

JULYANA DA NÓBREGA FARIAS

**Taxonomia, perfil químico e potencial biológico  
no complexo *Laurencia* (Ceramiales,  
Rhodophyta) do litoral da Paraíba e  
Pernambuco, Brasil**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da  
Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do título de  
DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL  
E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração  
de Plantas Avasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2015

JULYANA DA NÓBREGA FARIAS

**Taxonomia, perfil químico e potencial biológico  
no complexo *Laurencia* (Ceramiales,  
Rhodophyta) do litoral da Paraíba e  
Pernambuco, Brasil**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da  
Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do título de  
DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL  
E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração  
de Plantas Avasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. MUTUE TOYOTA FUJII

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Farias, Julyana da Nóbrega

F224t Taxonomia, perfil químico e potencial biológico no complexo *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) do litoral da Paraíba e Pernambuco, Brasil / Julyana da Nóbrega Farias -- São Paulo, 2015.

123p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2015

Bibliografia.

1. Complexo *Laurencia*. 2. Terpenos. 3. Ácidos graxos. I. Título

CDU: 582.26

Aos Meus pais, José e Zenilde Farias  
por todo amor e apoio, dedico.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

*Madre Teresa de Calcutá*

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Dra. Mutue Toyota Fujii, pela amizade, todo conhecimento transmitido e apoio em todas as etapas do projeto, desde o corajoso aceite até as correções finais;

À Dra Luciana Retz de Carvalho, minha profunda gratidão pela forma carinhosa que me ensina química e honrosa amizade construída ao longo do desenvolvimento desse projeto;

Ao Dr Pio Colepicolo do Instituto de Química da USP pela amizade e grande disponibilidade da estrutura de seu laboratório, essencial para esse trabalho. Estendo a todos os integrantes do laboratório, em especial a Msc Leonardo Villela pela disponibilidade e ajuda vital no uso dos equipamentos;

Ao Dr Cláudio Martins Pereira de Pereira e Dra Elizandra Braganhol da Universidade Federal de Pelotas por ter me recebido em seu laboratório, possibilitando os testes de atividades biológicas. Agradeço profundamente a todos os integrantes do laboratório, em especial a Rosiane Mastelari, Priscila Souza, Carlus Couto, Marco Ziemann que trabalharam diretamente no projeto;

À Dra Nair Sumie Yokoya pela amizade e ensinamentos;

A Bruno Alves pelo auxílio na estatística, edição de imagens e editoração final;

A Thiago Reis e Patrícia Guimarães, Watson Gama e Pablo Riul pelo auxílio em coletas e nos momentos de dúvidas;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente e todos os integrantes do Núcleo de Pesquisas em Ficologia do Instituto de Botânica, pesquisadores, alunos e funcionários, grandes amigos;

A todos os amigos espalhados pelo Brasil, importantíssimos nas horas de descanso e motivação;

A CAPES pela bolsa concedida e posterior complementação dentro do projeto “Biotecnologia de macroalgas e cianobactérias marinhas: bioprospecção e desenvolvimento de processos para a produção sustentável de biomassa e bioativos”, do programa Ciências do Mar Ciências do Mar II nº 43/2013;

À minha família, principalmente meus pais José Farias e Zenailde e irmãos Sérgio e Polyana pelo apoio incondicional desde a dissertação de mestrado até a tese, contabilizando muitas horas difíceis devido a distância física e a quem dedico esse trabalho;

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

## Índice

### Resumo

### Abstract

<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>3</b>
<b>Material e métodos</b> .....	<b>4</b>
<b>Referências</b> .....	<b>5</b>
<b>Capítulo 1: Potencial biotecnológico das espécies do complexo <i>Laurencia</i></b>	<b>9</b>
(Ceramiales, Rhodophyta) nos estados da Paraíba e Pernambuco	
Introdução .....	<b>10</b>
Material e métodos .....	<b>12</b>
Resultados e Discussão .....	<b>12</b>
Referências .....	<b>31</b>
<b>Capítulo 2: Triterpenos produzidos pelas espécies do complexo <i>Laurencia</i></b>	<b>38</b>
(Ceramiales, Rhodophyta), distribuição geográfica e atividade biológica	
Introdução .....	<b>39</b>
Diversidade química.....	<b>39</b>
Distribuição geográfica .....	<b>51</b>
Referências .....	<b>53</b>
<b>Capítulo 3: Isolamento e caracterização dos metabolitos de interesse em <i>Palisada</i></b>	<b>58</b>
<i>furcata</i> (Ceramiales, Rhodophyta)	
Introdução .....	<b>59</b>
Material e métodos .....	<b>61</b>
Resultados e Discussão .....	<b>64</b>
Referências .....	<b>79</b>

<b>Capítulo 4:</b> Avaliação das atividades microbiana e antitumoral dos ácidos graxos em três espécies de <i>Palisada</i> (Ceramiales, Rhodophyta) de ambiente tropical brasileiro	<b>83</b>
Introdução -----	<b>84</b>
Material e métodos -----	<b>85</b>
Resultados e Discussão -----	<b>90</b>
Referências -----	<b>99</b>
<b>Capítulo 5:</b> Primeiro registro de monoterpene para o complexo <i>Laurencia</i> (Ceramiales, Rhodophyta) identificado em compostos voláteis de <i>Laurencia translucida</i> , espécie endêmica do litoral brasileiro	<b>104</b>
Introdução -----	<b>105</b>
Material e métodos -----	<b>106</b>
Resultados e Discussão -----	<b>107</b>
Referências -----	<b>116</b>
<b>Considerações finais</b>	<b>122</b>
<b>Anexo:</b> Carvalho, L.R., Farias, J.N., Riul, P., Fujii, M.T. An overview of global distribution of the diterpenes synthesized by the red algae <i>Laurencia</i> Complex (Ceramiales, Rhodomelaceae). <i>In: Marine algae extracts: Processes, products, and applications.</i> First Edition. S.-K. Kim and K. Chojnacka (eds.). Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGa	<b>124</b>



## Resumo

O complexo *Laurencia* abrange seis gêneros: *Laurencia s.s.*, *Osmundea*, *Chondrophycus*, *Palisada*, *Yuzurua* e *Laurenciella* e suas espécies estão entre as mais estudadas do ponto de vista químico, devido à grande diversidade de metabolitos produzidos. Essas algas apresentam notável diversidade morfológica e produzem um dos mais interessantes e numerosos conjunto de terpenos. A tese é composta por cinco capítulos, visando analisar o potencial das espécies do complexo *Laurencia* no litoral da PB e PE e selecionar as espécies para o desenvolvimento do estudo de seus metabolitos, conhecer os diterpenos e triterpenos produzidos pelas espécies do complexo *Laurencia*, identificar possíveis terpenos em *Palisada furcata* e isolar as frações dos seus extratos para avaliação de atividade antitumoral, identificar os ácidos graxos das espécies de *Palisada* e avaliar o seu desempenho frente às atividades antimicrobiana e antitumoral e identificar os compostos voláteis de *Laurencia translucida*. Foram coletadas cinco espécies do complexo *Laurencia*: *L. dendroidea*, *L. translucida*, *Palisada flagellifera*, *P. furcata* e *P. perforata*. Foram identificados 18 ácidos graxos nas espécies de *Palisada*. Nos testes de atividade antimicrobiana, a espécie com maior espectro de atividade frente aos patógenos testados foi *P. perforata*, seguida por *P. flagellifera*. Empregando o método do MTT, *P. furcata* apresentou melhor atividade frente às células de glioblastoma em ratos. As três frações de ácidos graxos isoladas dessa espécie apresentaram até 70% de inibição de crescimento das células tumorais, indicando alto potencial farmacológico dessa espécie. Foram também identificados três monoterpenos como compostos voláteis em *L. translucida*, representando o primeiro registro dessas moléculas no complexo *Laurencia*. A distribuição das espécies produtoras de diterpenos e triterpenos é disjunta, ocorrendo quase que totalmente no hemisfério norte, o que sugere evolução independente na produção dessas moléculas dentro do complexo.

Palavras-chave: Complexo *Laurencia*, Monoterpeno, Diterpeno, Triterpeno, Ácidos graxos, Antimicrobianos, Antitumoral

## Abstract

The *Laurencia* complex that occur in Paraíba and Pernambuco, Brazil. This complex includes six genera: *Laurencia* ss, *Osmundea*, *Chondrophyucus*, *Palisada*, *Yuzurua* and *Laurenciella* and their species have been one of the most studied from the chemical point of view, due to the great diversity of metabolites produced. These algae have remarkable morphological diversity and produce one of the most interesting and numerous sets of terpenes. This thesis was developed in five chapters in order to analyze the potential of *Laurencia* complex species on the coast of Paraíba and Pernambuco and select the species to develop the study of metabolites; to know diterpenes and triterpenes produced by the complex *Laurencia*; identify possible terpenes in *Palisada furcata*, isolate *Palisada furcata* extract fractions for evaluation of antitumor activity; to identify the fatty acids of the species of *Palisada* and assess their performance against the antimicrobial and antitumoral activities. Five species were collected from the complex *Laurencia*: *L. dendroidea*, *L. translucent*, *Palisada flagellifera*, *P. furcata* and *P. perforata*. Eighteen fatty acids were identified in species *Palisada*. Also, the best result of the antimicrobial activity with the greatest spectrum of activity against the tested pathogens was *P. perforata*, followed by *P. flagellifera*. On the other hand, using the MTT method, *P. furcata* showed better activity against glioblastoma cells into the mice, a common and very aggressive brain tumor. The three fractions isolated counting fatty acids showed up to 70% inhibition of tumor cell growth, indicating high pharmacological potential of these species. Three monoterpenes were also identified as constituents of volatile substances in *L. translucent*, representing the first record of these molecules in the *Laurencia* complex. The distribution of species that produce diterpenes and triterpenes is disjunct, occurring almost entirely in the northern hemisphere, which suggests independent evolution in the production of these molecules within the complex.

Keywords: *Laurencia* complex, Monoterpene, Diterpene, Triterpene, Fatty acid, Antimicrobial, Antitumor

## Introdução

A busca por determinados produtos naturais marcou épocas na história da humanidade: as moléculas picantes, aromáticas e conservantes das especiarias redundaram em grandes descobrimentos; a morfina, isolada em 1804, juntamente com seus derivados, é utilizada até os dias atuais no controle da dor. A penicilina continua sendo um dos antibióticos mais empregados.

As necessidades da humanidade se modificam no decorrer do tempo. Entre os desafios atuais estão a cura do câncer e das doenças neurodegenerativas, como o mal de Alzheimer.

O ambiente marinho vem sendo reconhecido como um tesouro de produtos bioativos a serem encontrados (Teixeira 2002, Fujii *et al.* 2011), uma vez que sua diversidade é tão vasta quanto desconhecida. De fato, novas moléculas promissoras para áreas específicas estão continuamente sendo descritas e alavancando novas pesquisas (Cabrita *et al.* 2010).

A impressionante biodiversidade marinha ocupa nichos bastante distintos, determinados por fatores abióticos como hidrodinamismo, temperatura, sedimento e também, fatores bióticos como a competição inter- e intra-específica, o que determina a produção de diferentes metabolitos que podem ser usados como marcadores quimiotaxonômicos, principalmente em macroalgas (Gottlieb 1990, Fernandes *et al.* 2014, Keith *et al.* 2014).

Dentre os organismos marinhos alvo da bioprospecção, destacam-se esponjas, briozoários, corais e macroalgas marinhas, principalmente as vermelhas e pardas (Blunt *et al.* 2009, Blunt *et al.* 2011). O metabolito primário, igualmente ao secundário, também mostra potencial de aplicação. Dentre eles, os ficocolóides – agar, carragena e alginato são os mais explorados. Entretanto, pesquisas em biotecnologia ficológica tem buscado principalmente metabolitos secundários (Bixler & Porse 2011).

Mesmo com os resultados das pesquisas revelando o potencial dos produtos naturais marinhos (Cardozo *et al.* 2007, Mohamed *et al.* 2012), existe um importante fator limitante: a escassez de biomassa, tanto a baixa quantidade das substâncias no organismo, quanto a do próprio organismo (Pereira & Costa-Lotufo 2012). As macroalgas aparecem, portanto, como organismos promissores, uma vez que apresentam a vantagem de serem cultiváveis.

O complexo *Laurencia* (Rhodophyta) é um típico exemplo de organismos capazes de se desenvolver em ampla variedade de ambientes e, por isso, produzir expressiva variedade de substâncias diferentes. Essas espécies são encontradas desde as regiões temperadas a tropicais, sendo capazes de crescerem em muitos ambientes: desde a faixa inferior da zona entremarés até o infralitoral, tanto em costões rochosos como em ambientes recifais, de locais protegidos ou expostos, fixas diretamente ao substrato ou epifitando outras algas, em poças de maré ou compondo as comunidades de "turf" (Fujii & Senties 2005). Essas espécies podem sintetizar diferentes classes de substâncias, tais como terpenos (sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos), halogenados ou não e acetogeninas, a maioria com esqueleto carbônico exclusivo (Pereira & Teixeira 1999). Mais recentemente, Fujii *et al.* (2011) apresentaram um panorama do conhecimento sobre a taxonomia, os principais metabolitos secundários e suas atividades biológicas relacionadas à saúde humana, a partir das espécies do complexo *Laurencia* conhecidas para o Brasil.

O complexo *Laurencia* é considerado fonte de interessantes metabolitos secundários, que de acordo com sua natureza podem ser sesqui-, di- ou triterpenos ou ainda, acetogeninas, os quais, por sua vez, podem ser halogenados, ou não. Estes metabolitos formam um dos maiores e mais diversos grupos de terpenos, formados por 205 sesquiterpenos (Al-Massarani, 2014), 101 diterpenos (Carvalho *et al.*, 2015) e 39 triterpenos (Capítulo 3).

A utilização do termo complexo *Laurencia* é justificada pela grande plasticidade fenotípica de suas espécies e dificuldade taxonômica na delimitação dessas espécies. O complexo *Laurencia*, atualmente, compreende seis gêneros: *Laurencia sensu stricto*,

*Osmundea* Stackhouse (Nam *et al.* 1994), *Chondrophyucus* (Tokida & Saito) Garbary & J. Harper (1998), (Nam 1999), *Palisada* (Yamada) K.W. Nam (2006, 2007), *Yuzurua* Martin-Lescanne (Martin-Lescanne *et al.* 2010) e *Laurenciella* Cassano, Gil-Rodríguez, Senties, Díaz-Larrea, Oliveira & M.T. Fujii (2012), totalizando 194 espécies (Guiry & Guiry 2015). A história da taxonomia do complexo *Laurencia* é marcada por profundas mudanças nomenclaturais; desde a proposta inicial, muitas espécies foram incluídas e muitas outras transferidas para gêneros reestabelecidos ou novamente propostos (Fujii & Senties 2005).

O presente trabalho tem como objetivo principal realizar o levantamento das espécies do complexo *Laurencia* que ocorrem no litoral dos estados da Paraíba e Pernambuco, avaliando o potencial biotecnológico e os resultados são apresentados em cinco capítulos.

## Objetivos

- Realizar o levantamento das espécies do complexo *Laurencia* no litoral da Paraíba e Pernambuco e selecionar àquelas para a caracterização do perfil químico e potencial biológico (Capítulo 1).
- Levantamento dos triterpenos produzidos pelas espécies do complexo *Laurencia* (Capítulo 2).
- Obter o perfil químico de *Palisada furcata* e isolar compostos para avaliação de atividade antitumoral (Capítulo 3).
- Identificar os ácidos graxos de *Palisada flagellifera*, *P. furcata* e *P. perforata* e avaliar o desempenho frente às atividades microbiana e tumoral (Capítulo 4).
- Identificar os compostos voláteis de *Laurencia translucida* (Capítulo 5).

## Material e métodos

### Área de estudo

Os estados da Paraíba e Pernambuco estão localizados na região nordeste do Brasil, caracterizada por clima tropical quente e úmido do tipo As', com temperaturas médias anuais de 24 a 27°C e umidade relativa do ar de 80% (Andrade & Lins 1971, Carvalho 1982). O litoral da Paraíba e de Pernambuco possuem extensão de 138 km e 187 km, respectivamente, inseridos na zona tropical, com águas oligotróficas, abundância de substratos duros, propícios ao crescimento de macroalgas bentônicas. Nessa região, as macroalgas desenvolvem-se principalmente sobre os recifes de arenito incrustados por algas calcárias e corais (Horta *et al.* 2001).

As condições ambientais da região, bem como a diversidade de microhabitats favorecem o desenvolvimento das espécies do complexo *Laurencia* (Fujii & Senties 2015). Todavia, ainda há carência de conhecimento sobre o potencial biotecnológico das espécies do complexo que ocorrem nos estados da Paraíba e Pernambuco.

### Coleta de material

As coletas foram realizadas manualmente, na região entremarés e no infralitoral raso, durante as marés baixas, nos estados da Paraíba e Pernambuco. Logo após a coleta, o material foi limpo para remoção de organismos epibióticos e transportados para o laboratório. A quantidade de material, bem como os procedimentos utilizados em cada experimento estão especificados em cada capítulo. Cada experimento foi realizado com espécimes de uma única coleta, para não misturar material de praias ou épocas diferentes.

## Referências

- Al-Massarani, S.M. 2014. Phytochemical and biological properties of sesquiterpene constituents from the marine red seaweed *Laurencia*: A review. *Natural Products Chemistry & Research* 2(5).
- Andrade, G.O., Lins, R.C. 1971. *Os climas do Nordeste*. In: S. Vasconcelos (ed.) As regiões naturais do Nordeste, o meio e a civilização. Recife. CONAPE. 95-138p.
- Bixler, H.J., Porse, H. 2011. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *Journal of Applied Phycology* 23(3): 321-335
- Blunt, J.W., Copp, B.R. Hu, W.P., Munro, M.H.G. Northcotec, P.T. and Prinsepd, M.R. 2011. Marine natural products. *Natural Products Report* 26: 170-244.
- Blunt, J.W., Copp, B.R. Hu, W.P., Munro, M.H.G. Northcotec, P.T. and Prinsepd, M.R. 2009. Marine natural products. *Natural Products Report* 28: 196-268.
- Cabrita, M.T., Vale, Carlos, Rauter, A.P. 2010. Halogenated Compounds from Marine Algae. *Marine Drugs* 8(8): 2301-2317.
- Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P., Pinto, E. 2007. Metabolites from algae with economic impact. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146: 60-78.
- Carvalho, L.R., Farias, J.N., Riul, P., Fujii, M.T. An overview of global distribution of the diterpenes synthesized by the red algae *Laurencia* Complex (Ceramiales, Rhodomelaceae). In: Marine algae extracts: Processes, products, and applications. First Edition. S.-K. Kim and K. Chojnacka (eds.). Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGa
- Carvalho, M.G.R.F. 1982. Estado da Paraíba: classificação geomorfológica. Editora Universitária/UFPB. João Pessoa. 72pp
- Cassano, V., Oliveira, M.C., Gil-Rodríguez, M.C., Sentfés, 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(4): 349-357

- Fernandes, D.R.P., Oliveira, V.P., Valentin, Y.Y. 2014. Seaweed biotechnology in Brazil: six decades of studies on natural products and their antibiotic and other biological activities. *Journal of Applied Phycology* 26(5): 1923-19-37
- Fujii, M. T. e Senties, G. A. 2005. *Taxonomia do complexo Laurencia (Ceramiales, Rhodophyta) do Brasil, com ênfase nas espécies dos estados de São Paulo e do Espírito Santo*. In: Monografias Ficológicas. Senties, A. G. e Dreckman, K. (eds.). Mexico UniversidadAutonoma Metropolitana. Vol.2, 69-135p.
- 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. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21(2): 268-282.
- Garbary, D.J., Harper, J.T. 1998. A phylogenetic analysis of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae) of the red algae. *Cryptogamie Algologie*, 19: 185-200.
- Gottlieb, O. 1990. Phytochemicals: differentiation and function. *Phytochemistry* 29(6): 1715-1724.
- Guiry, M.D. in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2015. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; (acesso em 16-01-de 2015).
- Horta, P.A., Amancio, E., Coimbra, C.S., Oliveira, E.C. 2001. Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. *Hoehnea* 28(3): 243-265.
- Keith, S.A., Kerswell, A.P., Connolly, S.R. 2014. Global diversity of marine macroalgae: environmental conditions explain less variation in the tropics. *Global Ecology and Biogeography* 23: 517–529



- Martin-Lescanne, J., Rousseau, F., De Reviere, B., Payri, C., Couloux, A., Cruaud, C. and Le Gall, L. 2010. Phylogenetic analyses of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae, Ceramiales) support recognition of five genera: *Chondrophycus*, *Laurencia*, *Osmundea*, *Palisada* and *Yuzuru* stat. nov. *European Journal of Phycology*, 45 (1), 51-61.
- Mohamed, S., Hashim, S.N., Rahman, H.A. 2012. Seaweeds: a sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science & Technology* 23: 83-96.
- Nam, K.W. 1999. Morphology of *Chondrophycus undulata* and *C. parvipapillata* and its implications for the taxonomy of the *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) complex. *European Journal of Phycology* 34: 455–468.
- Nam, K.W. 2006. Phylogenetic re-evaluation of the *Laurencia* complex (Rhodophyta) with a description of *L. succulenta* sp. nov. from Korea. *Journal of Applied Phycology* 18: 679–697.
- Nam, K.W. 2007. Validation of the Generic Name *Palisada* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Algae* 22 (2): 53–55.
- Nam, K.W., Maggs, C.A., Garbary, D.J. 1994. Resurrection of the genus *Osmundea* with an emendation of the generic delineation of *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). *Phycologia*, 33 (5), 384–395.
- Pereira, R.C. Teixeira, V.L. 1999. Sesquiterpenos das Algas Marinhas *Laurencia* Lamouroux (Ceramiales, Rhodophyta): Significado Ecológico. *Química Nova* 22(3): 369-374.
- Pereira, R.C., Costa-Lotufo, L.V. 2012. Bioprospecting for bioactives from seaweeds: potential, obstacles and alternatives. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22(4): 894-905.

Teixeira, V.L. 2002. *Produtos Naturais Marinhos*. In *Biologia Marinha*. R.C. Pereira & A. Soares-Gomes (Eds). Interciência, Rio de Janeiro, 249-279p.

# Capítulo 1

## Potencial biotecnológico das espécies do complexo *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) nos estados da Paraíba e Pernambuco

### Introdução

O uso de algas e seus produtos derivados sofreu um aumento substancial na indústria farmacêutica, cosmética, veterinária, nutracêutica, biomedicina, bioenergia, alimentos e indústrias agrícolas (Marinho-Soriano *et al.* 2012). No Brasil, pesquisas envolvendo biotecnologia de algas começaram a se desenvolver mais recentemente, há algumas décadas, após os trabalhos de taxonomia e de ecologia terem sido consolidados (Fernandes *et al.* 2014).

Dentro desse contexto, como fruto das pesquisas com algas na Paraíba, destacam-se o perfil de ácidos graxos em espécies de *Gracilaria* Greville (Rhodophyta) com enfoque quimiotaxonômico (Tomaz *et al.* 2012). Os testes realizados utilizando extratos de algas vermelhas, *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) M.A.Howe e verdes, *Caulerpa mexicana* Sonder ex Kützing e *C. sertularioides* (S.G.Gmelin) M.A.Howe mostraram atividade anti-inflamatória (Matta *et al.* 2011, Cavalcante-Silva *et al.* 2012), assim como extratos da alga parda *Dictyota pulchella* Hörnig & Schnetter apresentaram ações hipotensoras e de bradicardia (Queiroz *et al.* 2011).

Aliança *et al.* (2014) analisaram a atividade do extrato diclorometano/metanol de *Dictyota mertensii* (Martius) Kützing (Ochrophyta) coletada em Pernambuco e mostraram que essa espécie representa um agente promissor no tratamento da leishmaniose cutânea. Frente às larvas de *Aedes aegypti*, transmissor da dengue, extratos de quinze espécies de algas foram testados e apresentaram bons resultados, com destaque para a rodofíceia *Laurencia dendroidea*

J. Agardh e seu metabolito secundário majoritário, o elatol (Koishi *et al.* 2012, Bianco *et al.* 2013).

Dentre as macroalgas marinhas, as pardas e vermelhas são consideradas as mais promissoras para a bioprospecção, e entre as algas vermelhas destaca-se o complexo *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta), constituído por 194 espécies válidas dos 518 nomes atribuídos (Guiry & Guiry 2015), incluídos em seis gêneros: *Laurencia sensu stricto*, *Osmundea* Stackhouse (Nam *et al.* 1994), *Chondrophycus* (Takida & Saito) Garbary & J. Harper (1998), (Nam 1999), *Palisada* (Yamada) Nam (2006, 2007), *Yuzurua* Martin-Lescanne (Martin-Lescanne *et al.* 2010) e *Laurenciella* Cassano, Gil-Rodríguez, Sentfies, Díaz-Larrea, Oliveira & M.T. Fujii (2012) cujos constituintes químicos começaram a ser estudados na década de 50 (Obota & Fukushi 1953) e continuam a ser uma das principais fontes de metabolitos com potencial biotecnológico (Blunt *et al.* 2007), por possuírem alto potencial de obtenção de novos protótipos de fármacos a serem utilizados em diversas patologias (Machado *et al.* 2010).

No litoral da Paraíba e de Pernambuco foram referidas até o momento sete espécies do complexo *Laurencia*: *L. dendroidea*, *L. oliveirana* Yoneshigue, *L. translucida* Cordeiro-Marino & M.T. Fujii, *Palisada flagellifera* (J. Agardh) K.W. Nam, *P. perforata* (Bory) K.W. Nam, *P. furcata* (Cordeiro-Marino & M.T. Fujii) Cassano & M.T. Fujii e *Yuzurua poiteaui* (J.V. Lamouroux) Martin-Lescanne var. *gemmaifera* (Harvey) M.J. Wynne (Cocentino 1994, Pereira *et al.* 2002, Fujii *et al.* 2011).

A identificação correta dos táxons e o estabelecimento da posição filogenéticas constituem a base para a implementação do desenvolvimento biotecnológico. Assim sendo, o presente capítulo objetivou realizar o levantamento das espécies do complexo *Laurencia* no litoral da Paraíba e Pernambuco e selecionar àquelas para a caracterização do perfil químico e potencial biológico.

## Material e Métodos

O material para o presente estudo foi coletado em seis pontos ao longo do litoral da Paraíba e Pernambuco (tabela 1), na região entremarés e no infralitoral raso (até 1 m de profundidade). Parte do material foi fixada em solução de formol a 4% em água do mar para identificação taxonômica e confecção de exsiccatas, que foram depositadas no Herbário Maria Eneyda P. Kauffman Fidalgo (SP), do Instituto de Botânica, em São Paulo.

A análise das características diagnósticas das espécies foi realizada por meio de observações, sob microscopia de luz. Cortes histológicos foram feitos à mão livre, utilizando lâminas de aço e, em seguida, corados com o azul de anilina a 1%, acidificado com HCl 1 mol.L<sup>-1</sup>. A identificação foi baseada em literatura especializada (Fujii & Senties 2005, Fujii *et al.* 2011) e as imagens dos caracteres diagnósticos foram obtidas com câmera digital Panasonic DMC-FT3.

Paralelamente, foi realizado um minucioso levantamento bibliográfico em busca de substâncias e atividades metabólicas já descritas para as espécies-alvo na região de estudo.

## Resultados e Discussão

Foram identificadas cinco espécies para a área de estudo (tabela 1), de acordo com a chave de identificação apresentada abaixo.

Dentre as espécies do complexo *Laurencia* encontradas no litoral da Paraíba e Pernambuco, *L. dendroidea* tem sido alvo de vários estudos relacionado à caracterização dos metabolitos secundários e avaliação de atividades biológicas (Santos *et al.* 2010, Veiga-Santos *et al.* 2010, Fujii *et al.* 2011, Machado *et al.* 2011, Stein *et al.* 2011a, b, Campos *et al.* 2012, Soares *et al.* 2012, Bianco *et al.* 2013). Em vista disso, o presente trabalho concentrou esforços

nas investigações de caracterização química e potencial biológico nas espécies de *Palisada* e *Laurencia translucida*.

Tabela 1. Espécies do complexo *Laurencia* identificadas nos estados da Paraíba e Pernambuco no presente estudo.

Espécies	Paraíba			Pernambuco		
	Município/Praia			Município/Praia		
	Conde/ Carapibus	Conde/ Coqueirinho	Pitimbu/ Pitimbu	Ipojuca Toquinho	Cabo de Santo Agostinho/ Enseada dos Corais	Recife/ Boa viagem
<i>Laurencia</i> <i>L. dendroidea</i>	+	+	+	+	+	+
<i>L. translucida</i>	-	+	-	+	-	+
<i>Palisada</i> <i>P. furcata</i>	+	+	-	+	+	+
<i>P. flagellifera</i>	+	+	-	+	+	+
<i>P. perforata</i>	+	+	+	+	+	+

+ indica presença da espécie no ponto de coleta; - indica ausência

## Chave de identificação das espécies coletadas

- 1a. Presença de células corticais externas translúcidas .....*Laurencia translucida*
- 1b. Ausência de células corticais externas translúcidas .....2
  
- 2a. Presença de quatro células pericentrais por segmento vegetativo .....*L. dendroidea*
- 2b. Presença de duas células pericentrais por segmento vegetativo .....3
  
- 3a. Células corticais externas com ligações secundárias .....*Palisada furcata*
- 3b. Células corticais externas sem ligações secundárias .....4
  
- 4a. Presença de râmulos de última ordem papiliformes .....*P. perforata*
- 4b. Ausência de râmulos de última ordem papiliformes .....*P. flagellifera*



## Aspectos taxonômicos das espécies identificadas

*Laurencia dendroidea* J. Agardh (1852)

LOCALIDADE TIPO: Brasil.

SINÔNIMO HOMOTÍPICO: *Laurencia obtusa* var. *dendroidea* (J. Agardh) Yamada (1931)

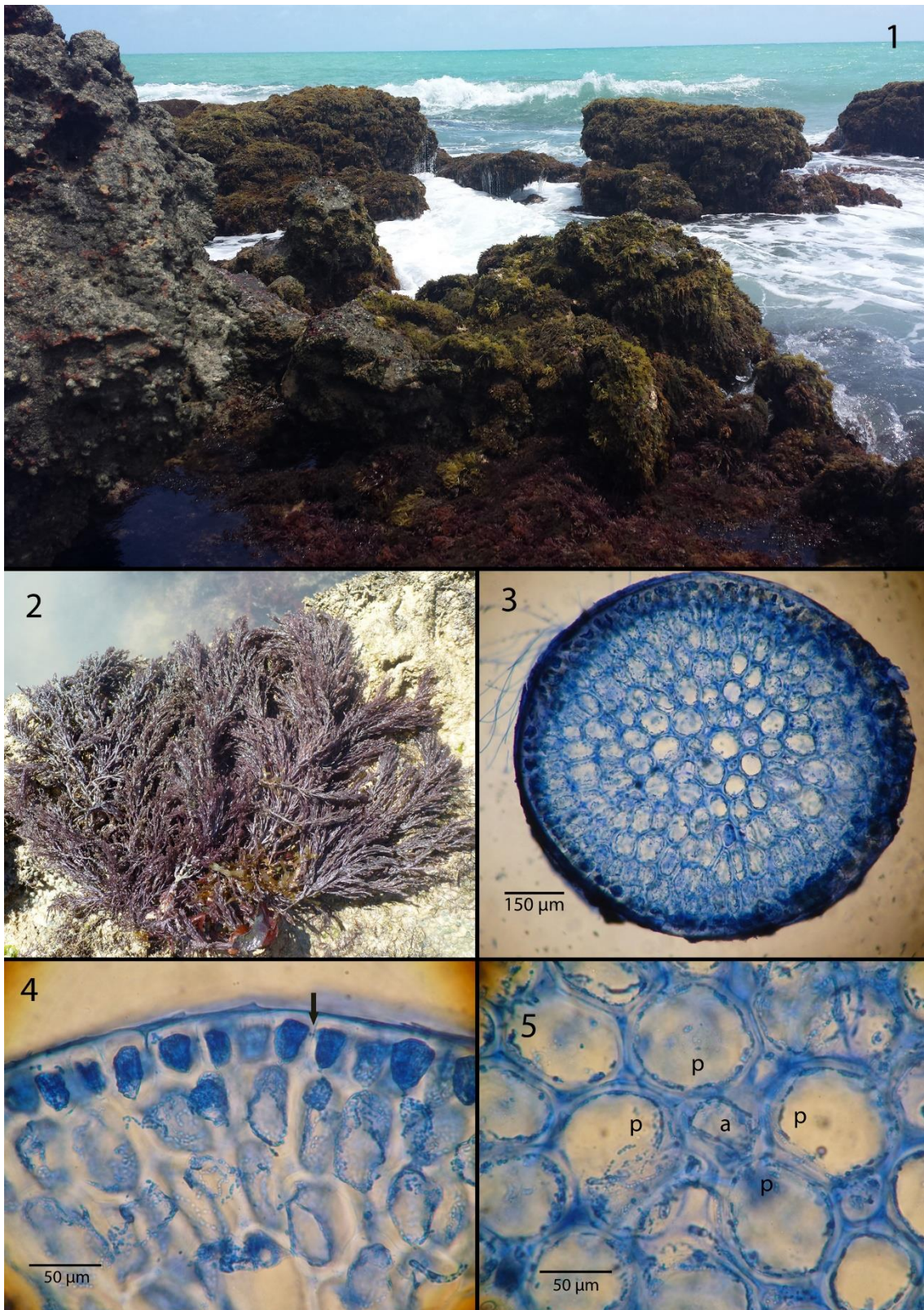
Figuras 1-5

Plantas de hábito ereto com até 20 cm de altura, coloração avermelhada escura a verde, formando tufos, fixas ao substrato por meio de apressório discoide. Talo cilíndrico 700-1250 µm de diâmetro na região mediana. Ramificação alterna-espiralada a irregular, densa desde a base até o ápice, ou apresentando porções mais espaçadas. Presença de *corps en cerise* em número de 2-3 em cada célula cortical externa e individualmente nos tricoblastos. Em secção transversal, células corticais arredondadas a longitudinalmente alongadas (27,5-42,5 x 37,5-50 µm), conectadas entre si por ligações secundárias. Uma camada de células corticais pigmentadas e 5 a 6 camadas de células medulares despigmentadas. Célula axial produz quatro células pericentraes. Tetrasporângios tetraédricos. Não foram observados talos gametofíticos.

