweeds with emphasis on Rhodophyta and Phaeophyta. In: Phang S-M, Critchley AT, Ang PO Jr (eds) Advances in seaweed cultivation and utilization in Asia. University of Malaya, Kuala Lumpur. 105–142.
- LIN, S.M.; FREDERICQ, S.; HOMMERSAND, M.H. 2001. Systematics of the Delesseriaceae (Ceramiales, Rhodophyta) based on large subunit rDNA and rbcL sequences, including the Phycodryoideae, subfam. nov. Journal of Phycology 37: 881-899. LYNCH, D.V.; DUNN, T.M. 2004. An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. New phytologist 161: 677-702.
- MACHADO, F. L. S.; KAISER, C. R..; COSTA, S. S.; GESTINARI, L. M.; SOARES,
  A. R. 2010. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. Revista Brasileira de Farmacognosia 20: 441-452
- MACHÍN-SÁNCHEZ, M.; LE GALL, L.; NETO, A.I.; ROUSSEAU, F.; CASSANO, V.; SENTÍES, A.; T.FUJII, M.; DÍAZ-LARREA, J.; PRUD'HOMME VAN REINE, W.F.; BONILLO, C.; GIL-RODRÍGUEZ, M.C. 2014. A combined barcode and morphological approach to the systematics and biogeography of *Laurencia pyramidalis* and *Laurenciella marilzae* (Rhodophyta). European Journal of Phycology 49: 115-127.
- MAGALHÄES, L.G.; MACHADO, C.B.; MORAIS, E.R.; MOREIRA, E.B.; SOARES, C.S.; DA SILVA, S.H.; DA SILVA FILHO, A.A.;RODRIGUES, V. In vitro schistossomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. Parasitology Research 104: 1197-1210.
  - MANRIQUEZ, C. P.; SOUTO, M. L.; GAVIN, J. A.; NORTE, M.; FERNANDEZ, J. J. 2001. Several new squalene derived triterpenes from *Laurencia*. Tetrahedron 57: 3117-3123.

- MARTI, B.C.; THOMSON, R.H. 1977. IN 'MARINE NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY', ED. BY D. J. FAULKNER; W. H. FENICAL. Plenum. New York. 159-163.
- MARTÍN JD, DARIAS J. 1978. Algal sesquiterpenoids. In Schevev PJ (ed.). *Marine Natural Products* vol 1. New York: Academic Press, p. 125-173.
  - MASUDA, M.; ABE, T.; SATO, S.; SUZUKI, T.; SUZUKI, M. 1997. Diversity of halogenated secondary metabolites in the red alga *Laurencia nipponica* (Rhodomelaceae, Ceramiales). Journal of Phycology 33: 196-208.
  - MATSUKAWA, R.; DUBINSKY, Z.; MASAKI, K.; MASUDA, Y.; TAKEUCHI, T.; CHIAARA, M.; YAMAMOTO, Y.; NIKI, E.; KARUBE, I. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. Journal of Applied Phycology 9: 29-35
  - MCDEVIT, D.C.; SAUNDERS, G.W. 2009. On the utility of DNA barcoding for species differentiation among brown macroalgae (Phaeophyceae) including a novel extraction protocol. Phycological Research 57: 131-141.
  - METTI, Y.; MILLAR, A.J.K.; CASSANO, V.; FUJII, M.T. 2013. Australian Laurencia majuscula (Rhodophyta, Rhodomelaceae) and the Brazilian Laurencia dendroidea are conspecific. Phycological Research 61: 98-104.
  - MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2015. Portal da Saúde Ministério da Saúde www. saude. gov. br. acesso em: 14/11/2015. http://portalsaude. saude. gov. br/index. php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/656-secretaria-svs/vigilanciade-a-a-z/esquistossomose.
  - MITAINE-OFFER, A; MAROUF, A.; HANQUET, B.; BIRLIRAKIS, N.; LACAILLE-DUBOIS, M. 2001. Two Triterpene Saponins from Achyranthes bidentata. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 49: 1492—1494
  - MITSNER, B.; SOKOLOVA, N.; ZVONKOVA, E.; EVSTIGNEEVA, R. 1975. SYNTHESIS OF 3-DEHYDRO-N-ACETYLSPHINGANINE AND ITS C16-HOMOLOG. BIOORGANICHESKAYA KHIMIYA 1: 889-897.

- MITSNER, B.I.; MAMONTOV, S.P.; SOKOLOVA, N.A.; ZVONKOVA, E.N.; EVSTIGNEEVA, R.P. 1974. Effect of neighboring functional groups on the ratio of erythro- and threo isomers during the reduction of 3-oxo derivatives by sodium tetrahydroborate during synthesis of sphingosine bases Quick View Other Sources From Zhurnal Organicheskoi Khimii. 10: 2518-2523.
- MOHAMMED, K. A.; HOSSAIN, C. F.; ZHANG, L.; BRUICK, R. K.; ZHOU, Y.; NAGLE, D. G. 2004. *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.
- MOLINSKI, T. F.; DALISAY, D. S.; LIEVENS, S. L.; SALUDES, J. P. 2009. Drug development from marine natural products. Nature Reviews Drug Discovery 8: 69-85.
- MONGRAND, S.; MOREL, J.; LAROCHE, J.; CLAVEROL, S.; CARDE, J.P.; HARTMANN, M.A.; BONNEU, M.; SIMON-PLAS, F.; LESSIRE, R.; BESSOULE, J.J. 2004. Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. Journal of Biological Chemistry 279: 36277-36286.
- MORAES, J. 2011. Efeito *in vitro* de extratos e compostos naturais em *Schistosoma mansoni*, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MORAES, J., C. NASCIMENTO, P. LOPES, E. NAKANO, L. F. YAMAGUCHI, M. J. KATO, AND T. KAWANO. 2011a. Schistosoma mansoni: In vitro schistosomicidal activity of piplartine. Experimental Parasitology 127:357-364.
- MORAES, J., M. P. SILVA, F. P. OHLWEILER, AND T. KAWANO. 2009. Schistosoma mansoni and other larval trematodes in Biomphalaria tenagophila (Planorbidae) from Guarulhos, Sao Paulo State, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 51:77-82.
  - MORALES, J. L.; CANTILLO-CIAU, Z. O.; SANCHEZ-MOLINA, I.; MENA-REJON, G.; J. 2006. Screening of antibacterial and antifungal activities of six

marine macroalgae from coasts of Yucatan peninsula. Pharmaceutical Biology 44: 632-635.

- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Immunol Meth 65: 55-64.
- MUELAS-SERRANO, S.; Nogal-uiz, J.J.; Gómez-Barrio, A. 2000. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Parasitology Research 86: 999-1002.
- MUHR P, LIKUSSAR W, SCHUBERT-ZSILAVECZ M. 1996. Structure Investigation and Proton and Carbon43 Assignments of Digitonin and Cholesterol using Multidimensional NMR Techniques. Magnetic Resonance In Chemistry, 34: 137-142.
- NAKAGAWA, N.; KATO, M.; TAKAHASHI, Y.; SHIMAZAKI, K.; TAMURA, K.; TOKUJI, Y.; KIHARA, A. ; IMAI, H. 2012. Degradation of long-chain base 1phosphate (LCBP) in Arabidopsis: functional characterization of LCBP phosphatase involved in the dehydration stress response. Journal of Plant Research 125: 439-449.
- NG, C.K.; CARR, K.; MCAINSH, M.R.; POWELL, B.; HETHERINGTON, A.M. 2001. Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1phosphate. Nature 410: 596-599.
  - NORDBERT, J.; ARNÉR, S.J. 2001. Reative oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Biology and Medicine 31: 1287-1312.
  - NYLANDER, J.A.A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
  - PARESQUE, K. 2008. Influência das características do hábitat na comunidade macrobentônica associada a diferentes fitais no entre-marés da Ilha do Boi, Vitória, Espírito Santo. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 37p.

- PARRA, J.F.; FRANCA, R.C.; KUSEL, J.R.; GOMEZ, M.V.; FIGUEIREDO, E.A.; MOTA-SANTOS, T.A. 1986. Schistosoma mansoni: phospholipid methylation and the escape of schistosomula from in vitro cytotoxic reaction. Mol Biochem Parasitol 21: 151-159.
- PARREIRA, N. A.; MAGALHÃES, L.G.; MORAIS, D.R.; CAIXETA, S. C.; DE SOUSA, J.P.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.; NANAYAKKARA, N.P.; RODRIGUES, V.; DA SILVA FILHO, A.A. 2010. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicroabial activies of the essencial oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. Chemistry & Biodiversity 7: 993-1001.
  - PAUL, V. J. 1992. Ecologycal roles of marine natural products. Cornell University Press, Ithaca and London. 245p.
- PAUL, V.J. 1992. Ecologycal roles of marine natural products. Cornell University Press, Ithaca and London. 245 p.
  - PEREIRA, R. C. 1993. Ciência Hoje 16: 37.
  - PEREIRA, R. C.; DA GAMA, B. A.; TEIXEIRA, V. L.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. 2003. Ecological roles of natural products of the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. Brazilian Journal of Biology 63: 665-672.
  - PEREIRA, R.C.; TEIXEIRA, V.L. 1999. Sesquiterpenos das algas marinhas Laurencia lamouroux (Ceramiales, Rhodophyta). 1. Significado ecológico. Quim Nova 22: 369-374.
  - PERRY, S. W.; EPSTEIN, L. G.; GELBART, H. A 1997. Simultaneous in situ detection of apoptosis and necrosis in monolayer cultures by TUNEL and trypan blue staining. Biotechniques 22: 1102-1106.
  - POSADA, D.; CRANDALL, K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14: 817-818.
  - RAGAN, M.A.; BIRD, C.J.; RICE, E.L.; GUTELL, R.R.; MURPHY, C.A.; SINGH, R.K. 1994. A molecular phylogeny of the marine red algae (Rhodophyta) based

on the nuclear small-subunit rRNA gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States 91: 7276-7280.

- RAMIREZ, B., BICKLE, Q.; YOUSIF, F.; FAKOREDE, F.; MOURIES, M.A.; NWAKA, S. 2007. Schistosomes: challenges in compound screening. Expert Opinion on Drug Discovery 2 (s1):S53-S61.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. 2001. Fotossíntese, luz e vida. BiologiaVegetal. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 124-151.
- REBOLLO, O.; DEL OLMO, E.; RUIZ, G.; LÓPEZ-PÉREZ, J.L.; GIMÉNEZ, A.; SAN FELICIANO, A. 2008. Leishmanicidal and trypanocidal activities of 2aminocyclohexanol and 1,2-cyclohexanediamine derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18: 184-187.
- REINDEL, F. 1930. Über Pilzcerebrin. I. Justus Liebigs Annalen der Chemie 480: 76-92.
- ROBBA, L.; RUSSELL, S.J.; BARKER, G.L.; BRODIE, J. 2006. Assessing the use of the mitochondrial cox1 marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). American journal of botany 93: 1101-1108.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572-1574.
- ROSS, A.G.; BARTLEY, P.B.; SLEIGH, A. C.; OLDS, G.R.; LI, Y.; WILLIAMS, G.M.; MCMANUS, D.P. 2002. Schistosomiasis. New England Journal of Medicine 346: 1212-1220.
- RUMJANEK, F.D.; SIMPSON, A.J. 1980. The incorporation and utilization of radiolabelled lipids by adult *Schistosoma mansoni* in vitro. Mol Biochem Parasitol 1: 31-44.
- SALGADO, L.T.; VIANA, N.B.; ANDRADE, L.R.; LEAL, R.N.; DA GAMA, B.A.; ATTIAS, M.; PEREIRA, R.C.; AMADO FILHO, G.M.2008.Intra-cellular storage, transport and exocytosis of halogenated compounds in marine red alga *Laurencia obtusa*. Journal of Structural Biology 162: 345-355.

- SANTOS, V.A.; REGASINI, L.O.; NOGUEIRA, C.R.; PASSERINI, G.D.; MARTINEZ,
  I.; BOLZANI, V.S.; GRAMINHA, M.A.; CICARELLI, R.M.; FURLAN, M.
  2012. Antiprotozoal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus ilicifolia*.
  Journal of Natural Products 75: 991–995.
- SANTOS, V.A.F.F.M.; LEITE, K.M.; SIQUEIRA, M. C.; REGASINI, L.O.;
  MARTINEZ, I.; NOGUEIRA, C.T.; GALUPPO, M.K.; STOLF, B.S.;
  PEREIRA, A.M.S.; CICARELLI, R.M.B.; FURLAN, M.; GRAMINHA, M.A.S.
  2013. Antiprotozoal Activity of quinonemethide triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). Molecules 18: 1053-1062.
- SAUMA, S.Y.; STRAND, M. 1990. Identification and characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked Schistosoma mansoni adult worm immunogens. Mol Biochem Parasitol 38: 199-209.
  - SAUNDERS, G. W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. Philosophical Transactions of the Royal Society B, doi:10.1098/rstb.2005.1719.
  - SAUNDERS, G.; KRAFT, G. 1994. Small-subunit rRNA gene sequences from representatives of selected families of the Gigartinales and Rhodymeniales (Rhodophyta). 1. Evidence for the Plocamiales ord. nov. Canadian Journal of Botany 72: 1250-1263.
  - SAUNDERS, G.W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 360: 1879-1888.
  - SAUNDERS, G.W.; MOORE, T.E. 2013. Refinements for the amplification and sequencing of red algal DNA barcode and RedToL phylogenetic markers: a summary of current primers, profiles and strategies. Algae 28: 31-43.
  - SCHMIDT, G.W.; MISHKIND, M. 1986. The transport of proteins into chloroplasts. Annual review of biochemistry 55: 879-912.

- SENTÍES, A.; DÍAZ-LARREA, J. 2008. Proposals of *Palisada poiteaui* var. gemmifera comb. nov. and *Palisada corallopsis* comb. nov. (Rhodomelaceae, Rhodophyta). Botanica Marina 51:69-70.
- SHERWOOD A, CHAN YL; PRESTING G. 2007. Application of universally amplifying plastid primers to environmental sampling of a stream periphyton community. Molecular Ecology Notes, 8: 1011-1014.
- SHERWOOD, A. R; KURIHARA, A.; CONKLIN, K. Y.; SAUVAGE, T.; PRESTING, G.G. 2010. The Hawaiian Rhodophyta Biodiversity Survey (2006-2010): a summary of principal findings. BMC Plant Biology 10:258-288
- SHERWOOD, A.R.; PRESTING, G.G. 2007. Universal Primers Amplify a 23s Rdna Plastid Marker in Eukaryotic Algae and Cyanobacteria1. Journal of Phycology 43: 605-608.
- SHERWOOD, A.R.; VIS, M.L.; ENTWISLE, T.J.; NECCHI JR, O.; PRESTING, G.G. 2008. Contrasting intra versus interspecies DNA sequence variation for representatives of the Batrachospermales (Rhodophyta): insights from a DNA barcoding approach. Phycological Research 56: 269-279.
- SIGNORELLI, P.; MUNOZ-OLAYA, J.M.; GAGLIOSTRO, V.; CASAS, J.; GHIDONI, R.; FABRIAS, G. 2009. Dihydroceramide intracellular increase in response to resveratrol treatment mediates autophagy in gastric cancer cells. Cancer Lett 282: 238-243.
- SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C. & MORRIL, T.C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1994. 387p.
  - SIMONS, K.; VAZ, W.L. 2004. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 33: 269-295.
- 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 Letters 15: 3487–3490.

