

CAMILA SILVA DE FIGUEIREDO

**CONTRIBUIÇÃO À QUIMIOTAXONOMIA E FICOQUÍMICA DE
Canistrocarpus cervicornis (Kützinger) De Paula & De Clerck
(DICTYOTACEAE) COLETADA NOS LITORAIS PARAIBANO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

JOÃO PESSOA-PB

2013

CAMILA SILVA DE FIGUEIREDO

**CONTRIBUIÇÃO À QUIMIOTAXONOMIA E FICOQUÍMICA DE
Canistrocarpus cervicornis (Kützinger) De Paula & De Clerck
(DICTYOTACEAE) COLETADA NOS LITORAIS PARAIBANO
E FLUMINENSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para a obtenção do título de Doutor(a) em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacoquímica

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

JOÃO PESSOA-PB

2013

F475c Figueiredo, Camila Silva de.
Contribuição à quimiotaxonomia e fícoquímica de
Canistrocarpus cervicornis (Kützinger) De Paula & De Clerk
(Dictyotaceae) : coletada nos litorais paraibano e fluminense /
Camila Silva de Figueiredo.-- João Pessoa, 2013.
116f. : il.
Orientador: José Maria Barbosa Filho
Coorientador: Josean Fachine Tavares
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. Phaeophyceae. 3. Dictyotaceae.
4. *Canistrocarpus cervicornis*. 5. Diterpenos dolastanos.
6. Secodolastanos.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

CAMILA SILVA DE FIGUEIREDO

CONTRIBUIÇÃO À QUIMIOTAXONOMIA E FICOQUÍMICA DE
Canistrocarpus cervicornis (Kützinger) De Paula & De Clerck
(DICTYOTACEAE) COLETADA NOS LITORAIS PARAIBANO
E FLUMINENSE

Tese aprovada em:05/12/2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Diana Negrão Cavalcanti (UNIFESP)

Profa. Dra. Valéria Laneuville Teixeira (UFF)

Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza (UFPB)

Prof. Dr. Emídio Vasconcellos Leitão da Cunha (UFPB)

Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho (Orientador)

Prof. Dr. Josean Fachine Tavares (Co-orientador)

JOÃO PESSOA-PB

2013

*Aos meus pais, William Valle de Figueiredo e
Maria das Graças Silva de Figueiredo (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, que sempre me guiaram, colocaram pessoas maravilhosas em meu convívio e me mostraram o caminho nos momentos mais angustiantes, não só desta tese, como de toda a minha vida.

Aos meus orientadores, professor Dr. José Maria Barbosa Filho, sempre acolhedor na sua calma e paciência, e acreditando que nosso trabalho com as algas daria certo! E ao professor Dr. Josean Fachine Tavares, pelo apoio em todos os momentos, os conselhos, um exemplo de jovem e talentoso professor.

A professora Dra. Valéria Laneuville Teixeira (UFF), pela contribuição enorme na conclusão deste trabalho, por todos os ensinamentos. Uma mulher admirável, de uma força e rapidez tamanha, capaz de contagiar todos ao seu redor com amor que dedica à ciência, à professora Dra. Diana Negrão Cavalcanti (UNIFESP), pelo apoio quando cheguei na UFF e todos os esclarecimentos, e um agradecimento também ao professor Dr. Joel Campos de Paula (UNIRIO) no auxílio com a taxonomia da alga.

À banca examinadora da qualificação composta pelos professores: Dra. Celidarque da Silva Dias, Dr. Emídio V. Leitão da Cunha e Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza, por disponibilizarem seu tempo na correção e contribuição neste trabalho, e por todos esses anos de convívio agradável no laboratório.

Ao professor Dr. Marcelo Sobral sempre disposto a ajudar quando o procurei com alguma dúvida.

Ao professor Dr. George E. C. de Miranda pela ajuda na coleta e identificação do material, a disponibilidade e a boa vontade de diversas tentativas que fomos a campo e não conseguimos, mas sempre disposto a voltar ao mar para conseguimos coletar nossa alga.

A minha família querida: meu pai, minha “boadrasta”, minhas irmãs, minha avó e, em especial, ao tio Wilson, tia Leyr, e primos Fabiana, Alessandra e Caio que me acolheram durante os seis meses que fiquei fazendo experimentos na UFF de Niterói-RJ. Vocês foram a força divina em minha vida! Amo vocês!

Ao meu querido e amado Bruno Lucena e sua família por todo apoio, carinho, compreensão e incentivo nos meses de ausência física.

Aos alunos de Iniciação Científica Diego Igor (hoje mestrando da PgPNSB) e Ana Letícia, meninos maravilhosos, dispostos e muito caprichosos na bancada.

Aos amigos que a pós me presenteou: Ana Silvia Suassuna, Analúcia Cabral, Carol Siqueira, Daysianne Lira, Denise Casimiro, Fábio Tenório, Hellane Lucena, Isis Fernandes,

Jaqueline Iris, Madalena Teles, Marianne Guedes, Paula Ferreira, Rafaela Soares, Sara Madeiro, Thaisa Rolim, Vivianne Marcelino, por todos os almoços, as risadas, as conversas, as placas e os solventes emprestados, enfim, pela amizade (essa palavrinha resume tudo!).

Aos meus queridos e eternos amigos Carminha Alustau, Karine Queiroga e Thyago Moreira pelos conselhos, pela torcida, por compartilhar momentos importantes sempre comigo.

Aos colegas de turma da pós e do laboratório, pelos bons momentos dentro e fora das salas de aula. Agora que nós vamos nos afastar, tomara que a vida nos faça reencontrar em alguma UF por esse Brasil afora.