Material examinado: Brasil, Paraíba, Município Conde, Praia de Coqueirinho, 12-03-2009, col. M.T. Fujii (SP400759). Praia de Carapibus, 11-03-2013, col. J.N. Farias & M.T. Fujii (SP468861). Pernambuco, Município de Cabo de Santo Agostinho, Enseada dos Corais, 26-10-2011, col. J.N. Farias & T. Reis (SP468883). Município de Serrambi, Praia do Toquinho, 17-09-2013, col. M.T. Fujii (SP468862).

Habitat: Essa espécie foi encontrada na zona entremarés dos recifes areníticos.

Distribuição geográfica no Brasil: Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Fujii & Cassano 2015)



Figuras 1-5. *Laurencia dendroidea*. 1. Aspecto geral da Praia de Coqueirinho, PB. 2. Aspecto geral da planta densamente ramificada. 3. Fotomicrografia da secção transversal do talo. 4. Detalhe das células corticais conectadas entre si por ligações secundárias (seta). 5. Célula axial (a) formando quatro células pericentrais (p).

*Laurencia translucida* M.T. Fujii et Cordeiro-Marino (1996)

LOCALIDADE TIPO: Espírito Santo, Brasil.

SINÔNIMO HOMOTÍPICO: *Chondrophyucus translucidus* (M.T.Fujii & M.Cordeiro-Marino)

D.J.Garbary & J.T.Harper (1998)

Figuras 6-10

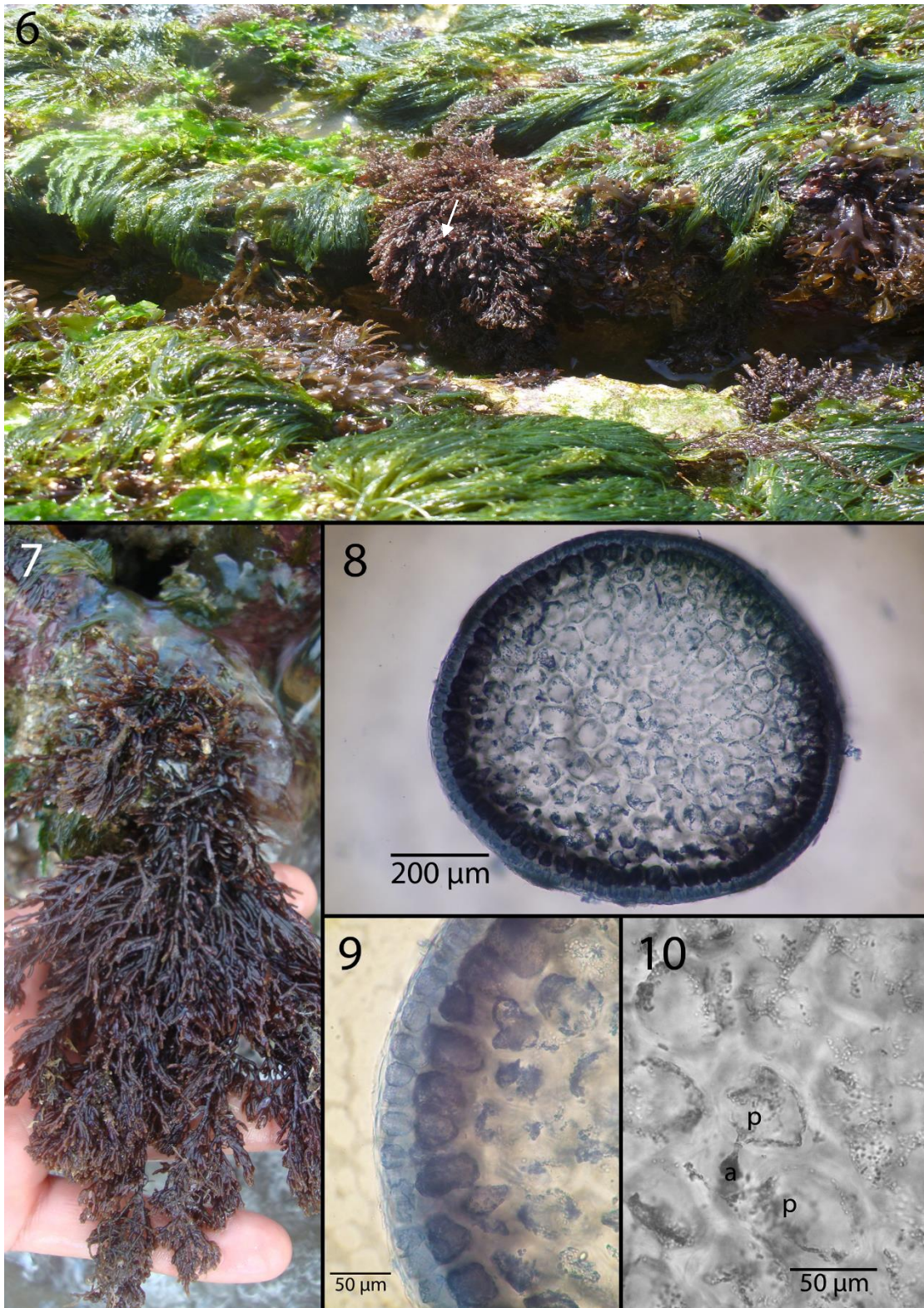
Plantas de hábito ereto com até 12 cm de altura, coloração avermelhada escura, formando tufos, firmemente fixos por meio de apressório discoide ou epífitas sobre outras macroalgas. Opcionalmente, esta espécie cresce fixa ao substrato consolidado sobre recifes areníticos e/ou substrato rochosos. Talo cilíndrico 300-875 µm. Ramificação alterna a espiralada com porções apicais achatadas. Espécimes vivos apresentam coloração brilhante e exalam odor adocicado característico. Células corticais externas pequenas (30,4-50 x 21-31,5) µm, translúcidas, com pouca pigmentação, não apresentando ligações secundárias. Células corticais mais internas maiores, bem pigmentadas e apresentando ligações secundárias. Ausência de *corps en cerise* nas células corticais. Célula axial produz duas células pericentrais. Não foram observados talos férteis.

Material examinado: Brazil, Pernambuco, Recife, Praia de Boa Viagem, 28-09-2011, col. M.T. Fujii (SP468863). Brazil, Paraíba, Conde, Praia de Coqueirinho, 15-08-2014, col. J.N. Farias (SP468864)

Hábito: Essa espécie foi encontrada na zona entremarés dos recifes areníticos dos estados de Pernambuco e Paraíba. Nas praias do Toquinho, Boa Viagem e Coqueirinho, formando tufos e crescendo firmemente fixas ou epífitas em outras macroalgas, principalmente, rodofíceas *Cryptonemia seminervis* (C. Aharth) J. Agardh e alga parda *Sargassum* spp.



Distribuição geográfica no Brasil: Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (Fujii & Cassano 2015)



Figuras 6-10. *Laurencia translucida*. 6. Vista geral do ambiente de ocorrência da espécie (seta), Praia de Boa Viagem, PE. 7. Aspecto geral da planta. 8. Fotomicrografia da secção transversal do talo com a camada de célula cortical translúcida. 9. Detalhe das células corticais externas menores e translúcidas. 10. Célula axial (a) formando duas células pericentrais (p).

*Palisada flagellifera* (J. Agardh) K.W. Nam (2007)

BASIÔNIMO: *Laurencia flagellifera* J. Agardh (1852)

LOCALIDADE TIPO: Indonésia.

SINÔNIMO HOMOTÍPICO: *Chondrophyucus flagelliferus* (J.Agardh) K.W.Nam (1999)

Figuras 11-15

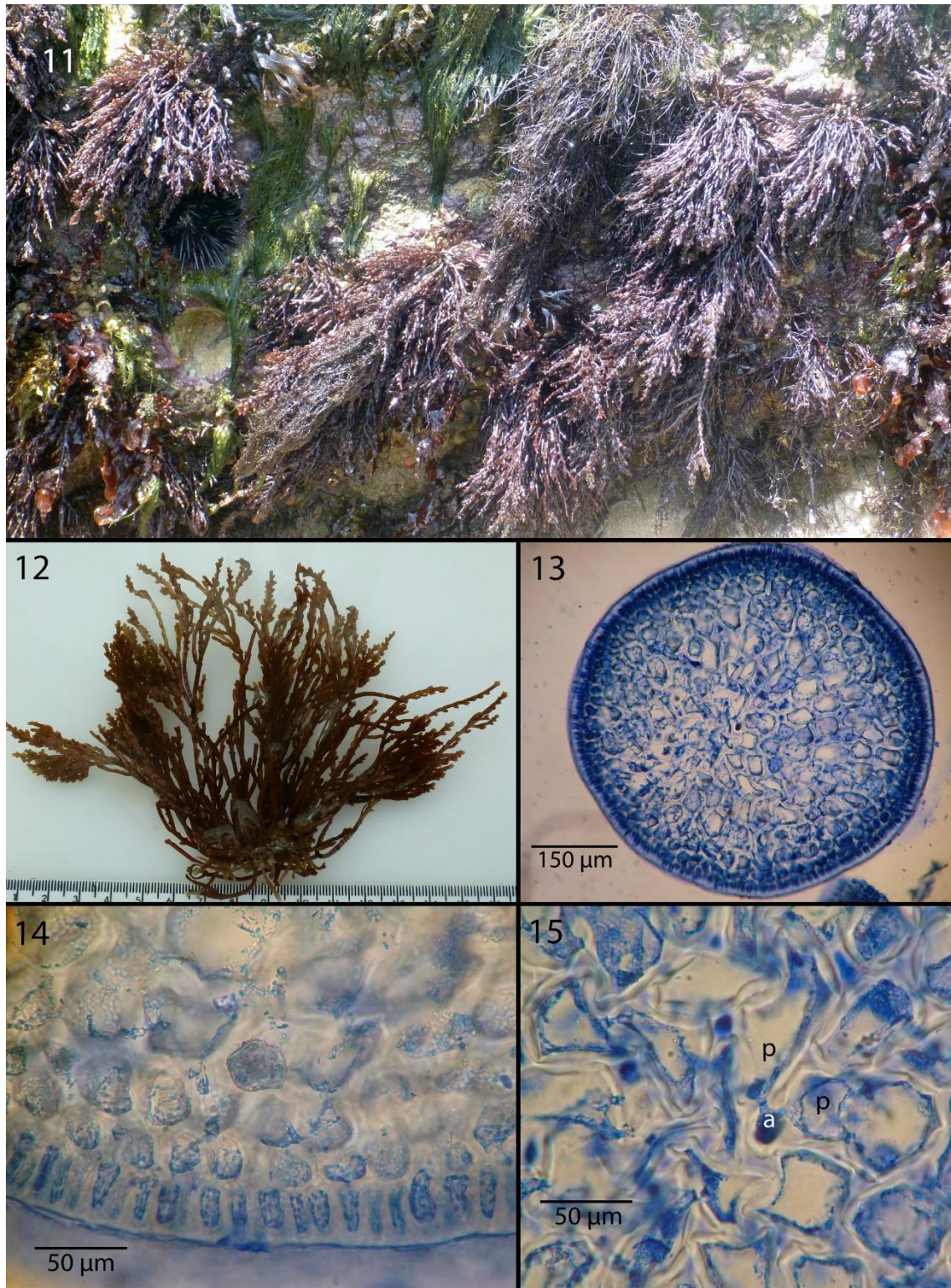
Plantas de hábito ereto, com até 20 cm de altura, coloração avermelhada intensa, comumente formando tufos, fixas ao substrato por meio de apressório discoide. Talo cilíndrico 1000-1500 µm de diâmetro, com ramificação alterna a espiralada, presente principalmente nas porções superiores do talo, quando apresentam-se mais densas, enquanto nas porções mais basais, a ramificação mais esparça. Ausência de *corps en cerise* nas células corticais e nos tricoblastos. Em secção transversal, células corticais arranjadas em paliçada (26-60,5 x 14-45) µm, nunca apresentando ligações secundárias. Segmento axial produz duas células pericentrais. Tetrasporângios tetraédricos, radialmente dispostos nos ramos férteis. Não foram observados talos gametofíticos.

Material examinado: Brasil, Pernambuco, Serrambia, Praia de Toquinho, 17/09/2013, col. M.T. Fujii (SP468865). Brasil, Pernambuco, Recife, Praia de Boa Viagem, 12/03/2013, col. J.N. Farias (SP468866); Brasil, Pernambuco, Cabo de Santo Agostinho, Enseada dos Corais, 26/10/2011, col. J.N. Farias & T. Reis (SP468884).

Brasil, Paraíba, Conde, Praia de Carapibus, 11-03-2013, col. J.N. Farias (SP468867). Brasil, Paraíba, Conde, Praia de Coqueirinho, 04-07-2012, col. J.N. Farias (SP468868).

Habitat: A espécie foi encontrada na zona entremarés dos recifes areníticos dos estados de Pernambuco e Paraíba, nas praias da Enseada dos Corais, do Toquinho, Boa viagem, Carapibus e Coqueirinho.





Figuras 11-15. *Palisada flagellifera*. 11. Fotografia do talo no ambiente, Praia de Toquinho-PE. 12. Aspecto geral da planta. 13. Fotomicrografia da secção transversal do talo cilíndrico. 14. Detalhe das células corticais arranjadas em paliçada e ausência de ligações secundárias. 15. Célula axial (a) formando duas células pericentrais (p).

*Palisada furcata* (Cordeiro-Marinho & M.T. Fujii) Cassano & M.T. Fujii In: Cassano *et al.* (2012).

BASIÔNIMO: *Laurencia furcata* Cordeiro-Marinho & M.T. Fujii (1994: 374)

LOCALIDADE DO TIPO: Praia de Guajirú, Município de Trairi, Ceará, Brasil. .

SINÔNIMO HOMOTÍPICO: *Chondrophyucus furcatus* (Cordeiro-Marinho & M.T. Fujii) M.T. Fujii & Senties (2005)

Figuras 16-20

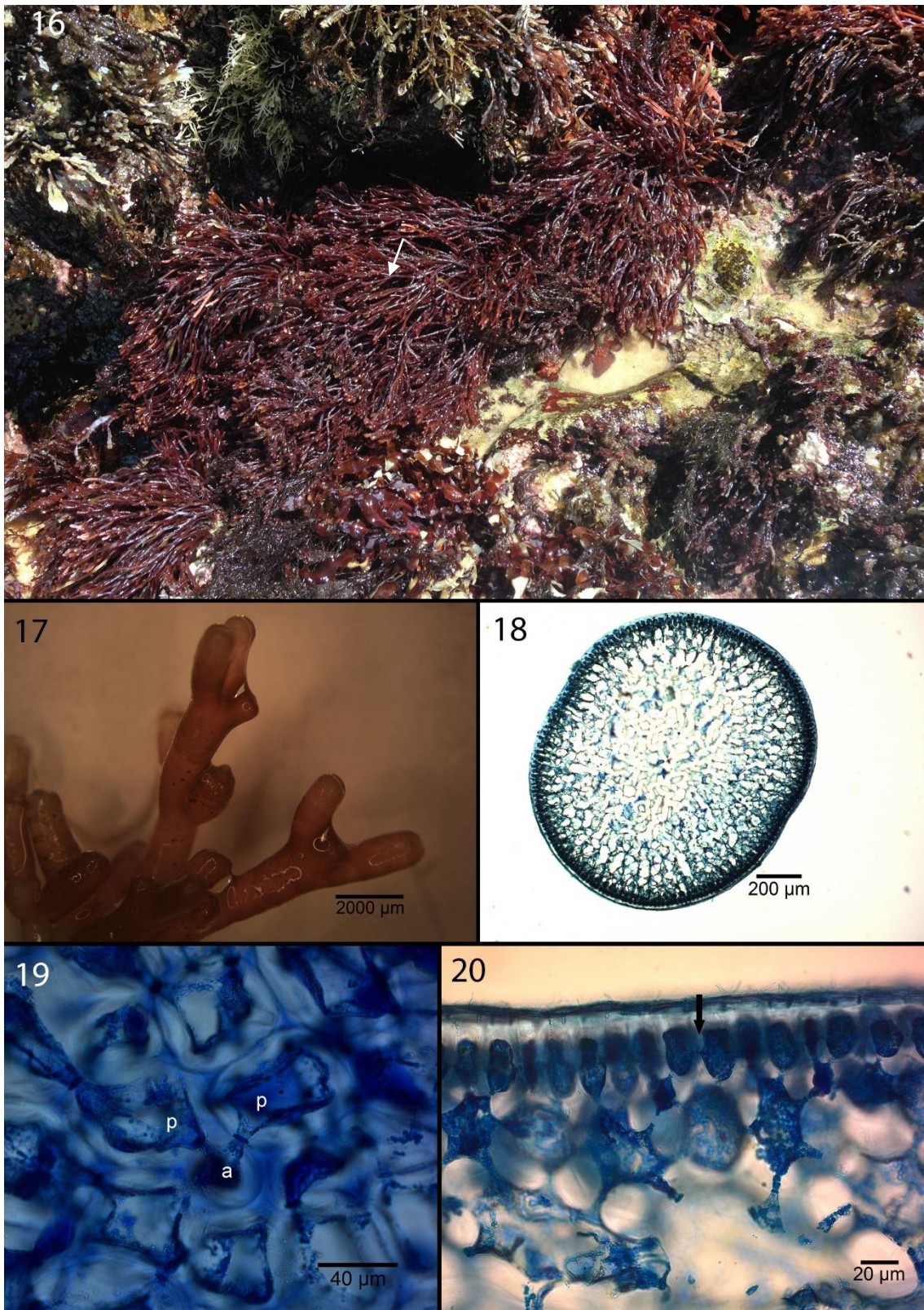
Planta ereta, com até 10 cm de altura, coloração avermelhada, consistência rígida, formando tufo, fixos por meio de apressório discóide fortemente aderido ao substrato. Ramificação radial, alterna a irregular. Nas porções apicais do talo, a presença de ramo muito curto entre a bifurcação é bastante característica da espécie. Ausência de *corps en cerise* nas células corticais ou nos tricoblastos. Em secção transversal, talo levemente comprimido, embora seja mais cilíndrico quando próximo à base (750-1240 µm em diâmetro). Em vista superficial, células corticais poligonais (28-40 x 13,3-25) µm, unidas entre si por ligações secundárias. Em secção transversal, células corticais não arrançadas em paliçada, com ligações secundárias esporádicas entre as células. Segmento axial vegetativo produz duas células pericentrais. Tetrasporângios tetraédricos com disposição radial em relação ao eixo central. Não foram observados talos gametofíticos.

Material examinado: Brasil, Paraíba, Município do Conde, Praia de Coqueirinho, 04-07-2012, col. J.N. Farias (SP468872); Praia de Carapibus, 11-03-2013, col. J.N. Farias (SP468873). Pernambuco, Município de Recife, Praia de Boa Viagem, 14-11-2012, col. T. Reis (SP468871); Município de Cabo de Santo Agostinho, Praia Enseada dos Corais, 27-09-2011, col. M.T. Fujii (SP468870); Município de Ipojuca, Praia do Toquinho, 17-09-2013, col. M.T. Fujii (SP468869).



Habitat: A espécie foi encontrada na zona entremarés dos recifes areníticos dos estados de Pernambuco e Paraíba. Nas praias da Enseada dos Corais e do Toquinho *P. furcata* forma populações densas no limite entre as zonas mesolitoral e infralitoral.

Distribuição geográfica no Brasil: Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Espírito Santo (Fujii & Cassano 2015).



Figuras 16-20. *Palisada furcata*. 16. Aspecto geral do talo na praia de Coqueirinho-PB (seta). 17. Detalhe da ramificação formando uma furca, característica da espécie. 18. Secção transversal do talo. 19. Detalhe da célula axial (a) com duas células pericentrais (p). 20. Detalhe da secção transversal apontando as células corticais unidas por meio de ligações secundárias (seta).

*Palisada perforata* (Bory de Saint-Vincent) K.W. Nam (2007)

BASIÔNIMO: *Fucus perforatus* Bory (1803: 505)

LOCALIDADE TIPO: Tenerife, Ilhas Canárias, Espanha.

SINÔNIMO HOMOTÍPICO: *Laurencia perforata* (Bory de Saint-Vincent) Montagne (1840)

*Chondrophyucus perforatus* (Bory de Saint-Vincent) K.W. Nam (1999)

Figuras 21-25

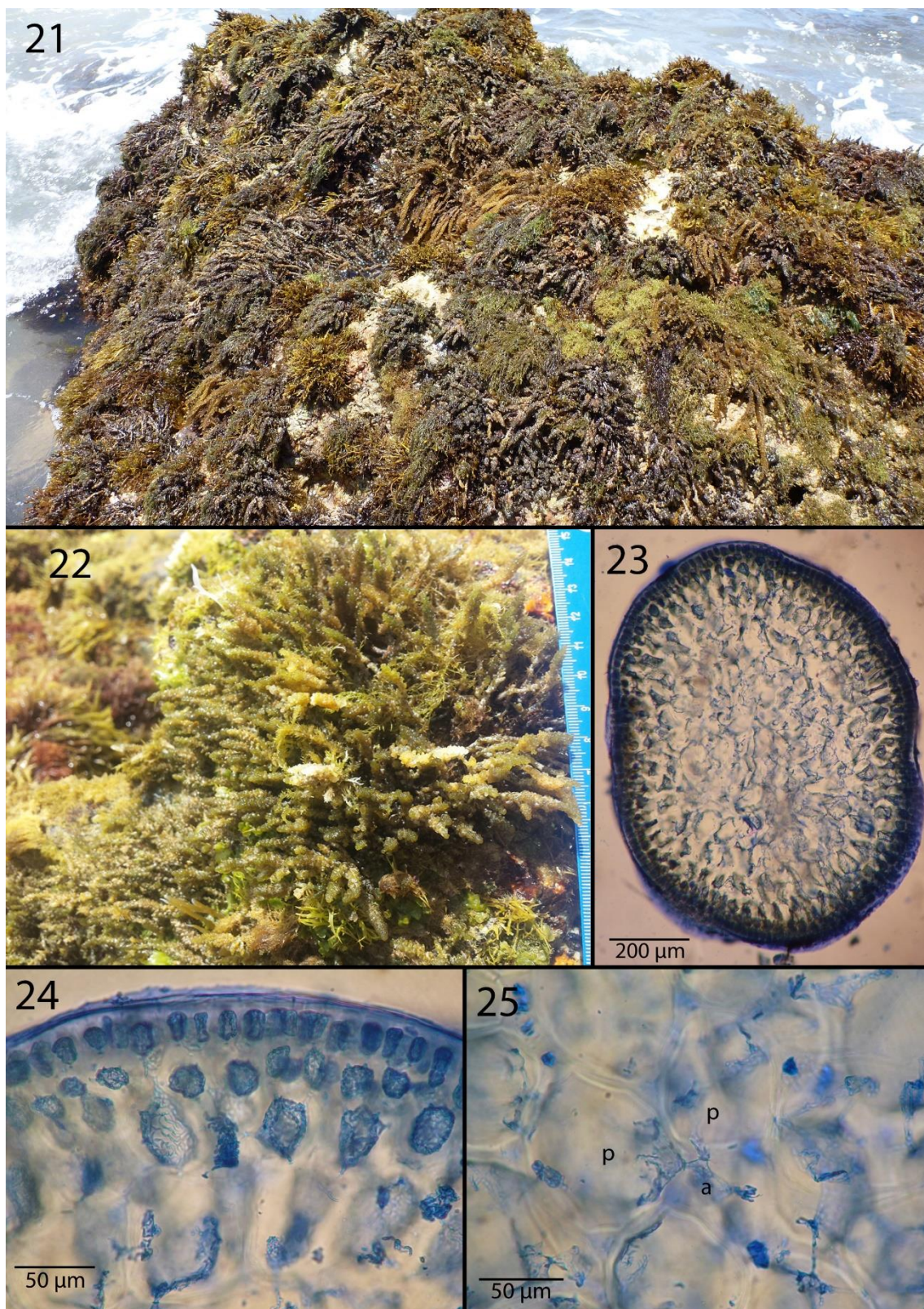
Talo parcialmente ereto, muitas vezes formando tufo de 2–7cm de altura, coloração marrom a esverdeada, consistência rígida, fixo por meio de apressório discoide, fortemente aderido ao substrato. Fixação secundária se faz por apressórios originados de ramos prostrados ou decumbentes. Talo cilíndrico (700-1500 µm em diâmetro) e de consistência rígida. Ramificação densa, alterna a irregular, com râmulos de última ordem papiliformes. Ausência de *corps en cerise*. Em secção transversal, células corticais arranjadas em paliçada (22,5-50 x 11,5-29) µm, nunca apresentando ligações secundárias. Talo com até duas camadas de células pigmentadas. Segmento axial vegetativo produz duas células pericentrais. Tetrasporângios tetraédricos, radialmente dispostos no ramo fértil. Não foram observados talos gametofíticos.

Material examinado: Brasil, Paraíba, Conde, Praia de Carapibus, 11-03-2013, col. J.N. Farias & M.T. Fujii (SP468874); Praia de Coqueirinho, 04-07-2012, col. J.N. Farias & M.T. Fujii (SP468875); Praia de Pitimbu, 12-03-2013, col. J.N. Farias & M.T. Fujii (SP468881). Pernambuco, Recife, Praia de Boa Viagem, 12/03/2013, col. J.N. Farias & M.T. Fujii (SP468877); Município de Cabo de Santo Agostinho, Praia Enseada dos Corais, 26-10-2011, col. J.N. Farias & T.N. Reis (SP468876); Município de Serrambi, Praia do Toquinho, 15-03-2013, col. J.N. Farias & M.T. Fujii (SP468878).

Habitat: A espécie foi encontrada na região superior da zona entremarés dos recifes areníticos dos estados de Pernambuco e Paraíba. Nas praias da Enseada dos Corais, do Toquinho, Boa viagem, Carapibus, Coqueirinho e Pitimbu. É a espécie mais comum em ambos os estados.

Distribuição geográfica no Brasil: todo litoral brasileiro exceto Sergipe, Alagoas e Rio Grande do Sul (Fujii & Cassano 2015).





Figuras 21-25. *Palisada perforata*. 21. Vista geral das plantas no ambiente, praia de Coqueirinho-PB. 22. Aspecto geral do talo. 23. Secção transversal do talo. 24. Secção transversal mostrando as células corticais externas dispostas em paliçada. 25. Detalhe da célula axial (a) formando duas pericentrais (p).

Os gêneros *Laurencia* e *Palisada* divergem primordialmente quanto ao número de células pericentraes produzidos pelo segmento axial vegetativo; o primeiro apresenta quatro e o segundo, duas (Nam 1999, 2006, Garbary & Harper 1998), com exceção de *L. translucida*, que se assemelha a *Palisada*, produzindo apenas duas células pericentraes (Fujii & Cordeiro-Marino (1996), Fujii *et al.* 2006).

No tocante às diferenças intraespecíficas, as espécies do gênero *Palisada* distinguem-se entre si pelo aspecto geral e detalhes da ramificação e dos râmulos. Como descrito por Cordeiro-Marino *et al.* (1994, como *Laurencia furcata*), *Palisada furcata* apresenta ramificação bi a trifurcada nas porções apicais dos talos, com um dos ramos curtos, semelhante a protusão de gema, muito característica da espécie. *Palisada flagellifera* é morfologicamente semelhante a *P. furcata*, porém a ramificação é mais esparsa, alterna-espinalada a irregular, apresentando as porções mais basais dos eixos principais com ramificação escassa ou até sem ramificação e não possui ramos curtos semelhante a protusão de gema descrito para *P. furcata*. Os espécimes de *P. perforata* apresentam-se densamente ramificadas, sendo os ramos de última ordem, papiliformes, muito característicos da espécie e facilmente identificáveis.

*Laurencia translucida* e *L. dendroidea* apresentam grande semelhança quanto ao hábito, mas podem ser diferenciadas entre si pelo odor característico de *L. translucida* e pela coloração brilhante e nunca esverdeada como em *L. dendroidea*. A coloração brilhante é devido à presença de células corticais translúcidas, que indicam ser o local de armazenamento das substâncias voláteis identificadas nesta espécie (Capítulo 5).

Potencial biotecnológico das espécies encontradas

A. *Laurencia dendroidea*

Das espécies do complexo *Laurencia* que ocorrem no Brasil, *L. dendroidea* é, sem dúvidas, a mais estudada, do ponto de vista químico. Seu metabolito secundário majoritário é o elatol, cujo transporte até a superfície do talo foi mostrado por Reis *et al.* (2013).

Em relação à saúde humana, o elatol já mostrou efeitos antileishmania, antitripanossoma e citotóxico em melanona (Santos *et al.* 2010, Machado *et al.* 2011, Veiga-Santos *et al.* 2010, Campos *et al.* 2012, Soares *et al.* 2012).

Obtusanos e o triquinano isolados de *L. dendroidea* também mostraram efeito antileishmania (Machado *et al.* 2011), além de atividade antiherpes, que foi observada em elatol e obtusano (Soares *et al.* 2012).

Davyt *et al.* (2001, 2006) relataram moderada atividade anti-helmíntica contra *Nippostrongylus brasiliensis* em diversas substâncias isoladas, principalmente um sesquiterpeno do tipo  $\beta$ -bisaboleno.

Stein *et al.* (2011a) e Bianco *et al.* (2013) observaram atividade antitumoral (MES-AS) e antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, respectivamente.

Além dos sesquiterpenos, foram isolados dois diterpenos em representantes de *L. dendroidea* (como *L. majuscula*) do Hawai, o kahukueno A e B (Brennan 1993), todavia, não há registros de atividades biológicas dessas substâncias.

#### B. *Laurencia translucida*

Stein *et al.* (2011a e b) realizaram estudos com *L. translucida* e, utilizando seu extrato bruto, mostraram interessante atividade citotóxica e antifúngica.

#### C. *Palisada flagellifera*

Apesar de não existir nenhum metabolito secundário isolado desta espécie, ensaios com o extrato bruto mostraram citotoxicidade em células de sarcoma uterino (Stein 2011a) e atividade antileishmania (Bianco *et al.* 2013).

#### D. *Palisada perforata*

Assim como *P. flagellifera*, nunca foi detectado nenhum metabolito secundário para esta espécie. Entretanto, Vieira & Caland-Noronha (1971) relataram efeito antibacteriano a partir de extrato bruto e, mais tarde, foi observado efeito na coagulação do sangue (Ainouz *et al.* 1992). Extrato bruto obtido com diclorometano/metanol também mostrou-se promissor frente ao vírus da dengue (Koishi *et al.* 2012).

#### E. *Palisada furcata*

Estevam & Carvalho (2002) relataram a ocorrência de um triterpeno em *P. furcata* (como *Laurencia furcata*) em exemplares coletados no litoral da Bahia (Fujii *et al.* 2011). Entretanto, estudos mais detalhados para isolamento dessa substância levaram à identificação de ácidos graxos (Capítulo 3) e não triterpenos como inicialmente prevista.