- SIMS, J.J.; LIN, G.H.Y.; WING, R.M. 1974. Marine natural products X elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga Laurencia elata. Tetrahedron Letters 15: 3487-3490.
- SINHA R.P., KLISCH M., GRÖNIGER A.; HÄDER D.P. 1998, Ultraviolet-absorbing / screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. Journal of Photochemistry and Photobiology. 47: 83–94.
- SKOLOVA, B.; JANDOVSKA, K.; PULLMANNOVA, P.; TESAR, O.; ROH, J.; HRABALEK, A.; VAVROVA, K. 2014. The role of the trans double bond in skin barrier sphingolipids: permeability and infrared spectroscopic study of model ceramide and dihydroceramide membranes. Langmuir 30: 5527-5535.
- SMITHERS, S. R., AND R. J. TERRY. 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology* 55 (4):695-700.
- SOKOLOVA, N.; MITSNER, B.; ZVONKOVA, E.; RP, E. 1974. General method for synthesis of n-acyl derivatives of rac-3-dehydrosphingenine and rac-3dehydrosphinganine. Zhurnal organicheskoi khimii 10: 32-35.
- SPIEGEL, S.; MILSTIEN, S. 2000. Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. FEBS Lett 476: 55-57.
- STEINBERG, P.D.; DE NYS, R.2002. Chemical mediation of colonization of seaweed surfaces. Journal of Phycology 38: 621-629.
- STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, metaanalysis, and estimates of people at risk. Lancet Infectious Diseases 6: 411-425.
- STIBAN, J.; FISTERE, D.; COLOMBINI, M. 2006. Dihydroceramide hinders ceramide channel formation: Implications on apoptosis. Apoptosis 11: 773-780.
- STICHT, G.; LEKIM, D.; STOFFEL, W. 1972. Chemical synthesis of D, L-3dehydrosphinganine, its C 14-, C 16-and C 20-homologues and the resolution into the enantiomeric forms. Chemistry and Physics of Lipids 8: 10-25.

- STOECKLE, M. 2003. Taxonomy, DNA, and the barcode of life. BioScience 53: 796-797.
- SWOFFORD, D.L. 2001. Paup: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) 4. 0. B5.
- SWOFFORD, D.L. 2002. PAUP v4. 0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- SYAD, A.N.; SHUNMUGIAH, K.P.; KASI, P.D. 2013. Seaweeds as nutritional supplements: Analysis of nutritional profile, physicochemical properties and proximate composition of *G. acerosa* and *S. wightii*. Biomedicine & Preventive Nutrition 3: 139-144.
- TAKAHASHI, S.; YASUDA, M.; NAKAMURA, T.; HATANO, K.; MATSUOKA, K.; KOSHINO, H. 2014. Synthesis and structural revision of a brominated sesquiterpenoid, aldingenin. Journal Organic Chemistry 79: 9373-9380.
- TAKAHASHI, Y.; DAITON, M.; SUZUKI, M.; ABE, T.; MASUDA, M. 2002. Halogenated metabolites from the new Okinawan red alga *Laurencia yonaguniensis*. Journal of Natural Products 65: 395-398.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6. 0. journal molecular biology evolution 30: 2725-2729.
- TAYLOR, W. R. 1960. Marine algae of the eastern tropical and subtropical cost of the Americans. Ann Harbour: University of Michigan Press. xi + 870p.
- TERNES, P.; FEUSSNER, K.; WERNER, S.; LERCHE, J.; IVEN, T.; HEILMANN, I.; RIEZMAN, H.; FEUSSNER, I. 2011. Disruption of the ceramide synthase LOH1 causes spontaneous cell death in Arabidopsis thaliana. Phytologist 192: 841-854.
- THUDICHUM, J.L.W. 1901. Die Chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere: Nach eigenen Forschungen bearbeitet. Tübingen: F. Pietzcker In:

DigitalPublicLibraryofAmerica(https://archive.org/stream/b23984569#page/n3/mode/2up)acessoem: 15/11/2015.

- TREMBLAY M, OLIVIER M, BERNIER R. 1996. *Leishmania* and the pathogenesis of HIV infection. Parasitology Today 12:257–261.
- UTZINGER, J.; KEISER, J.; SHUHUA, X.; TANNER, M.; SINGER, B.H. 2003. Combination chemoterapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47: 1487-1495.
  - VAIRAPPAN, C. S. 2003. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae *Laurencia majuscule* (Rhodomelaceae, Ceramiales).
     Biomolecular Engineering on ScienceDirect 20: 255-259.
  - VAIRAPPAN, C. S., Daitoh M, Suzuki M, Abe T, Masuda M 2001. Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. Phytochemistry 58: 291-297.
  - VAIRAPPAN, C.S. 2003. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales).
     Biomolecular Engineering 20: 255-259.
- VAIRAPPAN, C.S., DAITOH, M., SUZUKI, M., ABE, T., MASUDA, M., 2001. Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. Phytochemistry 58: 291–297.
  - VAIRAPPAN, C.S.; DAITOH, M.; SUZUKI, M.; ABE, T.; MASUDA, M. 2001. Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. Phytochemistry 58: 291-297.
- VALADARES, D.G.; DUARTE, M.C.; OLIVEIRA, J.S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; MARTINS, V.T.; COSTA, L.E.; LEITE, J.P.V.; SANTORO, M.M.; RÉGIS, W.C.B; TAVARES, C.A.P.; COELHO, E.A.F. 2011. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. Parasitology International 60: 357–363.

- WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. 2008. Thin layer chromatography in phytochemistry, CRC Press.
  - WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. 2008. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry (Chromatographic science series.) First edition. CRC Press, Taylor & Francis GroupPrint. ISBN: 978-1-4200-4677-9. eBook ISBN: 978-1-4200-4678-6. United States of America 896p.
- WESSELS, M.; KÖNIG, G.M.; WRIGHT, A.D. 2000. 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.
  - WOLTER, F.P.; FRITZ, C.C.; WILLMITZER, L.; SCHELL, J.; SCHREIER, P.H. 1988. rbcS genes in *Solanum tuberosum*: conservation of transit peptide and exon shuffling during evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences 85: 846-850.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHOa). 2014. Global Health Observatory (GHO). Leishmaniasis: Situation and trends. http://www.who.int/gho/neglected\_diseases/leishmaniasis/en/. Acesso em:17/07/2014
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHOb). 2014. Media centre Fact sheet N°375. Leishmaniasis. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/. Acesso em:17/07/2014
- WORRALL, D.; LIANG, Y.K.; ALVAREZ, S.; HOLROYD, G.H.; SPIEGEL, S.;
  PANAGOPULOS, M.; GRAY, J.E.; HETHERINGTON, A.M. 2008.
  Involvement of sphingosine kinase in plant cell signalling. Plant Journal 56: 64-72.
- XIAO, S. H.; KEISER, J.; CHOLLET, J.; UTZINGER, J.; DONG, Y.; ENDRISS, Y.; VENNERSTROM, J.L.; TANNER, M. 2007. In vitro and in vivo activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51:1440-1445.

- XIAO, S.H.; CATTO, B.A. 1989. In vitro and in vivo studies of the effect of artemether on Schistosoma mansoni. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 33:1557-1562.
- YANG, E.; KIM, M.; GERALDINO, P.; SAHOO, D.; SHIN, J.-A.; BOO, S. 2008.Mitochondrial cox1 and plastid rbcL genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta). Journal of Applied Phycology 20: 161-168.
- ZUCCARELLO, G.C.; BURGER, G.; WEST, J.A.; KING, R.J. 1999. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. Mol Ecol 8: 1443-1447.

.

#### Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (porção superior) entre as sequências utilizadas para a análise do UPA.

Amostras do Genbank estão identificadas com o número de acesso.

	Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
1	C. dangeardii HI (HQ421169)	ID	20	19	20	19	19	19	19	19	19	17	17	21	21	21	22	18	21	21	21	19	21	22	12	20	20	20	20	21	12	12	12	16	19	21
2	LA01	5,5	ID	3	4	3	3	3	3	3	3	17	16	6	6	7	6	6	5	5	5	5	5	8	16	7	5	5	5	6	16	16	16	14	18	20
3	LA02	5,2	0,9	ID	1	0	0	0	0	0	0	16	15	6	6	7	3	5	2	2	2	4	2	8	15	7	5	5	5	6	15	15	15	14	15	17
4	LA03	5,5	1,1	0,3	ID	1	1	1	1	1	1	17	16	7	7	8	4	6	3	3	3	5	3	9	16	8	6	6	6	5	16	16	16	15	16	18
5	LA04	5,2	0,9	0	0,3	ID	0	0	0	0	0	16	15	6	6	7	3	5	2	2	2	4	2	8	15	7	5	5	5	6	15	15	15	14	15	17
6	LA05	5,2	0,9	0	0,3	0	ID	0	0	0	0	16	15	6	6	7	3	5	2	2	2	4	2	8	15	7	5	5	5	6	15	15	15	14	15	17
7	LA06	5,2	0,9	0	0,3	0	0	ID	0	0	0	16	15	6	6	7	3	5	2	2	2	4	2	8	15	7	5	5	5	6	15	15	15	14	15	17
8	LA07	5,2	0,9	0	0,3	0	0	0	ID	0	0	16	15	6	6	7	3	5	2	2	2	4	2	8	15	7	5	5	5	6	15	15	15	14	15	17
9	LA08	5,2	0,9	0	0,3	0	0	0	0	ID	0	16	15	6	6	7	3	5	2	2	2	4	2	8	15	7	5	5	5	6	15	15	15	14	15	17
10	LA09	5,2	0,9	0	0,3	0	0	0	0	0	ID	16	15	6	6	7	3	5	2	2	2	4	2	8	15	7	5	5	5	6	15	15	15	14	15	17
11	Chondrophycus sp HI (HQ421454)	4,7	4,7	4,4	4,7	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	ID	2	18	18	18	19	15	18	18	18	16	18	19	15	17	17	17	17	18	15	15	15	18	27	29
12	C.undulatus HI (HQ421531)	4,7	4,4	4,1	4,4	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	0,6	ID	17	17	17	18	14	17	17	17	15	17	18	15	16	16	16	16	17	15	15	15	16	26	28
13	L.majuscula HI (HQ420941)	5,7	1,7	1,7	1,9	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	4,9	4,7	ID	0	2	7	5	6	6	6	4	6	4	18	3	1	1	1	2	18	18	18	18	21	23
14	L majuscula HI (HQ421514)	5,7	1,7	1,7	1,9	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	4,9	4,7	0	ID	2	7	5	6	6	6	4	6	4	18	3	1	1	1	2	18	18	18	18	21	23
15	L.majuscula HI (HQ421529)	5,7	1,9	1,9	2,2	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	4,9	4,7	0,6	0,6	ID	9	7	8	8	8	6	8	6	18	4	3	3	3	4	18	18	18	18	21	23
16	L.mcdermidiae HI (HQ421155)	6	1,7	0,9	1,1	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	5,2	4,9	1,9	1,9	2,5	ID	6	3	3	3	5	3	9	18	8	6	6	6	7	18	18	18	17	18	20
17	L.nidifica HI (HQ420935)	4,9	1,7	1,4	1,7	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	4,1	3,8	1,4	1,4	1,9	1,7	ID	3	5	5	1	5	7	15	6	4	4	4	5	15	15	15	17	20	22
18	L.obtusa HI (KC795895)	5,7	1,4	0,6	0,9	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	4,9	4,7	1,7	1,7	2,2	0,9	0,9	ID	2	2	2	2	8	17	7	5	5	5	6	17	17	17	16	17	19
19	Laurencia sp. HI (HQ421088)	5,7	1,4	0,6	0,9	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	4,9	4,7	1,7	1,7	2,2	0,9	1,4	0,6	ID	2	4	0	8	17	7	5	5	5	6	17	17	17	16	17	17
20	Laurencia sp. HI (HQ420951)	5,7	1,4	0,6	0,9	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	4,9	4,7	1,7	1,7	2,2	0,9	1,4	0,6	0,6	ID	4	2	8	17	7	5	5	5	6	17	17	17	16	17	19
21	Laurencia sp. HI (HQ421168)	5,2	1,4	1,1	1,4	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	4,4	4,1	1,1	1,1	1,7	1,4	0,3	0,6	1,1	1,1	ID	4	6	16	5	3	3	3	4	16	16	16	16	19	21
22	Laurencia sp. HI (HQ421516)	5,7	1,4	0,6	0,9	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	4,9	4,7	1,7	1,7	2,2	0,9	1,4	0,6	0	0,6	1,1	ID	8	17	7	5	5	5	6	17	17	17	16	17	17
23	Laurencia sp. HI (HQ421537)	6,0	2,2	2,2	2,5	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	5,2	4,9	1,1	1,1	1,7	2,5	1,9	2,2	2,2	2,2	1,7	2,2	ID	19	6	4	4	4	5	19	19	19	19	23	25
24	Laurenciella intricata V.Cassano	3,3	4,4	4,1	4,4	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,9	4,9	4,9	4,9	4,1	4,7	4,7	4,7	4,4	4,7	5,2	ID	17	17	17	17	18	0	0	0	5	18	22
25	LD01	5,5	1,9	1,9	2,2	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	4,7	4,4	0,9	0,9	1,1	2,2	1,7	1,9	1,9	1,9	1,4	1,9	1,7	4,7	ID	2	2	2	3	17	17	17	17	20	22
26	LD02	5,5	1,4	1,4	1,7	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	4,7	4,4	0,3	0,3	0,9	1,7	1,1	1,4	1,4	1,4	0,9	1,4	1,1	4,7	0,6	ID	0	0	1	17	17	17	17	20	22
27	LD03	5,5	1,4	1,4	1,7	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	4,7	4,4	0,3	0,3	0,9	1,7	1,1	1,4	1,4	1,4	0,9	1,4	1,1	4,7	0,6	0	ID	0	1	17	17	17	17	20	22
28	LD04	5,5	1,4	1,4	1,7	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	4,7	4,4	0,3	0,3	0,9	1,7	1,1	1,4	1,4	1,4	0,9	1,4	1,1	4,7	0,6	0	0	ID	1	17	17	17	17	20	22
29	LD05	5,7	1,7	1,7	1,4	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	4,9	4,7	0,6	0,6	1,1	1,9	1,4	1,7	1,7	1,7	1,1	1,7	1,4	4,9	0,9	0,3	0,3	0,3	ID	18	18	18	18	21	23
30	LI01	3,3	4,4	4,1	4,4	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,9	4,9	4,9	4,9	4,1	4,7	4,7	4,7	4,4	4,7	5,2	0,0	4,7	4,7	4,7	4,7	4,9	ID	0	0	5	18	22
31	LI02	3,3	4,4	4,1	4,4	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,9	4,9	4,9	4,9	4,1	4,7	4,7	4,7	4,4	4,7	5,2	0,0	4,7	4,7	4,7	4,7	4,9	0,0	ID	0	5	18	22
32	LI03	3,3	4,4	4,1	4,4	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,9	4,9	4,9	4,9	4,1	4,7	4,7	4,7	4,4	4,7	5,2	0,0	4,7	4,7	4,7	4,7	4,9	0,0	0,0	ID	5	18	22
33	LI04	4,4	3,8	3,8	4,1	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	4,9	4,4	4,9	4,9	4,9	4,7	4,7	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	5,2	1,4	4,7	4,7	4,7	4,7	4,9	1,4	1,4	1,4	ID	19	23
34	P.yamadana HI (HQ421478)	5,2	4,9	4,1	4,4	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	4,1	7,4	7,1	5,7	5,7	5,7	4,9	5,5	4,7	4,7	4,7	5,2	4,7	6,3	4,9	5,5	5,5	5,5	5,5	5,7	4,9	4,9	4,9	5,2	ID	7
35	P.parvipapillata HI (HQ421473)	5,7	5,5	4,7	4,9	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	7,9	7,6	6,3	6,3	6,3	5,5	6,0	5,2	4,7	5,2	5,7	4,7	6,8	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,3	6,0	6,0	6,0	6,3	2,0	ID

Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (porção superior) entre as sequências utilizadas para a análise do COI-5P.

	Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1	C. dangeardii HI (GU223879)	ID	82	82	75	75	75	76	76	75	76	75	76	75	75	75	81	80	81	73	85	85	85	83	85	72	82	75	75	75	75	75	83
2	C. cf. undulatus HI (GU223886)	12,3	ID	3	67	67	67	67	66	67	66	67	66	69	69	82	83	82	82	84	84	85	85	85	85	73	84	78	78	78	78	68	76
3	C. undulatus HI (HQ423055)	12,3	0,5	ID	66	66	66	66	64	66	64	66	64	68	68	68	83	82	83	83	87	88	88	86	88	74	85	76	76	76	76	69	75
4	LA01	11,3	10,1	9,9	ID	0	0	3	1	0	1	0	1	7	7	7	62	61	62	59	59	59	59	59	59	73	83	78	78	78	78	72	72
5	LA02	11,3	10,1	9,9	0,0	ID	0	3	1	0	1	0	1	7	7	7	62	61	62	59	59	59	59	59	59	73	83	78	78	78	78	72	72
6	LA03	11,3	10,1	9,9	0,0	0,0	ID	3	1	0	1	0	1	7	7	7	62	61	62	59	59	59	59	59	59	73	83	78	78	78	78	72	72
7	LA04	11,5	10,1	9,9	0,5	0,5	0,5	ID	4	3	4	3	4	8	8	8	63	62	63	60	62	62	62	62	62	74	84	79	79	79	79	72	72
8	LA05	11,4	9,9	9,7	0,2	0,2	0,2	0,6	ID	1	0	1	0	8	8	8	63	62	63	60	60	60	60	60	60	74	84	79	79	79	79	73	74
9	LA06	11,3	10,1	9,9	0,0	0,0	0,0	0,5	0,2	ID	1	0	1	7	7	7	62	61	62	59	59	59	59	59	59	73	83	78	78	78	78	72	72
10	LA07	11,4	9,9	9,7	0,2	0,2	0,2	0,6	0,0	0,2	ID	1	0	8	8	8	63	62	63	60	60	60	60	60	60	74	84	79	79	79	79	73	74
11	LA08	11,3	10,1	9,9	0,0	0,0	0,0	0,5	0,2	0,0	0,2	ID	1	7	7	7	62	61	62	59	59	59	59	59	59	73	83	78	78	78	78	72	72
12	LA09	11,4	9,9	9,7	0,2	0,2	0,2	0,6	0,0	0,2	0,0	0,2	ID	8	8	8	63	62	63	60	60	60	60	60	60	74	84	79	79	79	79	73	74
13	LC Can (KF492719)	11,3	10,4	10,3	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,0	1,2	1,0	1,2	ID	0	0	59	58	59	53	58	58	58	56	58	72	82	72	72	72	72	71	70
14	LC Can (KF492720)	11,3	10,4	10,3	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,0	1,2	1,0	1,2	0,0	ID	0	59	58	59	53	58	58	58	56	58	72	82	72	72	72	72	71	70
15	LC Can (KF492722)	11,3	12,3	10,3	1,0	1,0	1,0	1,2	1,2	1,0	1,2	1,0	1,2	0,0	0,0	ID	59	58	59	53	58	58	58	56	58	72	82	72	72	72	72	71	70
16	LD Can (KF492724)	12,2	12,5	12,5	9,4	9,4	9,4	9,5	9,5	9,4	9,5	9,4	9,5	8,9	8,9	8,9	ID	1	0	31	16	15	15	13	15	76	85	82	82	82	82	78	68
17	LD Can (KF492725)	12,0	12,3	12,3	9,2	9,2	9,2	9,4	9,4	9,2	9,4	9,2	9,4	8,7	8,7	8,7	0,2	ID	1	30	17	16	16	12	16	78	87	81	81	81	81	79	67
18	LD Can (KF492728)	12,2	12,3	12,5	9,4	9,4	9,4	9,5	9,5	9,4	9,5	9,4	9,5	8,9	8,9	8,9	0,0	0,2	ID	31	16	15	15	13	15	76	85	82	82	82	82	78	68
19	L.maj HI (HQ423051)	11,0	12,6	12,5	8,9	8,9	8,9	9,1	9,1	8,9	9,1	8,9	9,1	8,0	8,0	8,0	4,7	4,5	4,7	ID	41	40	40	36	40	75	86	83	83	83	83	74	70
20	LD01	12,8	12,7	13,1	8,9	8,9	8,9	9,3	9,0	8,9	9,0	8,9	9,0	8,7	8,7	8,7	2,4	2,6	2,4	6,2	ID	1	1	5	1	82	92	90	90	90	90	81	75
21	LD02	12,8	12,8	13,3	8,9	8,9	8,9	9,3	9,0	8,9	9,0	8,9	9,0	8,7	8,7	8,7	2,3	2,4	2,3	6,0	0,2	ID	0	4	0	82	92	90	90	90	90	82	75
22	LD03	12,8	12,8	13,3	8,9	8,9	8,9	9,4	9,0	8,9	9,0	8,9	9,0	8,7	8,7	8,7	2,3	2,4	2,3	6,0	0,2	0,0	ID	4	0	82	92	90	90	90	90	82	75
23	LD04	12,5	12,8	13,0	8,9	8,9	8,9	9,3	9,0	8,9	9,0	8,9	9,0	8,4	8,4	8,4	1,9	1,7	1,9	5,4	0,8	0,6	0,6	ID	4	82	92	88	88	88	88	82	71
24	LD05	12,8	12,8	13,3	8,9	8,9	8,9	9,3	9,0	8,9	9,0	8,9	9,0	8,7	8,7	8,7	2,3	2,4	2,3	6,0	0,2	0,0	0,0	0,6	ID	82	92	90	90	90	90	82	75
25	LM Can (KF9277)	10,8	10,9	11,1	11,0	11,0	11,0	11,1	11,1	11,0	11,1	11,0	11,1	10,8	10,8	10,8	11,5	11,7	11,5	11,3	12,4	12,4	12,4	12,4	12,4	ID	12	37	37	37	37	58	65
26	LM SP (KF270693)	12,3	12,7	12,8	12,5	12,5	12,5	12,7	12,7	12,5	12,7	12,5	12,7	12,4	12,4	12,4	12,9	13,0	12,9	13,0	13,9	13,9	13,9	13,9	13,9	1,7	ID	4	4	4	4	68	74
27	LI01	11,3	11,7	11,5	11,7	11,7	11,7	11,9	11,9	11,7	11,9	11,7	11,9	10,8	10,8	10,8	12,4	12,2	12,4	12,5	13,6	13,6	13,6	13,3	13,6	5,6	0,7	ID	0	0	0	66	60
28	LI02	11,3	11,7	11,5	11,7	11,7	11,7	11,9	11,9	11,7	11,9	11,7	11,9	10,8	10,8	10,8	12,4	12,2	12,4	12,5	13,6	13,6	13,6	13,3	13,6	5,6	0,7	0,0	ID	0	0	66	60
29	LI03	11,3	11,7	11,5	11,7	11,7	11,7	11,9	11,9	11,7	11,9	11,7	11,9	10,8	10,8	10,8	12,4	12,2	12,4	12,5	13,6	13,6	13,6	13,3	13,6	5,6	0,7	0,0	0,0	ID	0	66	60
30	LI04	11,3	11,7	11,5	11,7	11,7	11,7	11,9	11,9	11,7	11,9	11,7	11,9	10,8	10,8	10,8	12,4	12,2	12,4	12,5	13,6	13,6	13,6	13,3	13,6	5,6	0,7	0,0	0,0	0,0	ID	66	60
31	PF Can (KF492772)	11,3	10,2	10,4	10,8	10,8	10,8	10,8	11,0	10,8	11,0	10,8	11,0	10,6	10,6	10,6	11,7	11,9	11,7	11,1	12,2	12,4	12,4	12,4	12,4	8,7	10,3	10,0	10,0	10,0	10,0	ID	51
32	PP Can (KF492773)	12,5	11,4	11,3	10,9	10,9	10,9	10,9	11,1	10,9	11,1	10,9	11,1	10,5	10,5	10,5	10,3	10,1	10,3	10,6	11,3	11,3	11,3	10,6	11,3	9,8	11,1	9,1	9,1	9,1	9,1	7,7	ID

Amostras do Genbank estão identificadas com o número de acesso.

Porcentagem de divergência (porção inferior) e número de nucleotídeos divergentes (porção superior) entre as sequências utilizadas para a análise do rbcL.