Aos homens do laboratório: Vicente Carlos, Marcelo “Manso” (hoje professor da UFS), Raimundo Nonato, Sócrates Golzio, Alexsandro Marinho, sempre prontos a ajudar e tornar nossos dias mais leves com alguma brincadeira na ponta da língua.

Ao pessoal do ALGAMAR/UFF, pessoas muito receptivas, de bem com a vida, foi muito bom trabalhar com vocês: Carol Barros, Michelle Marchezan, Natália Noenta, Lívia, Ana Carol, Samara, Carlos Brito e Caio Richter. Sinto saudades! Obrigada pelo acolhimento, companheirismo e todo o apoio que me deram no laboratório no período que fiquei em Niterói.

Ao LMCA/UFPB e ao Laremn/UFF, pela obtenção dos espectros das substâncias isoladas.

Aos coordenadores da Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da UFPB, professora Dra. Fátima Agra e professor Dr. Josean Fachine. Aos funcionários da secretaria, especialmente Caroline Manguiera, com quem eu tive mais contato, pelos excelentes esclarecimentos prestados, pela simpatia e agilidade.

A todos os professores da Pós pelos ensinamentos e a todos que fazem a PgPNSB: professores, alunos, administrativos, pessoal da limpeza, da segurança, todos que tornam possível a realização de nossos trabalhos.

A Universidade Federal da Paraíba por permitir minha formação desde a graduação, onde conheci professores que fizeram a diferença em minha vida.

Ao Instituto Nacional em Ciência e Tecnologia em Ambientes Marinhos Tropicais (INCT_AmbTropic), pelo auxílio financeiro, e à Capes pela bolsa concedida.

Enfim, à todos que contribuíram para a concretização deste trabalho,z

Meu Muito Obrigada!

RESUMO

A biodiversidade marinha apresenta-se como uma fonte promissora de novas substâncias com grande potencial biológico. Dentre os diversos organismos que habitam o ambiente marinho, merecem destaque as algas pardas pertencentes à família Dictyotaceae e gênero *Canistrocarpus*. Este gênero foi instituído recentemente, e algumas algas anteriormente denominadas *Dictyota* foram reclassificadas como *Canistrocarpus*. O presente trabalho descreve os resultados do estudo ficoquímico de *Canistrocarpus cervicornis* (anteriormente classificada como *Dictyota pulchella*), envolvendo a avaliação do perfil ficoquímico de *C. cervicornis* coletada no litoral da Paraíba e no litoral do Rio de Janeiro. Este estudo contribuiu para a correta denominação da então *D. pulchella* em *C. cervicornis*. As amostras da alga foram coletadas na Praia do Bessa (coordenadas 07°04'01'' S e 34°49'35'' W) na cidade de João Pessoa (PB), em agosto de 2010 e em dezembro de 2012. A secagem foi realizada a temperatura ambiente, em local arejado e a extração procedida com CH₂Cl₂:MeOH (2:1). O extrato resultante da primeira coleta foi submetido a uma filtração a vácuo em sílica gel com os solventes hexano, acetato de etila e metanol em gradiente crescente de polaridade. A fração hexano:acetato de etila (85:15) foi submetida a cromatografia em coluna, de onde se obteve um novo produto natural, o diterpeno dolastano 4,7-diacetoxi de dichotenona A. O extrato resultante da segunda coleta foi dividido em duas partes. Uma alíquota foi submetida à cromatografia em coluna, de onde se obteve o diterpeno dolastano conhecido 4-acetoxi-14-hidroxidolasta-1(15),7,9-trieno. A segunda alíquota do extrato foi acetilada e submetida a cromatografias em coluna, o que levou ao isolamento de três diterpenos, sendo um dolastano inédito na literatura, o 4-desoxi-amijidictyol e dois secodolastanos conhecidos, o acetato de isolinearol e o indicol. Os constituintes químicos isolados foram identificados por análises espectroscópicas de RMN ¹H e ¹³C uni e bidimensionais, rotação ótica, e comparação com dados da literatura. Este estudo contribuiu para a quimiotaxonomia da tribo Dictyoteae, em especial de *C. cervicornis*.

Palavras-chave: Phaeophyceae. Dictyotaceae. *Canistrocarpus cervicornis*. Diterpenos dolastanos. Secodolastanos.

ABSTRACT

Marine biodiversity is presented as a promising source of new substances with high biological potential. Among the many organisms that inhabit the marine environment, we stress the brown algae belonging to the family Dictyotaceae. Genus *Canistrocarpus* was recently established, and some algae *Dictyota* formerly were reclassified as *Canistrocarpus*. This work describes the results of the phycochemical study of *Canistrocarpus cervicornis* (formerly classified as *Dictyota pulchella*), and the evaluation of the phycochemical profile of *C. cervicornis* collected on the coast of Paraíba and the coast of Rio de Janeiro, which contributed to the correct name of *Dictyota pulchella* as *Canistrocarpus cervicornis*. Alga samples were collected at Bessa Beach (coordinates 07°04'01 " S and 34°49'35 " W), city of João Pessoa (PB) in August 2010 and December 2012. The material was dried at room temperature and extraction was performed with CH₂Cl₂ : MeOH (2:1). The material was dried at room temperature in fresh air and extraction was performed with CH₂Cl₂: MeOH (2:1). The extract obtained the first collection was subjected to vacuum filtration on silica gel with solvent hexane, ethyl acetate and methanol in increasing gradient of polarity. The fraction hexane : ethyl acetate (85:15) was subjected to column chromatography yielded one new natural product, the dolastane diterpene 4,7-diacetoxy dichotenone A. The extract resulting from the second collection was divided in two parts. The first part was subjected to column chromatography resulted in the isolation of a known dolastane diterpene, 4-acetoxy-14-hidroxydolast-1(15),7,9-triene. A second aliquot of the extract was acetylated and subjected to column chromatography, which led to the isolation of three diterpenes, one dolastane unpublished in the literature, 4-desoxy-amijidictyol and two known secodolastanes, isolinearol acetate and indicol. Chemical constituents isolated were identified by spectroscopic methods ¹H and ¹³C-1D and 2D NMR, optical rotation and comparison with literature data. This study contributed to the chemotaxonomy of the tribe Dictyoteae, especially *C. cervicornis*.