A ausência de metabolitos secundários em *Palisada* talvez esteja relacionada à característica do talo, visto que, essas espécies apresentam talos mais rígidos quando comparados aos de espécies do complexo *Laurencia*. No que se refere a composição de açúcares, *Palisada flagellifera* e *P. perforata* (como *Chondrophyucus flagelliferus* e *C. papillosus*, respectivamente) apresentaram grandes quantidades de monossacarídeos xilose e manose (Cardoso *et al.* 2007, Ferreira *et al.* 2012), porém não foram observadas em *L. nipponica* Yamada. Em *Osmundea pinnatifida* (Hudson) Stackhouse (como *L. pinnatifida*) foram encontrados apenas traços de xilose (Usov & Elashvili 1991).



## Referências

- Ainouz, L., Sampaio, A.H., Benevides, N.M.B., Freitas, A.L.P., Costa, F.H.F., Carvalho, M.R., Pinheiro-Joventino, F. 1992. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine algal extracts. *Botanica Marina* 35(6): 475–480.
- Aliança, A.S.S., Anjos, K.F.L., Reis, T.N.V., Higino, T.M.M., Brelaz-de-Castro, M.C.A., Bianco, E.M., Figueiredo, R.C.B.Q. 2014. The *in vitro* biological activity of the Brazilian brown seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. *Molecules* 19(9): 14052-14065.
- Bianco, E.M., Oliveira, S.Q., Rigotto, C., Tonini, M.L., Guimarães, T.R., Bittencourt, F., Gouvêa, L.P., Aresi, C., Almeida, M.T.R., Moritz, M.I.G., Martins, C.D.L., Scherner, F., Carraro, J.L., Horta, P.A., Reginatto, F.H., Steindel, M.S., Simões, C.M.O., Schenkel, E.P. 2013. Anti-infective potential of marine invertebrates and seaweeds from the Brazilian coast. *Molecules* 18(5): 5761-5778.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Hu, W., Munro, M.H.G., Northcote, P.T.; Prinsep, M. 2007. Marine natural products. *Natural Product Reports* 24 (1): 31-86.
- Bowker, D.M., Turvey, J.R. 1968. Water-soluble polysaccharides of the red alga *Laurencia pinnatifida*. Part I. Constituent units. *Journal of the Chemical Society C* 983-988.
- Brennan, M.R., Kim, I.K., Erickson, K.L. 1993. Kahukuenes, new diterpenoids from the marine alga *Laurencia majuscula*. *Journal of Natural Products* 56(1): 76-84.
- Campos, A, Souza, C.B., Lhullier, C., Falkenberg, M., Schenkel, E.P., Ribeiro-do-Valle, R.M., Siqueira, J.M. 2012. Anti-tumour effects of elatol, a marine derivative compound obtained from red algae *Laurencia microcladia*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 64 (8): 1146–1154.

- Cardoso, M.A., Nosedá, M.D., Fujii, M.T., Zibetti, R.G.M., Duarte, M.E.R. 2007. Sulfated xylomannans isolated from red seaweeds *Chondrophycus papillosus* and *C. flagelliferus* (Ceramiales) from Brazil. *Carbohydrate Research* 342(18): 2766–2775.
- 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.
- Cassano, V., De-Paula, J.C., Fujii, M.T., Teixeira, V.L. 2008. Sesquiterpenes from the introduced red seaweed *Laurencia caduciramulosa* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Biochemical Systematic and Ecology* 36: 223-226.
- Cassano, V., Metti Y., Millar, A.J.K., Gil-Rodríguez, M.C., Senties, 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(1): 67-81.
- Cassano, V., Oliveira, M.C., Gil-Rodríguez, M.C., Senties, 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(4): 349-357
- Cavalcante-Silva, L.H.A., Matta, C.B.B., Araújo, M.V., Barbosa-Filho, J.M., Lira, D.P. Santos, B.V.O. Miranda, G.E.C., Alexandre-Moreira, M.S. 2012. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of crude methanolic extract of red alga *Bryothamnion triquetrum*. *Marine Drugs* 10(9): 1977-1992.
- Cocentino *et al.* (2006)
- Cocentino, A.L.M. 1994. Família Rhodomelaceae (Ceramiales, Rhodophyta) na Praia de Serrambi – Ipojuca-PE - Brasil. Recife. *Dissertação de Mestrado*, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco. 193pp.

- Cordeiro-Marino, M., Fujii, M.T., Pinheiro-Joventino, F. 1994. Morphological and cytological studies of *Laurencia furcata* Cordeiro-Marino and Fujii (Rhodophyta, Rhodomelaceae): a new species from Brazil. *Cryptogamic Botany* 4(4): 373-380.
- Davyt, D., Fernandez, R., Suescun, L., Mombrú, A.W., Saldaña, J., Domínguez, L., Coll, J., Fujii, M.T., Manta, E. 2001. New sesquiterpene derivatives from the red alga *Laurencia scoparia*, isolation, structure determination, and anthelmintic activity. *Journal of Natural Products* 64 (12): 1552–1555.
- Davyt, D., Fernandez, R., Suescun, L., Mombrú, A.W., Saldaña, J., Domínguez, L., Coll, J., Fujii, M.T., Manta, E. 2006. Bisabolanes from the red alga *Laurencia scoparia*. *Journal of Natural Products* 69(7): 1113–1116.
- Estevam, C., Carvalho, L.R. 2002. Estudo químico dos metabólitos secundários de *Laurencia furcata* Cord.-Marino et Fujii (Cerámiales, Rhodophyta). VI Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica. São Paulo, Brazil, p. 32
- Fernandes, D.R.P., Oliveira, V.P., Yoneshigue-Valentin, Y. 2014. Seaweed biotechnology in Brazil: six decades of studies on natural products and their antibiotic and other biological activities *Journal of Applied Phycology* 26: 1923-1937.
- Ferreira, L.G., Nosedá, M.D., Gonçalves, A.G., Ducatti, D.R.B., Fujii, M.T., Duarte, M.E.R. 2012. Chemical structure of the complex pyruvylated and sulfated agarán from the red seaweed *Palisada flagellifera* (Cerámiales, Rhodophyta). *Carbohydrate Research* 347(1): 83–94.
- Fujii, M. T. e Senties, G. A. 2005. *Taxonomia do complexo Laurencia (Cerámiales, Rhodophyta) do Brasil, com ênfase nas espécies dos estados de São Paulo e do Espírito Santo*. In: Senties, A.G. e Dreckman, K. (eds.). *Monografias Ficológicas*. Mexico: Universidad Autonoma Metropolitana. Vol.2, p. 69-135.

- Fujii, M. T., Cordeiro-Marino, M. 1996. *Laurencia translucida* sp. nov. (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil. *Phycologia* 35(6): 542-549
- 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. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21(2): 268-282.
- Fujii, M.T., Guimarães, S.M.P.B., Gurgel, C.F.D. Fredericq, S. 2006. Characterization and phylogenetic affinities of the red alga *Chondrophyucus flagelliferus* (Rhodomelaceae, Ceramiales) from Brazil on the basis of morphological and molecular evidence. *Phycologia* 45(4): 432-441.
- Fujii, M.T.; Cassano, V. 2015. *Palisada* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:  
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB99991> (acesso em: 16-07-2015).
- Garbary, D.J. & Harper, J.T. 1998. A phylogenetic analysis of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae) of the red algae. *Cryptogamie Algologie* 19: 185-200.
- Gressler, V., Stein, E.M., Dörr, F., Fujii, M.T., Colepicolo, P., Pinto, E. 2011. Sesquiterpenes from the essential oil of *Laurencia dendroide* a (Ceramiales, Rhodophyta): isolation, biological activities and distribution among seaweeds. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21: 248-254.
- Guiry, M.D. in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2015. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 01/13/2015.
- Koishi, A.C., Zanello, P.R., Bianco, E.M., Bordignon, J., Santos, C.N.D. 2012. Screening of dengue virus antiviral activity of marine seaweeds by an *in situ* enzyme-linked immunosorbent assay. *PLoS ONE* 7(12): e51089.

- Lhullier, C., Falkenberg, M., Ioannou, E., Quesada, A., Papazafiri, P., Horta, P.A., Schenkel, E.P., Vagias, C., Roussis, V. 2010. Cytotoxic halogenated metabolites from the Brazilian red alga *Laurencia catarinensis*. *Journal of Natural Products* 73: 27-32.
- Machado, F.L., Pacienza-Lima, W., Rossi-Bergmann, B., Gestinari, L.M.S., Fujii, M.T., De-Paula, J.C., Costa, S.S., Lopes, N.P., Kaiser, C.R., Soares, A.R. 2011. Antileishmanial sesquiterpenes from the Brazilian red alga *Laurencia dendroidea*. *Planta Medica* 77: 733-735.
- 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*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 20(3): 441-452.
- Marinho-Soriano, E., Pinto, E., Yokoya, N.S., Colepicolo, P., Teixeira, V.L., Yoneshigue-Valentin, Y. 2012. New insights on algal products and bioprospection in Brazil. Pharmaceutical, cosmetic and public health applications. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22(4): 1.
- Martin-Lescanne, J., Rousseau, F., De Reviere, B., Payri, C., Couloux, A., Cruaud, C. and Le Gall, L. (2010) Phylogenetic analyses of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae, Ceramiales) support recognition of five genera: *Chondrophyucus*, *Laurencia*, *Osmundea*, *Palisada* and *Yuzurua* stat. nov., *European Journal of Phycology*, 45(1): 51-61.
- Matta, C.B.B., Souza, E.T., Queiroz, A.C. Lira, D.P., Araújo, M.V., Cavalcante-Silva, L.H.A., Miranda, G.E.C., Araújo-Júnior, J.X., Barbosa-Filho, J.M., Santos, B.V.O., Alexandre-Moreira, M.S. 2011. Antinociceptive and anti-inflammatory activity from algae of the genus *Caulerpa*. *Marine Drugs* 9: 307-318.
- Nam, K.W. 1999. Morphology of *Chondrophyucus undulata* and *C. parvipapillata* and its implications for the taxonomy of the *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) complex. *European Journal of Phycology* 34: 455-468.

- Nam, K.W. 2006. Phylogenetic re-evaluation of the *Laurencia* complex (Rhodophyta) with a description of *L. succulenta* sp. nov. from Korea. *Journal of Applied Phycology* 18: 679–697.
- Nam, K.W. 2007. Validation of the generic name *Palisada* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Algae* 22(2): 53-55.
- Obota, Y., Fukushi, S. 1953. Studies on the components of the essential oil in a red algae, *Laurencia glandulifera*. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 27 (6): 331-334.
- Pereira, S.M.B., Carvalho, M.F.O., Angeiras, J.A., Pedrosa, M.E.B., Oliveira, N.M.B., Torres, J., Gestinari, L.M.S., Concentino, A.M., Santos, M.D., Nascimento, P.R.F., Cavalcanti, D.R. 2002. Algas marinhas bentônicas do estado de Pernambuco. In Tabarelli M, Silva JMC (eds.). *Diagnóstico da biodiversidade de Pernambuco*. Recife: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio.
- Queiroz, M.T., Machado, N.T., Furtado, F.F., Oliveira-Filho, A.A., Alustau, M.C., Figueiredo, C.S., Miranda, G.E.C., Barbosa-Filho, J.M., Braga, V.A., Medeiros, I.A. 2011. Vasorelaxation, induced by *Dictyota pulchella* (Dictyotaceae), a brown alga, is mediated via inhibition of calcium influx in rats. *Marine Drugs* 9: 2075-2088.
- Reis, V.M., Oliveira, L.S., Passos, R.M.F., Viana, N.B., Mermelstein, C.S., Sant'Anna, C., Pereira, R.C., Paradas, W.C., Thompson, F.L., Amado-Filho, G.M., Salgado, L.T. 2013. Traffic of secondary metabolites to cell surface in the red Alga *Laurencia dendroidea* depends on a two-step transport by the cytoskeleton. *Plos ONE* 8(5): e63929.
- Santos, A.O., Veiga-Santos, P., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B.P., Sudatti, D.B., Bianco, E.M., Pereira, R.C., Nakamura, C.V. 2010. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. *Marine Drugs* 8: 2733-2743.

- Soares, A.R., Robaina, M., Mendes, G.S., Silva, T.S.L., Gestinari, L.M.S., Pamplona, O.S. ; Yoneshigue-Valentin, Y., Kaiser, C.R., Romanos, M.T.V.. 2012. Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22: 714-723.
- Stein, E.M., Andregueti, D.X., Sousa, C., Fujii, M.T., Baptista, M., Colepicolo, P., Indig, G.L. 2011a. Search for cytotoxic agents in multiple *Laurencia sensu* seaweed species (Ceramiales, Rhodophyta) harvested from the Atlantic Ocean zone that bates the Brazilian state of Espírito Santo. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21: 239-243.
- Stein, E.M., Colepicolo, P., Afonso, F.A.K., Fujii, M.T. 2011b. Screening for antifungal activities of extracts of the Brazilian seaweed genus *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21: 290-295.
- Tomaz, A.C.A. Miranda, G.E.C., Souza, M.F.V., Cunha, E.V.L. 2012. Analysis and characterization of methyl esters of fatty acids of some *Gracilaria* species. *Biochemical Systematic and Ecology* 44: 303-306.
- Usov, A.I., Elashvili, M.Y. 1991. Polysaccharides of Algae. 44. Investigation of Sulfated Galactan from *Laurencia nipponica* Yamada (Rhodophyta, Rhodomelaceae) Using Partial Reductive Hydrolysis. *Botanica Marina* 34:553-560.
- Veiga-Santos, P., Pelizzaro-Rocha, K.J., Santos, A.O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Silva, S.O. Sudatti, D.B., Bianco, E.M., Pereira, R.C., Nakamura, C.V. 2010. In vitro anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. *Parasitology* 137: 1661–1670.
- Vieira, F.P., Caland-Noronha, M.C. 1971. Atividade antibiótica de algumas algas marinhas do estado do Ceará. *Arquivo de Ciências do Mar* 11: 91–93.

# Capítulo 2



## **Triterpenos produzidos pelas espécies do complexo *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta), distribuição geográfica e atividade biológica**

### Introdução

As algas vermelhas que compõem o complexo *Laurencia* J.V. Lamouroux apresentam grande plasticidade morfológica e distribuição mundial, ocupando oceanos temperados e tropicais. Este grupo, mais diverso do que se acreditava anteriormente, foi denominado Complexo *Laurencia*. Ele abrange seis gêneros: *Laurencia* propriamente dito (Nam *et al.* 1994), *Osmundea* Stackhouse (Nam *et al.* 1994), *Chondrophycus* (Tokida & Saito) Garbary & J.T. Harper (1998), (Nam 1999, 2006, 2007), *Palisada* (Yamada) K.W. Nam (1999), *Yuzurua* (K.W. Nam) Martin-Lescanne *et al.* (2010) e *Laurenciella* Cassano, Gil-Rodríguez, Senties, Díaz-Larrea, M.C. Oliveira & M.T. Fujii (2012).

As espécies que formam este complexo *Laurencia* produzem interessantes metabolitos secundários, que segundo sua natureza podem ser sesqui-, di- ou triterpenos ou ainda, acetogeninas, os quais, por sua vez, podem ser halogenados, ou não. Estes produtos naturais formam, sem dúvida, um dos maiores e mais diversos grupos de terpenos, pois, até o momento, somam 205 sesquiterpenos (Al-Massarani 2014), 101 diterpenos (Carvalho *et al.* 2015) e 39 triterpenos. Os triterpenos são o alvo desta revisão.

### Diversidade química

Estes triterpenos são formados por processos de ciclização incomuns e se destacam por suas estruturas únicas (Domingo *et al.* 2009). São definidos como moléculas oxigenadas, formadas por uma sequência de anéis contendo grupos C – O– C (éteres cíclicos) que podem

estar isolados ou fundidos em grupos de duas ou mais unidades, interconectadas por uma ligação carbono-carbono (Vilotijevic & Jamison 2009). Os anéis isolados podem ser tetrahidrofuranos conectados à molécula pelas posições 2,5 (**I**) ou tetrahidropiranos, ligados pela posição 6 (**II**), enquanto os fundidos, podem ser o dioxabicyclo [4.4.0] decano, (**III**), o dioxabicyclo [5.4.0] undecano (**IV**) e o trioxaciclo [5.3.0.3.4.0] hexadecano (**V**) (Fernández *et al.* 2000) (Figura 1).

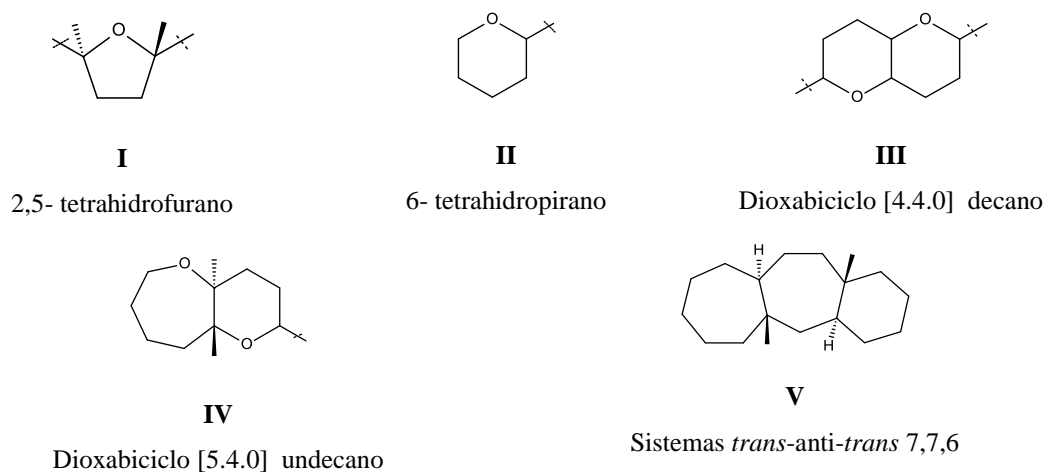


Figura 1. Anéis isolados e fundidos encontrados nos triterpenos de *Laurencia*.

Fernández *et al.* (2000) propuseram, como precursor biossintético para estes triterpenos, o (10*R*, 11*R*)- 10, 11- epóxido de esqualeno (**VI**) (Kigoshi *et al.*, 1986) que, em seguida, é transformado em (6*S*, 7*S*, 10*R*, 11*R*, 14*R*, 15*R*, 18*R*, 19*R*) tetraepóxido de esqualeno (**1**); neste ultimo, reações nucleofílicas *endo*-seletivas, em cascata, levam à abertura dos anéis epóxido, dando origem a este grupo particularmente interessante de triterpenos (Figura 2). Estas reações não concertadas são promovidas pela água (Ueberbacher *et al.*, 2012; Morten *et al.*, 2011; Vilotijevic & Jamison, 2009, 2011).

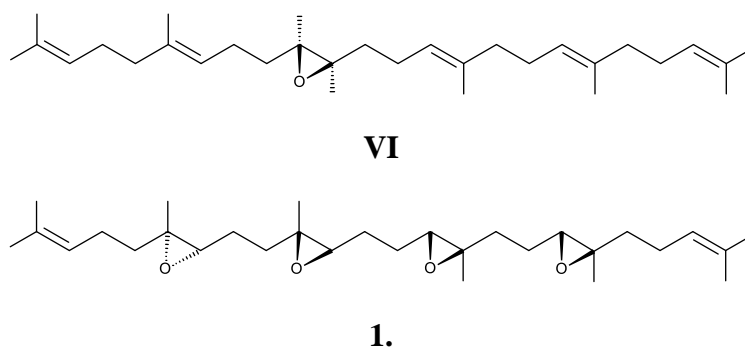


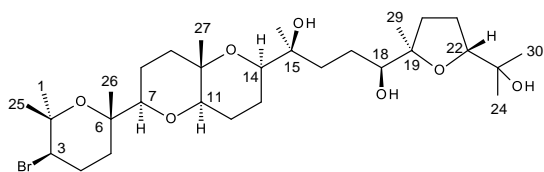
Figura 2. Estruturas do (10*R*, 11*R*)- 10, 11 epóxido de (+) esqualeno (**1**) e 6*S*,7*S*,10*R*,11*R*, 14*R*,16*R*, 18*R*,19*R* tetraepóxido de esqualeno (**VI**).

Underwood (2011) sugeriu que o enshuol (**35**), que possui um sistema de anéis dioxabicyclo [5.4.0] undecano, tem como intermediário o 6*S*, 7*S*,10*R*, 11*R*, 14*R*, 16*R*, 18*S*, 19*S* tetraepóxido de esqualeno, em substituição ao composto **VI**.

Com base nos pressupostos de Fernández *et al.*(2000), Underwood (2011) e Souto *et al.* (2002), a partir destes intermediários, existem quatro possíveis rotas para a formação desses oxaesqualenoides: a primeira é a via de síntese dos compostos que possuem o sistema de anéis [4.4.0] dioxabicyclo decano, tal como o thirsiferol e o venustatriol (**2** ,**3**); a segunda, leva a triterpenos com um sistema de anéis 2,8-dioxabicyclo [5.4.0] undecano, como o enshuol (**35**); a terceira dá origem a compostos simétricos, como o teurilene (**37**) e a quarta, às estruturas que contêm um sistema de anéis fundidos *trans*-*anti*-*trans*-7,7,6.

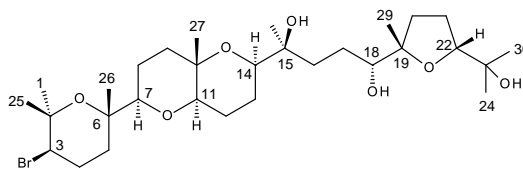
O único tetraepóxido de esqualeno isolado de *Laurencia* foi (**1**), extraído de *L. okamurai* coletada em Goza, Japão (Kigoshi *et al.* 1986).

O grupo que contém o sistema de anéis dioxabicyclo [4.4.0]decano está dividido em duas séries, de acordo com a configuração de C-18 e C-19, que estão em posições opostas no thirsiferol e no venustatriol; na posição C-22, a configuração de ambas as séries de moléculas permanece a mesma (Fernández *et al.* 2000).



2.

Tirsiferol



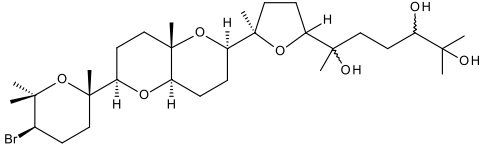
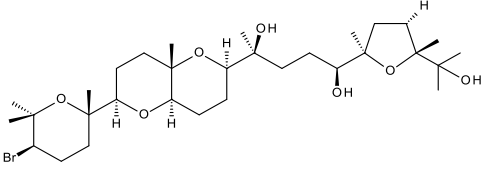
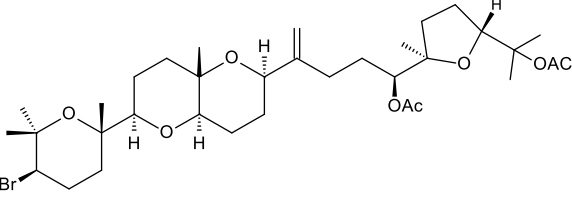
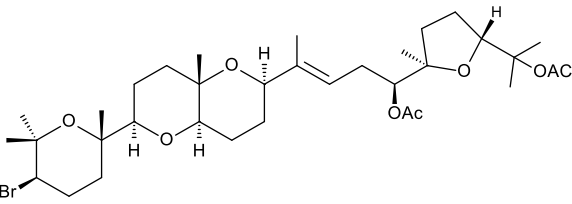
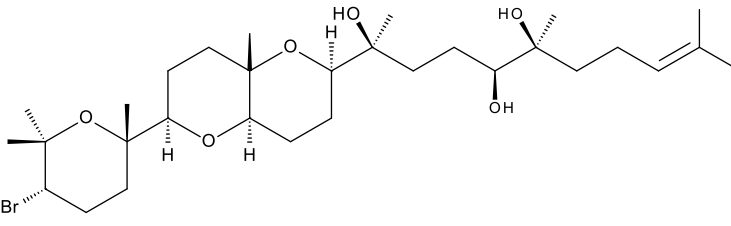
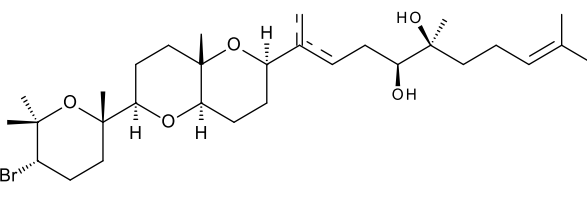
3.

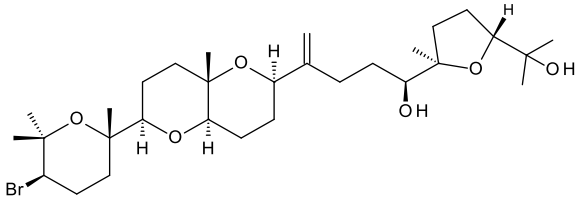
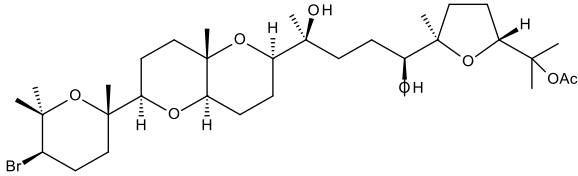
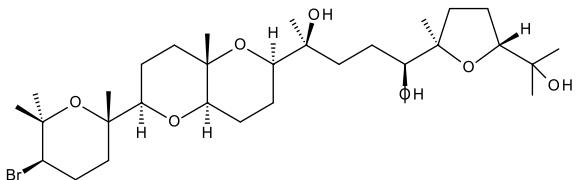
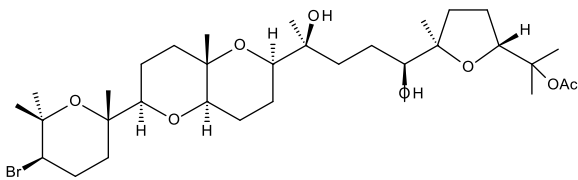
Venustatriol

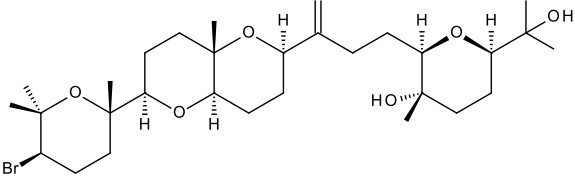
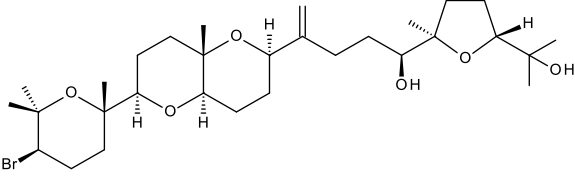
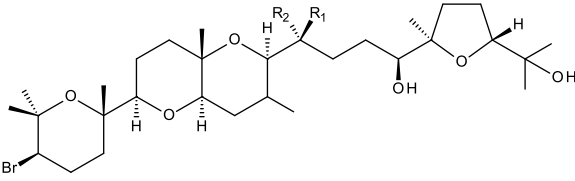
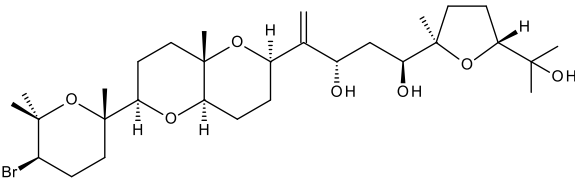
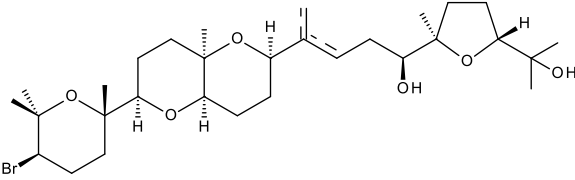
A tabela 1 contém os triterpenos pertencentes a estas séries.

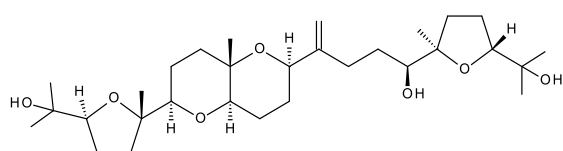
Tabela 1. Triterpenos contendo o sistema de anéis dioxabicyclo [4.4.0]decano e congêneres, produzidos por espécies de *Laurencia senso stricto*, os respectivos locais de coleta e suas atividades biológicas.