	Sequência	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1	CL US (KF672853)	ID	46	70	71	71	71	71	71	71	71	71	71	78	78	78	74	74	74	74	74	73	75	75	75	75	75	76	76	76	75	75	75	75	71	71	78	71	70	71	71
2	CC RJ (GU33022)	8,3	ID	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	71	71	71	59	59	59	59	59	61	60	60	60	60	60	70	70	70	69	69	69	69	67	66	75	66	73	75	80
3	LA01	12,6	11,0	ID	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	40	40	40	40	40	40	36	38	38	38	38	32	32	32	62	62	62	62	56	55	61	55	82	50	55
4	LA02	12,8	11,1	0,0	ID	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	40	40	40	40	40	40	36	38	38	38	38	32	32	32	62	62	62	62	56	55	61	55	82	50	55
5	LA03	12,8	11,1	0,0	0,0	ID	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	40	40	40	40	40	40	36	38	38	38	38	32	32	32	62	62	62	62	56	55	61	55	82	50	55
6	LA04	12,8	11,1	0,0	0,0	0,0	ID	0	0	0	0	0	0	3	3	3	40	40	40	40	40	40	36	38	38	38	38	32	32	32	62	62	62	62	56	55	61	55	82	50	55
7	LA05	12,8	11,1	0,0	0,0	0,0	0,0	ID	0	0	0	0	0	3	3	3	40	40	40	40	40	40	36	38	38	38	38	32	32	32	62	62	62	62	56	55	61	55	82	50	55
8	LA06	12,8	11,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ID	0	0	0	0	3	3	3	40	40	40	40	40	40	36	38	38	38	38	32	32	32	62	62	62	62	56	55	61	55	82	50	55
9	LA07	12,8	11,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ID	0	0	0	3	3	3	40	40	40	40	40	40	36	38	38	38	38	32	32	32	62	62	62	62	56	55	61	55	82	50	55
10	LA08	12,8	11,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ID	0	0	3	3	3	40	40	40	40	40	40	36	38	38	38	38	32	32	32	62	62	62	62	56	55	61	55	82	50	55
11	LA09	12,8	11,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ID	0	3	3	3	40	40	40	40	40	40	36	38	38	38	38	32	32	32	62	62	62	62	56	55	61	55	82	50	55
12	LA RJ (JF810351)	12,7	11,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ID	3	3	3	38	38	38	38	38	40	36	37	37	37	37	32	32	32	55	55	56	55	56	55	61	55	48	50	55
13	LC Can (KF492776)	14,0	12,7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	ID	0	0	43	43	43	43	43	45	41	44	44	44	44	37	37	37	58	58	58	58	58	58	57	58	53	54	58
14	LC Can (KF492781)	14,0	12,7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	ID	0	43	43	43	43	43	45	41	44	44	44	44	37	37	37	58	58	58	58	58	58	57	58	53	54	58
15	LC Can (KF492779)	14,0	12,7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,0	ID	43	43	43	43	43	45	41	44	44	44	44	37	37	37	58	58	58	58	58	58	57	58	53	54	58
16	LD01	13,3	10,6	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	6,8	7,7	7,7	7,7	ID	0	0	0	0	4	5	0	0	0	0	31	31	31	58	58	58	58	53	52	58	52	86	53	58
17	LD02	13,3	10,6	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	6,8	7,7	7,7	7,7	0,0	ID	0	0	0	4	5	0	0	0	0	31	31	31	58	58	58	58	53	52	58	52	86	53	58
18	LD03	13,3	10,6	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	6,8	7,7	7,7	7,7	0,0	0,0	ID	0	0	4	5	0	0	0	0	31	31	31	58	58	58	58	53	52	58	52	86	53	58
19	LD04	13,3	10,6	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	6,8	7,7	7,7	7,7	0,0	0,0	0,0	ID	0	4	5	0	0	0	0	31	31	31	58	58	58	58	53	52	58	52	86	53	58
20	LD05	13,3	10,6	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	6,8	7,7	7,7	7,7	0,0	0,0	0,0	0,0	ID	4	5	0	0	0	0	31	31	31	58	58	58	58	53	52	58	52	86	53	58
21	LD BA (GU330228)	13,2	10,9	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1	8,1	8,1	8,1	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	ID	4	4	4	4	4	31	31	31	55	55	55	55	55	54	60	54	54	55	60
22	LD Can (EF686000)	13,4	10,7	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,5	7,4	7,4	7,4	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,7	ID	5	5	5	5	27	27	27	53	53	53	53	54	52	59	52	52	54	56
23	LD RJ (GU330222)	13,4	10,7	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,6	7,9	7,9	7,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,9	ID	0	0	0	32	32	32	53	53	54	53	54	52	59	52	52	54	59
24	LD RJ (GU330237)	13,4	10,7	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,6	7,9	7,9	7,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,9	0,0	ID	0	0	32	32	32	53	53	54	53	54	52	59	52	52	54	59
25	LD SP (AF465810)	13,4	10,7	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,6	7,9	7,9	7,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,9	0,0	0,0	ID	0	32	32	32	53	53	54	53	54	52	59	52	52	54	59
26	LD ES (A Y593971)	13,4	10,7	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9	6,6	7,9	7,9	7,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,9	0,0	0,0	0,0	ID	32	32	32	53	53	54	53	54	52	59	52	52	54	59
27	LI Cu (GU330238)	13,6	12,5	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,8	6,6	6,6	6,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	4,9	5,8	5,8	5,8	5,8	ID	0	0	53	53	53	53	56	55	62	55	52	54	54
28	LI Mx (AF465809)	13,6	12,5	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,8	6,6	6,6	6,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	4,9	5,8	5,8	5,8	5,8	0,0	ID	0	53	53	53	53	56	55	62	55	52	54	54
29	LI US (AY588410)	13,6	12,5	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,8	6,6	6,6	6,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	4,9	5,8	5,8	5,8	5,8	0,0	0,0	ID	53	53	53	53	56	55	62	55	52	54	54
30	LI01	13,4	12,4	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	9,9	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	9,8	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	9,5	9,5	9,5	ID	0	0	0	7	6	7	6	86	55	58
31	LI02	13,4	12,4	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	9,9	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	9,8	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	9,5	9,5	9,5	0,0	ID	0	0	7	6	7	6	86	55	58
32	LI03	13,4	12,4	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	10,0	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	9,8	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	9,5	9,5	9,5	0,0	0,0	ID	0	7	6	7	6	86	55	58
33	LI04	13,4	12,4	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	9,9	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	9,8	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	9,5	9,5	9,5	0,0	0,0	0,0	ID	7	6	7	6	86	55	58
34	LM Can (EF686003)	12,7	12,1	10,1	10,1	10,1	10,1	10,1	10,1	10,1	10,1	10,1	10,0	10,3	10,3	10,3	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,8	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	10,0	10,0	10,0	1,3	1,3	1,3	1,3	ID	1	0	1	54	55	57
35	LM Mx (HQ115065)	12,7	11,8	9,9	9,8	9,8	9,8	9,8	9,8	9,8	9,8	9,8	9,8	10,3	10,3	10,3	9,3	9,3	9,3	9,3	9,3	9,6	9,4	9,4	9,4	9,4	9,4	9,8	9,8	9,8	1,1	1,1	1,1	1,1	0,2	ID	0	0	52	54	56
36	LM Pt (KF492798)	14,0	13,5	10,9	10,9	10,9	10,9	10,9	10,9	10,9	10,9	10,9	10,9	10,2	10,2	10,2	10,5	10,5	10,5	10,5	10,5	10,8	10,6	10,5	10,5	10,5	10,5	11,1	11,1	11,1	1,2	1,2	1,2	1,2	0,0	0,0	ID	0	61	62	65
37	LM SP (GU938189)	12,7	11,8	9,9	9,8	9,8	9,8	9,8	9,8	9,8	9,8	9,8	9,8	10,3	10,3	10,3	9,3	9,3	9,3	9,3	9,3	9,6	9,4	9,4	9,4	9,4	9,4	9,8	9,8	9,8	1,1	1,1	1,1	1,1	0,2	0,0	0,0	ID	52	54	56
38	PF ES (EF061647)	12,6	13,1	14,7	14,7	14,7	14,7	14,7	14,7	14,7	14,7	14,7	8,7	9,4	9,4	9,4	15,4	15,4	15,4	15,4	15,4	9,6	9,4	9,4	9,4	9,4	9,4	9,3	9,3	9,3	15,4	15,4	15,5	15,4	9,6	9,4	10,9	9,4	ID	1	20
39	PF RJ (GU330227)	12,7	13,4	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	8,9	9,7	9,7	9,7	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5	9,8	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	9,8	9,8	9,8	9,8	9,8	9,6	11,1	9,6	0,2	ID	19
40	PP RJ (EU256331)	12,7	14,3	9,9	9,9	9,9	9,9	9,9	9,9	9,9	9,9	9,9	9,8	10,5	10,5	10,5	10,4	10,4	10,4	10,4	10,4	10,7	10,0	10,5	10,5	10,5	10,5	9,6	9,6	9,6	10,3	10,3	10,4	10,3	10,3	10,0	11,6	10,0	3,6	3,3	ID

Amostras do Genbank estão identificadas com o número de acesso.

Valores de probabilidade posterior na árvore filogenética gerada na Análise Bayesiana

*Rbc*L - Bayesiana



Árvore consenso enraizada de Análise Bayesiana inferida para sequências do *rbc*L de espécimes do complexo *Laurencia*. *Chondria collinsiana* e *Chondria littoralis* foram utilizadas como grupo externo. Os valores nos ramos indicam a probabilidade posterior (PP) Sequências do Genbank estão identificadas com os números de acesso entre parênteses. As análises foram realizadas nos programas MrBayes versão 3.2.5.

#### Alinhamento das sequências do UPA

Alinhamento das sequências do UPA das amostras do complexo *Laurencia* estudadas. Os primers foram trimados e a sequência completa é dada apenas para a primeira amostra. Posições idênticas são expressas por pontos (.) e lacunas por traços (-). A régua acima dos nucleotídeos indicam a posição neste alinhamento. As sequências são identificadas pelas siglas à esquerda conforme a Tabela 4.

		10	20	30	40	50	60	70	80	90 1	LOO
		.									.
Cd421169	GCTTTACT	GTAGCTTGG	GAATTGATTTC	GGGTTTATTT	TGCGCAGTAT?	AGGTGGGAGG	CTAAGATAT	TATGTTTTCGGA	TATAAAGGA	<b>GCCATCAGTGAG</b>	SA
Py421478		<b>T</b>			••••••••••••	<mark>.</mark>	GC.	CAG		AT	•••
Pp421473		<b>T</b>			c	<mark>.</mark>	AC.	CAGT		A	•••
LA01			¥		••••••••••••	• • • <mark>•</mark> • • • • • •	AT.			AA	
LA02					••••••••••••	• • • <mark>•</mark> • • • • • •	AT.			AA	•••
LA03					••••••••••••	• • • <mark>•</mark> • • • • • •	AT.			AA	•••
LA04					••••••••••••	• • • <mark>•</mark> • • • • • •	AT.			AA	•••
LA05					••••••••••••	• • • <mark>•</mark> • • • • • •	AT.			AA	•••
LA06					••••••••••••	• • • <mark>•</mark> • • • • • •	AT.			AA	•••
LA07					••••••••••••	• • • <mark>•</mark> • • • • • •	AT.			AA	•••
LA08					• • • • • • • • • • •	• • • <mark>•</mark> • • • • • •	AT.			AA	
LA09					••••••••••••	• • • <mark>•</mark> • • • • • •	AT.			AA	•••
Lmaj420941					••••••••••••	• • • <mark>•</mark> • • • • • •	AT.			AA	•••
Lmaj421514					•••••••••••	<mark>.</mark>	AT.			AA	•••
Lmaj421529					••••••••••••	• • • <mark>•</mark> • • • • • •	AT.			AA	•••
Lmc421155			G <mark>C</mark>		•••••••••••	<mark>.</mark>	AT.			AA	••
Ln420935					•••••••••••	<mark>.</mark>	GAT.		<b>. T</b>	AA	••
Lo795895						<mark>.</mark>	GAT.	G		AA	•••
Lsp421088					••••••••••••	• • • <mark>•</mark> • • • • • •	AT.			AA	•••
Lsp420951					•••••••••••	<mark>.</mark>	AT.			AA	••
Lsp421168					•••••••••••	<mark>.</mark>	GAT.	G		AA	••
Lsp421516					•••••••••••	<mark>.</mark>	AT.	G		AA	••
Lsp421537			.RY		•••••••••••	<mark>.</mark>	AT.	G		AA	••
LD01					•••••••••••	<mark>.</mark>	AT.	G		AA	••
LD02						<mark>.</mark>	AT.	G		AA	•••
LD03						<mark>.</mark>	AT.	G		AA	•••
LD04						<mark>.</mark>	AT.	G		AA	•••
LD05						<mark>.</mark>	AT.	G		AA	•••
LiCassano					•••••••••••	<mark>.</mark>	т.	AG	G	G	••
LI01					•••••••••••	<mark>.</mark>	т.	AG	G	G	••
LI02						<mark>.</mark>	т.	AG	G	G	•••
LI03						<mark>.</mark>	т.	AG	G	G	•••
LIO4						<mark>.</mark>	т.	RG		G	•••
Csp421454						<mark>.</mark>	AT.	.G		A	•••
Cu421531					•••••••••••••	• • • <mark>•</mark> • • • • • •	AT.	.GG		<b>.</b> A	••

		110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
				.	.					.	
Cd421169	TACCACT	CTGATTAAA	CTAGAATTCT/	ATCTTGATG	CCGTTAACCO	GCCAAGAGAC	ATTTTCTGGT(	GGCAGTTTGA	ACTGGGGGCGG	CGCCTCCTA	АААА
Py421478			•••••••		т	•••••		· · · · · · · · · · ·	· • • • • • • • • • •		
Pp421473			••••••••	c	т	•••••		· · · · · · · · · · ·	· • • • • • • • • • •		
LA01			• • • • • • • • • •		<b>T</b>	R	A	<b></b>	• • • • • • • • • • •		G
LA02			• • • • • • • • • •		<b>T</b>	•••••	A	<b></b>	• • • • • • • • • • •		G
LA03		•••••	• • • • • • • • • •		<b>T</b>	•••••	A <i>I</i>	<b>. </b>			G
LA04		•••••	• • • • • • • • • •		<b>T</b>	•••••	A <i>I</i>	<b>. </b>			G
LA05			• • • • • • • • • •		<b>T</b>	•••••	A	<b></b>	• • • • • • • • • • •		G
LA06			• • • • • • • • • •		<b>T</b>	•••••	A	<b></b>	• • • • • • • • • • •		G
LA07			•••••••		т	•••••	A	4	· • • • • • • • • • •		G
LA08			• • • • • • • • • •		<b>T</b>	•••••	A	<b></b>	• • • • • • • • • • •		G
LA09			••••••••		т	•••••	A	4	· • • • • • • • • • •		G
Lmaj420941					т	A	A	<b></b>			G
Lmaj421514					т	A	A	<b></b>			G
Lmaj421529					т	A	AH	<b>ε</b>			G
Lmc421155			<b>r</b>		т	•••••		<b></b>			G
Ln420935					т	•••••	A <i>I</i>	4			G
Lo795895	• • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • •		<b>T</b>	•••••	A <i>I</i>	<b></b>			G
Lsp421088					т	•••••	A <i>I</i>	4			G
Lsp420951	• • • • • • •	A	• • • • • • • • • •		<b>T</b>	•••••	A <i>I</i>	<b></b>			G
Lsp421168	• • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • •		<b>T</b>	•••••	A <i>I</i>	<b></b>			G
Lsp421516	• • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • •		<b>T</b>	•••••	A A	<b></b>			G
Lsp421537	•••••	•••••	• • • • • • • • • •		<b>. T</b>	MA	AZ	<b></b>	••••••		G
Ld01	• • • • • • •	•••••	• • • • • • • • • •		<b>T</b>	A	A	••••••			G
Ld02	•••••	•••••	• • • • • • • • • •		<b>. T</b>	A	AZ	<b></b>	••••••		G
Ld03	•••••	•••••	•••••••		<b>T</b>	A	AZ	4	•••••		G
Ld04	• • • • • • •	•••••	••••••		<b>T</b>	A	AZ	4	• • • • • • • • • •		G
Ld05	• • • • • • •	•••••	••••••		<b>T</b>	A	AZ	4	• • • • • • • • • •		G
LiCassano	• • • • • • •	•••••	••••••		••••••••	•••••		••••••	• • • • • • • • • •		G
LI01	•••••	•••••	•••••••		••••••••	•••••		••••••	••••••		G
LI02	•••••	•••••	•••••••		••••••••	•••••		••••••	••••••		G
LI03	•••••	•••••	•••••••		••••••••	•••••		••••••	••••••		G
LIO4	•••••	•••••	•••••••		W	•••••		••••••	••••••		G
Csp421454	• • • • • • •	R		A.		•••••		••••••	• • • • • • • • • •		G
Cu421531					W	•••••		· · · · · · · · · · ·	· • • • • • • • • • •		G