Keywords: Phaeophyceae. Dictyotaceae. *Canistrocarpus cervicornis*. Dolastane diterpene. Secodolastane.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Proposta biossintética para os diterpenos de Dictyotaceae	30
FIGURA 2. Foto de <i>C. cervicornis</i>	31
FIGURA 3. Espectro de IV de D-1(pastilha de KBr)	54
FIGURA 4. Espectro de RMN ^1H de D-1 (CDCl_3 , 500 MHz)	55
FIGURA 5. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-1 na região entre 1,90 e 0,80 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....	55
FIGURA 6. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-1 na região entre 2,85 e 2,00 ppm (CDCl_3 , 500 MHz)	56
FIGURA 7. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-1 na região entre 6,10 e 4,70 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).....	56
FIGURA 8. Espectro de RMN ^{13}C de D-1 (CDCl_3 , 125 MHz).....	57
FIGURA 9. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-1 na região entre 37 e 17 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).....	57
FIGURA 10. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-1 na região entre 83 e 43 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).....	58
FIGURA 11. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-1 na região entre 220 e 100 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).....	58
FIGURA 12. Espectro de correlação ^1H x ^{13}C HMQC de D-1 (CDCl_3 , 500 MHz e 125 MHz).....	59
FIGURA 13. Espectro de correlação ^1H x ^1H -COSY de D-1 (CDCl_3 , 500 MHz).....	59
FIGURA 14. Espectro de correlação ^1H x ^{13}C HMBC de D-1 (CDCl_3 , 500 MHz e 125 MHz)	60

FIGURA 15. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-1 na região entre 90 e 10 ppm (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	60
FIGURA 16. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-1 na região entre 220 e 110 ppm (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	61
FIGURA 17. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-1 na região entre 180 e 10 ppm (CDCl_3 , 500 e 125 MHz)	61
FIGURA 18. Espectro de IV de D-2 (pastilha de KBr).....	66
FIGURA 19. Espectro de RMN ^1H de D-2 (CDCl_3 , 300 MHz).....	67
FIGURA 20. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-2 na região entre 1,65 e 0,8 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).....	67
FIGURA 21. Expansão do espectro de RMN ^1H de de D-2 na região entre 3,8 e 1,5 ppm (CDCl_3 , 300 MHz)	68
FIGURA 22. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-2 na região entre 6,05 e 4,65 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).....	68
FIGURA 23. Espectro de RMN ^{13}C de D-2 (CDCl_3 , 300 MHz).....	69
FIGURA 24. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-2 na região entre 32 e 19 ppm (CDCl_3 , 75 MHz).....	69
FIGURA 25. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-2 na região entre 170 e 40 ppm (CDCl_3 , 75 MHz).....	70
FIGURA 26. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC de D-2 (CDCl_3 , 300 MHz)	70
FIGURA 27. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC de D-2 na região entre 50 e 17 ppm (CDCl_3 , 300 MHz)	71
FIGURA 28. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC de D-2 na região entre 130 e 75 ppm (CDCl_3 , 300 MHz)	71

FIGURA 29. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY de D-2 (CDCl_3 , 300 MHz).....	72
FIGURA 30. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-2 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)	72
FIGURA 31. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-2 na região entre 85 e 17 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)	73
FIGURA 32. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-2 na região entre 200 e 130 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)	73
FIGURA 33. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-2 na região entre 110 e 20 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)	74
FIGURA 34. Espectro de RMN ^1H de D-3 (CDCl_3 , 300 MHz)	79
FIGURA 35. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-3 na região entre 1,8 e 0,7 ppm (CDCl_3 , 300 MHz)	79
FIGURA 36. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-3 na região entre 2,85 e 1,90 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).....	80
FIGURA 37. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-3 na região entre 6,0 e 3,7 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).....	80
FIGURA 38. Espectro de RMN ^{13}C de D-3 (CDCl_3 , 75 MHz).....	81
FIGURA 39. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-3 na região entre 30 e 14 ppm (CDCl_3 , 75 MHz)	81
FIGURA 40. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-3 na região entre 68 e 31 ppm (CDCl_3 , 75 MHz)	82
FIGURA 41. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-3 na região entre 140 e 75 ppm (CDCl_3 , 75 MHz)	82
FIGURA 42. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-3 na região entre 200 e 144 ppm (CDCl_3 , 75 MHz)	83

FIGURA 43. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC de D-3 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)	83
FIGURA 44. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC de D-3 na região entre 110 e 65 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)	84
FIGURA 45. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC de D-3 na região entre 55 e 15 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)	84
FIGURA 46. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC de D-3 na região entre 40 e 15 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)	85
FIGURA 47. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de D-3 (CDCl_3 , 300 MHz).....	85
FIGURA 48. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de D-3 na região entre 3,5 e 0 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).....	86
FIGURA 49. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-3 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).....	86
FIGURA 50. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-3 na região entre 85 e 25 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).....	87
FIGURA 51. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-3 na região entre 180 e 130 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).....	87
FIGURA 52. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-3 na região entre 48 e 16 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).....	88
FIGURA 53. Espectro de IV de D-4 (pastilha de KBr)	91
FIGURA 54. Espectro de RMN ^1H de D-4 (CDCl_3 , 300 MHz)	94
FIGURA 55. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-4 na região entre 1,30 e 0,74 ppm (CDCl_3 , 300 MHz)	94
FIGURA 56. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-4 na região entre 2,9 e 1,4 ppm (CDCl_3 , 300 MHz)	95