Série do tirsiferol				
Espécie	Triterpeno	Local de coleta	Atividade biológica	Referência
<i>L. calliclada</i>	<p>4. Calicladol</p>	An Thoi, PhuQuoc Island, KienGiang Province, Vietnam	Citotóxica de frente a linhagem P- 388 de leucemia em ratos	Suzuki <i>et al.</i> 1995

<i>L. mariannensis</i>		Hainan e Weizhou Islands, China	Ji <i>et al.</i> 2008
	<b>5.</b> Lauremarianol		
<i>L. obtusa</i>			
	<b>6.</b> (21 $\alpha$ )-21-hidroxitirsiferol e tirsiferol		
		Hokkaido, Japão	Citotóxica de frente a linhagem P- 388 de leucemia em ratos
	<b>7</b> 18,23- diacetato de $\Delta^{15,28}$ -anidrotirsiferila		Suzuki <i>et al.</i> 1987
			
	<b>8.</b> 18,23-diacetato de $\Delta^{15,16}$ - anidrotirsiferila		
			
	<b>9.</b> Magireol A		
			
	<b>10.</b> $\Delta^{15,28}$ magireol B		
	<b>11.</b> $\Delta^{15,16}$ magireol C		

<i>Osmundea pinnatifida</i> (como <i>Laurencia pinnatifida</i> )		Los Cristianos, Tenerife, Ilhas Canárias, Espanha.	<i>Gonzalez et al.</i> 1984
	<b>12.</b> Dehidrotirsiferol e acetogenina e sesquiterpenos		
<i>L.saitoi</i>		Yantai, China	<i>Ji et al.</i> 2008b
	<b>13.</b> 23-acetato de thirsiferila e tirsiferol		
<i>L. thyrsefera</i>		Seal Reef, Kaikoura, Nova Zelandia	<i>Blunt et al.</i> 1978
	<b>1.</b> Tirsiferol		
<i>L. venusta</i>		Onna, Okinawa, Japão	23-acetato de Tirsiferila  Sakemi and Higa 1986;  i Citotóxica de frente a linhagem P- 388 de leucemia em ratos: inibidor da proteína fosfatase 2A  González and Fosyth 2000
	<b>13.</b> 23-acetato de tirsiferila e tirsiferol		

		Ilhas Canárias, Macronésia	Antitumoral	Norte <i>et al.</i> 1996
	<b>14. Isodehidrotirsiferol</b>			
<i>L. viridis</i>				
	<b>15.</b> 10-epidehidrotirsiferol			
<i>L. viridis</i>		Callao Salvaje, Tenerife, Ilhas Canárias		Norte <i>et al.</i> 1997a.
	<b>16. Tirsenol A</b> $R_1 = OH$ e $R_2 = CH_2OH$			
	<b>17. Tirsenol B</b> $R_1 = CH_2OH$ e $R_2 = OH$			
<i>L. viridis</i>		Paraíso Floral, Callao Salvaje e El Palmar, South Tenerife, Ilhas Canárias		Norte <i>et al.</i> 1997b
	<b>18.</b> 16-Hidrooxidehidrotirsiferol			
<i>L. viridis</i>				
	<b>19.</b> 10-epi-15,16-dehidrotirsiferol e venustatriol, tirsiferol, dehidrotirsiferol, isodehidrotirsiferol, viridianol, viridiol A e B			

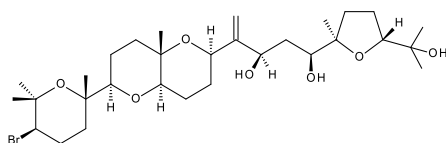


Macaronesi  
a, Ilhas  
Canárias

Manriquez *et al.* 2001

**20.**

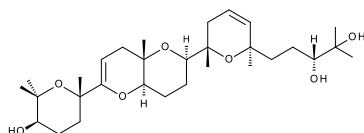
Pseudodehidrotirsiferol



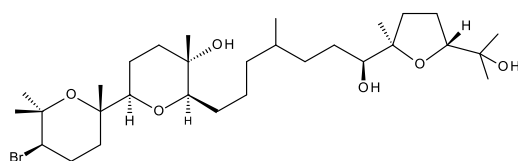
*L. viridis*

**21.**

16-epihidroxidehidrotirsiferol



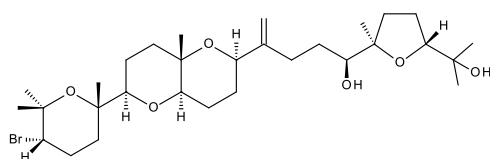
**22.** Martiriol



Tenerife,  
Ilhas  
Canárias

Souto *et al.*  
2002

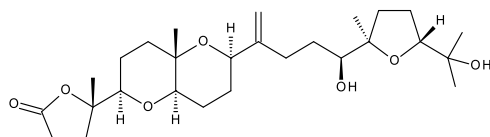
**23.**Clavidol



*L. viridis*

**24**

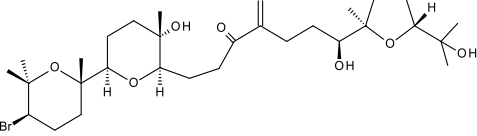
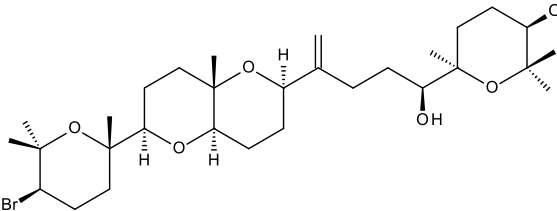
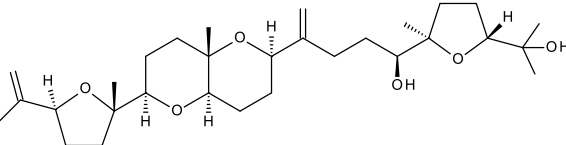
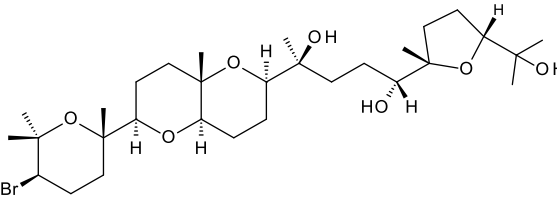
3-epi-dehidrotirsiferol

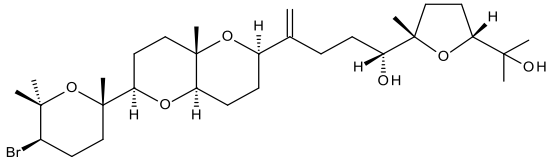
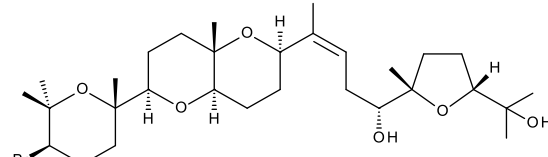
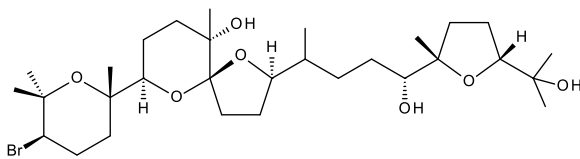
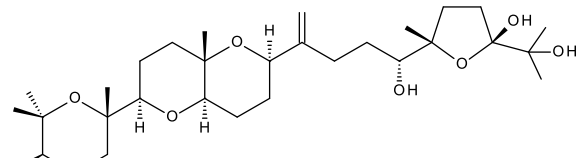


**25.** Lactodehidrotirsiferol

---

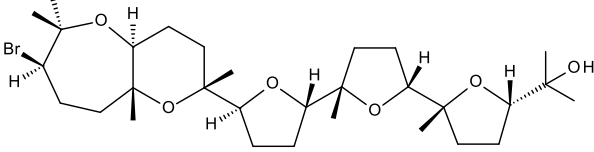


<i>L. viridis</i>		Tenerife, Ilhas Canárias	Cen-Pacheco <i>et al.</i> 2010
	<p align="center"><b>26.</b> 14-ceto-dehidrotirsiferol</p>		
<i>L. viridis</i>		Tenerife, Ilhas Canárias	Cen-Pacheco <i>et al.</i> 2011.
	<p align="center"><b>27.</b> Iubol</p>		
<i>L. viridis</i>			
	<p align="center"><b>28.</b> 1,2- Dehidropseudodehidrotirsiferol</p>		
<b>29. Secodehidrotirsiferol</b>			
Serie do venustatriol			
<i>L. venusta</i>		Onna, Okinawa, Japão	Venustatriol: Sakemi & ativo frente Higa 1986; aos virus de González & estomatite Fosyth 2000 vesicular (VSV) e herpes simplex tipo 1 (HSV-1)
	<p align="center"><b>3.</b> Venustatriol e tirsiferol</p>		

	 <p><b>30.</b> <math>\Delta^{15-28}</math>dehidrovenustatriol</p>	Paraíso Floral, Callao Salvage e El Palmar, Tenerife, Ilhas Canárias	Norte <i>et al.</i> 1997b
<i>L. viridis</i>	 <p><b>31.</b> <math>\Delta^{15,16}</math>dehidrovenustatriol</p>		
	<p><b>32.</b> Acetato de predehidrovenustatriol e venustatriol, tirsiferol, dehidrotirsiferol, isodehidrotirsiferol, viridianol, viridiol A e B</p>		
<i>L. viridis</i>	 <p><b>33.</b> Spirodehidrovenustatriol</p>	Tenerife, Ilhas Canárias	Cen-Pacheco <i>et al.</i> 2010
<i>L. viridis</i>	 <p><b>34.</b> 22-hidroxi-15(28)-dehidrovenustatriol</p>	Tenerife, Ilhas Canárias	Cen-Pacheco <i>et al.</i> 2011.

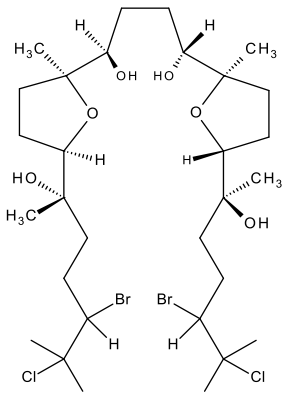
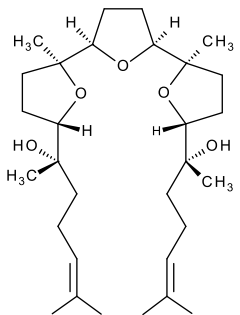
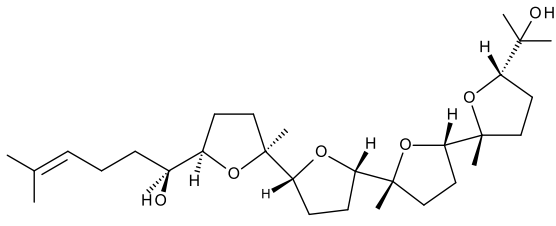
As informações acerca do único triterpeno que contem o sistema de anéis 2,8-dioxabicyclo [5.4.0] undecano são mostradas na tabela 2.

Tabela 2. Triterpenos contendo o Sistema de anéis 2,8-dioxabicyclo [5.4.0] undecano, produzidos por *Laurencia sensu stricto* e local de coleta.

Espécie	Triterpeno	Local de coleta	Referências
<i>L. omaezakiana</i>	 <p data-bbox="435 728 719 790"><b>35.</b> Enshuol e 15, 16-anidrotirsiferol</p>	Omaezaki , Japao	Matsuo <i>et al.</i> 1995, 2008

Os triterpenos com estruturas simétricas assemelham-se aos ionóforos, deles diferindo apenas pela ausência da carboxila presente nas extremidades das moléculas ionóforas (Vilotijevic & Jamison, 2009); esses triterpenos estão reunidos na tabela 3.

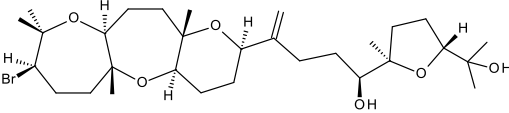
Tabela 3. Triterpenos simétricos produzidos por espécies do complexo *Laurencia* e seus locais de coleta

Espécie	Triterpeno	Local de coleta	Referência
<i>L. intricata</i>	 <p><b>36. Intricatetraol</b></p>	Bikyni, Shimamaki e Oshoro Bay em Hokkaido, Japão	Suzuki <i>et al.</i> 1993.
<i>L. obtusa</i>	 <p><b>37. Teurilene</b></p>	Teuri Islands, Hokkaido, Japão	Suzuki <i>et al.</i> 1985
<i>L. omaezakiana</i>	 <p><b>38. Omezaquianol</b></p>	Omaezaki, Japão	Matsuo <i>et al.</i> 1995, 2008

O único triterpeno de *Laurencia* contendo um sistema de três anéis fundidos é o *ent*-dioxepandehidrotirsiferol, que possui um grupo *trans*-*anti*-*trans*-7,7,6 de anéis. Um sistema 6,7,7 de anéis fundidos foi observado nos triterpenos de *Chondria armata* (Kützinger) Okamura,

que são os armatois A - F, que também possuem o esqualeno como precursor biossintético (Ciavatta *et al.*, 2001). A tabela 4 apresenta dados sobre esse oxasqualenoide de *Laurencia*.

Tabela 4. Triterpeno contendo o sistema fundido *trans-anti-trans* 7,7,6

Espécie	Composto	Local de coleta	Referências
<i>L. viridis</i>	 <p style="text-align: center;"><b>39.</b> <i>ent</i>-dioxepandehidrotirsiferol</p>	Macronésia, Ilhas Canárias	Souto <i>et al.</i> 2002

### Distribuição Geográfica

São conhecidos, até o momento, trinta e nove triterpenos produzidos por algas do complexo *Laurencia*. A figura 3 mostra a distribuição geográfica e as espécies que produzem triterpenos.

A maioria deles (84,62%) pertence às séries do tirsiferol e do venustatriol, cujos membros têm um sistema de anéis dioxabicyclo [4.4.0] decano em suas estruturas; *L. viridis* produz 77,77% destes terpenos (21 compostos), ou seja, 16 do tipo do tirsiferol e 5, do grupo do venustatriol.

Os simétricos representam 7,69% do total e os restantes possuem estruturas únicas, por conseguinte, cada uma responsável por 2,56% destes compostos.

*L. viridis* só é encontrada na região da Macronésia; a espécie *Osmundea pinnatifida* também ocorre nas Ilhas Canárias. Sete dessas espécies produtoras de triterpenos são encontrados no Japão, uma no Vietnã, uma na China e uma na Nova Zelândia (Figura 3). Em conclusão, este cenário de distribuição disjunta sugere tendência evolutiva independente na produção de triterpenos, dentro do complexo *Laurencia*.

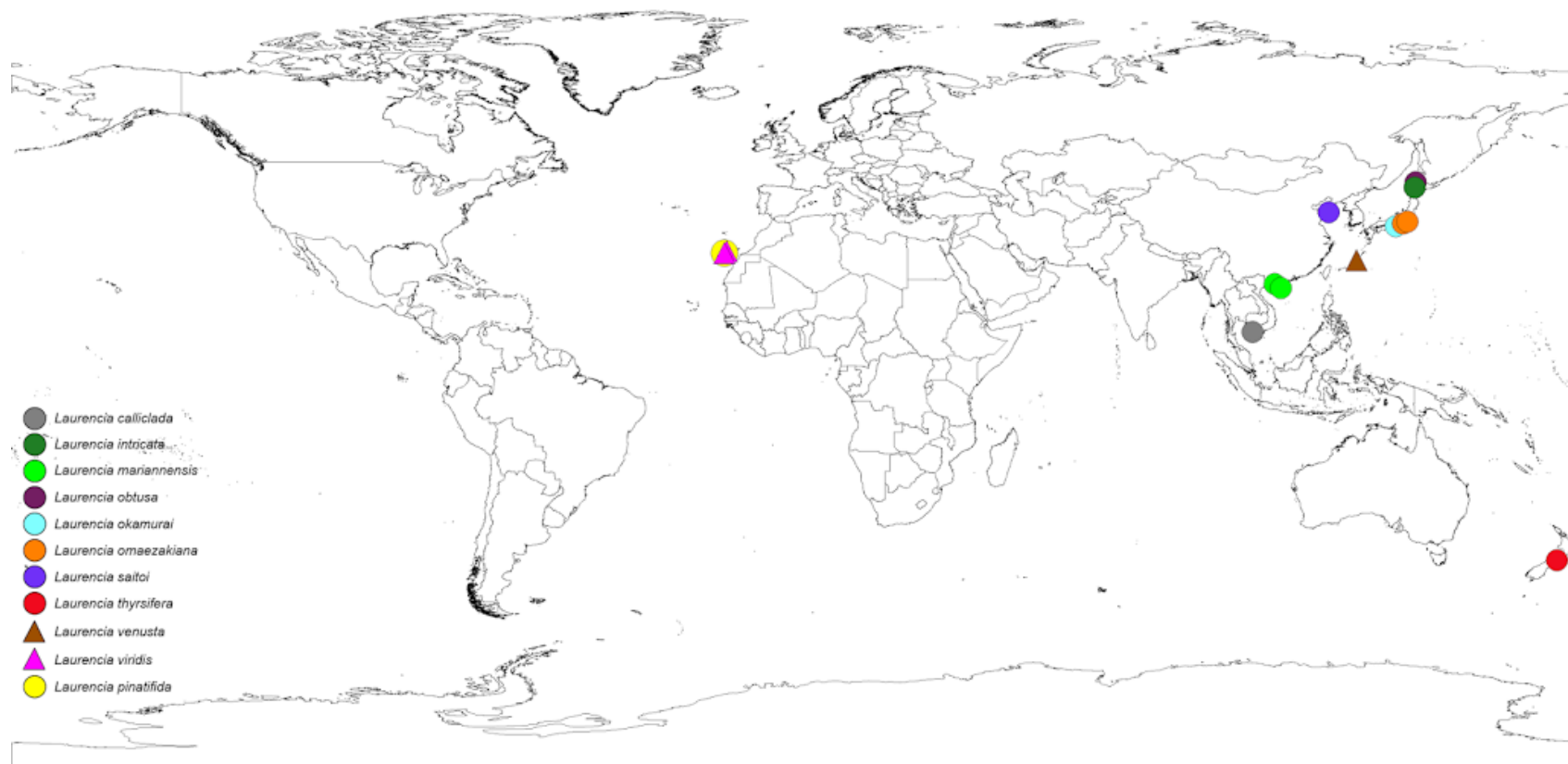


Figura 3. Distribuição geográfica das espécies componentes do complexo *Laurencia* que produzem triterpenos.

## Referências

- Al-Massarani, S.M. 2014. Phytochemical and biological properties of sesquiterpene constituents from the marine red seaweed *Laurencia*: A review. *Natural Products Chemistry & Research* 2(5).
- Blunt, J.W., Hartshorn, M.P., McLennan, T.J., Munro, M.H.G., Robinson, W.T., Yorke, S.C. 1978. Thyriferol: A squalene-derived metabolite of *Laurencia thyrifera*. *Tetrahedron Letters* 1: 69-72.
- Carvalho, L.R., Farias, J.N., Riul, P., Fujii, M.T. An overview of global distribution of the diterpenes synthesized by the red algae *Laurencia* Complex (Ceramiales, Rhodomelaceae). *In: Marine algae extracts: Processes, products, and applications*. First Edition. S.-K. Kim and K. Chojnacka (eds.). Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGa
- Cassano, V., Metti, Y., Millar, A.J.K., Gil-Rodríguez, M.C., Senties, 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(1): 67-81.
- Cen-Pacheco, F., Nordstrom, L., Souto, M.L., Martín, M.N., Fernández, J.J., Daranas, A.H. 2010. Studies on polyethers produced by red algae. *Marine Drugs* 8: 1178-1188.
- Ciavatta, M.L., Wahidulla, S., D'Souza, L., Scognamiglio, G., Cimino, G. 2001. New bromotriterpenepolyethers from the Indian alga *Chondria armata*. *Tetrahedron* 57: 617-623
- Domingo, V., Arteaga, J.F., Moral, J.F.Q., Barrero, A.F. 2009. Unusually cyclized triterpenes: occurrence, biosynthesis and chemical synthesis. *Natural Products Reports* 26: 115-134.
- Fernández, J.J., Souto, M.L., Norte, M. 2000. Marine polyether triterpenes. *Natural Products Report* 17: 235-246.

- Garbary, D.J., Harper, J.T. 1998. A phylogenetic analysis of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae) of the red algae. *Cryptogamie Algologie* 19: 185–200.
- Gonzalez, A.G., Arteaga, J.M., Fernandez, J.J., Martin, J.D., Norte, M., Ruano, J.Z. 1984. Terpenoids of the red alga *Laurencia pinnatifida*. *Tetrahedron* 40(14): 2751-2755.
- González, I.C., Forsyth, C.J. 2000. Total synthesis of thyriferyl 23-acetate, a specific inhibitor of protein phosphatase 2A and an anti-leukemic inducer of apoptosis. *Journal of American Chemical Society* 122: 9000-9108.
- Hashimoto, M., Kan, T., Nozaki, K., Yanagiya, M., Shirahama, M., Matsumoto, T. 1990. Total syntheses of (+)-thyriferol, (+)-thyriferyl 23-acetate, and (+)-venustatriol. *Journal of Organic Chemistry* 55(17): 5088–5107.
- Ji, N.Y., Li, X.M., Xie, H., Ding, J., Li, K., Ding, L.P., Wang, B. G. 2008. Highly oxygenated triterpenoids from the marine red alga *Laurencia mariannensis* (Rhodomelaceae). *Helvetica Chimica Acta* 91: 1940-1946.
- Ji, N.Y., Li, X. M., Wang, G.G., 2008b. Halogenated terpenes and a C15-acetogenin from the marine red alga *Laurencia saitoi*. *Molecules* 13: 2894-2899.
- Kigoshi, H., Makoto, O., Shizuri, Y., Niwa, H., Yamada, K. 1986. Isolation of (10R,11R-(+)-squalene-10,11-epoxide from the red alga *Laurencia okamurai* and its enantioselective synthesis. *Tetrahedron* 42(14): 3789-3792.
- Manríquez, C.P., Souto, M.L., Gavín, J.A., Norte, M., Fernández, J.J. 2001. Several new squalene-derived triterpenes from *Laurencia*. *Tetrahedron* 57: 3117-3123.
- Martin-Lescanne, J., Rousseau, F., De Reviers, B., Payri, C., Couloux, A., Cruaud, C., Le Gall, L. 2010. Phylogenetic analyses of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae, Ceramiales) support recognition of five genera: *Chondrophyucus*, *Laurencia*, *Osmundea*, *Palisada* and *Yuzuruastat*. nov., *European Journal of Phycology* 45 (1): 51-61.



- Matsuo, Y., Suzuki, M., Masuda, M. 1995. Enshuol, a novel squalene-derived pentacyclic triterpene alcohol from a new species of the red algal genus *Laurencia*. *Chemistry Letters* 24: 1043-1044.
- Matsuo, Y., Suzuki, M., Masuda, M., Iwai, T., Morimoto, Y. 2008. Squalene-derived triterpene polyethers from the red alga *Laurencia omaezakiana*. *Helvetica Chimica Acta* 91(7): 1261-1266.
- Morimoto, Y., Iwai, T., Kinoshita, T. 2000. Revised structure of squalene-derived pentaTHF polyether, glabrescol, through its enantioselective total synthesis: Biogenetically intriguing  $C_{5v}$  vs  $C_2$  symmetric relationships. *Journal of American Chemical Society* 122(29): 7124-7125
- Morten C.J., Byers, J.A., Jamison, T.F. 2011. Evidence that epoxide-opening cascades promoted by water are stepwise and become faster and more selective after the first cyclization. *Journal of American Chemical Society* 133(6): 1902-1908.
- Nam, K.W. 1999. Morphology of *Chondrophyucus undulata* and *C. parvipapillata* and its implications for the taxonomy of the *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) complex. *European Journal of Phycology* 34: 455–468.
- Nam, K.W. 2006. Phylogenetic reevaluation of the *Laurencia* complex (Rhodophyta) with a description of *L. succulenta* sp. nov. from Korea. *Journal of Applied Phycology* 18: 679–697.
- Nam, K.W. 2007. Validation of the generic name *Palisada* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Algae* 22 (2): 53–55.
- Nam, K.W., Maggs, C.A., and Garbary, D.J. 1994. Resurrection of the genus *Osmundea* with an emendation of the generic delineation of *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). *Phycologia* 33 (5): 384–395.
- Norte, M., Fernández, J.J., Souto, M.L. 1997b. New polyether squalene derivatives from *Laurencia*. *Tetrahedron* 53(13): 4649-4654.

- Norte, M., Fernández, J.J., Souto, M.L., Garcia-Grávalos, M.D. 1996. Two new antitumoral polyether squalene derivatives. *Tetrahedron Letters* 15: 2671-1672.
- Norte, M., Fernández, J.J., Souto, M.L., Gavin, J.A., Garcia-Grávalos, M.D. 1997a. Thyrsenols A and B, two unusual polyether squalene derivatives. *Tetrahedron* 53(9): 3173-3178.
- Sakemi, S. and Higa, T. 1986. Venustatriol. A new, anti-viral, triterpene tetracyclic ether from *Laurencia venusta*. *Tetrahedron Letters* 27(36): 4287-4290.
- Souto, M.L., Manríquez, C.P., Norte, M., Fernández, J.J. 2002. Novel marine polyethers. *Tetrahedron* 58: 8119-8125.
- Suzuki, M., Matsuo, Y., Takahashi, Y., Masuda, M.M. 1995. Callicladol, a novel cytotoxic bromotriterpene polyethers from a Vietnamese species of the red algal genus *Laurencia*. *Chemistry Letters* 1045-1046.
- Suzuki, M., Matsuo, Y., Takeda, S., Suzuki, S. 1993. Intricatetraol, a halogenated triterpene alcohol from the red alga *Laurencia intricata*. *Phytochemistry* 33(3): 651-656.
- Suzuki, M., Takeda, S., Suzuki, M., Kurosawa, E., Kato, A., Imanaka Y. 1987. Cytotoxic aqualene-derived polyethers from the marine red alga *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux. *Chemistry Letters* 361-364.
- Suzuki, T., Suzuki, M., Furusaki, A., Matsumoto, T., Kato, A., Imanaka, Y., Kurosawa, E. 1985. Teurilene and thyriferyl 23-acetate, meso and remarkably cytotoxic compounds from the marine red alga *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux. *Tetrahedron Letters* 26(10): 1329-1332.
- Ueberbacher, B.T., Hall, M., Faber, K. 2012. Electrophilic and nucleophilic enzymatic cascade reactions in biosynthesis. *Natural Products Report* 29: 333-350.
- Underwood, B.S. 2011. Synthesis and determination of the absolute configuration of armatol A through a polyepoxide cyclization cascade. Revision of the proposed structures of armatols A -F. Doctoral thesis. Massachusetts Institute of Technology.

Vilotijevic, I. and Jamison, T.F. 2009. Epoxide-opening cascades in the synthesis of polycyclic polyether natural products. *Angewandte Chemie International Edition in English* 48(29): 5250-5281.

Vilotijevic, I. and Jamison, T.F. 2011. Biomimetic synthesis of polyether natural products via polyepoxide opening. *In: Biomimetic Organic Synthesis*. First edition. E. Poupon and B. Nay (eds.). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. pp. 537-590.

# Capítulo 3

## Isolamento e caracterização dos metabólitos de interesse em *Palisada furcata* (Ceramiales, Rhodophyta)

### Introdução

Metabólitos são substâncias orgânicas que resultam da adaptação de um organismo ao meio ambiente e, conseqüentemente, diretamente relacionados à história de vida da espécie. Desta forma, detêm valiosas informações filogenéticas (Cimino & Ghiselin 2001) e frequentemente são também possuidores de importantes atividades biológicas (Mandéo 2007)

Essas substâncias, de acordo com sua função, são tradicionalmente denominadas metabólitos primários ou especiais (secundários) e estão divididas em classes químicas: proteínas, peptídeos, aminoácidos, ácidos graxos, alcaloides, polifenóis, terpenos, acetogeninas, dentre outras (Gottlieb 1990, Carvalho & Roque 2000, Mandéo 2007)

Diferentemente das plantas, as algas produzem poucos alcaloides, sendo, até o momento, conhecidos apenas 44 (Güven *et al.*, 2013).

Dentre as macroalgas vermelhas, as espécies do complexo *Laurencia* J.V. Lamouroux, que é reconhecido por 194 espécies válidas dos 518 nomes atribuídos, incluídos em seis gêneros: *Laurencia sensu stricto*, *Osmundea* Stackhouse (Nam *et al.* 1994), *Chondrophycus* (Takida & Saito) Garbary & J. Harper (1998), (Nam 1999), *Palisada* (Yamada) Nam (2006, 2007), *Yuzurua* Martin-Lescanne (Martin-Lescanne *et al.* 2010) e *Laurenciella* Cassano, Gil-Rodríguez, Senties, Díaz-Larrea, Oliveira & M.T. Fujii (2012), produzem predominantes os ácidos graxos e os terpenos, seguidos pelas acetogeninas. Os terpenos são formados a partir do difosfato de isopentenila e os ácidos graxos e acetogeninas, pela condensação do ácido acético, tendo todos, como precursor comum, a acetil CoA. (Cardozo *et al.* 2007).

As espécies de alga do complexo *Laurencia* são reconhecidas como importante fonte de terpenos, halogenados ou não, que podem ser sesqui, di ou triterpenos, possuidores de apreciável gama de atividades biológicas (Pereira & Teixeira 1999; Fujii *et al.* 2011). Muitas dessas moléculas são específicas da espécie (Fenical & Norris 1975), como o diterpeno Dactylomelol, produzido por *Laurenciella marilzae* (Fernandez *et al.* 2005; Cassano 2009) e aldigenina A, B, C e D, sesquiterpenos produzidos por *L. aldingensis* Saito & Womersley (Carvalho *et al.* 2003 e 2006).

Dentre as substâncias terpenoídicas produzidas pelas espécies do complexo *Laurencia*, os sesquiterpenos são os mais numerosos e estão amplamente distribuídos nos oceanos, de regiões temperadas a tropicais. (Al-Massarani 2014). Em menor número estão os diterpenos, tendo sido registrados, até o momento, uma centena deles, produzidos, em sua maioria, em espécies que habitam o hemisfério norte (Carvalho *et al.* 2015). Os triterpenos, por sua vez, compreendem 39 diferentes esqueletos carbônicos, que têm distribuição restrita à região da Macronésia e Japão (capítulo 2).

Ainda não são conhecidas a distribuição geográfica das espécies do complexo *Laurencia* que produzem acetogeninas, substâncias que se originam a partir de C<sub>15</sub> hidroxi-, halohidroxi ou epoxipolieninas lineares, que por sua vez surgem do ácido hexadeca 4,7,10,13-tetraenoico (Murai 1997, Cepeda 2012).

Devido a dados preliminares gerados ao longo da pesquisa química a que vêm sendo submetidas as espécies brasileiras do complexo *Laurencia* e que indicavam a possibilidade da presença de triterpeno na espécie endêmica do Brasil, *Palisada furcata* (Cordeiro-Marino & M.T. Fujii) Cassano & M.T. Fujii (Estevam & Carvalho 2002, Fujii *et al.* 2011), o presente estudo foi direcionado para identificar os triterpenos produzidos por *P. furcata*.

## Material e métodos

Os espécimes de *Palisada furcata* (100g, peso seco) coletadas da praia Enseada dos Corais, Pernambuco, em 26/10/2011 (SP468882) foram submetidos à triagem e limpeza manual para retirada das espífitas e organismos indesejáveis associados e secos à sombra em temperatura ambiente. Em seguida, o material seco foi levado ao laboratório de Química de Algas e de Cianobactérias do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do IBT, o material foi triturado e submetido à extração com diclorometano (5x, 48 horas, na ausência de luz). Os extratos foram filtrados, reunidos em frasco âmbar, e acondicionados a 4 °C, até a fase de concentração, realizada em rotoevaporador, em temperatura ambiente.

O extrato obtido foi submetido à uma série de procedimentos cromatográficos em coluna de gel de sílica ou de Sephadex LH20 e em placas preparativas com fases móveis adequadas. Todos esses procedimentos foram acompanhados por cromatografia planar comparativa, utilizando-se fases móveis adequadas e, como revelador, *p*-hidroxibenzaldeído. Todos esses procedimentos estão descritos no fluxograma na figura 1.

Todas as frações resultantes do primeiro procedimento cromatográfico foram analisadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM); as amostras foram diluídas em 1mL de DCM. Esta análise foi feita em GCMS-QP2010 PlusInjetor AOC-20i com acessório AOC20s para acomodar 150 amostras.

Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: coluna ZB-5MS (Phenomenex), 30m x 0.25mm x 0.25µm; temperatura do injetor 220 °C; programação da temperatura do forno de 60 a 300 °C (5 °C/min) e mantida a 300 °C por 20 min. Temperatura de interface de 250 °C; temperatura do detector 200 °C. Hélio como gás de arraste, a um fluxo constante de 1,76 mL.min<sup>-1</sup>. Faixa de varredura: 40 a 800 (*m/z*).

Também foram submetidas à análise por CG-EM todas as frações, que nas análises por Cromatografia Planar aparentavam conter substâncias isoladas, o mesmo ocorrendo com frações de interesse.



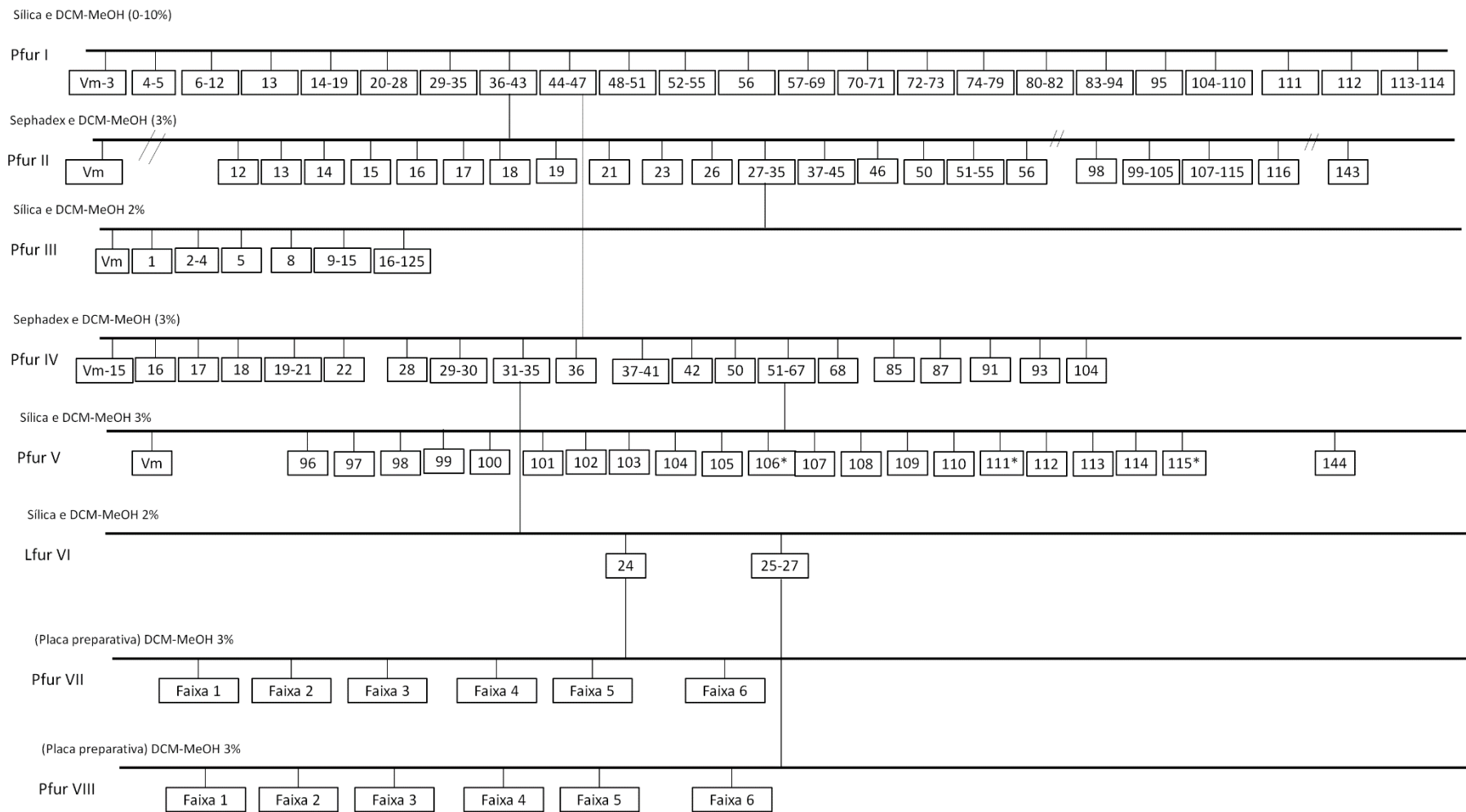


Figura 1. Fluxograma mostrando os procedimentos cromatográficos para busca de terpenos em *P. furcata*.