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
				.	.	.	.	.	.	.
Cd421169	GTAACGGAGGCG	rg <mark>caaaggtt</mark>	<b>TTCTCAGGCT</b> G	G <mark>TC</mark> GGAAA <mark>TC</mark>	AG <mark>TC</mark> GTAGAG'	TGTAAAGGCA'	TAAGAAAG <mark>C</mark> I	<b>TGACTGCGAG</b>	ACCTACAAGT	CGAGCAG
Py421478								<b>T</b>	т	A
Pp421473								<b>T</b>	т	.A.A
LA01	• • • • • • • • • • • • •		.CR			.A	G	<b>T</b>	т	A
LA02	• • • • • • • • • • • • •		.CA		· · · · · · · · · · · ·	.A	G	<b>T</b>	т	A
LA03	• • • • • • • • • • • • •		.CA		· · · · · · · · · · · ·	.A	G	<b>T</b>	т	A
LA04	• • • • • • • • • • • • •		.CA		· · · · · · · · · · · ·	.A	G	<b>T</b>	т	A
LA05	• • • • • • • • • • • • •		.CA		· · · · · · · · · · · ·	.A	G	<b>T</b>	т	A
LA06	• • • • • • • • • • • • •		.CA		· · · · · · · · · · · ·	.A	G	<b>T</b>	т	A
LA07			.CA			.A	G	<b>T</b>	т	A
LA08	• • • • • • • • • • • • •		.CA		· · · · · · · · · · · ·	.A	G	<b>T</b>	т	A
LA09	• • • • • • • • • • • • •		.CA		· · · · · · · · · · · ·	.A	G	<b>T</b>	т	A
Lmaj420941			.c			.AT.	G	<b>T</b>	т	A
Lmaj421514			.c			.AT.	G	<b>T</b>	т	A
Lmaj421529			.c			.AY.	G	<b>T</b>	т	A
Lmc421155			.CA			.AT.	G	<b>T</b>	т	A
Ln420935	•••••		.c			.AT.	G	<b>T</b>	<b>T</b>	A
Lo795895	•••••		.CA			.AT.	G	<b>T</b>	<b>T</b>	A
Lsp421088			.CA			.AT.	G	<b>T</b>	т	.A.A
Lsp420951			.CA			.AT.	G	<b>T</b>	т	A
Lsp421168	•••••		.c			.AT.	G	<b>T</b>	<b>T</b>	A
Lsp421516	•••••	•••••	.CA			.AT.	G	<b>T</b>	<b>T</b>	.A.A
Lsp421537	•••••	•••••	.c		•••••	.A <b>T</b> .	G	Y	. <b>. T</b>	A
LD01	•••••	•••••	.c			.AT.	G	<b>T</b>	<b>T</b>	A
LD02	•••••	•••••	.c		•••••	.A <b>T</b> .	G	<b>T</b>	. <b>. T</b>	A
LD03	•••••	•••••	.c	•••••	••••••	.A <b>T</b> .	••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	<b>T</b>	. <b>. T</b>	A
LD04	•••••	••••••	.c	•••••	••••••	.AT.	••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	<b>T</b>	. <b>. T</b>	A
LD05	•••••	•••••	.C	•••••	••••••	.AT.	G	<b>T</b>	. <b>. T</b>	A
LiCassano		2	.c	•••••	••••••	•••••	••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••	. <b>. T</b>	•••••
LI01		2	.c	•••••	••••••	•••••	••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••	. <b>. T</b>	••••
LI02		2	.c	•••••	••••••	•••••	••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••	. <b>. T</b>	••••
LI03		2	.c	•••••	••••••	•••••	G	•••••	. <b>. T</b>	••••
LIO4		2	.CR	•••••	••••••	•••••	G	•••••	. <b>. T</b>	••••
Csp421454	•••••	••••••	.c	•••••	<b>c</b>	•••••	••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	•••••	. <b>. T</b>	•••••
Cu421531			.c		<b>C</b>		G		т	

	310	320	330	340	350	360
		.				
Cd421169	AGACGAAAGTCGG	CCTTAGTGATC(	CGACAGTTCT	GAGTGGAAAG	GCTGTCGCTC	AACGGATAAAAGTTA
Py421478				· · · · · · · · · ·		
Pp421473	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	•••••		• • • • • • • • • •		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
LA01	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			• • • • • • • • • •		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
LA02				• • • • • • • • • •		
LA03				A		
LA04						
LA05						
LAOG						
LA07						
T.A08						
T.A09						
Imai420941						
Imai421514						
I.mai421529	•••••	••••••	••••••	•••••••••	•••••	••••••
Imc421155	•••••	••••••	••••••	•••••••••	•••••	••••••
Ln420935	•••••••••••••	••••••••••	••••••••••	•••••••••	•••••	••••••
1.0795895	•••••••••••••	••••••••••	••••••••••	•••••••••	•••••	••••••
Len/21088	•••••••••••••	••••••••••	••••••••••	•••••••••	•••••	••••••
LSP421000	•••••••••••	••••••	•••••••	••••••••	•••••	••••••
15p420951	•••••••••••	••••••	•••••••	••••••••	•••••	••••••
$13p_{121100}$ $1 cp_{121516}$	•••••••••••	••••••	•••••••	••••••••	•••••	••••••
$13p_{121510}$ $1 cp_{121537}$	•••••••••••	••••••	•••••••	••••••••	•••••	••••••
150421007	•••••••••••	••••••	•••••••	••••••••	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	••••••
	•••••••••••	•••••	••••••	•••••••	· · · · · · · · · · · · · · · ·	••••••
	•••••••••••	•••••	••••••	••••••••	•••••	••••••
	•••••••••••	•••••	••••••	••••••••	•••••	••••••
	•••••••••••	•••••	••••••		•••••	••••••
	•••••••••••	•••••	••••••	· · · · · · · A · · · ·	•••••	••••••
	••••••••••••	•••••	••••••	•••••••••	•••••	••••••••••••••••
T101	•••••••••••	•••••	••••••••••	••••••••	•••••	••••••
TT05	•••••••••••	•••••	•••••••••	••••••••	•••••	•••••••
TT03	••••••••••	•••••	•••••••	••••	•••••	•••••••••••
	••••••••••	•••••	••••••	••••	•••••	•••••••••••
Csp421454	••••••••••	•••••	••••••	••••••••	•••••	•••••••••••
Cu421531	· · · · · · · · · · · · · · ·	•••••	• • • • • • • • • •	•••••	•••••	•••••

#### Alinhamento das sequências do COI-5P

Alinhamento das sequências do COI-5P das amostras do complexo *Laurencia* estudadas. Os primers foram trimados e a sequência completa é dada apenas para a primeira amostra. Posições idênticas são expressas por pontos (.) e lacunas por traços (-). A régua acima dos nucleotídeos indicam a posição neste alinhamento. As sequências são identificadas pelas siglas à esquerda conforme a Tabela 4.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
			.	.	.	.	.	.		
Cd223879	TACTTTATATTTAATT	TTTGGTGCAT	TTTCAGGAG1	TATTAGGAGG	TTGTATGTCA/	ATGTTAATACO	GTATGGAATT?	AGCTCAACCAG	GAAA <mark>CCATT</mark>	TACTT
Cu223886	G	<b>т</b> .	<b>T</b> <mark>C</mark>	• • • • • • • • • •	С <b>т</b>	<b>. T</b>	· • • • • • • • • •	<mark>С</mark> <b>т</b> .	.TT	
Cu423055	G	<b>T</b> .	<b>T</b> <mark>C</mark>	• • • • • • • • • •	Ст	<b>. T</b>	· • • • • • • • • •	<mark>С</mark> <b>т</b> .	.TT	••••
LA01	GG	<b>T</b> .	<b>TT</b> .	• • • • • • • • • •	••••••	. <b> C .</b> .	A	<b>A</b> G.	.TT	.G
LA02	GG	<b>T</b> .	т.т.	• • • • • • • • • •	••••••	. <b> C</b>	A	<b>A</b> G.	.TT	.G
LA03	GG	<b>T</b> .	<b>TT</b> .	• • • • • • • • • •	••••••	. <b> C .</b> .	A	<b>A</b> G.	.TT	.G
LA04	GG	<b>T</b> .	<b>TT</b> .	• • • • • • • • • •	••••••	. <b> C .</b> .	A	<b>A</b> G.	.TT	.G
LA05	GG	<b>T</b> .	<b>TT</b> .	• • • • • • • • • •	C	. <b> C .</b> .	A	<b>A</b> G.	.TT	.G
LA06	GG	<b>T</b> .	<b>TT</b> .	• • • • • • • • • •	••••••	. <b> C .</b> .	A	<b>A</b> G.	.TT	.G
LA07	GG	<b>T</b> .	<b>TT</b> .	• • • • • • • • • •	C	. <b> C .</b> .	A	<b>A</b> G.	.TT	.G
LA08	GG	<b>т</b> .	<b>т</b> т.	• • • • • • • • • •	••••••	. <b> C</b>	A	<b>A</b> G.	.TT	.G
LA09	GG	<b>T</b> .	<b>TT</b> .	• • • • • • • • • •	C	. <b> C .</b> .	A	<b>A</b> G.	.TT	.G
Lc492719				· · · ·	••••••	. <b> C .</b> .	A	<b>A</b> G.	.TT	.G
Lc492720				· · · ·	••••••	. <b> C .</b> .	A	<b>A</b> G.	.TT	.G
Lc492722				· · · ·	••••••	. <b> C</b>	A	<b>A</b> G.	.TT	.G
Ld492724				· · · ·	••••••	<b>. T</b>	AG		.TT	
Ld492725				· · · ·	••••••	<b>. T</b>	AG		.TT	••••
Ld492728				· · · ·	••••••	<b>. T</b>	AG		.TT	••••
Lmaj423051	G	<b>T</b> .	<mark>. T</mark>	<b>TA</b>		<b>. T</b>	AG	<mark>.</mark> G	.TT	• • • • •
LD01	C	<b>т</b> .	<b>T</b> A.	<b>TA</b>	••••••	<b>. T</b>	AG		.TT	
LD02	C	<b>T</b> .	<b>T</b> A	<b>TA</b>	••••••	<b>. T</b>	AG		.TT	••••
LD03	C	<b>т</b> .	<b>T</b> A.	<b>TA</b>	••••••	<b>. T</b>	AG		.TT	
LD04	C	<b>T</b> .	<b>T</b> A	<b>TA</b>	••••••	<b>. T</b>	AG		.TT	••••
LD05	C	<b>T</b> .	<b>T</b> A	<b>TA</b>	••••••	<b>. T</b>	AG		.TT	••••
Lm492762				· · · ·	••••••	<b>. T</b>	· • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	GA	.T	••••
Lm270693		<b>T</b> .	.CGT.		••••••	<b>. T</b>	· • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	GA	.T	••••
LI01		<b>T</b> .	.CGT.	• • • • • • • • • •	••••••	<b>. T</b>	· • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	GG	.T	т
LIO2		<b>T</b> .	.CGT.	• • • • • • • • • •	••••••	<b>. T</b>	· • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	GG	.T	т
LI03		<b>T</b> .	.CGT.			<b>. T</b>	· • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	GG	.T	T
LIO4		<b>T</b> .	.CGT.			<b>. T</b>	· • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	GG	.T	T
Pf492772				C.	• • • • • • • • • •	<b>. T</b>		G	.TTC.	
Pp492773				• •		<b>. T</b>		A	.TT	

		110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
	.	.	.	.			.				
Cd223879	TTAGGA	AA <mark>TCATC</mark> AAG	TTTACAATGT	<mark>ТТТААТААС</mark> А	GCACATGCG	<b>TTTTTAATGA</b>	TATTTTTTATC	GTTATGCCA	GTAATGATTG	GTGGTTTTG	GAAATT
Cu223886	•••••				Т		.T	т		.A	.T
Cu423055	•••••				т		.T	т		.A	.T
LA01	<b>T</b>		<b>T</b>		A					.G	.T
LA02	<b>T</b>		<b>T</b>		A					.G	.T
LA03	<b>T</b>		<b>T</b>		A					.G	.T
LA04	<b>T</b>		<b>T</b>		A					.G	.T
LA05	<b>T</b>		<b>T</b>		A					.G	.T
LA06	<b>T</b>		<b>T</b>		A					.G	.T
LA07	<b>T</b>		<b>T</b>		A					.G	.T
LA08	т		T		A					.G	.T
LA09	<b>T</b>		<b>T</b>		A					.G	.т
Lc492719	<b>T</b>		<b>T</b>		A					.G	.T
Lc492720	<b>T</b>		<b>T</b>		A					.G	.T
Lc492722	<b>T</b>		<b>T</b>		A					.G	.т
Ld492724	<b>T</b>	c			CA	c		т	A	.A	.т
Ld492725	<b>T</b>	C			A	c		т	A	.A	.T
Ld492728	<b>T</b>	C			CA	c		т	A	.A	.T
Lmaj423051	<b>T</b>				A				A	.G	.т
LD01	<b>T</b>		<b>T</b>		CA	c		т	A	.A	.т
LD02	<b>T</b>		<b>T</b>		CA	c		т	A	.A	.T
LD03	<b>T</b>		<b>T</b>		CA	c		т	A	.A	.T
LD04	<b>T</b>		<b>T</b>		A	c		т	A	.A	.T
LD05	<b>T</b>		<b>T</b>		CA	c		т	A	.A	.т
Lm492762	<b>T</b>			т	т		.т	т			.т
Ln270693	<b>T</b>			т	т		.T	т			.T
LI01	<b>T</b>	cc		т	c		.T	<b>CT</b>		C.	.T
LI02	<b>T</b>	cc		т	c		.т	ст		C.	.т
LI03	<b>T</b>	cc		т	c		.т	ст		c.	.т
LIO4	<b>T</b>	cc		т	c		.т	ст		C.	.т
Pf492772	<b>T</b>			т	G <mark>C</mark> T		.т				.т
Pp492773	т	c	<b>T</b>				.т			.A	.т
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
------------	-----------------------	------------	------------	------------	--	-------------	---------------------	---------------	-----------	---------------	
Cd223879	GATTTGTTCCAATAA	TGATTGGAAG	TCCAGACATG	GCTTTTCCTA	GATTAAATAA	TATTTCTTTT!	<b>FGATTATTA</b>	CACCATCATT	ATGTTTATT	ACTTTT	
Cu223886	<b>.</b> G <b>T</b> .	A	С. т. т		••••••	<b>C</b>		.TTTC.		. <b>T</b> .G	
Cu423055	<b>AT</b> .	A	С. т. т		••••••	<b>C</b>		.TTTC.		. <b>T</b> .G	
LA01	<b>AT</b> .	G	<b>T</b>		••••••		C.T	.CT	G		
LA02	<b>AT</b> .	G	<b>T</b>				<mark>С</mark> .т	.CT	G		
LA03	<b>AT</b> .	G	<b>T</b>		••••••		C.T	.CT	G		
LA04	<b>AT</b> .	G	Ст		••••••		C.T	.CT	G		
LA05	<b>AT</b> .	G	<b>T</b>	•••••	••••••		C.T	.CT	G	••••	
LA06	<b>AT</b> .	G	<b>T</b>	•••••	••••••		C.T	.CT	G	••••	
LA07	<b>AT</b> .	G	<b>T</b>		••••••		C.T	.CT	G		
LA08	<b>AT</b> .	G	<b>T</b>	•••••	••••••••••••••••••••••••••••••••••••••		C.T		G	••••	
LA09	<b>AT</b> .	G	<b>T</b>	•••••	••••••		C.T	.CT	G	••••	
Lc492719	<b>AT</b> .	G	<b>T</b>	•••••	•••••		C.T		G	••••	
Lc492720	<b>AT</b> .	G	<b>T</b>	•••••	••••••		C.T		G	••••	
Lc492722	<b>AT</b> .	G	<b>T</b>	•••••	••••••		C.T	.CT	G	••••	
Ld492724	AT	•••••	G <u>T</u>	•••••	G <mark>C</mark>		C.T	<b>T</b> C	G	••••	
Ld492725	AT	•••••	G <u>T</u>	•••••	G <mark>C</mark>		C.T	<b>T</b> C	G	••••	
Ld492728	AT	•••••	G <u>T</u>	•••••	G <mark>C</mark>		C.T		G	••••	
Lmaj423051	A	•••••	<b>T</b>	•••••	<mark>C.</mark> G <mark>C</mark>		C.T	.TT	C.	••••	
LD01	AT	•••••G••	G <u>T</u>	•••••	<mark>C.</mark> G <mark>C</mark>		C.T		G	••••	
LD02	AT	•••••G••	G <u>T</u>	•••••	<mark>C.</mark> G <mark>C</mark>	•••••	<mark>С.</mark> Т		G	••••	
LD03	AT	•••••G••	G <u>T</u>	•••••	<mark>C.</mark> G <mark>C</mark>	•••••	<mark>С.</mark> Т		G	••••	
LD04	AT	G	G <u>T</u>	•••••	<mark>C.</mark> G <mark>C</mark>		C.T	.cc	G	••••	
LD05	AT	•••••G••	G <u>T</u>	•••••	<mark>C.</mark> G <mark>C</mark>	•••••	<mark>С.</mark> Т		G	••••	
Lm492762	.G <b>AT</b> .	<b>AT</b>	•••••	G	•••••	CG	<mark>С.</mark> Т		C.	G	
Lm270693	.G <b>AT</b> .	<b>AT</b>	•••••	G	•••••	CG	CTTC.T		C.	G	
LI01	.G <b>AT</b> .	<b>AT</b>	<b>T</b>	•••••	•••••	G	G <mark>C.T.</mark>	G	C	••••	
LIO2	.G <b>AT</b> .	<b>AT</b>	<b>T</b>	•••••	••••••	G	G <mark>C.T.</mark>	G	C	••••	
LI03	.G <b>AT</b> .	<b>AT</b>	<b>T</b>	•••••	•••••	G	G <mark>C.T.</mark>	G	c	••••	
LIO4	.G <b>AT</b> .	<b>AT</b>	<b>T</b>	•••••	•••••	G	G <mark>C.T.</mark>	G	<b>C</b>	••••	
Pf492772	<b>AT</b> .	<b>AT</b>	<b>T</b>	AA.	•••••	CA	C.T			••••	
Pp492773	<b>AT</b> .	AT	T	A		G	G <mark>C.T.</mark>	. <b>T</b> CG	c		