FIGURA 57. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-4 na região entre 5,0 e 4,6 ppm (CDCl_3 , 300 MHz)	95
FIGURA 58. Espectro de RMN ^{13}C de D-4 (CDCl_3 , 75 MHz)	96
FIGURA 59. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-4 na região entre 47 e 17 ppm (CDCl_3 , 75 MHz)	96
FIGURA 60. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-4 na região entre 220 e 80 ppm (CDCl_3 , 75 MHz)	97
FIGURA 61. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-4 (CDCl_3 , 300 MHz)	97
FIGURA 62. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-4 na região entre 90 e 20 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz)	98
FIGURA 63. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-4 na região entre 100 e 20 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).....	98
FIGURA 64. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-4 na região entre 220 e 155 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).....	99
FIGURA 65. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de D-4 (CDCl_3 , 300 MHz)	99
FIGURA 66. Espectro de RMN ^1H de D-5 (CDCl_3 , 300 MHz)	102
FIGURA 67. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-5 na região entre 5,0 e 0,7 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).....	102
FIGURA 68. Espectro de RMN ^{13}C de D-5 (CDCl_3 , 75 MHz).....	103
FIGURA 69. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-5 na região entre 44 e 18 ppm (CDCl_3 , 75 MHz)	103
FIGURA 70. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-5 na região entre 215 e 77 ppm (CDCl_3 , 75 MHz)	104
FIGURA 71. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-5 (CDCl_3 , 300 MHz).....	104

FIGURA 72. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-5 na região entre 110 e 30 ppm (CDCl_3 , 300 MHz)	105
FIGURA 73. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-5 entre 110 e 20 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).....	105
FIGURA 75. Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) dos extratos brutos de <i>C. cervicornis</i> coletada no litoral da Paraíba (EPB2) e <i>C. cervicornis</i> coletada no litoral do Rio de Janeiro (ERJ) eluída em diclorometano e acetato de etila (8:2).....	107
FIGURA 76. Diterpenos majoritários em <i>C. cervicornis</i> coletada no litoral da Paraíba (A) e no litoral do Rio de Janeiro (B).....	108
FIGURA 77. Espectro de RMN ^1H do extrato diclorometano (ECC) de <i>C. cervicornis</i> coletada no litoral do Rio de Janeiro (CDCl_3 , 300 MHz)	108
FIGURA 78. Espectro de RMN ^1H do extrato diclorometano:metanol (2:1) (EPB2) de <i>C. cervicornis</i> coletada no litoral da Paraíba (CDCl_3 , 300 MHz)	108

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Fracionamento cromatográfico da fração Hex:AcOEt /85:15.....	40
TABELA 2. Fracionamento cromatográfico da Fração 8-14	41
TABELA 3. Fracionamento cromatográfico de EPB2	44
TABELA 4. Fracionamento cromatográfico de EPBA	45
TABELA 5. Fracionamento cromatográfico da Fração 113-115	46
TABELA 6. Fracionamento cromatográfico da Fração 130-132	47
TABELA 7. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz) da substância D-1	52
TABELA 8. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz) de D-1 em CDCl_3 com dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 MHz) da literatura para a dichotenona-A (ALI et al., 2003)	53
TABELA 9. Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) uni e bidimensionais de D-2 em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz)	64
TABELA 10. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz) de D-2 em CDCl_3 com dados de RMN de ^1H (220 MHz) e ^{13}C (25 MHz) de referência da literatura (SUN, 1981; CREWS, 1982).	65
TABELA 11. Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) de D-3 em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz).....	77
TABELA 12. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz) de D-3 em CDCl_3 com dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 MHz) da literatura para o Amijidictyol em CDCl_3 (OCHI et al., 1980) comparados a D-1.....	78

TABELA 13. Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz) da substância D-491

TABELA 14. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz) de D-4 em CDCl_3 com dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 MHz) da literatura em CDCl_3 e CD_3OD (ALI, PERVEZ, 2003)92

TABELA 15. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz) de D-5 em CDCl_3 com dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 MHz) da literatura (BANO et al., 1990)101

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1. Obtenção e fracionamento do Extrato Bruto de <i>C. cervicornis</i> 1 (EPB1)	39
ESQUEMA 2. Fracionamento cromatográfico da fração Hex:AcOEt /85:15	42
ESQUEMA 3. Fracionamento cromatográfico de EPB2	44
ESQUEMA 4. Fracionamento cromatográfico de EPBA	48