## Resultados e discussão

A massa do triturado da alga foi de 95 g e a do extrato em DCM, de 1,6488 g. Os cromatogramas das frações P<sub>fur</sub> I desenvolvidos com as frações eluídas da coluna de gel de sílica, estão mostrados na figura 1.

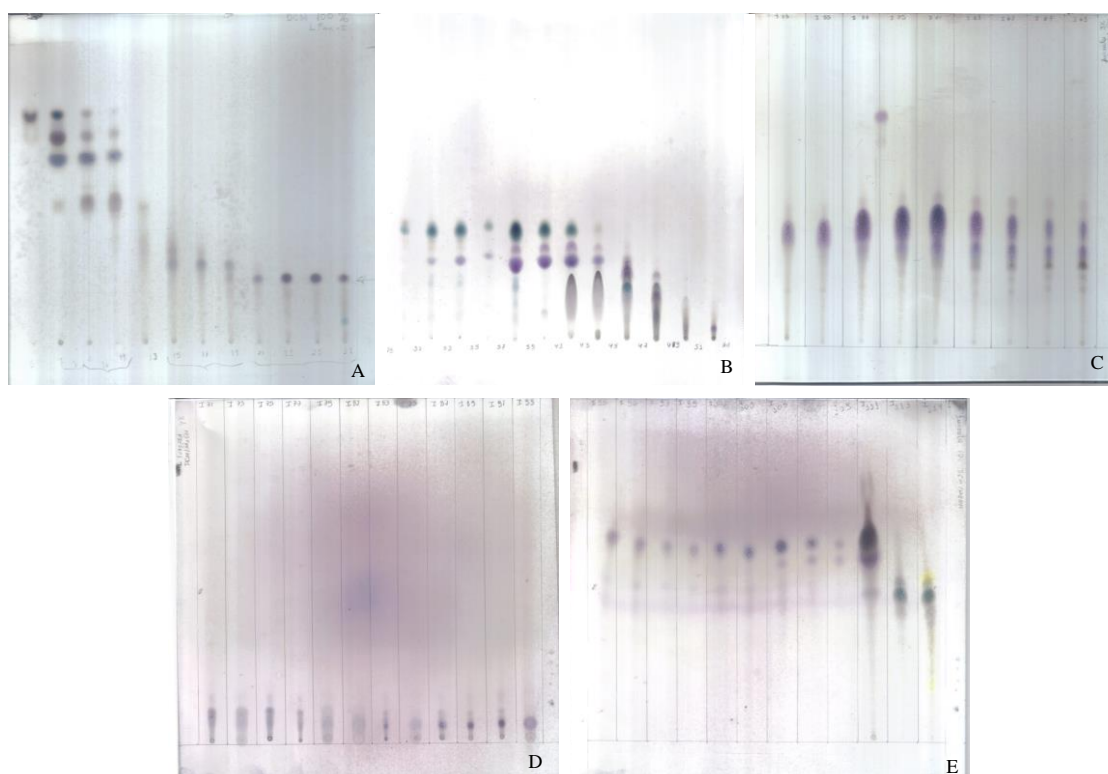


Figura 2. Cromatogramas das frações ímpares do extrato em DCM de *P. furcata*, revelador: *p*-hidroxibenzaldeído. Fig. A. Frações 3 a 27; fase móvel DCM 100%. Fig B. Frações 29 a 51; fase móvel DCM/MeOH 1%. Fig. C. Frações 53 a 69; fase móvel DCM/MeOH 3%. Fig. D. 71 a 93; fase móvel DCM/MeOH 4%. Fig. 1E. Frações 95 a 114; fase móvel DCM/MeOH 10%.

As frações foram reunidas segundo a similaridade de características físico-químicas observadas nestes cromatogramas e pesadas; essas massas estão compiladas na tabela 1.

Tabela 1. Massa das frações reunidas, após primeira comparação cromatográfica	
Frações P. fur I	Massa (mg)
0 a 3	2,0
4 a 5	9,3
6 a 12	109,4
14 a 19	37
21 a 27	11,6
29 a 35	43,3
36 a 39	108,3
40 a 43	124,5
44 a 47	136,2
48 a 51	338,2
53 a 55	9,8
57 a 69	55,5
70 a 71	152,6
75 a 77	34,0
83 a 93	51,1
97 a 101	4,6
105 a 109	826,1

Cromatogramas adicionais permitiram que mais frações fossem reunidas (Figura 3).

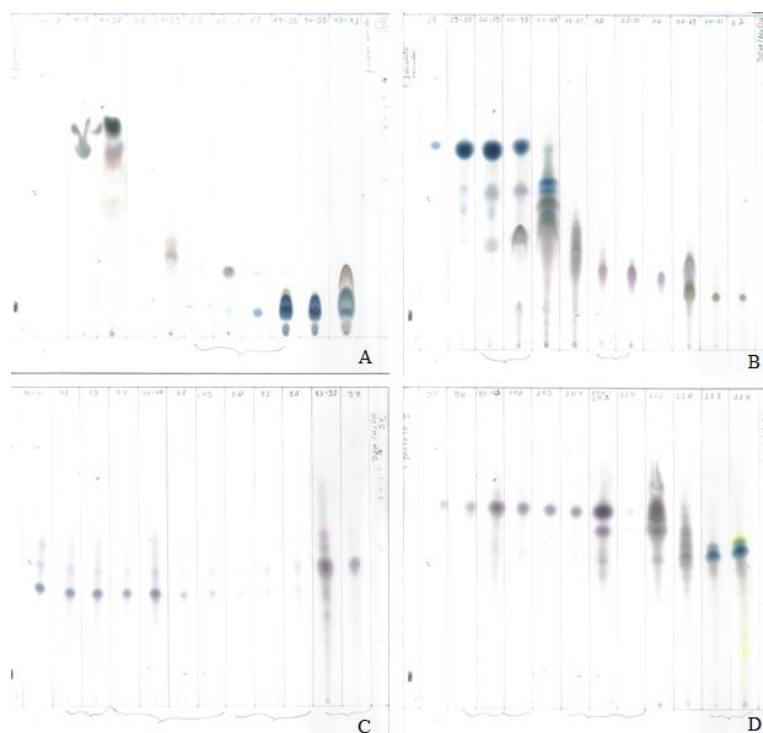


Figura 3. Cromatogramas das frações do extrato em DCM de *P. furcata*, revelador: *p*-hidroxibenzaldeído. Fig. A. Cromatograma das frações do volume morto a 43 com solvente DCM 100%. Fig. B. Frações de 28 a 72, fase móvel DCM/MeOH 2%. Fig. C. Frações de 70 a 94, fase móvel DCM/MeOH 5%. Fig. D. 95 a 114; fase móvel DCM/MeOH 10%.

Os procedimentos cromatográficos, seguidos pela reunião das frações semelhantes e a posterior análise das frações reunidas por CG-EM, permitiu a identificação dos ácidos graxos listados na tabela 2. As identificações foram feitas por comparação com a Biblioteca NIST08, disponível no equipamento.

Tabela 2. Ácidos graxos identificados em extrato em DCM de *Palisada furcata*, fração onde foi encontrado e a área do seu pico.

Nome	Nome comum	Sigla	Fração	Área
Ácido tetradecanoico	Ácido mirístico	C14:0	Pfur I 36-43	0,87%
			Pfur I 44-47	0,11%
			Pfur I 48-51	15,31%
			Pfur 52-55	8,58%
Ácido pentadecanoico		C15:0	Lfur I 44-47	0,59%
			Lfur I 36-43	0,13%
Ácido 9-Octadecenoico	Ácido oleico	C18:1n9c	Pfur I 36-43	12,18%
5,8,11,14-Ácido Eicosatetraenoico	Ácido aracdônico	C20:0	Pfur I 36-43	11,15%
			Pfur I 44-47	0,02%
Ácido 9,12-Octadecadienoico	Ácido linoleico	C18:2n6c	Pfur I 44-47	9,3%
Ácido n-hexadecanóico	Ácido palmítico	C16:0	Pfur I 36-43	
			Pfur I 52-55	4,01%
			Pfur I 57-69	24,95%

Também foram identificados os ésteres citados na tabela 3.

Tabela 3. Ésteres de ácidos graxos identificados no extrato em DCM de *P. furcata*, fração de origem e área do correspondente pico.

Nome	Fração	Área
Éster bis (2-etilexílico) do ácido hexanodióico	P fur 36-43	0,07%
Éster metílico do ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	P fur 36-43	11,53%

Os espectros de massas obtidos e os correspondentes espectros da Biblioteca AOCS (Christie 2013), que permitiram a identificação das substâncias componentes das frações analisadas, estão nas figuras 4-11

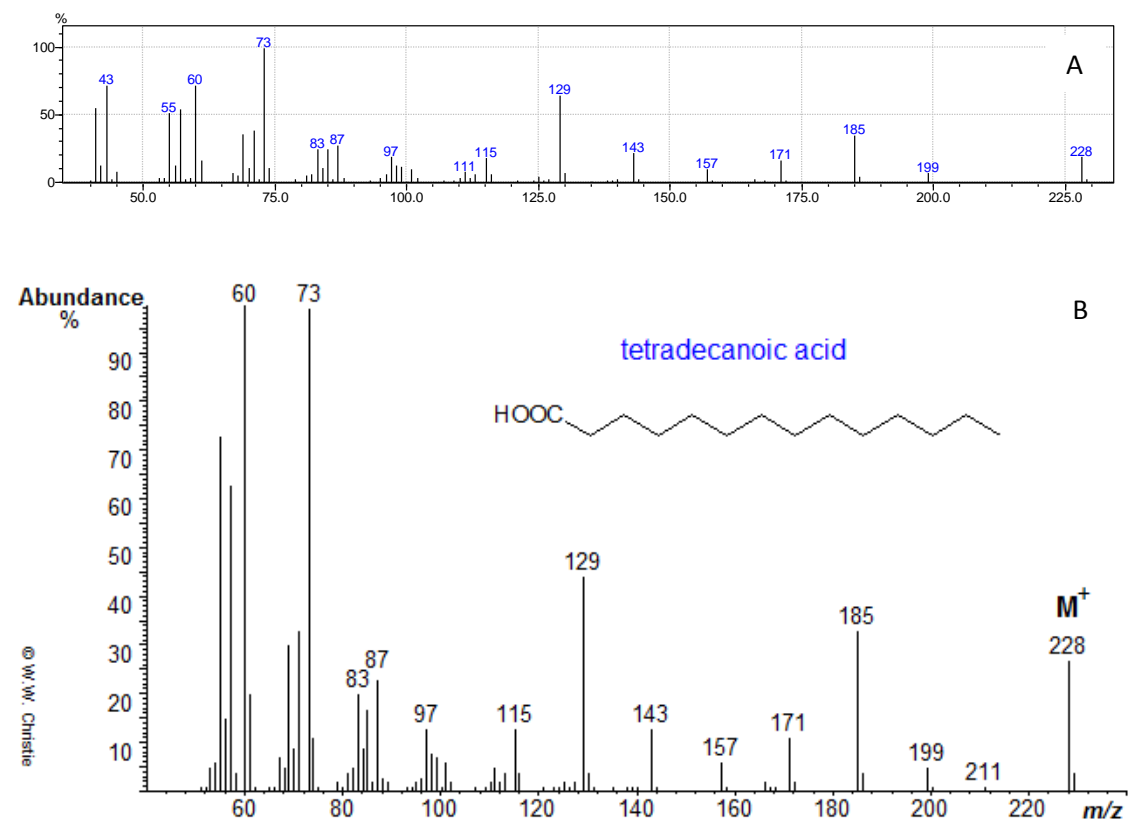
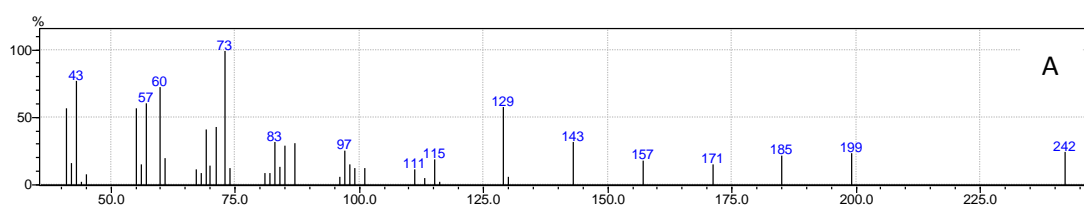


Figura 4. Espectro de massas do ácido tetradecanoico (A) e o espectro de referência (B)



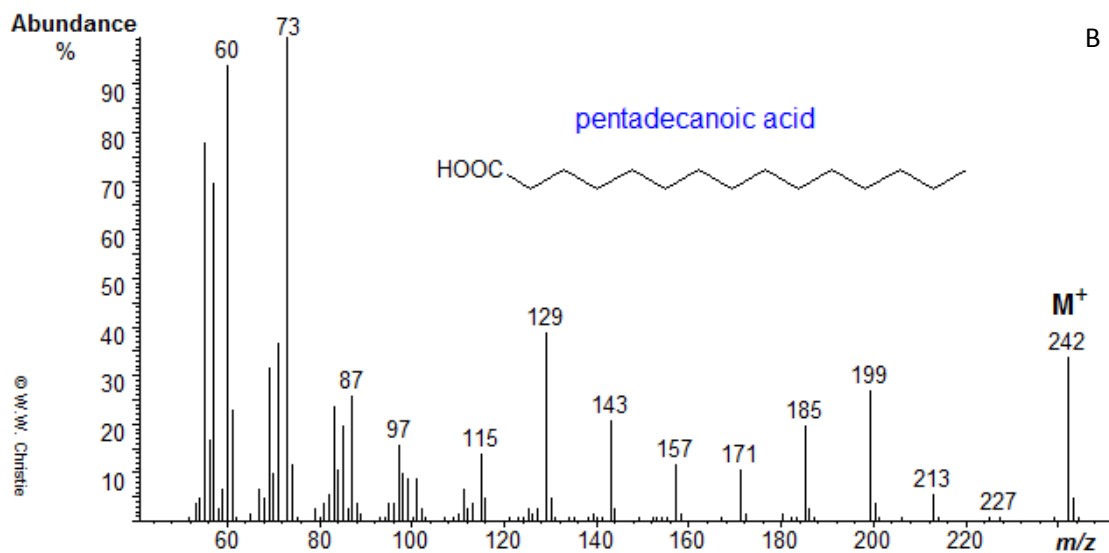


Figura 5. Espectro de massas do ácido pentadecanoico (A) e o espectro de referência (B)

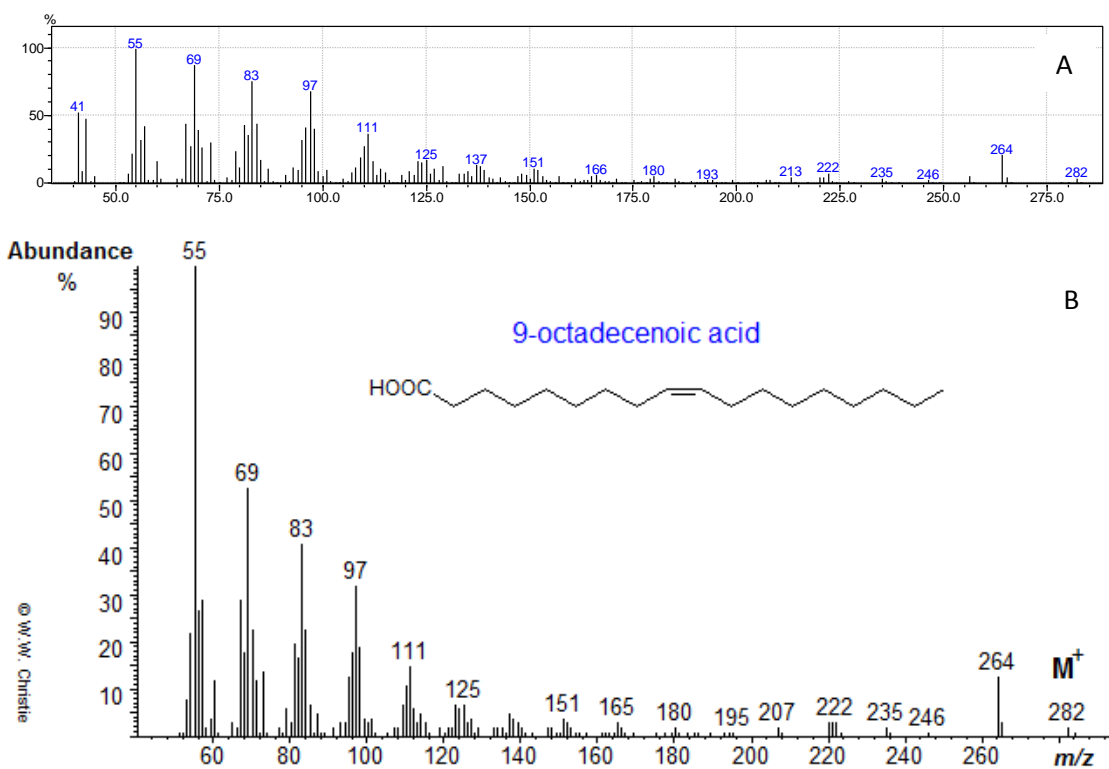


Figura 6. Espectro de massas do ácido 9-octadecenoico (A) e o espectro de referência (B)

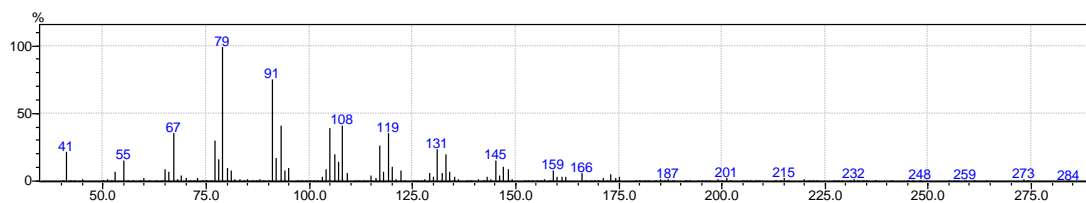


Figura 7. Espectro de massas do ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico

### Ácido 9,12-octadecadienoico

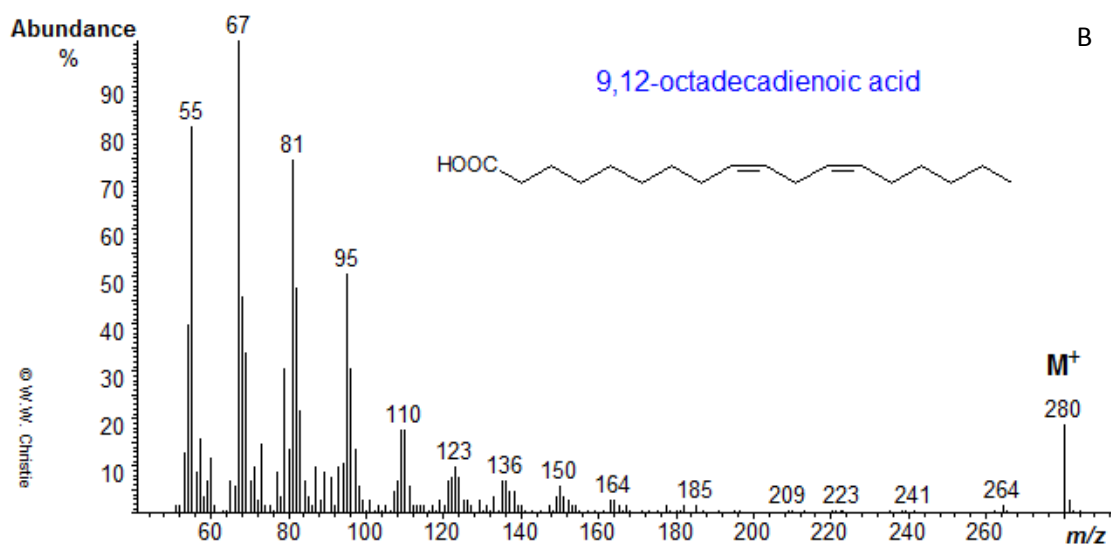
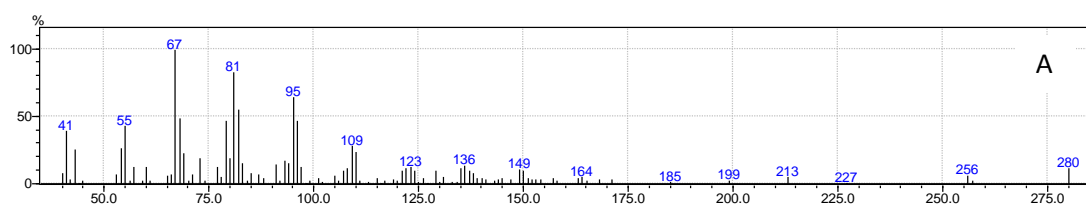
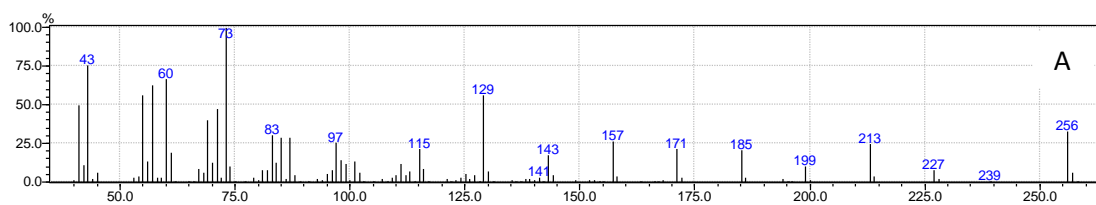


Figura 8. Espectro de massas do ácido 9,12-octadecadienoico (A) e o espectro de referência (B)



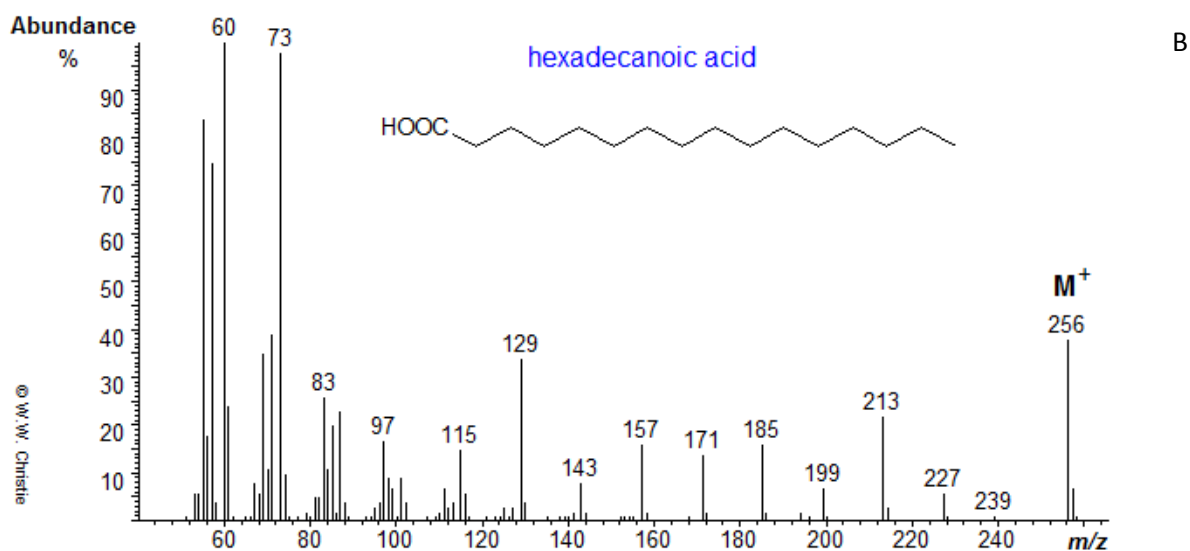
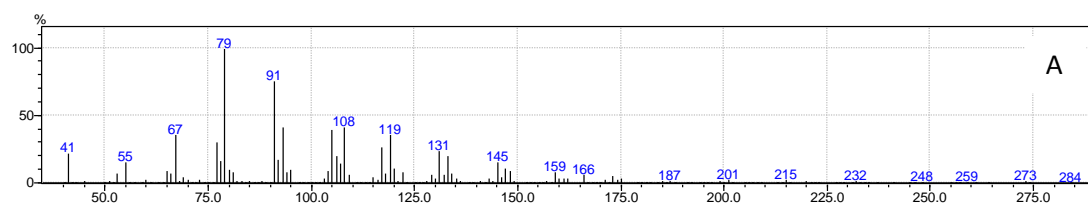


Figura 9. Espectro de massas do ácido n-hexadecanóico (A) e o espectro de referência (B)

### Ésteres de ácidos graxos



B

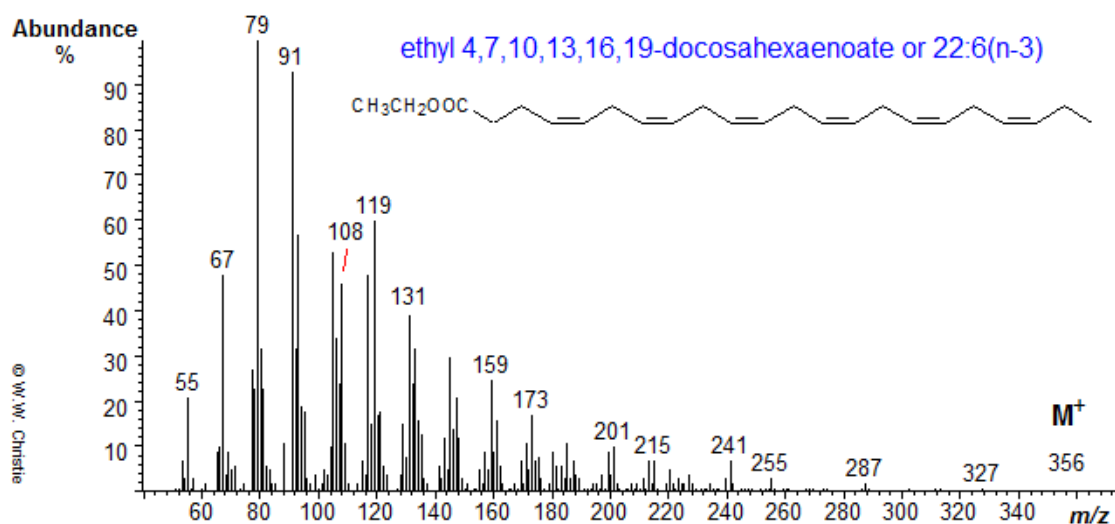


Figura 10. Espectro de massas do éster metílico do ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (A) e o espectro de referência (B)



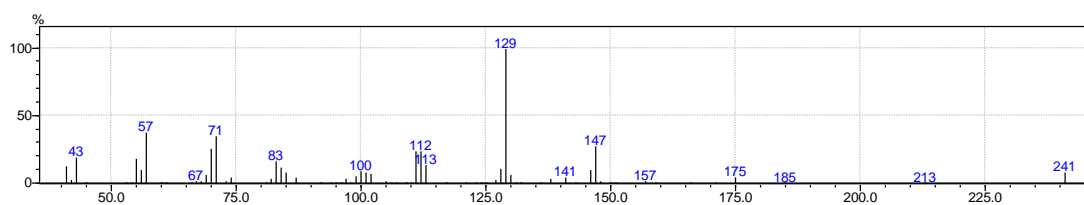


Figura 11. Espectro de massas do éster bis (2-etilexílico) do ácido hexanodióico.

As frações reunidas Pfur I 36-43, devido à quantidade disponível (153,9 mg) e aos resultados de seu estudo por CG-EM, foram submetidas à fracionamento em Sephadex LH-20 (coluna PfurII). O cromatograma desenvolvido com Pfur II 37-45, após derivatização com *p*-hidroxibenzaldeído, mostrou uma única mancha (Figura 12).



Figura 12. Cromatograma da fração Pfur II 37-45, desenvolvido com a fase móvel DCM/MeOH 97:3, v/v e derivatizado com *p*-hidroxibenzaldeído.

Por esse motivo, essa fração foi submetida à estudos por Ressonância Magnética de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e à espectrometria de massas (Figuras 13-17).

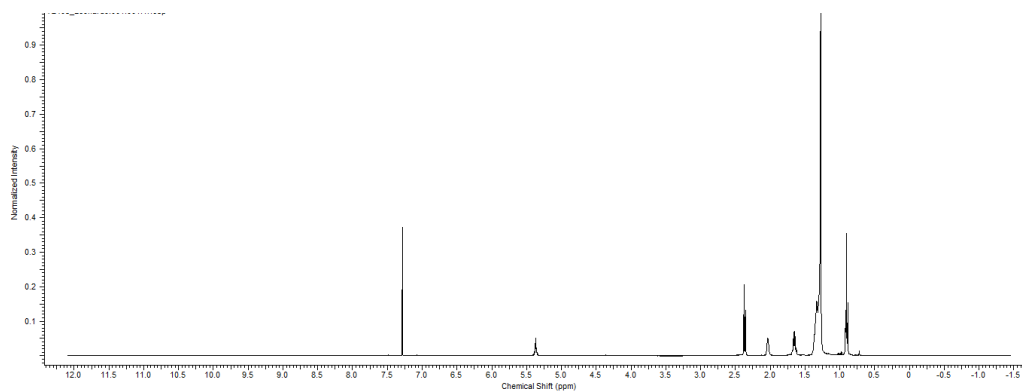


Figura 13. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,) da fração Pfur II 37-45 (em  $\text{CDCl}_3$ ).

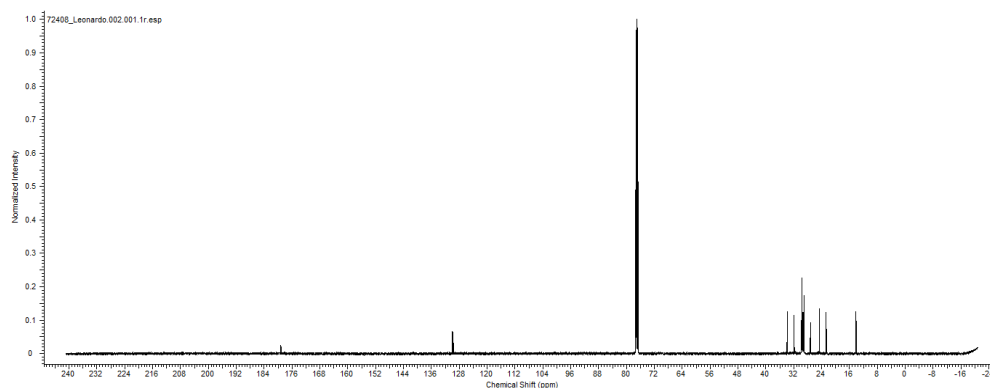


Figura 14. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (500 MHz,) da fração Pfur II 37-45 (em  $\text{CDCl}_3$ ).

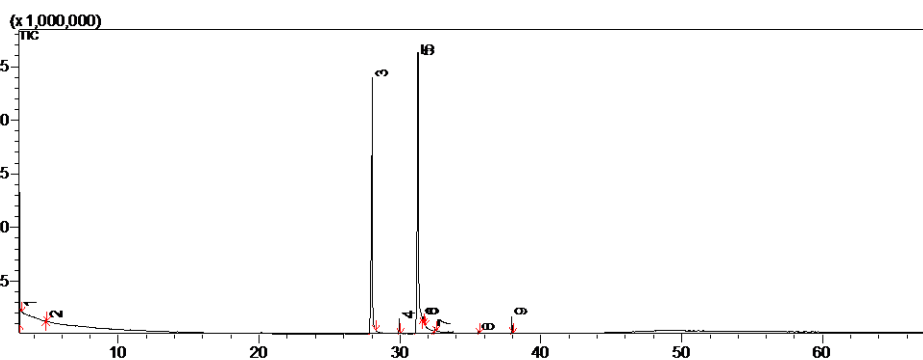


Figura 15. Cromatograma da fração Pfur II 37-45.

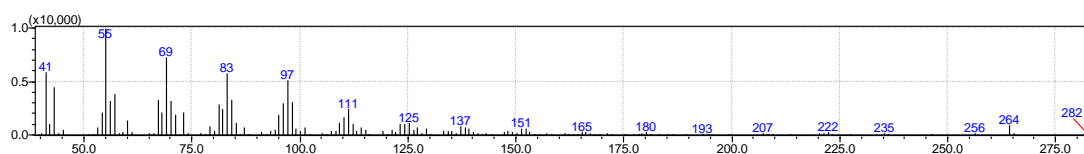


Figura 16. Espectro de massas do ácido oleico obtido da fração Pfur II 37-45.