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
Cd223879	ATCGTCAATTGTAGA	AGTTGGTA <mark>C</mark> T	GG <mark>TAC</mark> TGGTT	GAACCGTTTA	CCCACCATTG	AGTTCTATTC	AAAGTCATTC	AGGAG <mark>CTTCT</mark>	GTTGATTTAG	CAATC
Cu223886	<b>T</b>	A	AA.	<b>T</b> G'	ГС.Т	AA.	c	GA	c	.TT
Cu423055	<b>T</b>	A	AA.	<b>T</b> G'	г <mark>с.</mark> т	AG.A.	c	GA	c	.TT
LA01	<b>T</b>	AG	A		ГТТА	A.	AC	A	С.Т.	т
LA02	<b>T</b>	AG	A	T	ГТТА	A.	AC	A	С.т.	т
LA03	<b>T</b>	AG	A	T	ГТТА	A.	AC	A	С.т.	т
LA04	<b>T</b>	AG	A	T	ГТТА	A.	AC	A	<b>СС</b> . <b>т</b> .	т
LA05	<b>T</b>	AG	A	<b>T</b>	ГТТА	A.	AC	A	С.т.	т
LA06	<b>T</b>	AG	A		ГТТА	A.	AC	A	С.Т.	т
LA07	<b>T</b>	AG	A		ГТТА	A.	AC	A	С.Т.	т
LA08	<b>T</b>	AG	A		ГТТА	A.	AC	A	С.Т.	т
LA09	<b>T</b>	AG	A		ГТТА	A.	AC	A	С.Т.	т
Lc492719	<b>T</b>	AA	A		<b>FTT</b> A	A.	c	A	С.Т.	T
Lc492720	<b>T</b>	AA	A		ГТТА	A.	c	A	С.Т.	т
Lc492722	<b>T</b>	AA	A		<b>FTT</b> A	A.	c	A	С.Т.	T
Ld492724	AG	A	A	<b>T</b>	CTA	A.	CC	<b>T</b> A	•••••	.TT
Ld492725	AG	A	A	<b>T</b>	CTA	A.	CC	<b>T</b> A	•••••	.TT
Ld492728	AG	A	A	<b>T</b>	CTA	A.	cc	<b>T</b> A		.TT
Lmaj423051	A	A	A	<b>T</b>	CTA	A.		<b>T</b> A	•••••	.TT
LD01	AG	A	A	<b>T</b>	CTA	A.	AC	GA	•••••	.TT
LD02	AG	A	A	<b>T</b>	CTA	A.	AC	<b>T</b> A	•••••	.TT
LD03	AG	A	A	<b>T</b>	CTA	A.	AC	<b>T</b> A	•••••	.TT
LD04	AG	A	A	<b>T</b>	CTA	A.	c	<b>T</b> A	•••••	.TT
LD05	AG	A	A	<b>T</b>	CTA	A.	AC	<b>T</b> A	•••••	.TT
Lm492762	<b>T</b>	G	CC.	AA	<b>C</b> . <b>T</b>	AA.	<b>C.</b> .			.TT
Lm270693	<b>T</b>	G	CCC	TTAA	<b>C</b> . <b>T</b>	AA.	<b>C.</b> .			.TT
LI01	<b>T</b>		••••••		ГС.Т	AA.				.TT
LI02	<b>T</b>			G	г <mark>с.</mark> т	AA.				.TT
LI03	<b>T</b>				гс.т	AA.				.TT
LIO4	<b>T</b>				гс.т	AA.				.TT
Pf492772	<b>T</b>	.A		<b>TA</b>	<b>T</b> A	AA.		<b>T</b> GC	A	.TT
Pp492773	<b>T</b> G		c	<b>T</b> . <b>C</b> G	cc	AA.	c	<b>T</b> A		.тт

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
		.	.			.				
Cd223879	TTTAGTTTACATTTA	<b>CTGGAGCGTC</b>	ATCCATCTTA	GG <mark>TGC</mark> GA <mark>TC</mark> A/	ATTTTATTC	TACAATATTA	AACATGCGT	AA <mark>TCCT</mark> GGA <mark>C</mark> AA	ACTTTTTA	TAGAA
Cu223886	G		тт	AAT.		тт	<b>T C</b>			<b>C</b>
Cu423055	G		тт	AAT.		тт	<b>T C</b>			<b>C</b>
LA01	G.		TT	CAG.T.		<b>T</b>	<b>T</b> C	A		••••
LA02	G.		TT	CAG.T.		<b>T</b>	<b>T</b> C	A		••••
LA03	G.		тт	CAG.T.		<b>T</b>	<b>T C</b>	A		••••
LA04	G.		TT	AG.T.		<b>T</b>	<b>T</b> C	A		••••
LA05	G.		<b>TT</b>	CAG.T.		<b>T</b>	<b>T C</b>	A	A	••••
LA06	G.		<b>TT</b>	CAG.T.		<b>T</b>	<b>T</b> C	A	A	••••
LA07	G.		<b>TT</b>	<mark>CAG.T</mark> .	• • • • • • • • • •	<b>T</b>	<b>T C</b>	<b>.</b>	A	••••
LA08	G.		<b>TT</b>	<mark>CAG.T</mark> .	• • • • • • • • • •	<b>T</b>	<b>T C</b>	<b>.</b>	A	••••
LA09	G.		<b>TT</b>	<mark>CAG.T</mark> .	• • • • • • • • • •	<b>T</b>	<b>T C</b>	<b>.</b>	A	••••
Lc492719	G.	A <b>T</b>	TT	AG.T.		<b>T</b>	<b>T</b>	A	A	<b>C</b>
Lc492720	G.	A <b>T</b>	TT	AG.T.		<b>T</b>	<b>T</b>	A	A	<b>C</b>
Lc492722	G.		<b>TT</b>	AG.T.	• • • • • • • • • •	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>.</b>	A	<b>C</b>
Ld492724	C	ATTO	G <mark>TT.</mark> G	<b>T</b> .A.	• • • • • • • • • •	<b>TC</b>	<b>T</b>	<b>.</b>	A	<b>C</b>
Ld492725	C	ATT(	G <mark>TT.</mark> G	<b>T</b> .A.		<b>TC</b>	<b>T</b>	A	A	<b>C</b>
Ld492728	C	ATT	G <mark>TT.</mark> G	<b>T</b> .A.	••••••	<b>TC</b>	<b>T</b>	A	A	<b>C</b>
Lmaj423051	C	ATT!	<b>FTT</b> G	<b>T</b> .A.		<b>T</b>	<b>T</b>	A	A	••••
Ld01	••••••••••••	ATT(	G <mark>TT.</mark> G	<b>CT</b> .A.	. <b>C</b>	<b>TC</b>	<b>T</b>	A	A	<b>C</b> G.
Ld02	••••••••••••••	ATT	G <mark>TT.</mark> G	C <b>T.</b> A.	.c	<b>TC</b>	<b>T</b>	A	A	<mark>C</mark> G.
Ld03	••••••	ATT(	GTTG	<b>CT</b> .A.	. <b>C</b>	<b>TC</b>	<b>T</b>	A	A	<b>C</b> G.
Ld04	••••••	ATT(	GTTG	<b>CT</b> .A.	. <b>C</b>	<b>TC</b>	<b>T</b>	A	A	<b>C</b> G.
Ld05	••••••••••••••	ATT	G <mark>TT.</mark> G	C <b>T.</b> A.	.c	<b>TC</b>	<b>T</b>	A	A	<mark>C</mark> G.
Lm492762	••••••••••••••	AT!	FTT	<b>AT</b> .		<b>T</b>	<b>T</b>	A	A	••••
Lm270693	••••••	AT!	FTT	<b>AT</b> .	A	<b>T</b>	<b>T</b>	A	A	••••
LI01	••••••	<b>. T</b> !	FTT	<b>AT</b> .	A	<b>T</b>	<b>T</b>	A	A	<b>C</b>
LIO2	••••••	<b>. T</b> !	FTT	<b>AT</b> .	A	<b>T</b>	<b>T</b>	A	A	<b>C</b>
LI03	••••••••••••••	<b>. T</b> !	<b>FTT</b>	<b>AT</b> .		<b>T</b>	<b>T</b>	<b>.</b>	A	<b>C</b>
LIO4	••••••••••••••	<b>. T</b> !	<b>FTT</b>	<b>AT</b> .		<b>T</b>	<b>T</b>	<b>.</b>	A	<b>C</b>
Pf492772	G		<b>F</b> G <b>T</b>	<b>T</b> A.	••••••	<b>TC</b>	<b>T</b>		• • • • • • • •	••••
Pp492773		<b>. T</b> !	<b>FAT</b> G	<b>TA</b> .		<b>T</b>	<b>T</b>	c		••••

	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
		.								
Cd223879	TTCCATTATTTGT7	TGGT <mark>CTA</mark> TTTT	TGTTACCGCT	TTTTTATTAI	TATTAGCTGT	<b>FCCAGTTTTA</b>	GCAGGAGCAA	TAACAATGTI	ATTGACTGAT	CGAAA
Cu223886	<b>T</b>	AAA	AA		CA		TT	<b>T</b>	A	A
Cu423055	<b>T</b>	AAA	AA		CA		<b>TT</b>	<b>T</b>	A	A
LA01	<b>T</b>	AA	A <b>T</b> G		CA	<b>T</b> A	<mark>T</mark> G	<b>T</b>	A	A
LA02	T	AA	ATG		CA	<b>T</b> A	<mark>T</mark> G	<b>T</b>	A	A
LA03	T	AA	ATG		CA	<b>T</b> A	S.TG	<b>T</b>	A	A
LA04	T	AA	ATG		CA	<b>T</b> A	<b>T</b> G	<b>T</b>	A	A
LA05	<b>T</b>	AA	A <b>T</b> G		CA	<b>T</b> A	<mark>T</mark> G	<b>T</b>	A	A
LA06	<b>T</b>	AA	A <b>T</b> G		CA	<b>T</b> A	<mark>T</mark> G	<b>T</b>	A	A
LA07	<b>T</b>	AA	ATG	••••••••	CA	<b>T</b> A	<mark>T</mark> G	<b>T</b>	A	A
LA08	<b>T</b>	AA	A <b>T</b> G		CA	<b>T</b> A	<mark>T</mark> G	<b>T</b>	A	A
LA09	<b>T</b>	AA	A <b>T</b> G		CA	<b>T</b> A	<mark>T</mark> G	<b>T</b>	A	A
Lc492719	<b>T</b>	AA	A <b>T</b> G		CA	<b>T</b> A	<mark>T</mark> G	<b>T</b>	.C.A	A
Lc492720	<b>T</b>	AA	A <b>T</b> G		CA	<b>T</b> A	<mark>T</mark> G	<b>T</b>	.C.A	A
Lc492722	<b>T</b>	AA	A <b>T</b> G		CA	<b>T</b> A	<mark>T</mark> G	<b>T</b>	.C.A	A
Ld492724	<b>T</b>	G	A <b>T</b> G		.GG	т		<b>T</b>	G A	A
Ld492725	<b>T</b>	G	A <b>T</b> G		.GG	т		<b>T</b>	G A	A
Ld492728	<b>T</b>	G	A <b>T</b> G		.GG	т		<b>T</b>	G A	A
Lmaj423051	T	G	A <b>T</b>		.GCA	т		<b>T</b>	GC.T	A
LD01	T	G	ATG		.GG	т		<b>TC</b> .	A	A
LD02	T	G	ATG		.GG	т		<b>TC</b> .	A	A
LD03	T	G	ATG		.GG	т		YTC.	A	A
LD04	<b>T</b>	G	A <b>T</b> G		.GG	т		<b>T</b>	GA	A
LD05	T	G	ATG		.GG	т		<b>TC</b> .	A	A
Lm492762	GG	AA	A <b>T</b>			GT	<b>T</b>		A	A
Lm270693	GG	. CTT A	A <b>T</b>			GT	<b>T</b>		A	A
LI01	G		A <b>T</b>	C		A <b>T</b>	<b>T</b>		.C.A	A.G
LI02	G		A <b>T</b>	C		A <b>T</b>	<b>T</b>		.C.A	A.G
LI03	G		<b>AT</b>			AT	<b>T</b>		.C.A	A.G
LIO4	G		<b>AT</b>			AT	<b>T</b>		.C.A	A.G
Pf492772	<b>T</b>	AA	A <b>T</b> A			A	<b>T</b>	.т. т	AC	A
Pp492773	.CT	AA	ATG		G	AG	<b>T</b>	.TT	GC.A	A