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

AcOEt	Acetato de etila
ALGAMAR/UFF	Laboratório de Produtos Naturais de Algas Marinhas
APT	Attached Proton Test
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCEN	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
EPBA	Extrato Bruto de <i>Canistrocarpus cervicornis</i> da Paraíba Acetilado
EPB1	Extrato Bruto de <i>Canistrocarpus cervicornis</i> da Paraíba 1
EPB2	Extrato Bruto de <i>Canistrocarpus cervicornis</i> da Paraíba 2
ERJ	Extrato Bruto de <i>Canistrocarpus cervicornis</i> do Rio de Janeiro
Hex	Hexano
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HSV	Herpes simplex virus (Vírus Herpes simplex)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LMCA	Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise
m	Multiplete
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
PgPNSB	Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
ppm	Partes por milhão
R _f	Fator de Retenção
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
s	Singlete
sl	Singlete largo
δ	Deslocamento químico
t	Triplete
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1 Algas Pardas (Filo: Heterokontophyta; Classe: Phaeophyceae)	27
2.2 Família Dictyotaceae.....	28
2.3 Importância dos diterpenos na classificação de algas da tribo Dictyoteae	29
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4 EXPERIMENTAL	36
4.1 Levantamento bibliográfico.....	36
4.2 Métodos cromatográficos	36
4.3 Identificação estrutural das substâncias isoladas	37
4.4 Coleta e identificação da alga	37
4.5 Processamento de <i>C.cervicornis</i> Coletada no litoral da Paraíba.....	38
4.6 Obtenção dos Extratos Brutos de <i>C. Cervicornis</i> da Paraíba (EPB1 e EPB2).....	38
4.7 Fracionamento cromatográfico de EPB1.....	38
4.7.1 Fracionamento cromatográfico da Fase Hex:AcOEt/85:15.....	40
4.7.2 Fracionamento cromatográfico da Fração 8-14	41
4.8 Comparação dos Extratos Brutos de <i>C.cervicornis</i> coletada no litoral da Paraíba (EPB2) e no litoral do Rio De Janeiro (ERJ)	43
4.9 Fracionamento cromatográfico de EPB2	43

4.10 Acetilação do Extrato Bruto de <i>C. Cervicornis</i>	45
4.11 Fracionamento cromatográfico do Extrato Bruto Acetilado de <i>C.cervicornis</i> da Paraíba.....	45
4.11.1 Fracionamento cromatográfico da Fração 113-115	46
4.11.2 Fracionamento cromatográfico da Fração 130-132	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
5.1 Identificação estrutural de D-1.....	50
5.2 Identificação estrutural de D-2.....	62
5.3 Identificação estrutural de D-3.....	75
5.4 Identificação estrutural de D-4.....	89
5.5 Identificação estrutural de D-5.....	100
5.6 Comparação das amostras de <i>C. cervicornis</i> coletada no litoral da Paraíba (EPB2) e <i>C. cervicornis</i> coletada no litoral do Rio de Janeiro (ERJ)	106
6 CONCLUSÕES.....	110
REFERÊNCIAS.....	112

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A vida surgiu no mar há cerca de 3,5 bilhões de anos e seus habitantes constituem o sistema mais diversificado do planeta. Dos microorganismos às algas e animais, quase a totalidade dos filos tem representantes nos mares (BRASIL, 2010).

Ao contrário dos organismos terrestres, os seres marinhos tem que se adaptar a condições ambientais extremas, como elevada pressão, elevada concentração de sal, baixa concentração de nutrientes, limitada luz solar, baixo teor de oxigênio. Em geral, temperatura baixa, exceto próximo a vulcões submarinos, ou temperatura extremamente baixas em regiões polares (HU et al., 2011).

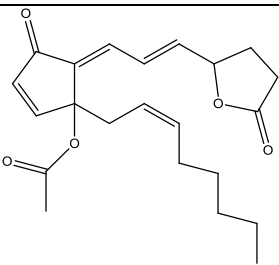
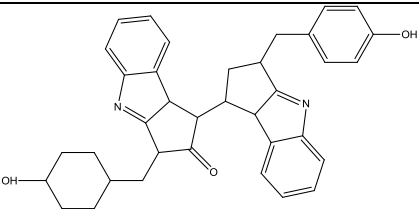
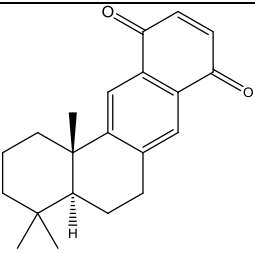
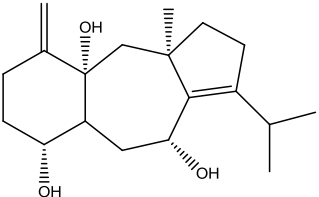
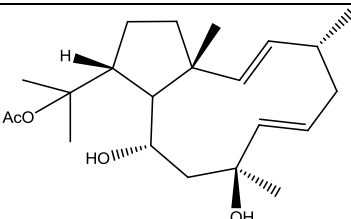
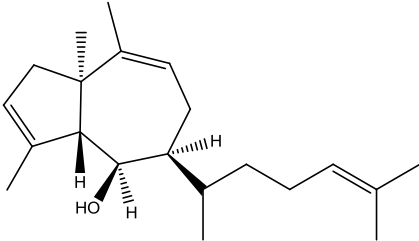
Para se adaptar a essas variações, os organismos marinhos possuem características únicas que os diferenciam de organismos terrestres em muitos aspectos, tais como comportamento, metabolismo, estratégia de adaptação e transferência de informação. Essas características são úteis para determinar as diferenças entre os organismos terrestres e aquáticos em relação aos mecanismos do metabolismo secundário e reações enzimáticas. Estas diferenças são responsáveis pela diversidade no metabolismo secundário de organismos marinhos (HU et al., 2011).

Os metabólitos secundários produzidos, também chamados produtos naturais, estão presentes desde as bactérias e algas até equinodermos, moluscos, tunicados, vertebrados, além de esponjas e corais (BLUNT et al., 2010). Alguns exemplos de substâncias isoladas de organismos marinhos, juntamente com suas respectivas atividades podem ser visualizados no Quadro 1 (página 23).

Segundo Brasil (2010), esses seres vivos guardam muitas substâncias desconhecidas que atuam na comunicação entre espécies, na defesa contra herbívoros ou predadores, entre competidores, na reprodução ou simplesmente como produto de seu metabolismo. Uma substância que atua como mediador químico para um organismo pode também ser a esperança para o tratamento e/ou cura de muitas doenças conhecidas (BRASIL, 2010).