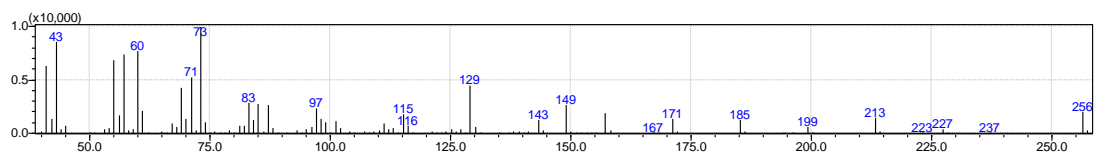


Figura 17. Espectro de massas do ácido palmítico obtido da fração Pfur II 37-45.

Como pode ser observado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Pfur II 37-45 (Figura 13), esta fração é uma mistura de diversas substâncias; em seu espectro de massas (Figuras 15-17) obtidos por CG-EM, aparecem em maior quantidade o ácido oléico ( $M = 282$ , 54,85%) (Figuras 15 -16 e 18) e o ácido palmítico ( $M = 256$ , 39,71%) (Figura 15, 17 e 19).

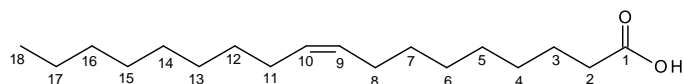


Figura 18. Estrutura do ácido oléico.

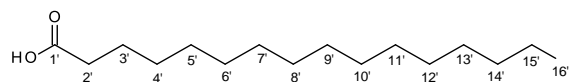


Figura 19. Estrutura do ácido palmítico.

Os sinais observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração Pfur II 37-45 (Figura 13) estão listados na Tabela 4.

Tabela 4. Dados de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz,) da fração PfurII 37-45 (em $\text{CDCl}_3$ ).			
Ácido oleico	Ácido palmítico	$\delta_{\text{H}}$	Multiplicidade
18	16'	0,85–0,91	tripletos (superpostos)
4, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15, 16 e 17	4', 5', 6', 7', 8', 9', 10, 11', 12', 13', 14', 15'	1,22 – 1,30	multipleteo
3	3'	1,60 - 1,65	multipleteo
11, 18		2,00 – 2,03	multipleteo
2	2'	2,32 - 2,38	tripleteo
10, 9		5,32 – 5,37	multipleteo
Deslocamento químico ( $\delta$ ) em ppm			

A figura 14 mostra o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração Pfur II 37-45. Os sinais neles observados estão compilados na Tabela 5.

Tabela 5. Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz,) da fração X (em $\text{CDCl}_3$ ).			
Ácido oleico $\delta_{\text{C}}$		Ácido palmítico $\delta_{\text{C}}$	
C18	14,0	C16'	14,0
C17	22,6	C15'	22,6
C16	32,4	C14''	32,4
C4, C5, C6, C7, C12, C13, C14, C15	28,5 - 29,9,	C4', C5', C6', C7', C8', C9', C10', C11', C12', C13'	28,5 - 29,9
C11	27,2		
C9 e C10	130		
C8	27,2		
C3	24,7	C3'	24,7
C2	34,1	C2'	34,2
C1	180	C1'	180
Deslocamento químico ( $\delta$ ) em ppm			

No espectro de RNM de  $^1\text{H}$  da fração Pfur II 37-45 (Figura 13), os deslocamentos atribuíveis ao ácido oleico podem ser facilmente observados, enquanto que os do ácido palmítico estão encobertos pelos do ácido oleico; neste espectro, a maioria dos picos aparece como multipletes, devido a essa superposição. Os sinais atribuíveis ao ácido palmítico podem ser observados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 14). Todas as atribuições foram feitas com

auxílio dos espectros bidimensionais homonuclear COSY (Figura 20) e do heteronuclear HMBC (Figura 21) e dos dados existentes para os espectros de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  dos ácidos palmítico e oleico YMDB (2012)

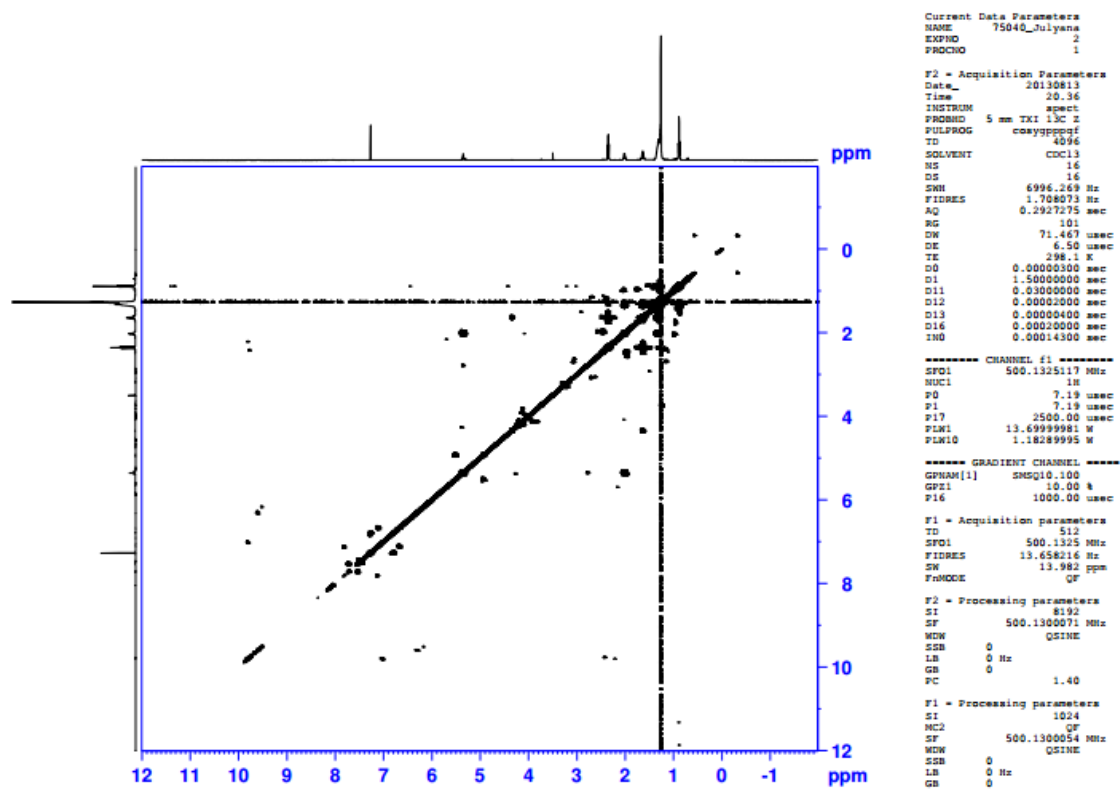


Figura 20. Espectro bidimensional homonuclear COSY da fração Pfur II 37-45

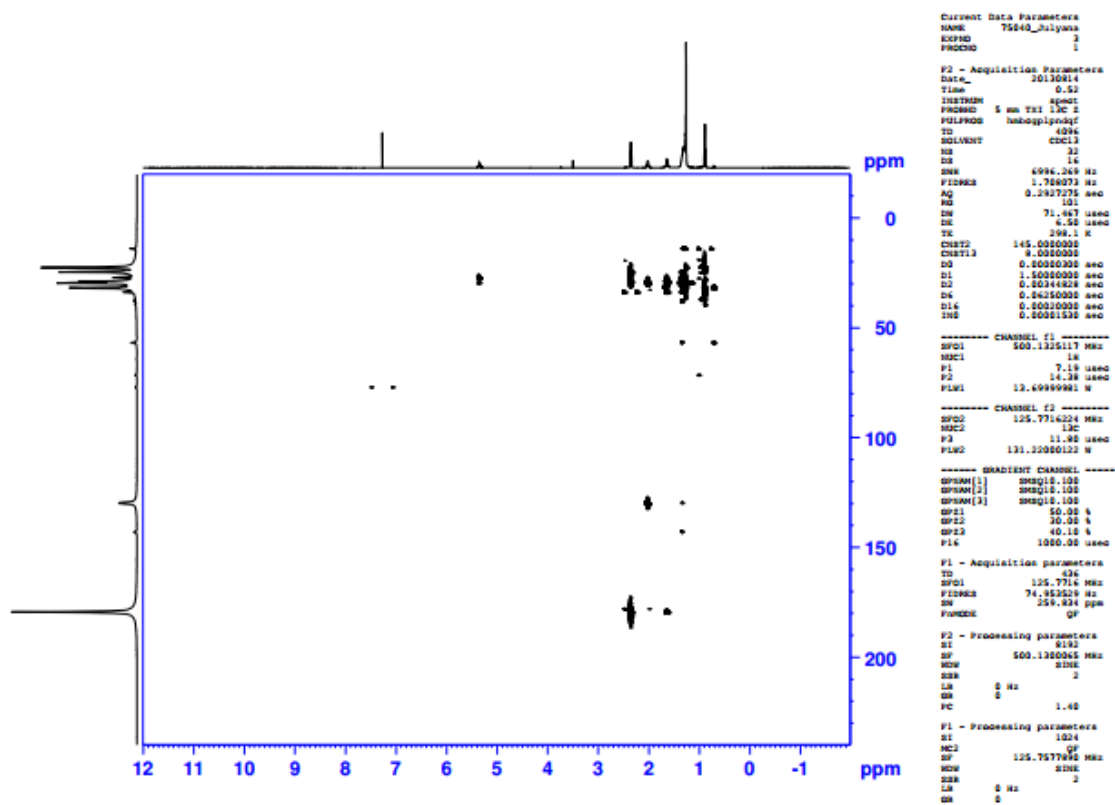


Figura 21. Espectro bidimensional heteronuclear HMBC

Os demais ácidos graxos e ésteres identificados na sequência de fracionamentos e estudos por CG-EM, realizados segundo o esquema mostrado na figura 1, estão reunidos na tabela 6.

Tabela 6 Substâncias identificadas por CG-EM, fração de origem, área do pico, tempo de retenção (TR) e massa ( $m/z$ ).

Substância	Fração	Área (%)	TR (min)	M ( $m/z$ )
Ácido n-hexadecanóico (Ácido palmítico)	PfurII51-55	53,91	27,96	
	PfurV106	36	27,85	256
	PfurVIIeVIII	49,34	27,77	
	Faixa 2			
Ácido tetradecanóico (Ácido mirístico)	PfurII51-55	30,11	23,93	228
Diexadecanoato do ácido ascórbico	PfurV 111	94	28,17	652
Ester bis(2-etilhexil) do ácido hexanedioico	PfurV 115	29	35,57	370
Dioclatato do ácido hexanedioico	Pfur VIIeVII	15,2	35,57	370
	Faixa 5			

Algumas substâncias sintéticas, consideradas poluentes, foram também identificadas (Figuras 22-25).

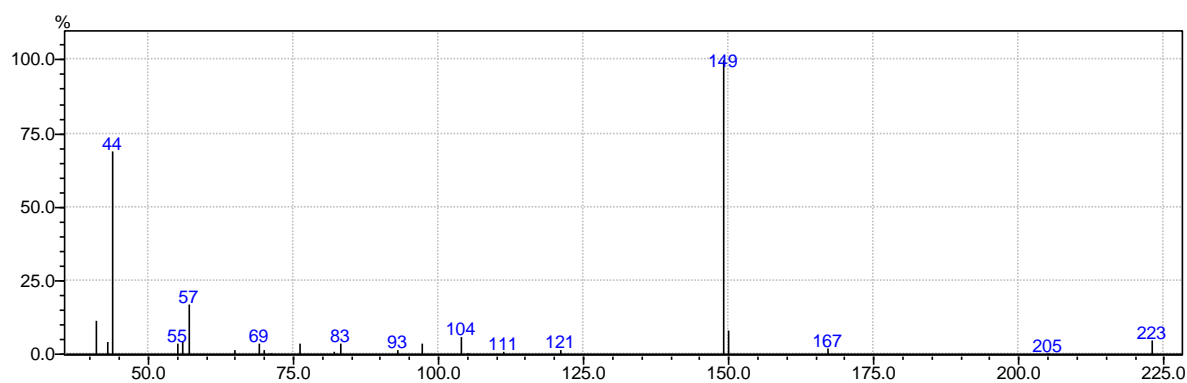


Figura 22. Espectro de massas do éster bis(2-metilpropílico) do ácido 1,2-benzenodicarboxílico

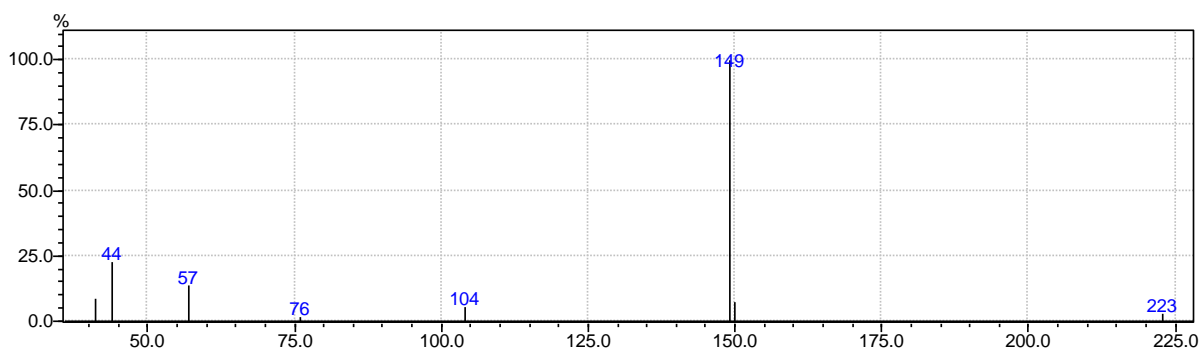


Figura 23. Espectro de massas do éster isobutílico do ácido fitálico

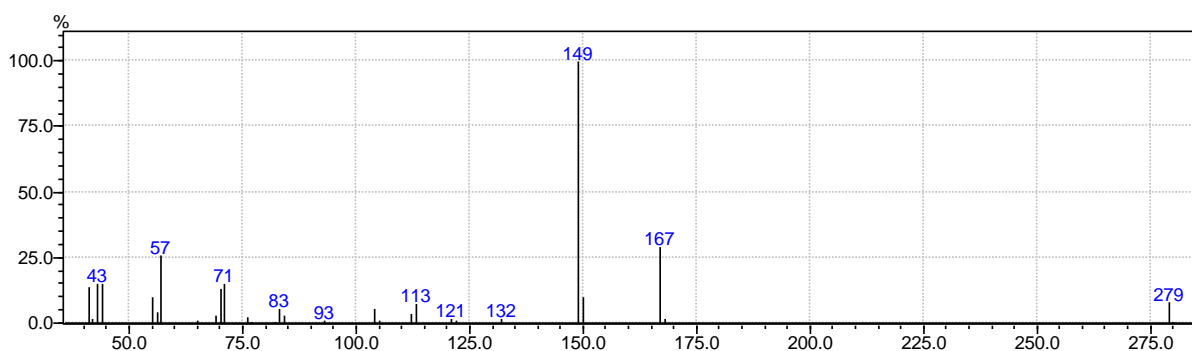


Figura 24. Espectro de massas do éster mono(2-etilhexílico) do ácido 1,2-benzenodicarboxílico

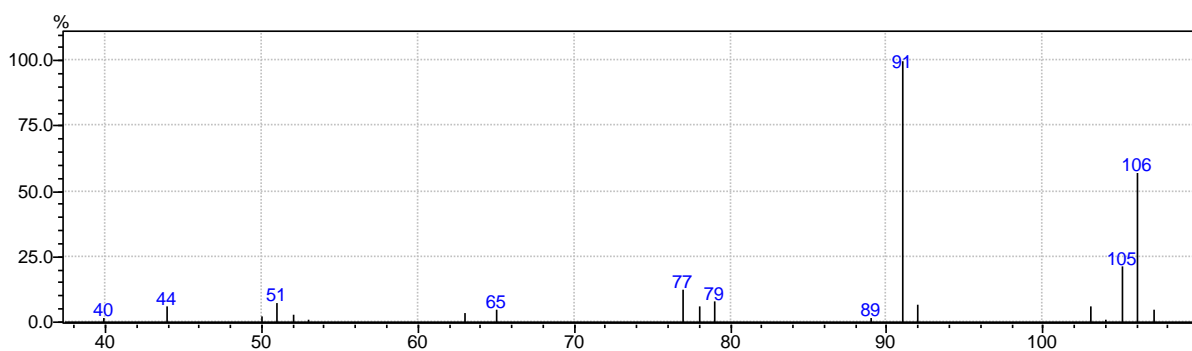


Figura 25. Espectro de massas do 1,4-dimetil-benzeno (*p*-xileno)

Não foram identificados terpenos no extrato em DCM de *Palisada furcata*, mas sim ácidos graxos e alguns de seus ésteres. Este resultado indica ausência de terpenos nesta espécie, o que está em conformidade com os membros do gênero *Palisada* do litoral brasileiro.



Entretanto, a ausência de terpenos não diminui a importância desta espécie, como candidata à bioprospecção, uma vez que as substâncias encontradas também apresentam importantes atividades biológicas (Desbois & Smith 2010).

As figuras 1-11 confirmam a presença dos ácidos mirístico (C:14), pentadecanóico (C15:0), oleico (C18:1n9c), araquidônico (C20:0), linoleico (C18:2n6c) e palmítico (C16:0), listados na tabela 2 e dos ésteres bis (2-etilexilico) do ácido hexanodióico e metílico do ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico, mostrados na tabela 3. Todos esses compostos são comuns entre as algas (Kumari *et al.* 2013) sendo que as algas vermelhas apresentam o ácido palmítico (C16:0) como ácido graxo majoritário (Gnneken 2011, Kumari *et al.* 2013) e *Palisada furcata* enquadra-se nesse padrão. Em fanerógamas, o ácido hexadecanoico (palmítico) está envolvido na proteção contra a dessecação, radiação e herbivoria (Chen *et al.* 2006). Os ácidos hexadecanoico e o tetradecanóico (ácido mirístico) estão entre os ácidos graxos com o maior espectro de atividades antimicrobianas (Mahadkar *et al.* 2013). Segundo Paradas (2013), o ácido palmítico apresenta atividade citotóxica e anti-incrustante.

A presença desses ácidos graxos que possuem distintas e múltiplas atividades descritas por Desbois & Smith (2010) agrega valor comercial a essa espécie de algas marinha vermelha.

## Referencias

- Al-Massarani, M.S. 2014. Phytochemical and biological properties of sesquiterpene constituents from the marine red seaweed *Laurencia*: a review. *Natural Product Chemistry & Research* 2: 147.
- Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P., Pinto, E. 2007. Metabolites from algae with economic impact. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146: 60-78.

- Carvalho, L.R., Farias, J.N., Riul, P., Fujii, M.T. 2015. An overview of global distribution of the diterpenes synthesized by the red algae *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodomelaceae). In: *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications*. Kim, C.K. and Chojnacka, K. (Eds). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 1st ed. 245-266p.
- 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, 2003.
- Carvalho, L.R.; Roque, N.F. 2000. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. *Química Nova* 23(6): 757-764
- Carvalho, R. ; Fujii, M.T., Roque, N.F., Lago, J.H.G. 2006. Aldingenin derivatives from the red alga *Laurencia aldingensis*. *Phytochemistry* 67(13):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 do Estado de São Paulo. São Paulo-SP.
- Cepeda, A.G. 2012. *Metabolitos secundários de Laurencia marilzae*. Tese de doutorado. Estudio de metabolitos secundarios de Rhodophytas y Phaeophytas. Universidad da la Laguna. Santa Cruz de Tenerife, Espanha 348pp.
- Christie, W.W. 2013. The AOCS Lipid Library. Em [http://lipidlibrary.aocs.org/ms/arch\\_xyz/index.htm](http://lipidlibrary.aocs.org/ms/arch_xyz/index.htm) (acesso em 15-12-2014).
- Cimino G., Ghiselin M.T. 2001. Marine natural products chemistry as an evolutionary narrative. In *Marine Chemical Ecology*. McClintock, J.B., Baker, B.J. (eds). CRC, Boca Raton, FL. 115–154p.
- Desbois, A.P., Smith, V.J. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 1629-1642

- Estevam C, Carvalho LR 2002. Estudo químico dos metabólitos secundários de *Laurencia furcata* Cord.-Marino et Fujii (Cerámiales, Rhodophyta). VI Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica. São Paulo, Brazil, p. 32.
- Fenical, W. Norris, J.N. 1975. Chemotaxonomy in marine algae: chemical separation of some *Laurencia* species (Rhodophyta) from the Gulf of California. *Journal of Phycology* 11: 104-108.
- Fernandez, J.J., Souto, M.L., Gil, L.V. & Norte, M. (2005) Isolation of naturally occurring dactylomelane metabolites as *Laurencia* constituents. *Tetrahedron*, **61** (37), 8910-891
- Ginneken, V.J.T., Helsper, J.P.F.G., Visser, W., Keulen, H., Brandenburg, W.A. 2011. Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from north Atlantic and tropical seas. *Lipids in Health and Disease* 10(104): 1-8.
- Gottlieb, O. 1990. Phytochemicals: differentiation and function. *Phytochemistry* 29 (6): 1715-1724.
- Güven, K.C., Coban, B., Sezik, E., Erdugan, H., Kaleağasioğlu, F. 2013. Alkaloids of Marine Macroalgae. In *Natural Products*. Ramawat, K.G., Mérillon, J.M. (eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 25-37p.
- Kumari, P., Bijo, A.J., Mantri, V.A., Reddy, C.R.K., Jha, B. 2013. Fatty acid profiling of tropical marine macroalgae: an analysis from chemotaxonomic and nutritional perspectives. *Phytochemistry* 86: 44–56.
- Mahadkar, S., Valvi, S., Jadhav, V. 2013. Gas chromatography mass spectroscopic (GCMS) analysis of some bioactive compounds form five medicinally relevant wild edible plants. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 6(1): 136-139.
- Mandeo, A.G. 2007. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. *Pharmacognosy Reviews* 1(1): 69-79

- Murai, A. 1997. Biosynthesis of cyclic bromo ethers from red algae. In: *Dynamic aspects of natural products chemistry: molecular biological approaches*. Ogura, T. (Ed). Harwood Academic Publishers, Amsterdam. 209-225pp.
- Paradas, W.C. 2013. *Mecanismos de armazenamento, biossíntese e liberação de metabólitos secundários em macroalgas vermelhas (Rhodophyta)*. Tese de Doutorado. Universidade Federal Fluminense. Niteroi-RJ. 179pp.
- Pereira, R.C. Teixeira, V.L. 1999. Sesquiterpenos das Algas Marinhas *Laurencia* Lamouroux (Ceramiales, Rhodophyta): Significado Ecológico. *Química Nova* 22(3): 369-374.
- YMDB: The Yeast Metabolome Database. Jewison T, Neveu V, Lee J, Knox C, Liu P, Mandal R, Murthy R.K., Sinelnikov I., Guo A..C, Wilson M., Djoumbou Y. and Wishart D.S. 2012. *Nucleic Acids Res.* <http://www.ymdb.ca/> (acesso em 15-05-2015).

# Capítulo 4

## **Avaliação das atividades microbiana e antitumoral dos ácidos graxos de três espécies de *Palisada* (Ceramiales, Rhodophyta) de ambiente tropical brasileiro**

### Introdução

Algas marinhas bentônicas são reconhecidamente profícuas produtoras de moléculas com uma variedade química excepcional que podem ser revertidas em utilidade na saúde humana. Na literatura, há numerosos exemplos de compostos produzidos por macroalgas que apresentam atividades biológicas tais como antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, anticoagulante e antioxidante (Kumaran *et al.* 2010, Rhimou *et al.* 2010; Shalaby 2011; Vijayabaskar & Shiyamala 2012; Liang *et al.* 2014).

Embora possuam baixa quantidade de lipídios, as algas podem produzir importantes ácidos graxos como os da família ômega ( $\omega$ -3 e  $\omega$ -6), os chamados ácidos graxos essenciais, uma vez que o corpo humano não pode sintetizar e precisa obtê-los por meio de dieta (Kumari *et al.* 2013; Mohamed *et al.* 2012). As fontes tradicionais dessas substâncias para dieta são os peixes marinhos. Entretanto, dados apontam um declínio e um futuro extermínio do pescado (Worm *et al.* 2009), aumentando a importância da busca por novas fontes.

Ácidos graxos são comumente encontrados ligados a outros compostos como glicerol, açúcar e grupo fosfato, formando os lipídios. Estes, embora sejam considerados indesejáveis em dietas, teorias modernas de nutrição têm atribuído numerosos benefícios para a saúde humana com a manutenção dos níveis de ácidos graxos em nossos organismos, especialmente os poli-insaturados (PUFA) (Arts *et al.* 2001).

Além da importância nas dietas, os ácidos graxos vem demonstrando atividades biológicas frente a micro-organismos patogênicos ou oportunistas; por estar entre os componentes de membrana podem funcionar como barreira de proteção (Desbois & Smith

2010). Também é observada a influência destas moléculas na inibição do desenvolvimento do câncer. Por exemplo, dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados, ômega 3, possuem propriedades supressoras de tumor (Kato *et al.* 2002, 2007).

Considerando o aumento da resistência de bactérias e fungos a antimicrobianos e ao crescente número de pacientes imunocomprometidos, além da escassez de agentes antimicrobianos eficazes (Norrby *et al.* 2005), é urgente a necessidade de busca por moléculas que possam combater as doenças infecciosas e tumorais. O presente trabalho objetiva avaliar as atividades dos extratos lipídicos das espécies de *Palisada* Nam (Ceramiales, Rhodophyta) coletada na Paraíba, frente às atividades antimicrobiana e antitumoral, uma vez que as características quali e quantitativas dos ácidos graxos variam entre as espécies.

## Material e métodos

### Material

Espécimes de *Palisada flagellifera* (SP468879)(J. Agardh) K.W. Nam, *P. furcata* (SP468880) (Cordeiro-Marino & M.T. Fujii) Cassano & M.T. Fujii e *P. perforata* (SP468881)(Bory de Saint-Vincent) K.W. Nam foram coletadas na praia de Coqueirinho, município de Conde, Paraíba. Cada espécie foi coletada uma única vez. Inicialmente, foram feitas triagens minuciosas para retirada de organismos epibióticos e, em seguida, os materiais foram secos à sombra em temperatura ambiente. Para os testes de atividades biológicas, foram utilizados 3g de material seco de cada espécie.

### Extração de ácidos graxos

A extração de lipídios seguiu o método convencional de Bligh & Dyer (1959) utilizando 1 g de material seco, triturado. Este método baseia-se na extração de ácidos graxos utilizando

clorofórmio e metanol em temperatura ambiente. As amostras foram agitadas durante 30 minutos com um agitador magnético, com 30 mL de clorofórmio / metanol (1: 2 v / v) e 10 mL de sulfato de sódio a 1,5% (m / v). Depois de agitação foram adicionados 10 mL de clorofórmio e 10 mL de sulfato de sódio a 1,5% (m / v). Os extratos foram centrifugados a 3000 rpm (rotações por minuto) durante 30 minutos e, em seguida, a fase orgânica foi recolhida e seca.

Os ácidos graxos extraídos foram metilados e convertidos nos seus respectivos ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAME), de acordo com a metodologia modificada de Moss *et al.* (1974): em um frasco de 100 ml contendo os lipídios foi adicionado 2 mL de solução de NaOH (0,5 mol . L<sup>-1</sup>) em metanol a 2% (m / v) sob agitação e aquecimento a 100 °C, por um período de 5 minutos a partir do início do refluxo. Foram adicionados 3 mL de BF<sub>3</sub> (ácido de Lewis), seguido de agitação por 2 minutos e depois adicionou-se 3 mL de solução de NaCl a 20 % (m / v). A amostra foi deixada em repouso em temperatura ambiente e, em seguida, transferida para um funil separador com 20 mL de hexano. A fase orgânica foi separada em hexano (15 mL) e seca com 2 g de sulfato de sódio anidro. A evaporação do solvente foi realizada com N<sub>2</sub> e a amostra pesada. As amostras foram analisadas em triplicata.

As análises quantitativas em cromatografia gasosa do material derivatizado foram realizadas de acordo com as seguintes condições: cromatógrafo de gás CG / DIC com COA-20i amostrador automático (Shimadzu 2010, Japão) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (Rtx-WAX, com dimensões de 30 m x 0,25 mm DI x 0,25 mm de espessura). As injeções foram realizadas com uma razão de 1:25 e o hidrogênio foi utilizado como gás de arraste no modo de fluxo constante de 1,2 mL / min. O injetor foi aquecido a 250 °C e um detector de ionização de chama operou a 250 °C. Programação de temperatura inicial do forno utilizado foi de 100 °C a 7 °C / min até 200 °C e, em seguida, aumentada a 5 °C min<sup>-1</sup> 223,7 °C, isotérmica durante 2 min a esta temperatura, e depois aumentada para 5 °C min<sup>-1</sup> a 222,9 °C, isotérmica, mantida durante 2 min e, em seguida, aumentada para 230 °C a 5 °C min<sup>-1</sup> e



mantida isotérmica durante 10 min a 230 °C (Tang *et al.* 2013). As identificações foram feitas utilizando padrão FAME Mix 37 (Sigma-Aldrich).

#### Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos ácidos graxos de algas foi determinada utilizando duas bactérias representativas gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC19095 e *Enterococcus faecalis* ATCC4083), duas bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC29214 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027), e seis cepas representativas de cinco espécies diferentes de leveduras (*Candida albicans* ATCC62342 e isolados clínicos de *C. albicans* a partir da cavidade bucal humana (3), *C. parapsilosis*, *C. lipolytica* e *C. famata*). As bactérias e os fungos foram mantidas em ágar Mueller-Hinton e ágar de dextrose de Sabouraud, respectivamente, a 4 °C e foram reativados antes do uso.

#### Teste de microdiluição

O ensaio antimicrobiano para levedura (M27-A3) e para bactérias (M7-A7) foi realizado com o método de microdiluição em caldo, de acordo com as orientações do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI).

As cepas microbianas foram inoculadas por 12h. Colônias foram ressuspensas em solução salina até uma turbidez equivalente ao padrão de McFarland de 0,5. Esta suspensão foi então ajustada para se obter uma concentração de trabalho de  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias (UFC) mL<sup>-1</sup>. Caldo de Mueller-Hinton (BD, Sparks, MD, EUA) e meio RPMI-1640 (Sigma, St Louis, MO, EUA) tamponado a pH 7,0 com MOPS foram usadas para o cultivo e diluindo as suspensões bacterianas e fúngicas, respectivamente. Dimetil sulfóxido (DMSO) foi

usado como um diluente para obter a concentração desejada dos extratos e fármacos de referência.

As amostras diluídas em série foram transferidas em duplicatas para microplacas de 96 poços, e 100  $\mu\text{L}$  de inóculo microbiano foi adicionado para atingir um volume final de 200  $\mu\text{L}$ . As concentrações variaram entre 1 e 500 (1; 1,9; 3,9; 7,8; 13,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os experimentos controle para testar a viabilidade microbiana e esterilidade do meio e do extrato foram também realizados. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h para as bactérias e 48 horas para os fungos. As placas foram lidas antes e após incubação a 630 nm para as bactérias e 590 nm para os fungos. O efeito antimicrobiano foi caracterizado pela CI50, que é a concentração que inibe em 50% o crescimento dos micro-organismos, bactérias ou fungos, comparado ao crescimento do controle. Os valores de CI50 foram determinados a partir de gráficos logarítmicos de inibição do crescimento em função da concentração. Os testes foram realizados em duplicata.

#### Atividade antitumoral

A linhagem de glioblastoma multiforme, grau IV, de rato (C6) foi obtida de ATCC (CCL-107<sup>TM</sup>). As células foram cultivadas em DMEM suplementado com 5% de FBS (soro fetal bovino), pH 7,4, inativado pelo calor. As células foram mantidas numa atmosfera umidificada a 37 °C, em 5 % de CO<sub>2</sub>. O estudo de citotoxicidade foi realizado quando as células atingiram 70-80% de confluência. As células foram semeadas em placas de 96 poços, fundo chato. Após 24h de cultivo da linhagem C6, foram realizados ensaios utilizando o método do MTT - brometo de tetrazólio/azul de tolidina, a fim de verificar a viabilidade celular (Mosmann, 1983).