		610	62	0	630		640		650		660
			.			.					.
Cd223879	TTTTAAT	ACTTCA	TTTTTG	ATCCTT	CAGGAGG	AGGA	GATCC'	TATAT'	TATAT	CAACAT	TTGTTT
Cu223886		т		G.	<b>. T</b>	т		АТ.			A
Cu423055		т									
LA01						т.		т.	.G		
LA02					G	т		т.	G		
T.AO3			•••••	•••••	с	 т	• • • • •	 т	с С	• • • • • •	•••••
T.AO4	•••••	•••••	•••••	•••••	с.	··· •	••••	<u>т</u>	с	•••••	•••••
1705	•••••	•••••	•••••	•••••	. <del>с</del>	··· •	••••	· ··· · · · · · · · · · · · · · · · ·	. с	•••••	••••
LAUS	•••••	•••••	•••••	•••••	. G C		••••			•••••	•••••
LAUG	•••••	•••••	•••••	•••••			••••	· · · 1 ·		•••••	•••••
	•••••	••••	•••••	•••••	. G	· · · T .	••••	· · · T ·		•••••	•••••
	•••••	•••••	•••••	•••••	.G	· · · T	••••	· · · T ·	.G	•••••	•••••
LAU9	•••••	•••••	•••••	•••••	.G	· · · T	••••	т.	.G	•••••	•••••
Lc492719	• • • • • • •	•••••	••••								
Lc492720	• • • • • • •	•••••	••••								
Lc492722	• • • • • • •	••••	••••								
Ld492724	C	T	••••								
Ld492725	C	т	••••								
Ld492728	C	т									
Lmaj423051	<b>c</b>	C									
LD01	C	т		A		т.		т.	.G		A
LD02	C	т		A.		т.		т.	.G		A
LD03	C	т		A.		т		т.	.G		A
LD04	C	т		A.		т.		т.	.G		A
LD05	C	т		A.		т.		т.	.G		
Lm492762	C	т									
Lm270693	C	т		.c	<b>.T</b>	т. т.	c	т.	.G		
LI01	C	т			. <b>c</b>	т	c	т.			A
LI02		Т			<b>C</b>	т	с.	т.			. A
L103		. т			. <b>C</b>	т	. C.	т			. A.
<u></u> ; <u></u>		т			C	 Т.	C				A
Pf492772											
Dn/102773	•••••										
EPasziis	••••	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	• • • •								

## Alinhamento das sequências do *rbc*L

Alinhamento das sequências do *rbc*L das amostras do complexo *Laurencia* estudadas. Os primers foram trimados e a sequência completa é dada apenas para a primeira amostra. Posições idênticas são expressas por pontos (.) e lacunas por traços (-). A régua acima dos nucleotídeos indicam a posição neste alinhamento. As sequências são identificadas pelas siglas à esquerda conforme a Tabela 4.

	10		20	30		40	50		60	70	80	90	100
	.			.		.			.		.		
C1672853	AGATCCTTTAA	<b>FGATCA</b>	AAGGTTT	CTATGAT	ACCTTAC	TACAACC	GTATCTA	AAAG <mark>T</mark>	<b>FAATTTAC</b>	TCAAGGTA	TTTTCTTTGAG(	:AAGATTGG	GCATCT
Cc330225	<b>T</b>	т.	.G		Т	G	A			•••••		C	• • • • • •
LA01	т	т.	.GA.	A.C.	т	G	ACT		3 <b>.</b>		.c		A
LA02	т	т.	.GA.	A.C.	т	G	ACT		3 <b>.</b>		.c		A
LA03	т	т.	.GA.	A.C.	т	G	ACT		3 <b>.</b>		.c		A
LA04	т	т.	.GA	A.C.		G	ACT		3 <b>.</b>	•••••	.c		A
LA05	т	т.	.GA.	A.C.	т	G	ACT		3 <b>.</b>		.c		A
LA06	т	т.	.GA.	A.C.	т	G	ACT		3 <b>.</b>		.c		A
LA07	т	т.	.GA.	A.C.	т	G	ACT		3 <b>.</b>		.c		A
LA08	т	т.	.GA	A.C.		G	ACT		3 <b>.</b>		.c		A
LA09	т	т.	.GA	A.C.		G	ACT		3 <b>.</b>		.c		A
La810351	т	т.	.GA	A.C.		G	ACT		3 <b>.</b>		.c		A
Lc492776	т	т.	A	A.C.		G	ACT	· · · · • •	3 <b>.</b>		.c		A
Lc492781	т	т.	A	A.C.	т	G	ACT		g		.c		A
Lc492779	т	т.	A	A.C.		G	ACT		3 <b>.</b>		.c		A
LD01	TCC	т.		A	TC.GT	G	A	G <mark>C</mark>		G	.c		A
LD02	TCC	т.		A	TC.GT	G	A	G <mark>C</mark>		G	.c		A
LD03	TCC	т.		A	TC.GT	G	A	G <mark>C</mark>		G	.c		A
LD04	TCC	т.		A	TC.GT	G	A	G <mark>C</mark>		G	.c		A
LD05	TCC	т.		A	TC.GT	G	A	G <mark>C</mark>		G	.c		A
Ld330228	TCC	т.		CA	TC.GT	G		G <mark>C</mark>		G	.c		A
Ld686000	TCC	т.		CA	TC.GT	G	A	G <mark>C</mark>			.c		A
Ld330222	TCC	т.		A		G	A	G <mark>C</mark>		G	.c		A
Ld330237	TCC	т.		A	TC.GT	G	A	G <mark>C</mark>		G	.c		A
Ld465810	TCC	т.		A	TC.GT	G	A	G <mark>C</mark>		G	.c		A
Ls593971	TCC	т.		A	TC.GT	G	A	G <mark>C</mark>		G	.c		A
Li330238	TCC	т.		<b>TC</b> A	тс т	.GG	ACT		A		.CTA.		A
Li465809	TCC	т.		<b>TC</b> A		.GG	ACT		A		.CTA.		A
Li588410	TCC	т.		<b>TC</b> A		.GG	ACT		A		.CTA.		A
LI01	<b>TC</b>	т.		TA.C.		G	A	GCTA.	A				<b>T</b> A
LI02	<b>TC</b>	т.		TA.C.		G	A	GCTA.	A				<b>T</b> A
LI03	TC	т.		TA.C.		G	A	GCTA.	A				<b>T</b> A
LIO4	TC	т.		TA.C.		G	A	GCTA.	A				<b>T</b> A
Lm686003	TC	т.		TA.C.	c	G	A	сст	3 <b>.</b>		A.		<b>T</b> A

т	· • • C • • • • • • •	.T1	CA.C	<b>C</b> G	.ACC	<b>T</b> G	•••••	A	••••••
т		.T	CA.C	<b>C</b> G	.ACC	<b>T.</b> .G	• • • • • • • • • • •	A	•••••••
т		.T	<b>C</b> A.C	<b>C</b> G	.ACC	<b>T.</b> .G	• • • • • • • • • •	A	
т		.T.G	<b>AT</b>	G	.ACTGC	<b>T</b>	AA.	A	
т	••••	. <b>T</b> .G	<b>AT</b>	G	.ACTGC	тс.	A	A	
с	•••••	.T.G1	ГАТ	G	.ACTGC	тс.	AA	A	
	110	120	130	140	150	160	170	180	190
							.		
TTAC	TAAAGTAAC'	TCCAGTTGCTT	CAGGCGGTA	<b>FCCATTGTGG</b>	TCAAATGCAC	CAATTACTAC	GATTATCTAGGT	GATGACGTAG	TACTACAATT
			<b>T</b>	.т	Сл	· <b>T</b>	<b></b>	A <b>T</b>	т
с		т	<b>T</b>	.тсс	G	c		A <b>T</b>	т
с		т	т	.т. с. с.	G	c	Ст	A <b>T</b>	<b>T</b>
C			Т	т. с. с.	G		СТ	ΑΤ	<b>T</b>
C		т. Т	т	ТСС	G	C	СТ	АТ	т
C		т. Т	т	ТСС	G	C	СТ	АТ	т
c	•••••			т с с	с т	с	Ст	Δ Ψ	тт
c	•••••	····	±		g	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ст	λ	····
c	•••••	····	±		G	· · · · C · · · · · ·	ст.	λ	····
C	•••••	<u>.</u>	<u>1</u>				СШ	л <u>т</u>	
C	•••••	<u>.</u>	<u>1</u>				CI	A	
C	•••••		T	.TCC	G1		CT	AT	T
C	•••••		T	.TCC	G1		CT	AT	T
C	•••••		T	.тсс			CT	AT	····T····
C	•••••	· · · T · · · · · · ·	T	.тсс	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	· · · C · · · · ·	CT	AT	T
••••	•••••		· · · · · T · · · ·	. T	C1	••••	· · · · · CT · · · ·	AT	
••••	•••••	· · · T · · · · · · ·	· · · · · <b>T</b> · · · ·	. <u>T</u>	C1	• • • • • • • • •	CT	AT	TG
••••	•••••	· · · T · · · · · · ·	· · · · · <b>T</b> · · · ·	. <u>T</u>	C1	• • • • • • • • •	CT	AT	TG
••••	•••••	· · · T · · · · · · ·	· · · · · <b>T</b> · · · ·	. <u>T</u>	C1	• • • • • • • • •	CT	AT	TG
• • • • •	•••••	· · · T · · · · · · ·	· · · · · <b>T</b> · · · ·	. <b>T</b>	C1	• • • • • • • • •		.AT	
• • • • •	•••••	T	<b>T</b>	. <b>T</b>	Сл	•••••	CT	AT	<b>T</b> G
••••	••••	<b>T</b>	<b>T</b>	. <b>T</b> C	C1	•••••	CT	A <b>T</b>	<b>T</b> G
• • • •	•••••	<b>T</b>	· · · · · <b>T</b> · · · ·	. <b>T</b>	C1	•••••	CT	A <b>T</b>	<b>T</b> G
• • • • •	•••••	T	<b>T</b>	. <b>T</b>	Сл	•••••	CT	A <b>T</b>	<b>T</b> G
• • • • •	•••••	<b>T</b>	<b>T</b>	. <b>T</b>	Сл	•••••	<b>CT</b>	AT	<b>T</b> G
• • • • •	•••••	<b>T</b>	<b>T</b>	. <b>T</b>	Сл	•••••	CT	AT	<b>T</b> G
<b>C</b>	•••••	T	<b>T</b>	. <b>T</b> CC	G	•••••		A	<b>T</b> G
с	•••••	<b>T</b>	<b>T</b>	.TCC	G	• • • • • • • • • •		A	<b>T</b> G

Li588410	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>TT</b>	cc	.G	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	CCT	A. <b>.</b>	<b>T</b> G	
LI01	C	T	T T	C		<b>T</b>	•••••	.AT	<b>T</b> G	• • • • •
LI02	C	<b>T</b>	<b>T T</b>	C		<b>T</b>	•••••	.A <b>T</b>	<b>T</b> G	• • • • •
LI03	C	<b>T</b>	<b>T T</b>	C		<b>T</b>	•••••	.A <b>T</b>	<b>T</b> G	• • • • •
LIO4	C	T	T T	C		<b>T</b>	•••••	.AT	<b>T</b> G	• • • • •
Lm686003	C	<b>T</b>	<b>T T</b>	C	<b>T</b>	<b>T</b>	•••••	.A <b>T</b>	<b>T</b> G	• • • • •
Lm115065	C	<b>T</b>	<b>T T</b>	C	<b>T</b>	<b>T</b>	•••••	.AT	<b>T</b> G	• • • • •
Lm492798	C	<b>T</b>	<b>T T</b>	c	т	<b>T</b>		.AT	<b>T</b> G	• • • • •
Lm938189	C	<b>T</b>	<b>T T</b>	c	т	<b>T</b>		.AT	<b>T</b> G	• • • • •
Pf061647	<b>C</b>	T	тт			· · · · · · · · · · ·		АТТ	<b>T</b> G	2
Pf330227	С.т	<b>T</b>	<b>T T</b>					АТТ	<b>T</b> G	2
Pp256331	С.т	<b>T</b>		c				АТТ	G <mark>T</mark> G(	2
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
			.		.	.	.			
C1672853	GAGGAACTATTGG	GCATCCAGATGG	<mark>FATTCAACC</mark> AG	GGG <mark>CAAC</mark> AGC	CAAACCGTGTI	GCTTTAGAAG	CTATGGTTAT	CGCACGTAAT	GAAGG <mark>TC</mark> GT	GATTA
Cc330225	· · · · · · · · · · · · · · ·	A	AG	.A	<b>T</b> A.AA	<b></b>		A		••••
LA01	.TT	т	G. <b>T</b> .	. <b>T</b>	<b>T</b> A	4	.GA.	TA.A		<b>C.</b> .
LA02	.TT	т	G. <b>T</b> .	. <b>T</b>	<b>T</b> A	4	.GA.	TA.A		<b>C.</b> .
LA03	.TT	<b>T</b>	G. <b>T</b> .	.т	<b>T</b> A	<b></b>	.GA.	<b>T</b> A.A		<b>C.</b> .
LA04	.TT	т		. <b>T</b>	<b>T</b> A	<b></b>		TA.A		<b>c.</b> .
LA05	.TT	т		. <b>T</b>	<b>T</b> A	<b></b>		TA.A		<b>c.</b> .
LA06	.TT	т		. <b>T</b>	<b>T</b> A	<b></b>		TA.A		<b>c.</b> .
LA07	.TT	т		. <b>T</b>	<b>T</b> A	<b></b>		TA.A		<b>c.</b> .
LA08	.TT	т		. <b>T</b>	<b>T</b> A	<b></b>		TA.A		<b>c.</b> .
LA09	.TT	<b>T</b>		. <b>T</b>	<b>T</b> A	<b></b>	.GA.	TA.A		<b>c.</b> .
La810351	.TT	<b>T</b>		. <b>T</b>	<b>T</b> A	<b></b>	.GA.	TA.A		<b>c.</b> .
Lc492776	.TT	<b>T</b>		. <b>T</b>	<b>T</b> A	<b></b>		TA.A		c
Lc492781	.TT	т		. <b>T</b>	<b>T</b> A	<b></b>		TA.A		<b>c.</b> .
Lc492779	.TT	т		. <b>T</b>	<b>T</b> A	<b></b>		TA.A		<b>c.</b> .
LD01	.TT	A		. <b>T</b>	<b>T</b> A		.AA.	TA.AC	c	<b>c.</b> .
LD02	.TT	A		. <b>T</b>	<b>T</b> A		.AA.	TA.AC	c	<b>c.</b> .
LD03	.TT	A		. <b>T</b>	<b>T</b> A		.AA.	TA.AC	c	<b>c.</b> .
LD04	.TT	A		. <b>T</b>	<b>T</b> A		.AA.	TA.AC	c	<b>c.</b> .
LD05	.TT	AC		. <b>T</b>	<b>T</b> A	<b></b>	.AA.	TA.AC	c	<b>c.</b> .
Ld330228	.TT	AC		.T	<b>T</b> A		.AA.	TA.AC		<b>c</b>
Ld686000	.TT	AC	G.T.	.T	<b>T</b> A	<b></b>	.AA.	TA.AC	•••••	<b>C</b>