Apesar de o Brasil possuir uma costa litorânea bastante extensa, com aproximadamente 8.000 Km, o início do estudo da química de organismos marinhos brasileiros foi lento, uma vez que o foco dos químicos de produtos naturais brasileiros se voltava quase que totalmente para o estudo de plantas medicinais e para a quimiotaxonomia de plantas terrestres (BERLINCK et al., 2004).

Quadro 1. Compostos de origem marinha e atividades relatadas.

ESTRUTURA	ATIVIDADE	ORIGEM	REFERÊNCIA
	Anti-hipertensiva, Estimulante uterino	Coral mole <i>Clavularia viridis</i>	LEI; ZHOU, 2002
	Antiinflamatória	Pigmento das cianofíceas	LEI; ZHOU, 2002
	Antiherbivoria	Alga parda <i>Dictyopteris undulata</i>	KURATA et al., 1996
	Antiviral	Alga parda <i>Canistrocarpus cervicornis</i>	VALLIM et al., 2010
	Antiviral	Alga parda <i>Dictyota friabilis</i>	BARBOSA et al., 2004
	Citotóxica	Alga parda <i>Dictyota dichotoma</i>	DURAN et al., 1997

Acredita-se que os oceanos ofereçam um imenso potencial para a descoberta de novos fármacos. Nesse contexto, os produtos naturais marinhos representam uma importante e interessante área de estudo e a completa apreciação permite comprovar a legitimidade dos seus inúmeros benefícios para a população como um todo.

A partir da década de 70, vários grupos de pesquisadores iniciaram a triagem sistemática de extratos de algas com o intuito de encontrar produtos com atividades biológicas. Como resultados, foram encontradas substâncias com atividades antifúngica, antiviral, antibacteriana e anticâncer, mostrando que as algas são uma fonte muito rica de produtos potencialmente utilizáveis como fármacos (BONGIORNE; PIETRA, 1996).

A tendência atual das pesquisas de produtos naturais marinhos é a obtenção de princípios ativos contidos nas espécies para uma possível aplicação prática no tratamento das doenças que afligem a sociedade atual. As macroalgas marinhas têm sido objeto de pesquisas para a cura e tratamento de Aids (HIV) (CIRNE-SANTOS et al., 2008), Herpes (HSV) (SOUZA et al., 2008), leishmaniose (DOS-SANTOS et al., 2011), além de demonstrarem propriedades vasorrelaxantes (QUEIROZ et al., 2011), citotóxicas e antitumorais (OVENDEN et al., 2012), contra veneno de cobra (DOMINGOS et al., 2011). Todos esses trabalhos tem sido realizados por Universidades Federais brasileiras, alguns até patenteados no intuito de proteger os resultados promissores encontrados.

Os produtos isolados das macroalgas marinhas constituem uma ferramenta poderosa no estabelecimento dos limites taxonômicos de espécies, gêneros e famílias de algas (TEIXEIRA, 2013), e quanto ao seu papel ecológico, os diterpenos isolados tem demonstrado propriedades anti-herbivoria, protegendo as algas dos ataques de herbívoros (BIANCO et al., 2009) e atividade anti-incrustante, que confere proteção aos cascos de navios, impedindo a fixação do biofilme formado por organismos marinhos nos cascos.

Devido à extensa gama de atividades biológicas relatadas a algas do gênero *Dictyota* e à ausência de estudos fícoquímicos relatados com *Dictyota pulchella* (reclassificada neste trabalho como *Canistrocarpus cervicornis*), foi dado início ao estudo desta espécie, onde foram obtidos um diterpeno seco-dolastano e quatro dolastanos (FIGUEIREDO, 2009).

Acreditando no potencial desta alga como fonte de novas moléculas de interesse farmacológico e quimiotaxonômico, durante o doutorado foram disponibilizados extratos e substância para testes farmacológicos, os quais apresentaram atividade vasorrelaxante (QUEIROZ et al., 2011) e atividade moduladora da resistência bacteriana da alga (MENEZES-SILVA, 2013), suporte que incentivou a continuidade ao estudo fícoquímico.

Para o desenvolvimento deste trabalho foi estabelecida uma colaboração com a Profa. Dra. Valéria L. Teixeira da Universidade Federal Fluminense, em Niteroi (RJ), que contribuiu, através dos seus conhecimentos em taxonomia e química de algas pardas, para a reclassificação da alga em estudo como *C. cervicornis*.

Neste trabalho foi proposto avaliar quimicamente a alga parda do litoral paraibano *C.cervicornis*, através do isolamento e identificação de seus metabólitos secundários, visando fornecer os produtos obtidos para testes biológicos, e realizar a comparação da amostra coletada no litoral paraibano com a coletada no litoral fluminense, contribuindo com o conhecimento quimiotaxonômico da tribo Dictyoteae.

Fundamentação

Teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Algas pardas (Classe Phaeophyceae)

As algas pardas marinhas constituem o grupo mais estudado no Brasil em diversas linhas de pesquisas, tais como: isolamento de novas moléculas, estudo das suas potências atividades biológicas, ecologia química, taxonomia, filogenia, e biogeografia baseada em dados químicos de seus produtos naturais (TEIXEIRA, 2013).

A classe Phaeophyceae é constituída por aproximadamente 285 gêneros, totalizando mais de 1800 espécies quase que exclusivamente marinhas, distribuídas desde os trópicos até os pólos (REVIERS; ROUSSEAU; DRAISMA, 2007). Geralmente são dominantes, em termos de biomassa, ao longo da costa do Brasil, mas apresentam um menor número de espécies em comparação às algas vermelhas (Rhodophyceae) e verdes (Chlorophyceae) (LITTLER; LITTLER, 2000; WYNNE, 2005). Duas ordens em particular, Fucales e Dictyotales, se destacam na costa brasileira (WYNNE, 2005).