O extrato lipídico das espécies de *Palisada*: *P. flagellifera*, *P. furcata* e *P. perforata*, bem como as frações da *P. furcata* foram solubilizados em DMSO, obtendo-se uma solução de 10 mg/mL em DMEM 5 %. A partir da solução estoque foram realizadas diluições em DMEM para obtenção de cinco concentrações para a linhagem C6.

As frações testadas foram isoladas do extrato de *Palisada furcata* (SP468882), em DCM, mostrado no capítulo 3 do presente trabalho, aqui nomeadas de A, B e C

#### Fração A

Ácido oleico – 54,85%

Ácido palmítico – 39,71%

#### Fração B

Ácido palmítico – 53,91%

Ácido mirístico – 30,11%

#### Fração C

Ácido palmítico – 49,34%

Antes da aplicação do MTT diluído em 5 % de DMEM, os poços foram lavados com 100 µL de PBS. Após 2h de exposição em atmosfera umidificada a 37 °C, em 5 % de CO<sub>2</sub>, a solução de MTT foi retirada e, ao final, através de um leitor de microplacas a 405 nm, foi verificada a absorbância em cada poço e calculada a percentagem da inibição celular, descontando os controles (DMEM + DMSO).

## Análises dos dados

Os resultados foram expressos em médias e desvio-padrão. Os perfis de ácidos graxos das três espécies estudadas foram comparados entre si por ANOVA. Os testes de atividade microbiana, por não atenderem às premissas para teste paramétricos, foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis. Enquanto os experimentos de atividade antitumoral foram avaliados por ANOVA bifatorial e as múltiplas comparações analisadas pelo teste de Tukey. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

## Resultados e discussão

### Composição de ácidos graxos

A partir de três espécies *Palisada furcata*, *P. perforata* e *P. flagellifera*, dezoito ácidos graxos foram identificados e o perfil desses ácidos graxos em porcentagem de éster é mostrado na tabela 1. Os cromatogramas representativos dos ácidos graxos metilados das espécies são mostrados na figura 1

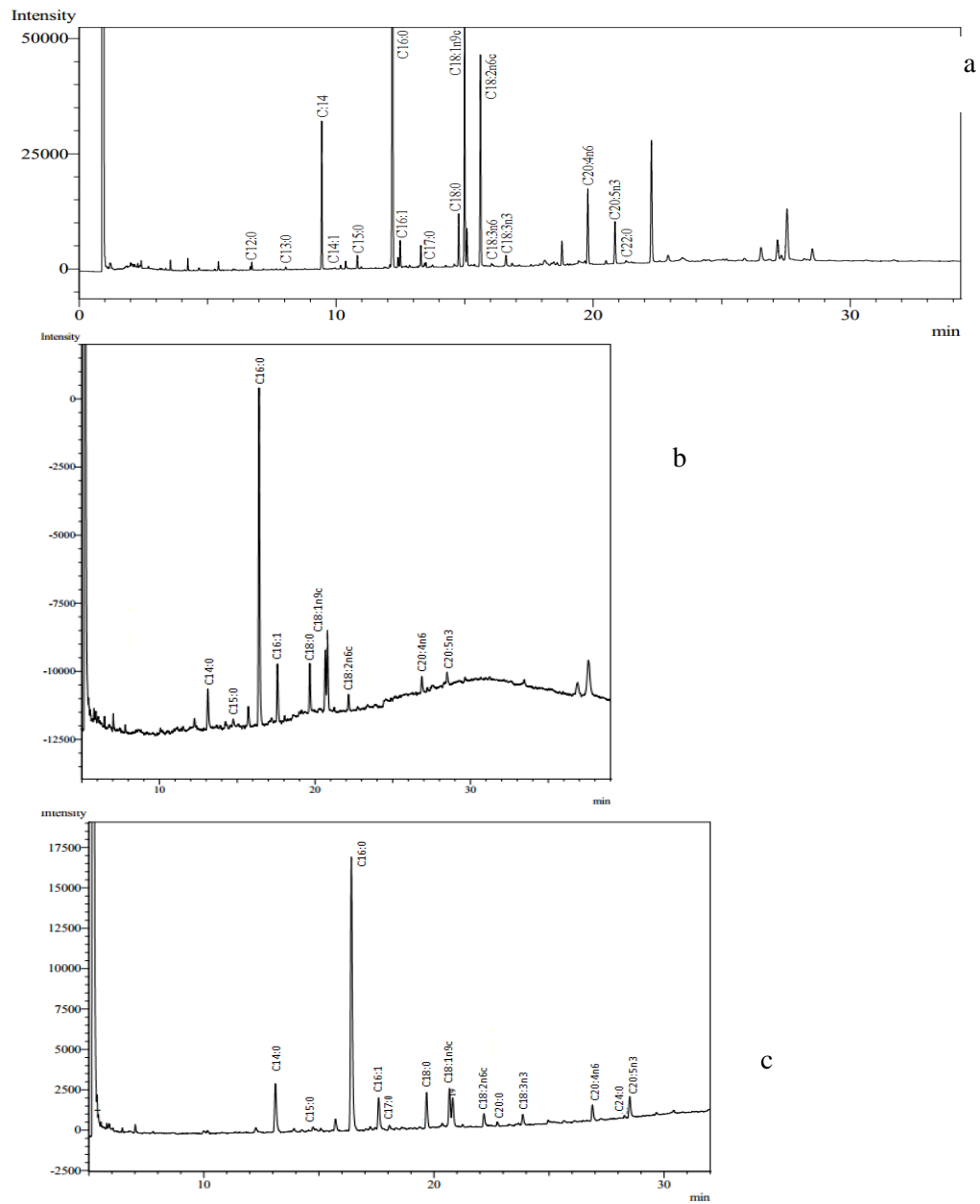


Figura 1. Cromatograma dos ácidos graxos metilados obtidos de *P. flagellifera* (a), *P. furcata* (b) e *P. perforata* (c)

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos nas três espécies de *Palisada* analisadas, em porcentagem de éster.

	Nome comum	<i>P. flagellifera</i>	<i>P. furcata</i>	<i>P. perforata</i>
C12:0	Láurico	0,35±0,02	nd	Nd
C13:0	Tridecanóico	0,19±0	nd	Nd
C14:0	Mirístico	5,44±0,08	5,88±0,21	8,36±0,47
C15:0	Pentadecanóico	0,57±0	1,72±0,05	0,72±0,07
C16:0	Palmítico	33,39±0,07	42,3±0,65	42,15±0,82
C17:0	Margárico	0,3±0,01	nd	0,72±0,09
C18:0	Esteárico	2,26±0,04	7,61±0,05	5,62±0,08
C20:0	Araquídico	nd	nd	0,74±0,04
C22:0	Docosanóico	0,35±0	nd	Nd
C24:0	Lignocérico	nd	nd	1,12±0,08
C14:1	Miristoléico	0,08±0	nd	Nd
C16:1	Palmitoléico	1,22±0	8,33±0,45	5,77±0,09
C18:1n9c	Oléico	11,36±0,04	8,25±0,35	6,34±0,24
C18:2n6c	Linoléico	9,66±0,02	3,28±0,17	2,59±0,04
C18:3n6	γ-linolênico	0,24±0,02	nd	Nd
C18:3n3	α-linolênico	0,8±0,01	nd	2,38±0,09
C20:4n6	Araquidônico	4,23±0,05	3,66±0,32	4,18±0,03
C20:5n3	Eicosapentaenóico	2,48±0,04	3,56±0,16	4,36±0,06
SFAs		42,89±0,22	57,53±0,96	59,45±1,57
MUFAs		12,67±0,04	16,59±0,8	12,12±0,33
PUFAs		17,41±0,14	10,51±0,65	13,53±0,22
PUFAω6		14,14±0,09	6,94±0,49	6,77±0,07
PUFAω3		3,30±0,05	3,56±0,16	6,75±0,15
ω-6: ω-3		4,29	1,95	1,00

SFA=ácidos graxos saturados; MUFA= ácidos graxos monoinsaturados; PUFA=ácidos graxos poli-insaturados; nd=não detectado.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os valores totais de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, de acordo com a ANOVA ( $p=0,6117$ ).

Os mais abundantes foram os ácidos graxos saturados, com 42,8 % *P. flagellifera*, 57,5 % em *P. furcata* e 59,4 % em *P. perforata*. Estes valores correspondem quase inteiramente ao teor de ácido palmítico (C16:0), seguido do ácido mirístico (C14:0). Os outros ácidos graxos saturados foram observadas em traços que, conjuntamente contribuíram com 4-9,3 %. As algas vermelhas tem como ácido graxo majoritário o palmítico (Gnneken 2011; Kumari *et al.* 2013) e este apresenta atividade antibiótica

A melhor quantidade MUFAs foi observada em *P. furcata* com 8,3 % de C16:1 e 8,2 % do  $\omega$ -9 C18: 1n9c (tabela 1). Em *P. perforata* foram observados 5,7 % de C16:1 e 6,3 % de C18:1n9c. Os quase MUFAs de *P. flagellifera* foi  $\omega$ -9 C18:1n9c, C16:1 apareceu com aproximadamente 1% e foi detectado traços de C14:1.

O total de PUFA variou de 10,51 % em *P. furcata* a 17,4 % em *P. flagellifera* e  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 PUFAs contribuíram bastante para estes valores (Tabela 2). Ácido araquidônico (C20:4n6) conta cerca de 4%. Outro C20 PUFA observado foi o eicosapentaenóico (C20:5n3), contabilizado com 3,5 % em *P. furcata*, 4,3 % em *P. perforata* e 2,4 % em *P. flagellifera*. O ácido linoleico (C18:2n6) foi em maior quantidade em *P. flagellifera* com 9,6 %, seguido por *P. furcata* (3,2 %) e *P. perforata* (2,5 %). Traços de ácido  $\alpha$ -linoleico foram detectados em *P. flagellifera*. Nenhum FAs trans foram encontradas em nenhuma espécie. A razão  $\omega$ -6:  $\omega$ -3 obtida foi de 1,9 para *P. furcata*, 1 para *P. perforata* e 4,2 para *P. flagellifera*.

As espécies aqui estudadas mostraram grande quantidade de ácidos graxos saturados, com maior teor de ácido palmítico. Além disso, foi observada alta quantidade de PUFAs (C20:5n3, C20:4n6, C18:2n6c, C18:3n3). Estes resultados encontrados nos perfis das espécies estão de acordo com as observadas anteriormente em algas vermelhas (Kumar *et al.* 2011, Kumari *et al.* 2013).

Os ácidos linoléico ( $\omega$ -6) e  $\alpha$ -linolênico ( $\omega$ -3) não são produzidos pelo corpo humano, sendo obtidos através da dieta. Assim, a carência na alimentação dos mamíferos acarreta problemas fisiológicos (Innis 2004). Dietas ricas em  $\omega$ -6 são características de países ocidentais. O equilíbrio dos ácidos graxos  $\omega$ -6: $\omega$ -3 é importante na diminuição do risco de doenças modernas como as cardíacas, inflamatórias e câncer (Kang 2008, Simopoulos 2008). A OMS (Organização Mundial de Saúde) recomenda a relação  $\omega$ -6: $\omega$ -3 inferior a 10 (Simopoulos 2009), o que foi observado nas espécies estudadas.

Assim, a disponibilidade de PUFA's importantes, como ácido linoléico, ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico, com aplicações biomédicas e nutracêuticas comprovadas, indicam o potencial uso de algas na preparação de alimentos com baixo teor de gordura (Kumar *et al.* 2011). Além disso, a escolha de algas como fonte de FAs pode melhorar a qualidade da dieta e evitar a dependência de fonte tradicional, o que é relevante se considerarmos dois pontos principais: a diminuição da pesca e o fato de que as algas podem ser cultivadas (Arts *et al.* 2001).

#### Atividade antimicrobiana

A partir dos extratos lipídicos testados, foram observados CI50 em duas cepas de bactéria e quatro de fungos, como mostrado na tabela 2.



Tabela 2. CI50 de bactérias gram-positivas (G+) e gram-negativas (G-) e fungos e fármacos de referência, expressos em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

	<i>P. flagellifera</i>	<i>P. furcata</i>	<i>P. perforata</i>	Fluconazol	Tetraciclina	Clorafenicol
<i>Enterococcus faecalis</i> (G+)	-	-	-			
<i>Escherichia coli</i> (G-)	-	-	-			
<i>Staphylococcus aureus</i> (G+)	-	261,4	408,2		< 1	2,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G-)	-	401,1	167,7		< 1	1,92
<i>Candida albicans</i>	-	-	-			
<i>C.albicans</i> isolado clínico 1	-	-	-			
<i>C.albicans</i> isolado clínico 2	-	-	476,2	< 1		
<i>C.albicans</i> isolado clínico 3	-	-	-	< 1		
<i>C. parapsilosis</i> isolado clínico	258,1	16,73	140,8	< 1		
<i>C. lipolytica</i> isolado clínico	35,61	279,1	1,14	< 1		

A estrutura e forma dos ácidos graxos devem influenciar a atividade bacteriana, embora ainda não haja um consenso (Desbois & Smith 2010). Nossos resultados para *Staphylococcus aureus* estão de acordo com o relatado por Feldlaufer *et al.* (1993) e Desbois & Smith (2010), de que os ácidos graxos monoinsaturados que apresentam maior atividade frente a organismos gram-positivos, usualmente têm 14 ou 16 átomos de carbonos. Dentre os extratos testados, o de *P. furcata* apresentou o maior valor. O melhor resultado antibacteriano foi observado no extrato lipídico de *P. perforata* contra a gram-negativa *E. faecalis* ( $160 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Extrato lipídico de *P. furcata* apresentou bons resultados contra *Candida parapsilosis*, com CI50 de apenas  $16,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . *Candida parapsilosis* é uma das espécies mais comuns de fungos causadores de doenças invasivas em todo o mundo, sendo a espécie não-albicans mais comum em alguns países. *C. parapsilosis* é um comensal frequente dos tecidos epiteliais e mucosas (Kuhn *et al.* 2004).

Como os testes foram feitos em extratos, os altos valores de CI50 em relação aos fármacos de referência já eram esperados e testes com isolados podem ser promissores.

#### Citotóxica

A viabilidade das células da linhagem de glioblastoma de rato, C6, nos extratos das espécies de *Palisada* estão mostrados na figura 1. No tratamento antitumoral com extrato de *Palisada flagellifera* foi observada diferença significativa em relação ao controle (C) na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  com exposição de 96h ( $p \leq 0,05$ ). Os melhores resultados foram observados nos tratamentos com extrato de *P. furcata* que, em 72h de exposição, apresentou diferenças significativas em relação ao controle (C) nas concentrações de 50, 100 e  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p \leq 0,005$ ), sendo a inibição do crescimento das células de 42,6; 42,9 e 41,2 %, respectivamente. Com 96h de exposição também foram observadas diferenças significativas entre 50, 100 e  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e o controle ( $p \leq 0,005$ ), bem como com  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $p \leq 0,05$ ). O tratamento com extrato em DCM de *P. perforata* mostrou diferença significativa na concentração de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em

72 e 96h, comparados aos respectivos controles, havendo inibição de crescimento de 25,5 e 24,3 %, respectivamente.

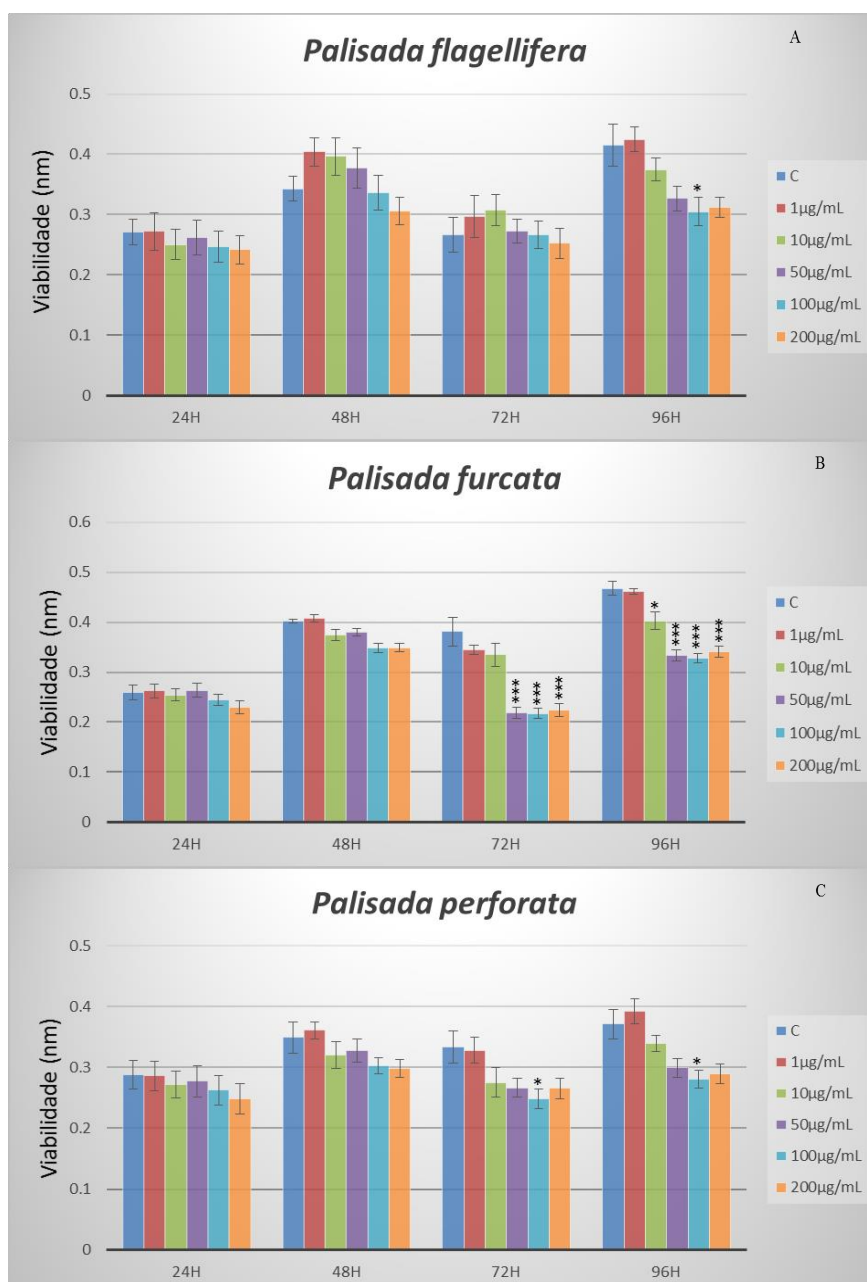


Figura 1. Viabilidade celular do glioblastoma de ratos. A. Tratamento com extrato em DCM de *Palisada flagellifera*. B. Tratamento com extrato em DCM de *P. furcata*. C. Tratamento com extrato de DCM de *P. perforata*. O Controle (C) corresponde a exposição sem nenhum extrato algal.

\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\* $p \leq 0,005$  comparando os tratamentos ao controle (C) correspondente ao mesmo tempo de exposição.

Dentre as espécies estudadas, a que mostrou melhor atividade foi *P. furcata* (figura 1B). Nas concentrações de 50, 100 e 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , com 72h de exposição, apresentaram inibição de crescimento de 37,2, 37,5 e 35,9 %, sugerindo que testes com frações de seu extrato apresentem resultados ainda melhores. De fato, a figura 2 mostra a viabilidade das frações A, B e C nas concentrações 40 e 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em 48 e 72h observa-se diferenças significativas em relação aos respectivos controles, sem drogas (C).

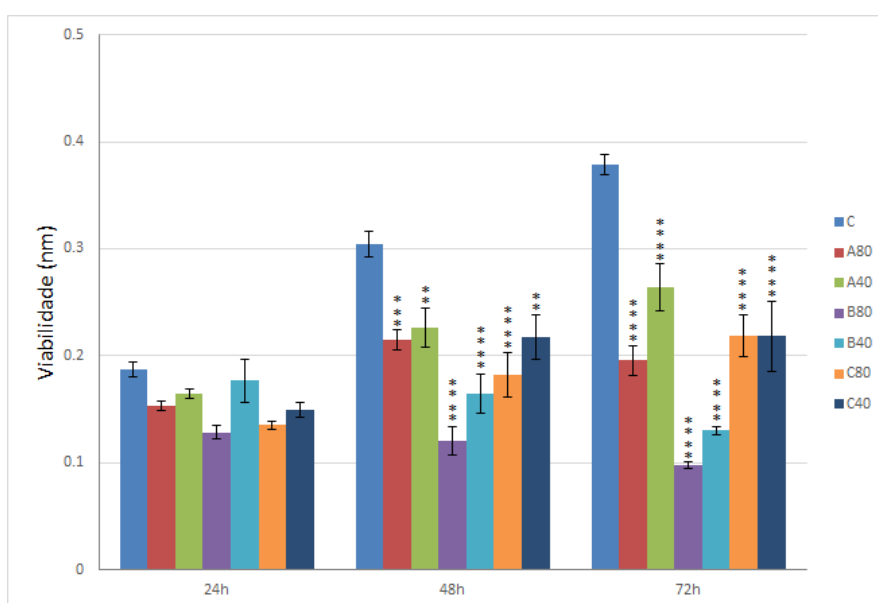


Figura 2. Viabilidade das células C6 quando expostas as frações A, B e C do extrato de *P. furcata* nas concentrações de 80 e 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . \*\* $p \leq 0,005$ ; \*\*\* $p \leq 0,005$  e \*\*\*\* $p \leq 0,0001$  comparando os tratamentos ao controle (C) correspondente ao mesmo tempo de exposição, mas sem exposição à nenhuma fração.

A tabela 3 mostra as porcentagens de inibição de crescimento das células C6 expostas às frações dos extratos.

Tabela 3. Inibição de células da linhagem C6 em relação ao controle

	24h	48h	72h
A 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	17,8% $\pm$ 1,69	29,28% $\pm$ 3,43	48,25% $\pm$ 7,33
A 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	12,05% $\pm$ 1,13	25,41% $\pm$ 4,54	30,14% $\pm$ 5,18
B 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	31,33% $\pm$ 3,9	60,44% $\pm$ 13,8	74,22% $\pm$ 6,3
B 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	5,35% $\pm$ 1,28	45,72% $\pm$ 10,78	65,63% $\pm$ 4,76
C 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	27,71% $\pm$ 2,62	40,13% $\pm$ 9,8	42,1% $\pm$ 7,84
C 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	20,08% $\pm$ 2,28	28,29% $\pm$ 5,82	42,3% $\pm$ 12,96

Embora preliminares, os resultados observados nas frações do extrato em DCM de *Palisada furcata* são bastante significativas, uma vez que glioblastoma é o tumor maligno cerebral mais comum e bastante letal, levando a óbito em 2 anos, aproximadamente, contados a partir do diagnóstico (Antal *et al.* 2014). Dentre as frações, destaca-se a fração B composta por ácido palmítico e mirístico, com os maiores percentuais de inibição.

Os resultados observados com as frações A, B e C, de *P. furcata*, mostram que elas contem promissores quimioterápicos para glioma maligno. As três frações são essencialmente compostas por ácidos graxos comuns nas dietas, sugerindo baixa toxicidade. O quimioterápico que vem sendo usado no tratamento desse tipo de tumor, a Temozolamida apresenta toxicidade moderada-severa (Mason & Cairncross 2005) e, portanto, há grande necessidade de novos fármacos.

## Referências

Antal, O., Hackler Jr, L., Shen, J., Mán, I., Hideghéty, K., Kitajka, K., Puskás, L.G. 2014.

Combination of unsaturated fatty acids and ionizing radiation on human glioma cells: cellular, biochemical and gene expression analysis. *Lipids in Health and Disease* 13:142.

- Arts, M.T., Ackman, R.G. and Holub, B.J. 2001. "Essential fatty acids" in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58: 122–137.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* (37): 911-917.
- Desbois, A.P., Smith, V.J. 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 1629-1642.
- Feldlaufer, M.F., Knox, D.A., Lusby, W.R., Shimanuki, H. 1993. Antimicrobial activity of fatty acids against *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease. *Apidologie* 1993, 24 (2): 95-99.
- Ginneken, V.J.T., Helsper, J.P.F.G., Visser, W., Keulen, H., Brandenburg, W.A. 2011. Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from north Atlantic and tropical seas. *Lipids in Health and Disease* (104): 1-8
- Innis, S.M. 2004. Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 554: 27-43.
- Kang, J.X. 2008. Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio is Important for Health: Lessons From Genetically Modified Cells and Animals. In *Wild-Type Food in Health Promotion and Disease Prevention*, R.R. Watson and F. DeMeester (Eds.) Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Kato, T., Hancock, R.L., Mohammadpour, H., McGregor, B., Manalo, P., Khaiboullina, S., Hall, M.R., Pardini, L., Pardini, R.S. 2002. Influence of omega-3 fatty acids on the growth of human colon carcinoma in nude mice. *Cancer Letters* 187(1-2): 169-177

- Kato, T., Kolenic, N. and Pardini, R.S. 2007. Docosaheptaenoic Acid (DHA), a Primary Tumor Suppressive Omega-3 Fatty Acid, Inhibits Growth of Colorectal Cancer Independent of p53 Mutational Status. *Nutrition and Cancer* 58(2): 178-187
- Kuhn, D.M., Mikherjee, P.K., Clark, T.A., Pujol, C., Chandra, J., Hajjeh, R.A., Warnock, D.W., Soll, D.R., Mahmoud, A. 2004. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerging Infectious Diseases* 10: 1074–1081.
- Kumar, M., Kumari, P., Trivedi, N., Shukla, M.K., Gupta, V., Reddy, C.R.K., Jha, B. 2011. Minerals, PUFAs and antioxidant properties of some tropical seaweeds from Saurashtra coast of India. *Journal of Applied Phycology* 23: 797-810.
- Kumaran, S., Deivasigamani, B., Alagappan, K., Sakthivel, M., Karthikeyan, R. 2010. Antibiotic resistant *Escherichia coli* strains from seafood and its susceptibility to seaweed extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3(12): 977-981.
- Kumari, P., Bijo, A.J., Mantri, V.A., Reddy, C.R.K., Jha, B. 2013. Fatty acid profiling of tropical marine macroalgae: an analysis from chemotaxonomic and nutritional perspectives. *Phytochemistry* 86: 44–56.
- Liang, W., Mao, X., Peng, X., Tang, S. 2014. Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity. *Carbohydrate Polymers* 10: 776-785.
- Mason, W.P., Cairncross, J.G. 2005. Drug insight: temozolomide as a treatment for malignant glioma: impact of a recent trial. *Nature Clinical Practice Neurology* 1: 88–95.
- Mohamed, S., Hashim, S.N., Hafeedza, A.R. 2012. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends in Food Science & Technology* 23: 83-96.

- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Moss, C.W., Lambert, M.A., Merwin, W.H. 1974. Comparison of rapid methods for analysis of bacterial fatty acids. *Journal of Applied Microbiology* (28): 80-85.
- Norrby, S.R., Nord, C.E., Finch, R. 2005. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *The Lancet Infectious Diseases* 5(2) 115-119.
- Rhimou, B., Hassane, José, M., Nathalie, B. 2010. The antibacterial potential of the seaweeds (Rhodophyceae) of the Strait of Gibraltar and the Mediterranean Coast of Morocco. *African Journal of Biotechnology* 9(38): 6365–6372.
- Shalaby, E. 2011. Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signaling & Behavior* 6(9): 1338-1350.
- Simopoulos, A. 2008. The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Experimental Biology and Medicine* 233: 674-688.
- Simopoulos, A. P. 2009. Omega-6/omega-3 essential fatty acids: biological effects. *World Review of Nutrition & Dietetics* 99: 1-16.
- Tang, B., Row, K.H. 2013. Development of gas chromatography analysis of fatty acids in marine organisms. *Journal of Chromatographic Science* 51: 599-607
- Vijayabaskar. P., Shiyamala. V. 2012. Antioxidant properties of seaweed polyphenol from *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh, 1848. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (2011): 90-98.
- Worm, B., Hilborn, R., Baum, J.K., Branch, T.A, Collie, J.S., Costello, C.Fogarty, M.J. Fulton, E.A., Hutchings, J.A., Jennings, S., Jensen, O.P., Lotze, H.K., Mace, M.P. McClanahan,



T.R., Minto, C., Palumbi, S.R., Parma, A.M., Ricard, D., Rosenberg, A.A., Watson, R.,  
Zeller, D. 2009. Rebuilding Global Fisheries. *Science* 325(5940): 578-585

# Capítulo 5

**Primeiro registro de monoterpene para o complexo *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) identificado em compostos voláteis de *Laurencia translucida*, espécie endêmica do litoral brasileiro**

## Introdução

Metabólitos secundários de algas vêm despertando interesse devido as suas múltiplas potenciais aplicações. As espécies que compõem o complexo *Laurencia* J.V. Lamouroux, atualmente constituído por 194 espécies reconhecidas (Guiry & Guiry 2015), e distribuídas em seis gêneros, destacam-se, sobremaneira, pela profusão dos metabólitos que produzem e que podem ou não ter natureza terpenoídica (Fujii *et al.* 2011).

Como compreendido atualmente, o complexo é composto por *Laurencia sensu stricto*, *Osmundea* Stackhouse (Nam *et al.* 1994), *Chondrophyucus* (Takida & Saito) Garbary & J. Harper (1998), (Nam 1999), *Palisada* (Yamada) Nam (2006, 2007), *Yuzurua* Martin-Lescanne (Martin-Lescanne *et al.* 2010) e *Laurenciella* Cassano, Gil-Rodríguez, Senties, Díaz-Larrea, Oliveira & M.T. Fujii (2012). As revisões de Fujii *et al.* (2011), Al-Massarani (2014) e Carvalho *et al.* (2015) mostram que, dos seis gêneros deste complexo, *Laurencia* é, sem dúvida, o maior produtor de terpenos, contabilizando um total de 342 destas substâncias, até o momento.

*Laurencia translucida* M.T. Fujii & Cordeiro-Marino é endêmica em nosso litoral e é a única representante do gênero que não possui *corps en cerise* em células corticais e, segundo a literatura, não produz sesqui- di ou triterpenos (Fujii *et al.* 2011, Paradas 2013). Essa espécie tem como característica a presença de uma camada externa de células menores, translúcidas, com poucos plastídios, em comparação com as células subcorticais, que são maiores e pigmentadas (Fujii & Cordeiro-Marino 1996, Paradas 2013). Na descrição original desta

espécie (Fujii & Cordeiro-Marino 1996) já consta a observação de que os espécimes vivos emitem um cheiro adocicado, informação bastante útil para a sua identificação em campo, uma vez que, morfológicamente, é bastante semelhante à *Laurencia dendroidea* J. Agardh.

Compostos orgânicos voláteis emitidos por algas geralmente são terpenos menores, cujo odor é, na maioria das vezes, bastante agradável. Também podem ser ácidos, fenóis, benzaldeídos, álcoois e substâncias halogenadas e sulfatadas, cujos aromas são desagradáveis (Güven *et al.* 2013). De modo análogo ao que ocorre nas plantas terrestres, essas moléculas voláteis desempenham funções de comunicação na população, na comunidade e no meio-ambiente (Loreto *et al.* 2014).

Estudos químicos e biológicos realizados com esta espécie relatam que seu extrato hexânico apresenta atividade citotóxica frente a células de sarcoma uterino (Stein *et al.* 2011) e anti-incrustante frente ao mexilhão (Da Gama *et al.* 2008) e às microalgas marinhas incrustantes (Paradas 2013) e que seu componente majoritário é o ácido palmítico (Paradas 2013).

O presente estudo visa contribuir para o conhecimento dos constituintes químicos das espécies brasileiras do complexo *Laurencia* e teve como objetivo analisar os compostos voláteis de *L. translucida*, particularmente quanto à produção de terpenos.

## Material e Métodos

*Laurencia translucida* foi coletada na praia de Coqueirinhos, município do Conde, Paraíba, em agosto de 2014. Ainda em campo, um talo com cerca de 2,5g foi acondicionado em uma bolsa plástica à qual foi acoplado um cartucho de extração em fase sólida [C<sub>18</sub> (SPE), 1 mL, Sigma-Aldrich/Supelco]. Com auxílio de um êmbolo ajustado ao cartucho, o sistema foi submetido, manualmente, à sucção, de modo a obrigar os compostos voláteis, que porventura aí existissem, a passarem juntamente com o ar, através da sílica octadecilssilanizada. O

procedimento foi repetido por 100 vezes. No laboratório, imediatamente antes de ser analisado em sistema formado por headspace/CG-MS, o cartucho foi eluído com pentano.