Ld330222	.TTA.		G. <b>T</b> .	. <b>T</b>	<b>T</b> A	• • • • • • • • • •		TA.AC.	CC.	•
Ld330237	.TTA.		G.T.	.т	<b>T</b> A	• • • • • • • • • • •		TA.AC.	cc.	
Ld465810	.TTA.		G. <b>T</b> .	.т	<b>T</b> A	• • • • • • • • • •		TA.AC.	cc.	
Ls593971	.TTA.		G. <b>T</b> .	.т	<b>T</b> A	• • • • • • • • • •		TA.AC.	cc.	
Li330238	.TT		G.T.	.т	<b>T</b> A	• • • • • • • • • • •		TA.AC.		
Li465809	.TT		G.T.	.т	<b>T</b> A	• • • • • • • • • • •		TA.AC.		
Li588410	.TT		G.T.	. <b>T</b>	<b>T</b> A	• • • • • • • • • •		TA.AC.		
LI01	.TT		G.T.	.c	<b>T</b> A	• • • • • • • • • • •		TTA.AC.	• • • • • • • • • • • • • • •	т
LI02	.TT		G.T.	.c	<b>T</b> A	• • • • • • • • • •		TTA.AC.		т
LI03	.TT		G.T.	.c	<b>T</b> A	• • • • • • • • • •		TTA.AC.		т
LIO4	.TT		G.T.	.c	<b>T</b> A	• • • • • • • • • •		TTA.AC.		т
Lm686003	.TT		G.T.	.c	<b>T</b> A	• • • • • • • • • •		TTA.AC.		т
Lm115065	.TT		G.T.	.c	<b>T</b> A	• • • • • • • • • •		TTA.AC.	• • • • • • • • • • • • •	т
Lm492798	.TT		G.T.	.c	<b>T</b> A	• • • • • • • • • •		TTA.AC.		т
Lm938189	.TT		G.T.	.c	<b>T</b> A	• • • • • • • • • •		TTA.AC.		т
P£061647	.TTCT.		.AG.T.	. <b>T</b> G		c.		<b>T</b> A.A		
Pf330227	.TTCT.		.AG.T.	. <b>T</b> G		c.		<b>T</b> A.A		
Pp256331	.TT	G	G.T.	. <b>T</b> G	<b>T</b>	c.	AA	<b>T</b> A.A	•••••	•
	310	320	330	340	350	360	370	380	390 4	00
					.	.	.			
C1672853	TGTAGCTGAAGGACC	CACAAATTTTACG	CGA <mark>T</mark> GCAGC	GAAAA <mark>CAT</mark> GT(	GGTCCTTTAC	AAACAGCAC	TAGACTTATGG	AAAGACATTAC	ATTTAACTATAC	т

C1672853	TGTAGCTGAAGGACCACAAATTTTACGCGATGCAGCGAAAACATGTGGTCCTTTACAAACAGCACTAGACTTATGGAAAGACATTACATTTAACTATACT
Cc330225	A
LA01	TAC
LA02	TAC
LA03	TAC
LA04	TAC
LA05	TAC
LA06	TAC
LA07	TAC
LA08	TAC
LA09	TAC
La810351	TAC
Lc492776	TA
Lc492781	TA
Lc492779	TA
LD01	TAC

LD02	TAC
LD03	T. AC
LD04	TAC
LD05	T. AC
Ld330228	T. AC
Ld686000	TAC
Ld330222	TAC
Ld330237	TAC
Ld465810	TAC
Ls593971	TAC
Li330238	TAC
Li465809	TAC
Li588410	TAC
LI01	CT
LI02	CT
LI03	CTYGCAACGYGCC.
LIO4	CT
Lm686003	CT
Lm115065	CT
Lm492798	CT
Lm938189	CT
Pf061647	G. A
Pf330227	G. A
Pp256331	ATT
-	
	410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
C1672853	TCTACAGATACAGCTGACTTTGTAGAAACTCCGACAGCAAATGTTTAA
Cc330225	
LA01	CCAAWATCAAATAAATTATAAACATTAATATATTATAT
LA02	
LA03	CC
LA04	CC
LA05	CCAATATCAAATAAAT
LA06	CCAATATCAAATAAAT
LA07	CC
LA08	CCAATATCAAATAAAT

С		А	T	ΑΨ <u>C</u> ΑΑΑ <u>C</u> ΑΑΑΨCΑΨΑΑΑCΑΨΨΑΑΨΨΑΨΨΨ <mark>C</mark> GGΨGΨΑΑCΨΨΨ
		A	т	ATCAAACAAATCATAAACATTAATTATATTTCGGTGTAACTTT
С		A	π	ΑΤCAAACAAATCATAAACATTAATTATATTCGGTGTAACTTT
		A	т	ATCAAACAAATCATAAACATTAATTATATTTCGGTGTAACTTT
С		A	<b>T</b>	ATCAAACAAATCATAAACATTAATTATATTTCGGTGTAACTTT
С		A	<b>T</b>	
C		A.	T	
C		A	<b>T</b>	
C		A.	<b>T</b>	
C		A	т	
C		A	<b>T</b>	
		A.	т	
		A	т	
		A	<b>T</b>	
		A	т	ATCAAACAAATCATAAACATTCATTATATTTCAATGTTAATTT
		A	т	ATCAAACAAATCATAAACATTCATTATATTTCAATGTTAATTT
		A	<b>T</b>	ATCAAACAAATCATAAACATTCATTATATTTCAATGTTAATTT
		A	т	ATCAAACAAATCATAAACATTCATTATATTTCAATGTTAATTT
<b>T</b>		c	т	
<b>T</b>		A	т	
<b>T</b>		A	т	
•••••		A	т	ATCAAATAGATTGTATACATTCATAATCTTTTAGTGTCAATTT
•••••		A	<b>T</b>	
G		A	<b>T</b>	
510	520	530	540	550
				····

LA03	GTAAGATATCATTAAAAAGCCCCTTAACTAAGATTAATCATTAATAAGGAGTATAGATAA
LA04	GTAAGATATCATTAAAAAGCCCCTTAACTAAGATTAATCATTAATAAGGAGTATAGATAA
LA05	GTAAGATATCATTAAAAAGCCCCTTAACTAAGATTAATCATTAATAAGGAGTATAGATAA
LA06	GTAAGATATCATTAAAAAGCCCCTTAACTAAGATTAATCATTAATAAGGAGTATAGATAA
LA07	GTAAGATATCATTAAAAAGCCCCTTAACTAAGATTAATCATTAATAAGGAGTATAGATAA
LA08	GTAAGATATCATTAAAAAGCCCCTTAACTAAGATTAATCATTAATAAGGAGTATAGATAA
LA09	GTAAGATATCATTAAAAAGCCCCTTAACTAAGATTAATCATTAATAAGGAGTATAGATAA
La810351	
Lc492776	
Lc492781	
Lc492779	
LD01	GTAAGATAGCATTAGAAACTCTTAACTAAGATTAATTATTAATAAGGAGTATAGATAA
LD02	GTAAGATAGCATTAGAAACTCTTAACTAAGATTAATTATTAATAAGGAGTATAGATAA
LD03	GTAAGATAGCATTAGAAACTCTTAACTAAGATTAATTATTAATAAGGAGTATAGATAA
LD04	GTAAGATAGCATTAGAAACTCTTAACTAAGATTAATTATTAATAAGGAGTATAGATAA
LD05	GTAAGATAGCATTAGAAACTCTTAACTAAGATTAATTAAT
Ld330228	
Ld686000	
Ld330222	
Ld330237	
Ld465810	
Ls593971	
Li330238	
Li465809	
Li588410	
LI01	GTAAAATCACATTAGAAATTCTTAAACAAGATTAATCATTAATAAGGAGTATAGATAA
LI02	GTAAAATCACATTAGAAATTCTTAAACAAGATTAATCATTAATAAGGAGTATAGATAA
LI03	GTAAAATCACATTAGAAATTCTTAAACAAGATTAATCATTAATAAGGAGTATAGATAA
LIO4	GTAAAATCACATTAGAAATTCTTAAACAAGATTAATCATTAATAAGGAGTATAGATAA
Lm686003	
Lm115065	
Lm492798	
Lm938189	
Pf061647	AATTCTTGACTAAGATTAATTATTAATAAGGAGTATAGATAG
Pf330227	
Pp256331	

Espectros de IV das substância isoladas no presente trabalho.



Espectro de IV da substância 1



Espectro de IV da substância 2



Espectro de IV da substância 3



Espectro de IV da substância 4



Espectro de IV da substância **5** 



Espectro de IV da substância 6



Espectro de IV da substância 7



Espectro de IV da substância 8



Espectro de IV da substância 9



Espectro de IV da substância 10



Detalhes do espectro de IV da substância 10



Espectro de IV da substância 11



Detalhes do espectro de IV da substância 11



Espectro de IV da substância 12



Espectro de IV da substância 13



Espectro de IV da substância 14



Espectro de IV da substância 15



Espectro de IV da substância 16

#### Artigo publicado 1



sophisticated structures, marine organisms are considered good candidates to provide new drugs with pharmaceutical activities, including chemicals to parasitic diseases (Torres et al., 2014). It is well established that marine and freshwater synthetize important metabolites with economic impact (Cardozo et al., 2006; Gressler et al., 2011a,b; Stein et al., 2011; Andreguetti et al., 2013; Machado et al., 2014; Simas-Rodrigues et al., 2015, such as low-weight hydrocarbons, tannins, fatty acids, acetogenins, saponins, phenolic compounds, lignans, alkaloids and terpenoids (Crews et al., 1978; González et al., 1982; Laus, 2001; Li et al., 2011). Specifically, the last five classes cited have been described for their anthelmintic properties.

In this paper, we show the efficacies of 13 macroalgae extracts against S. mansonl. The active extracts from the GracIlarla, Dictyota and Laurencia genera were analyzed by LC-MS, and possible candidates are proposed.

Corresponding author.
E-mail: andreguetti@usp.br (D.X. Andreguetti).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.09.005 0102-695X/© 2015 Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

widely spread in Africa and Latin America. The infection occurs

when the host's skin is penetrated by the cercaria, the infectious form of the parasite life cycle. Once inside the host they transform

into schistosomula, mature and form couples in the venous system, The egg is responsible for parasite transmission and is also the main cause of the disease symptoms (Gryssels et al., 2006).

The disease affects approximately 240 million people around

the world, resulting in an annual mortality rate of 280 000 people, Disease treatment is based on two therapeutic drugs; praziquan-

tel and oxamniquine (WHO, 2015). Praziguantel is ineffective

Please cite this article in press as: Stein, E.M., et al, Antischistosomal activity from Brazilian marine algae. Revista Brasileira de Farmacognosia (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.09.005

#### Artigo publicado 2

J Appl Phycol DOI 10.1007/s10811-015-0757-4

### Preparation of silver nanoparticles using aqueous extracts of the red algae *Laurencia aldingensis* and *Laurenciella* sp. and their cytotoxic activities

Adriana Pires Vieira<sup>1</sup> • Erika Mattos Stein<sup>2</sup> • Daniel Xavier Andreguetti<sup>2</sup> • Pio Colepicolo<sup>3</sup> • Ana Maria da Costa Ferreira<sup>1</sup>

Received: 5 August 2015 / Revised and accepted: 10 November 2015 © Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract This paper describes the preparation of silver nanoparticles (AgNPs) through an environmentally friendly route, using a disposable aqueous extract of seaweed as a reducing agent. The seaweeds used were Laurencia aldingensis and Laurenciella sp., and the AgNPs obtained from both algae were characterized by UV-vis spectroscopy, energydispersive X-ray (EDX), X-ray diffraction (XRD), highresolution transmission electron microscopy (HRTEM), and zeta potential measurements. Furthermore, cell viability assays were carried out to assess the cytotoxicity of these AgNPs on the P4 human foreskin fibroblast cell line, as well as on human uterine sarcoma (MES-SA) and the corresponding doxorubicin-resistant mutant MES-SA/Dx5 cells. High toxicity was observed in both of the tested cancer cell lines with very similar half maximal inhibitory concentration (ICso) values (1- to 4 µM range); however, no toxicity was observed in the P4 cells. The alternative synthetic method proposed in this work allows the use of renewable and disposable algae extracts, which leads to the preparation of AgNP with remarkable cytotoxicity against sarcoma tumor cells.

Adriana Pires Vieira apiresvieira@gmail.com

<sup>1</sup> Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lincu Prestes 748, São Paulo, SP 05508-000, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, São Paulo, SP, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, São Paulo, SP, Brazil

Published online: 18 November 2015

Keywords Silvernanoparticles · Green synthesis · Algae · Rhodophyta · Cytotoxic

Currently, possible environmental damage from technological products and procedures is an important issue for society, with concems regarding effects on living organisms. Therefore, impressive efforts have been made to develop alternative methods to technological processes with the aim of reducing environmental impacts and promote sustainability. In this context, the development of synthetic methods using renewable raw materials and avoiding the use of toxic solvents and high temperatures is required.

The syntheses of metal nanoparticles are generally performed by physical and chemical processes demanding high costs and with significant toxicity (Austin et al. 2015; Rodríguez-Sánchez et al. 2000; Tsuji et al. 2007; Caia et al. 2004). As an altemative, new routes have been developed, employing renewable feedstock, such as plant extracts (Akhtar et al. 2013; Gopinatha et al. 2012), bacteria (Saifuddin et al. 2009; Sintubin et al. 2009), fungi (Balaji et al. 2011), enzymes (Schneidewind et al. 2012), and algae (Asmathunisha and Kathiresan 2013; Sahayaa et al. 2012), which are able to produce metal nanoparticles with high efficiency, low cost, and without further impairment to the environment.

Metallic nanoparticles have important applications in the field of medicine (Schröfel et al 2014). In particular, silver nanoparticles (AgNPs) show strong bactericidal properties (Cho et al. 2005; Kim et al. 2007; Shrivastava et al. 2007), as well as anticancer activities (Ramar et al. 2015a, b; Kathiravan et al. 2014; Venkatesan et al. 2014). The high pharmacological potential of these AgNPs motivated the

🕗 Springer

Introduction

CrossMark