Entre os metabólitos secundários produzidos por algas pardas, tem destaque as classes dos terpenos e polifenóis (PAUL; CRUZ-RIVEIRA; THACKER, 2001). Os terpenos, principalmente sesquiterpenos e diterpenos (simples ou ligados a fenóis), são característicos das espécies tropicais e subtropicais, apresentando propriedades anti-herbivoria contra uma variedade de consumidores (HAY et al., 1988; PAUL; VAN ALSTYNE, 1988).

Os polifenóis são polímeros de floroglucinol e derivados, encontrados em todas as Phaeophytas, sendo abundantes nas espécies de regiões temperadas (RAGAN; GLOMBTIZA, 1986). Estas substâncias parecem atuar como redutores de digestibilidade nos herbívoros marinhos (STEINBERG, 1985). As algas pardas e vermelhas caracterizam-se ainda pela produção de hidrocarbonetos voláteis, os quais podem atuar como feromônios sexuais (TEIXEIRA et al., 1991).

Os terpenos constituem os produtos naturais mais estudados no Brasil e no mundo. Atuam nas relações ecológicas como minimizadores da herbivoria, e como anti-incrustantes. Possuem potencial para diversas atividades biológicas e servem como marcadores taxonômicos e biogeográficos para alguns gêneros ou famílias (TEIXEIRA, 2013).

Algumas algas pardas e vermelhas participam de maneira bastante abrangente da vida cotidiana do homem, através de colóides extraídos dos seus talos. Existem alguns produtos de

importância econômica, como os ácidos algínico (alginatos), agaranas e carragenanas, as quais são usadas como matéria prima em vários segmentos da indústria alimentícia, têxtil, de bebidas, como também na biotecnologia (VIDOTTI; ROLEMBERG, 2004).

2.2 Família Dictyotaceae

A família Dictyotaceae composta por aproximadamente 18 gêneros (WYSOR; DE CLERCK, 2003), constitui uma excelente fonte de substâncias biologicamente ativas, especialmente terpenos. Estes tem apresentado diversas atividades biológicas em humanos e desempenham papel ecológico na natureza (DE PAULA; VALLIM; TEIXEIRA, 2011).

Segundo De Clerck e colaboradores (2006) a família Dictyotaceae é subdividida em duas tribos, Dictyoteae e Zonarieae, baseado estudo de análises da sequência de DNA ribossomal 26 S e *rbcL*. Nesse estudo os autores propõem a divisão da tribo Dictyoteae em três gêneros: *Dictyota* Lamouroux, *Canistrocarpus* De Paula et De Clerck, e *Rugulopteryx* De Clerck et Coppejans. O gênero *Canistrocarpus* inclui as antigas espécies *Dictyota cervicornis* Kützinger, *D. crispata* Kützinger e *D. magneana* De Clerck et Coppejans.

Nos últimos anos, o aumento significativo de novos epítetos específicos de macroalgas bentônicas ao redor do mundo (WYNNE, 2011), tem sido relacionado à dificuldade em estabelecer limites de separação entre espécies, em especial na tribo Dictyoteae devido ao alto pleomorfismo dos indivíduos e pela diferenciada interpretação dos caracteres diagnósticos, o que tem levado a confusões taxonômicas em casos reportados como coespecificidade (TEIXEIRA; KELECOM 1987, 1988; BULA-MEYER, 1994; SOLÉ; FOLDATS 2003; WYSOR; DE CLERCK 2003).

Sem muita surpresa, a taxonomia das algas pardas, como as Dictyotaceae, ainda apresenta alguns pontos controversos. O gênero *Dictyota*, por exemplo, apresenta problemas e certas dificuldades no estabelecimento correto dos limites de separação entre várias de suas espécies. Os diterpenos das espécies da tribo Dictyoteae possuem, assim, um importante papel como marcadores taxonômicos e biogeográficos (TEIXEIRA; ALMEIDA; KELECOM, 1990).

2.3 Importância dos diterpenos na classificação de algas da tribo Dictyoteae

Com base num esquema biogenético proposto, os diterpenos de Dictyoteae foram divididos em três grupos em relação à primeira ciclização do precursor geranil-geraniol comum (TEIXEIRA; TOMASSINI; KELECOM, 1985).

O grupo I inclui derivados prenilados de sesquiterpenos conhecidos como resultantes da ciclização 1-10 do geranilgeraniol, levando à formação do derivado prenilado germacrano (SUN; FENICAL, 1979). Posterior ciclização em 2-7 ou 2-6 fornece homólogos prenilados do occidentalol (SUN et al., 1977) ou do guaiano (HIRSCHFELD et al., 1973) (Figura 1, página 30).

Os compostos pertencentes ao grupo II derivam da primeira ciclização em 1-11 do geranil-geraniol dando origem ao esqueleto dolabellano, encontrado em diterpenos de algas e moluscos (SUN; FENICAL, 1979; IRELAND; FAULKNER, 1977). A ciclização transanular dos dolabellanos em 2-6 ou 2-7 produz o inusitado esqueleto dictymanol (ENOKI et al., 1983) ou o mais frequente esqueleto dolastano (PETTIT et al., 1976). A obtenção do seco-dolastano pode ser entendida, teoricamente, pela clivagem oxidativa da ligação 10-14 do dolastano (OCHI; MIURA; TOKOROYAMA, 1981) (Figura 1, página 28).

O grupo III deriva da ciclização em 2-10 do precursor geranil-geraniol, o que leva à formação do esqueleto xeniano e seus derivados (VANDERAH et al., 1977), encontrado em numerosos diterpenos de algas pardas (FINER et al., 1979) e octocorais (KASMMAN; GROWEISS, 1980) (Figura 1, página 30).