A análise dos voláteis foi realizada em CG-EM-QP2010 Ultra (Shimadzu) e autoinjeter AOC-5000 (Shimadzu), nas seguintes condições cromatográficas: coluna ZB-5MS (Phenomenex), 30 m de comprimento, 0.25 mm de diâmetro interno e 0.25 µm de espessura da camada do filme; temperatura do injetor 150 °C; programação da temperatura do forno de 40 °C à 220 °C (5 °C · min<sup>-1</sup>) e mantida à 220 °C por 10 min; temperatura de interface de 150 °C; temperatura do detector de 150 °C; Hélio como gás de arraste, em fluxo constante de 0,7 mL·min<sup>-1</sup>. Faixa de varredura da massa: 30 a 650 m/z. Headspace com seringa a 50 °C; temperatura de incubação 50 °C, por 5 min. Os espectros de massas obtidos foram comparados com os das bibliotecas NIST08 e Wiley9, disponíveis no equipamento.

O material biológico seguiu para a análise morfológica, para a confirmação da espécie. Foram realizadas secções transversais para a visualização das células corticais translúcidas e consequente identificação em nível específico.

## Resultados e Discussão

As figuras 1-3 mostram as características diagnósticas de *Laurencia translucida* certificando a identificação da espécie.

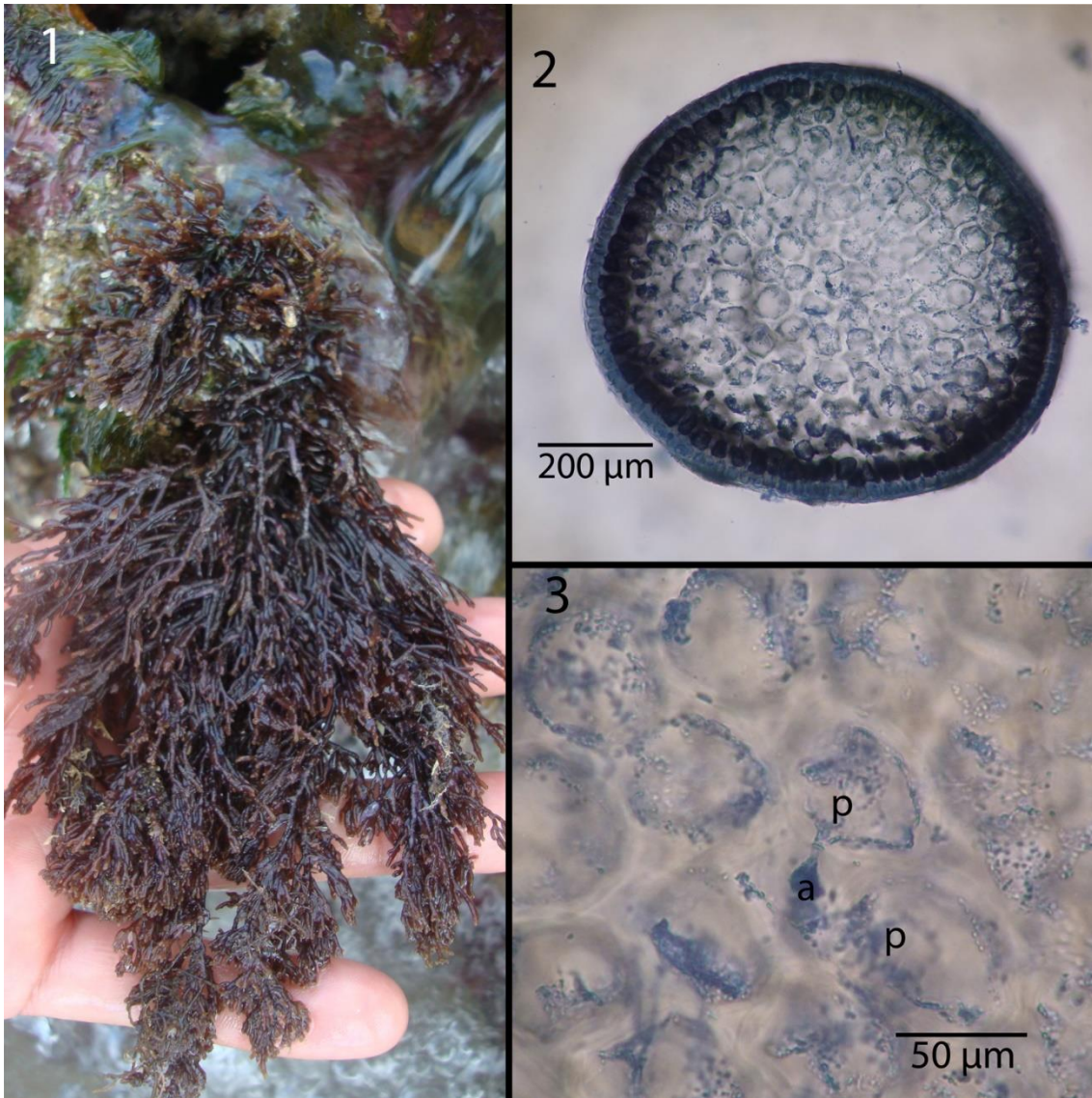


Figura 1-3. *Laurencia translucida*. 1 Aspecto geral do talo. 2. Fotomicrografia da secção transversal, mostrando as células corticais mais externas despigmentadas. 3. Detalhe da célula axial (a) formando duas células pericentrais (p).

O perfil cromatográfico obtido por cromatografia gasosa, desenvolvido com o material volátil capturado de espécimes vivos de *L. translucida* é mostrado na Figura 4.

Os dados de fragmentação resultantes desse estudo estão compilados na tabela 1, com as configurações das moléculas identificadas.

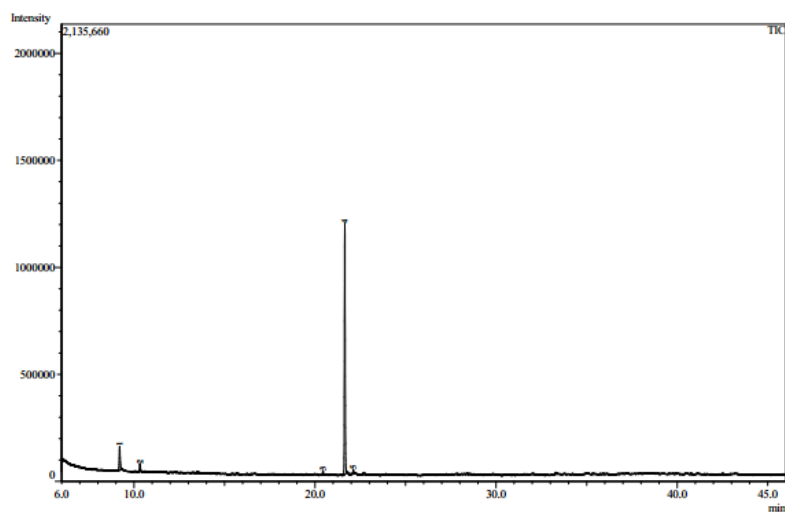


Figura 4. Cromatograma dos compostos voláteis de *Laurencia translúcida*.

Tabela 1. Substâncias identificadas no presente estudo e seus principais dados.

No	Substância	Massa	TR(min)	Principais picos (m/z)	Área	Área (%)	Molécula
1	Canfeno	136	9,209	M <sup>+</sup> 136; (M <sup>+</sup> - CH <sub>3</sub> ) 121; 107; (M <sup>+</sup> - CH-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) 93	383615	9,55	
2	2,2-dimetilheptano(?)	?	10,332	Pico molecular ausente; Pico base: 57(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )	107025	2,66	
3	2-bornanol	154	20,436	Pico molecular ausente (M <sup>+</sup> -18) 136; (M <sup>+</sup> - H <sub>2</sub> O -CH <sub>3</sub> ) 121; 109; [M <sup>+</sup> - CH-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] 93	46824	1,17	
4	Acrilato de isobornila	208	21,644	Pico molecular ausente (M <sup>+</sup> -72) 136; (M <sup>+</sup> - 72 - CH <sub>3</sub> ) 121; 108; M <sup>+</sup> 95	3435467	85,49	
5	Perbenzoato de tert-butila	194	22,115	M <sup>+</sup> 194; 77; 59	45547	1,13	



Além dos espectros de massas obtidos nas bibliotecas Wiley9.lib e NIST08, a caracterização dessas substâncias foi feita por comparação com os dados existentes na literatura (Ryhage & Von Sidow 1963, Budzikiewicz *et al.* 1967, Daniel & Pavia 1971, Brophy & Maccoll 1992, Adams 2001, Yermakov *et al.* 2010).

O espectro de massas da substância **1** (canfeno) é mostrada na figura 5.

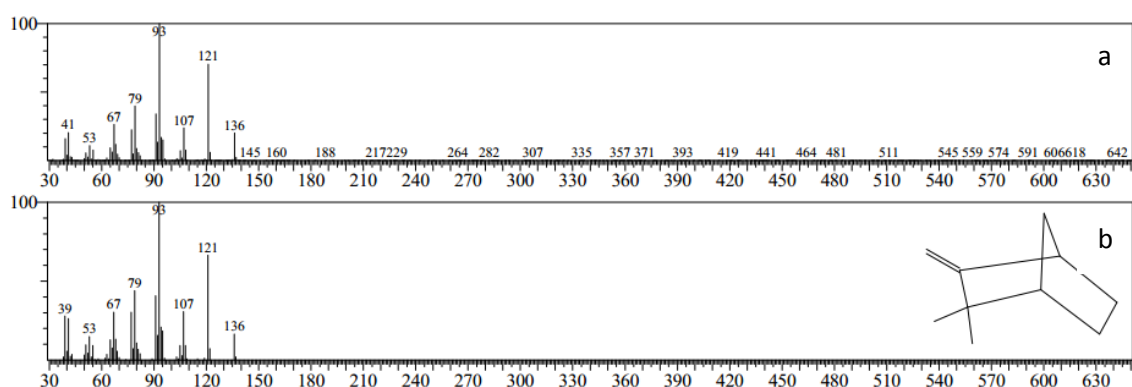


Figura 5. **a.** Espectro de massas da substância **1** (canfeno), eluída em TR = 9.210 min. **b.** Espectro de massas do canfeno, obtido da Biblioteca Wiley9.lib.

O pico base (100%) em  $m/z$  93, segundo os autores Ryhage & Von Sidow (1963) e Keller (2011), forma-se a partir do pico molecular ( $M^+$  136), pela saída do radical isopropílico (fragmento neutro).

No espectro de massas da substância **2**, um hidrocarboneto linear, o pico base [ $m/z$  57] é devido ao íon butílico ( $C_4H_9^+$ ). Entretanto, o espectro não oferece condições para a determinação do tamanho da cadeia desta substância. O fato de ser uma substância volátil indica que sua cadeia não pode ser muito longa (Fig. 6).

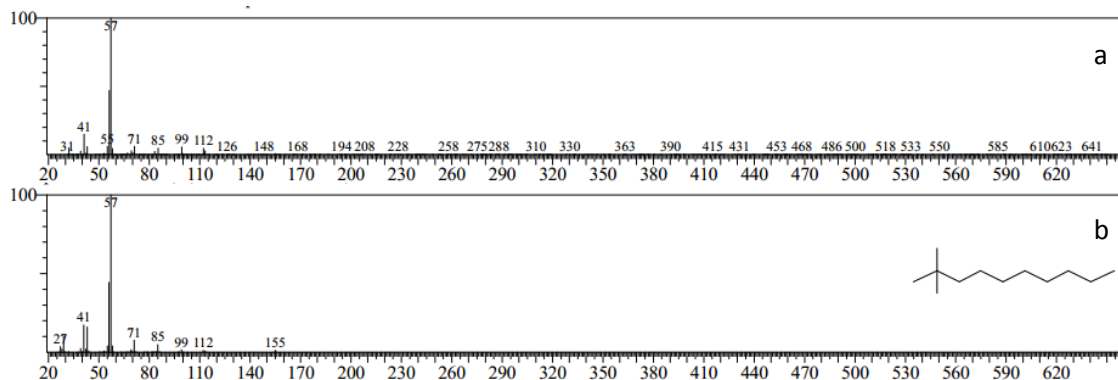


Fig 6. a. Espectro de massas da substância **2** [2,2-dimetilheptano (?)], eluída em Tr 10.33min. b. Espectro de massas do 2,2-dimetildecano (Biblioteca Wiley9.lib).

A figura 7 mostra o espectro de 2-bornanol (substância **3**), para o qual não foi encontrado similar, nas bibliotecas consultadas. Neste espectro, a intensidade do pico em  $m/z$  136 (100%) indica que ele não é o pico molecular, que nos monoterpenos de massa molecular 136 D têm intensidade menor, mas sim resultado de perda de fragmento neutro (Adams 2001).

O estudo sobre monoterpenos monossustituídos, pertencentes à série do bornano, realizado por Daniel & Pavia (1971), mostra que os picos em  $m/z$  93, 109, 121 e 136, são observados durante a fragmentação do 2-bornanol. O pico em  $m/z$  136 corresponde à perda de  $H_2O$  ( $m/z$  18) e os picos em  $m/z$  121 e 93 são derivados de  $m/z$  136 por eliminação de  $CH_3$  e  $C_3H_7$ , respectivamente. Não foi dada explicação para a formação dos picos em  $m/z$  55 e 109.

O 2-bornanol é uma das poucas exceções, entre os terpenos da série do bornano, que não apresenta pico em  $m/z$  95, mas sim em  $m/z$  93. Este pico em  $m/z$  95 é característico desta série de substâncias (Daniel & Pavia, 1971).

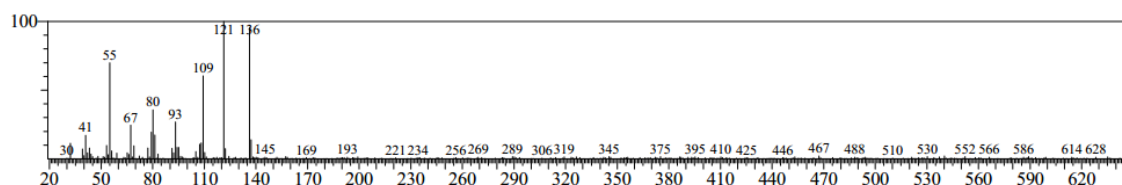


Figura 7. Espectro de massas da substância **3** (2-bornanol), eluída em TR 20.435 min.

A figura 8 mostra o espectro de massas do acrilato de isobornila (substância **4**), caracterizado por comparação com o espectro correspondente da Biblioteca Wiley9.lib. Na quebra do acrilato de isobornila (éster), a molécula sofre um duplo rearranjo de hidrogênios, descrito por Budzikiewicz *et al.* (1967), do qual resulta o íon  $[M - 136]^+$ .

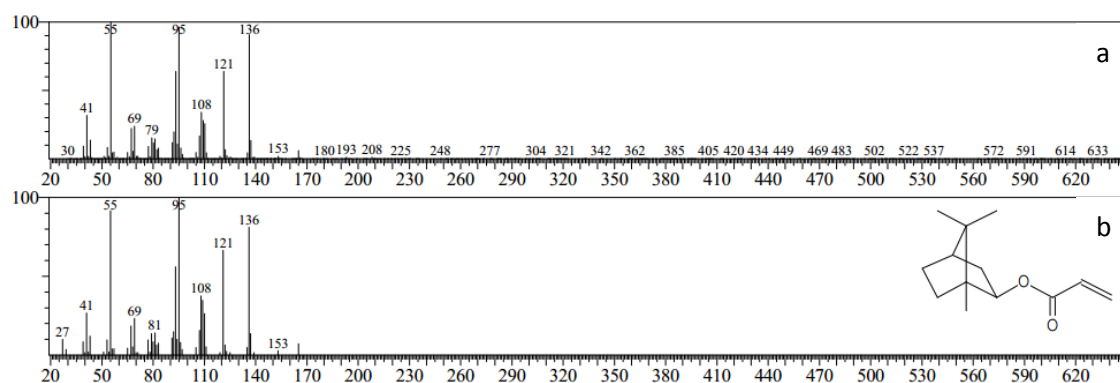


Figura 8. **a.** Espectro de massas de acrilato de isobornila (substância **4**), eluída em TR 21.645 min. **b.** Espectro de massas de acrilato de isobornila (Biblioteca Wiley9.lib).

No espectro de acrilato de isobornila (substância **4**), o pico base em  $m/z$  95, que corresponde ao íon  $[C_7H_{11}]^+$ , é formado pela maioria dos monoterpenos da série do bornano, sendo portanto um indicador bastante útil para a caracterização de uma substância (Dimmel & Wolinsky 1967, Partanen *et al.* 1990, Daniel & Pavia 1971).

A substância **5**, o perbenzoato de tert-butila, cujo espectro encontra-se na figura 9, foi reconhecida por comparação com o padrão da Biblioteca Wiley9.lib.

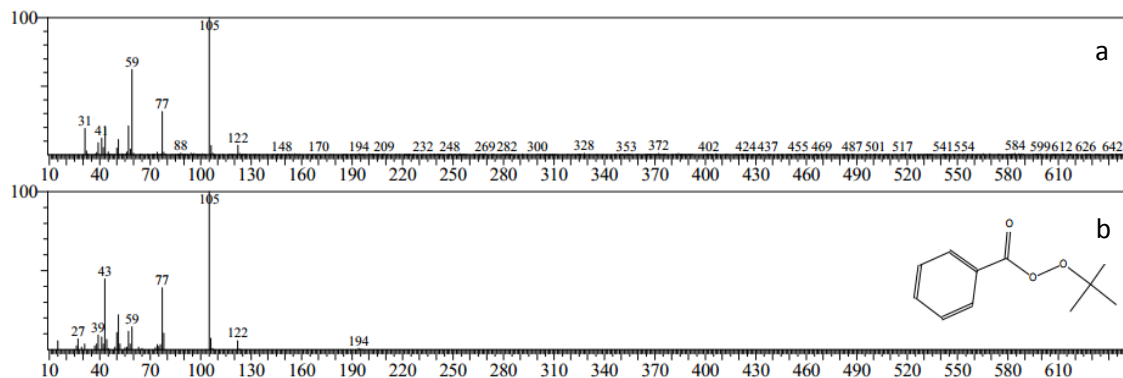


Fig. 9. a. Espectro de massas de perbenzoato de tert-butila (substância **5**), eluida em TR 20.435 min. b. Espectro do padrão perbenzoato de tert-butila (Biblioteca Wiley9.lib).

Dentre as espécies do complexo *Laurencia* que ocorrem no Brasil, *L. translucida* e *Osmundea sanctarum* M.T. Fujii & Rocha-Jorge são as que apresentam células corticais translúcidas, com escassos cloroplastos nessas células (Paradas 2013). Em campo, é possível identificá-las devido ao odor característico, exalado por espécimes vivos, como os descritos por Fujii & Cordeiro-Marino (1996) e Rocha-Jorge & Fujii (2013), respectivamente para *L. translucida* e *O. sanctarum*. Esta característica é bastante útil para a identificação da espécie, apesar de estar presente em outras espécies do complexo *Laurencia*, tais como em *Osmundea pinnatifida* (Hudson) Stackhouse, encontrada nas Ilhas Canárias (Machín-Sánchez *et al.* 2012).

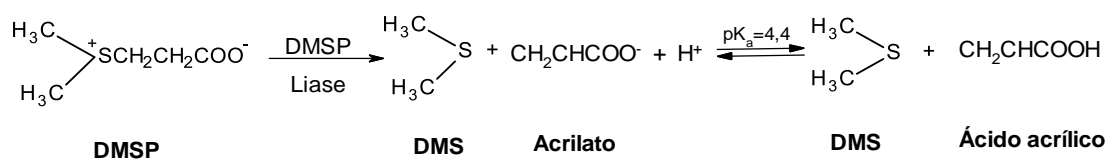
De acordo com os trabalhos filogenéticos realizados sobre o complexo *Laurencia* utilizando o marcador molecular *rbcL*, *L. translucida* agrupa-se com as demais espécies de *Laurencia*, porém geralmente ocupando posição isolada das outras (Fujii *et al.* 2006, 2011). Esta condição é compatível com as características morfológicas apresentadas por esta espécie, que são compartilhadas com vários outros gêneros do complexo, simultaneamente. Embora pertencente à *Laurencia*, *L. translucida* apresenta duas células pericentrais e ausência de *corps en cerise* como em *Chondrophycus*, *Osmundea*, *Palisada* e *Yuzurua* e arranjo paralelo dos tetrasporângios, que é típico de espécies de *Laurencia* e *Laurenciella* (Cassano 2009, Fujii *et*

al. 2011). Em vista disso, Garbary & Harper (1998) haviam transferido a espécie para o gênero *Chondrophycus*, porém com base em resultados da análise filogenética (Fujii *et al.* 2006) mantiveram-na como integrante do gênero *Laurencia*.

Imagens de microscopia eletrônica mostram que as células translúcidas de *L. translucida* apresentam características de alta atividade secretora, a qual foi relacionada à secreção do metabolito majoritário do extrato hexânico, o ácido palmítico (Paradas 2013). Porém, segundo Nagegowda (2010), a enzima responsável pela produção de terpenos localiza-se no retículo endoplasmático e estruturas vesiculares esféricas no citoplasma. As observações destes dois autores, Paradas (2013) e Nagegowda (2010), consideradas em conjunto, sugerem que estas estruturas poderiam estar envolvidas na produção e secreção dos monoterpenos produzidos por *L. translucida*, uma vez que no presente estudo foram identificados três monoterpenos: o canfeno, o bornanol-2 e o isoborneol, este último formando o éster acrilato de isobornila.

O canfeno é encontrado em plantas, estando presente na citronela, na noz moscada e no gengibre e, na indústria, vem sendo utilizado como aromatizante e em fragrâncias (Tiwari & Kakkar 2009). Possui atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória e recentemente foi objeto de estudos relacionados a riscos decorrentes da obesidade e de doenças metabólicas do fígado, com ótimos resultados (Kim *et al* 2014).

O isoborneol também é encontrado em diversas plantas (Sell 2003). O ácido acrílico é produto da reação da quebra do DMSP (dimetilsulfoniopropionato), que ocorre, em situações de estresse, como mostrado no esquema abaixo (Alstyn *et al.* 2001):



Os espectros de massas de um grupo bastante numeroso de monoterpenos, particularmente dos que possuem massa molecular 136 D apresentam valores idênticos para uma série de picos de íons, os quais diferem apenas quanto à intensidade. Isto dificulta sobremaneira a caracterização dessas substâncias, que normalmente é feita com auxílio de bibliotecas e de estudos de fragmentação (Daniel & Pavia 1971, Dimmel & Wolinsky 1967, Adams 2001).

No presente estudo, foram encontrados monoterpenos pela primeira vez no complexo *Laurencia*, e todos eles pertencem à série do bornano. Muitos compostos voláteis são restritos a linhagens específicas e são responsáveis por interações espécie-específicas (Pichersky *et al.* 2006, Pichersky & Gang 2000), podendo tornar-se ferramentas importantes em estudos quimiosistemáticos (Fenical & Norris 1975, Masuda *et al.* 1997). Desta forma, *L. translucida* exibe grande potencial para dar continuidade às pesquisas, visando aplicações biotecnológicas.

## Referências

- Adams RP. 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream: Allured Publishing, Academic Press, Inc. San Diego, California.
- Al-Massarani, M.S. 2014. Phytochemical and biological properties of sesquiterpene constituents from the marine red seaweed *Laurencia*: a review. *Natural Product Chemistry & Research* 2: 147.

- Alstyne, K.L., Wolfe, G.V., Freidenburg, T.L., Neill, A., Hicken, C. 2001. Activated defense systems in marine macroalgae: evidence for an ecological role for DMSP cleavage. *Marine Ecology Progress Series* 213: 53–65.
- Basic, C. Harrison, A.G. 1991. A Mass Spectral Study of Some C<sub>10</sub>H<sub>16</sub> Monoterpenes. *Canadian Journal of Applied Spectroscopy* 36: 33–40.
- Brophy, J.J., Maccoll, A. 1992. Low-energy, low-temperature mass spectra. Part 15: Electron Ionization mass spectra of some monoterpene hydrocarbons. *Organic Mass Spectrometry* 27: 1042-1051.
- Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Williams, D.H. 1967. Mass spectrometry of organic compounds. Holden-Day Inc., San Francisco, 690 p.
- Carvalho, L.R., Farias, J.N., Riul, P., Fujii, M.T. 2015. An overview of global distribution of the diterpenes synthesized by the red algae *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodomelaceae). In: *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications*. Kim, C.K. and Chojnacka, K. (Eds). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 1st ed. 245-266pp.
- 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 da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo-SP. 328 p.
- Cassano, V., Oliveira, M.C., Gil-Rodríguez, M.C., Senties, 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(4): 349-357
- Da Gama, B.A.P., Santos, R.P.A., Pereira, R.C. 2008. The effects of epibionts on susceptibility to herbivory and fouling of the red seaweed *Cryptonemia seminervis*. *Biofouling* 24: 209-218.

- Daniel, A., Pavia, A.A. 1971. Spectrographie de masse em série du bornane I: bornanes monosubstitués. *Organic Mass Spectrometry* 5: 1237-1256.
- Dimmel, D.R., Wolinsky, J. 1967. Preferential methyl eliminations in camphor and isoborneol on Electron Impact. *Journal of Organic Chemistry* 32: 410-416.
- Fenical, W. Norris, J.N. 1975. Chemotaxonomy in marine algae: chemical separation of some *Laurencia* species (Rhodophyta) from the Gulf of California. *Journal of Phycology* 11: 104-108.
- Fujii, M. T., Cassano, V., Sentíes, Abel; Díaz-Larrea, J.; Machín-Sánchez, M. ; Gil-Rodriguez, M. C. 2012. Comparative analysis of the *corps en cerise* in several species of *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) from the Atlantic Ocean. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22:11-21.
- 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. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21(2): 268-282.
- Fujii, M.T., Cordeiro-Marino, M. 1996. *Laurencia translucida* sp. nov. (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil. *Phycologia* 35(6): 542-549.
- Fujii, M.T.; Guimarães, S.M.P.B.; Gurgel, C.F.D., Fredericq, S. 2006. Characterization and phylogenetic affinities of the red alga *Chondrophycus flagelliferus* (Rhodomelaceae, Ceramiales) from Brazil on the basis of morphological and molecular evidence. *Phycologia* 45(4): 432-441.
- Garbary, D.J., Harper, J.T. 1998. A phylogenetic analysis of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae) of the red algae. *Cryptogamie Algologie* 19: 185-200.



- Guiry, M.D. in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2015. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; (acesso em 16-08-2015).
- Güven, K.C., Sezik, E., Kaleağasioğlu, F., Erdugan, H., Coban, B., Karakaş, E. 2013. Volatile Oils from Marine Macroalgae. In *Natural Products*. K.G. Ramawat, J.M. Me´rillon (eds.). Springer-Verlag. 2883-2912p.
- Keller, J. 2011. Eletron impact (EI) fragmentation mechanisms: The case of  $\beta$ -pinene, Chem 324. Department of Chemistry and Biochemistry. University of Alaska Fairbanks. <http://chem.uaf.edu/keller/Courses/324Sp11/PDF/PineneFragmentation.pdf>. (acesso em 23-12-2014).
- Kim, S., Choi, Y., Choi, S., Choi, Y., Park, T. 2014. Dietary camphene attenuates hepatic steatosis and insulin resistance in mice. *Obesity* 22(2): 408-417
- Loreto, F., Dicke, M., Schnitzler, J.P., Turlings, C.J. 2014. Review: Plant volatiles and the environment. *Plant, Cell and Environment* 37: 1905–1908.
- Machín-Sánchez, M., Díaz-Larrea, J., Fujii, M.T., Senties, A., Cassano, V. & Gil-Rodríguez, M.C. 2012. Morphological and molecular evidences within *Osmundea* (Ceramiales, Rhodophyta) from the Canary Islands, eastern Atlantic Ocean. *African Journal of Marine Sciences* 34(1): 27–42.
- Martin-Lescanne, J., Rousseau, F., De Reviere, B., Payri, C., Couloux, A., Cruaud, C. and Le Gall, L. 2010. Phylogenetic analyses of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae, Ceramiales) support recognition of five genera: *Chondrophycus*, *Laurencia*, *Osmundea*, *Palisada* and *Yuzurua* stat. nov. *European Journal of Phycology*, 45 (1): 51-61.

- Masuda, M., Abe, T. & Sato, S. 1997. Diversity of halogenated secondary metabolites in the red alga of *Laurencia nipponica* (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Journal of Phycology* 33: 196-208.
- Nagegowda, D.A. 2010. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Letters* 584: 2965–2973.
- Nam, K.W., C.A. Maggs, C.A., Garbar, D.J. 1994. Resurrection of the genus *Osmundea* with an emendation of the generic delineation of *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). *Phycologia* 33(5): 384-395.
- Nam, K.W. 1999. Morphology of *Chondrophyucus undulata* and *C. parvipapillata* and its implications for the taxonomy of the *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) complex. *European Journal of Phycology* 34: 455–468.
- Nam, K.W. 2006. Phylogenetic re-evaluation of the *Laurencia* complex (Rhodophyta) with a description of *L. succulenta* sp. nov. from Korea. *Journal of Applied Phycology*, 18: 679–697.
- Nam, K.W. 2007. Validation of the Generic Name *Palisada* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Algae*, 22(2): 53–55.
- Paradas, W.C. 2013. *Mecanismos de armazenamento, biossíntese e liberação de metabólitos secundários em macroalgas vermelhas (Rhodophyta)*. Tese de Doutorado. Universidade Federal Fluminense. Niteroi-RJ. 179pp.
- Partanen, T., Mälkönen, P.J. & Vainiotalo, P. 1990. Differentiation of isomeric camphane-2,3-diols by NMR Spectroscopy and chemical ionization mass spectrometry. *Journal of the Chemical Society Perkin Trans 2*:777-782.

- Pichersky, E., Gang, D.R. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science* 5(10): 439-445.
- Pichersky, E., Noel, J.P., Dudareva, N. 2006. Review biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311: 808-811.
- Rocha-Jorge, R., Cassano, V., Barros-Barreto, M.B., Díaz-Larrea, J., Senties, A., Gil-Rodriguez, M.C., Fujii, M.T. 2013. *Osmundea sanctarum* sp. nov. (Ceramiales, Rhodophyta) from the southwestern Atlantic Ocean. *Phytotaxa* 100(1): 41-56
- Ryhage, R., von Sidow, E. 1963. Mass spectra of terpenes. *Acta chemical Scandinavica* 17(7): 2015-2035.
- Sell, C.S. 2003. A fragrant introduction to terpenoid chemistry. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 409 p.
- Stein, E.M., Andregueti, D.X., Sousa, C., Fujii, M.T., Baptista, M., Colepicolo, P., Indig G.L. 2011. Search for cytotoxic agents in multiple *Laurencia* sensu seaweed species (Ceramiales, Rhodophyta) harvested from the Atlantic Ocean zone that bates the Brazilian State of Espírito Santo. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21(2): 239-243.
- Tiwari, M., Kakkar, P. 2009. Plant derived antioxidants – geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-bhp induced oxidative stress. *Toxicology in Vitro* 22(2): 295-301.
- Yermakov, A., Khlaifat, A.L., Qutob, H., Abramovich, R.A., Khomyakov, Y.Y. 2010. Characteristics of the GC-MS mass spectra of terpenoids (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>). *Chemical Sciences Journal* 2010: CSJ-7: 1-10.

## Considerações finais

- Cinco espécies do complexo *Laurencia* foram identificadas para o litoral da Paraíba e Pernambuco: *Laurencia dendroidea*, *L. translucida*, *Palisada flagellifera*, *P. furcata* e *P. perforata*, as quais indicaram fontes potenciais de bioativos importantes.
- Exceto *Laurencia dendroidea*, todas as demais careciam de estudos com abordagens químicas e de atividades biológicas. Com o presente trabalho, o primeiro registro de monoterpenos em espécies do complexo *Laurencia* está sendo feito, identificados como componentes de compostos voláteis em *L. translucida*, uma espécie endêmica do Brasil.
- O perfil químico das espécies estudadas de *Palisada* revelou presença de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, sendo ácido palmítico o majoritário. Os dados obtidos até então sugerem que *P. furcata* não produz ou acumula triterpenos.
- Os extratos lipídicos das espécies de *Palisada* apresentaram atividades contra os fungos, bactérias e células de glioma de rato e caracterizam-se como potenciais fontes de novos fármacos.
- Diante deste cenário, fica patente a importância de dar continuidade à prospecção de novas moléculas com potencial biotecnológico a partir da vasta biodiversidade de macroalgas

disponíveis na costa brasileira, porém de maneira racional e salvaguardando a diversidade, preservando o meio ambiente e garantindo a sustentabilidade, obtendo biomassa de interesse a partir de cultivos.

# Anexo