A via biossintética de formação de diterpenos assume importância variada em diferentes localidades. A distribuição cosmopolita dos diterpenos do grupo I indica que estes são os mais antigos e importantes precursores na síntese de outros diterpenos (OLIVEIRA, 2006).

Os diterpenos do grupo III são muito importantes na região Indo-Pacífica, enquanto que a produção dos diterpenos do grupo II em direção ao Oceano Atlântico e Mar Mediterrâneo é favorecida, indicando uma mudança de estratégia na produção de metabólitos secundários, o que sugere que estes diterpenos são mais importantes nestas regiões (TEIXEIRA; KELECOM, 1987; TEIXEIRA; ALMEIDA; KELECOM, 1990; VALLIM et al., 2005).

Acredita-se que a ampla variedade de substâncias produzidas por espécies de *Dictyota* faça parte de estratégia de defesa contra herbívoros no ambiente marinho (KELECOM; TEIXEIRA, 1986; PEREIRA; CAVALCANTI; TEIXEIRA, 2000; PEREIRA et al., 2002), e

que as variações nas quantidades relativas dos grupos de esqueletos diterpênicos nas várias regiões do mundo podem estar diretamente relacionadas com o impacto de herbivoria (KELECOM; TEIXEIRA, 1986; VALLIM et al., 2005).

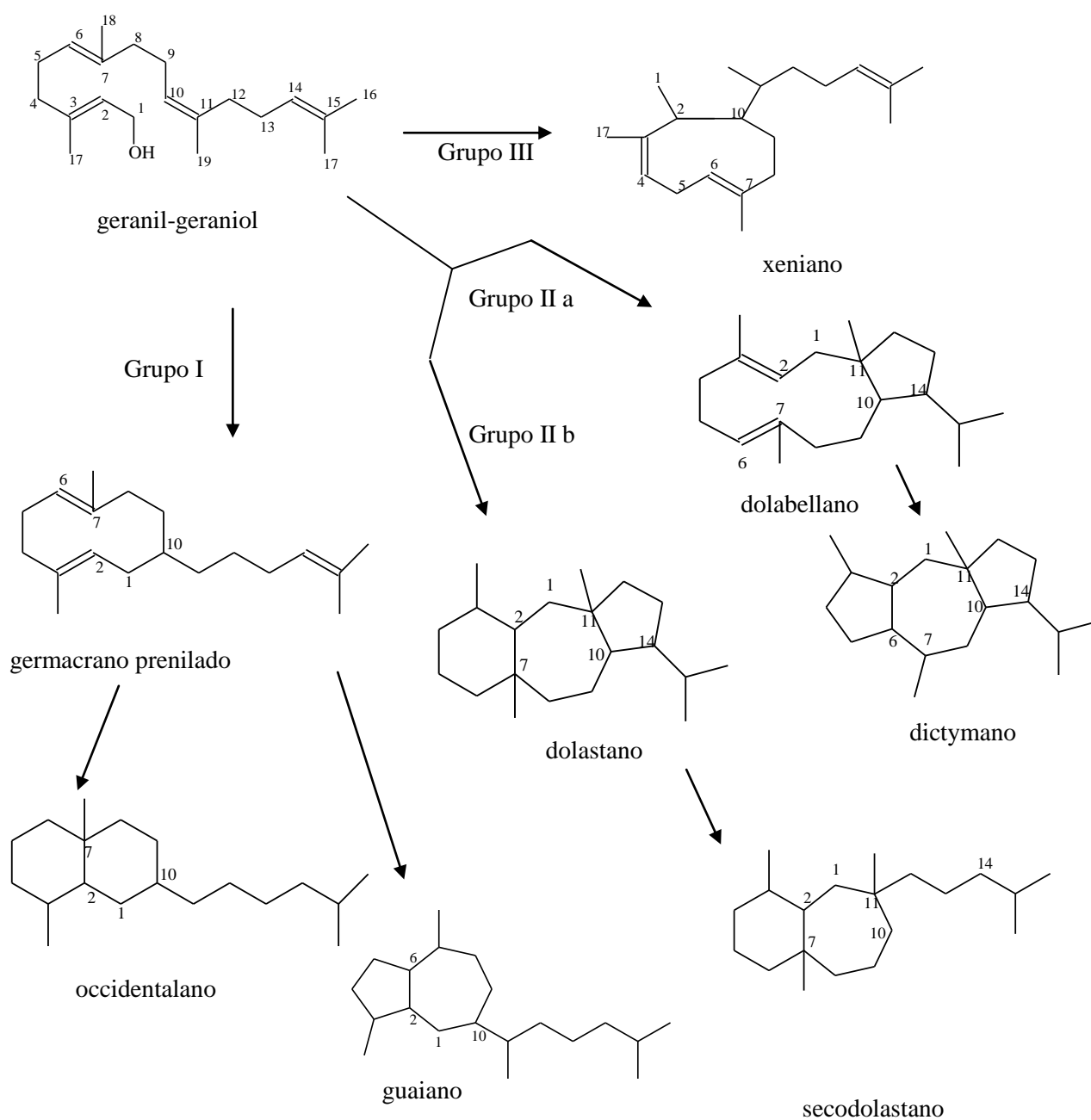


Figura 1: Proposta biossintética para os diterpenos de Dictyotaceae (Adaptado de Teixeira, Tomassini, Kelecom, 1985).

A esse respeito as algas pardas marinhas (Phaeophyceae), mais especificamente as pertencentes a ordem Dictyotales, são ricas fontes de terpenos (TEIXEIRA; KELECOM, 1988). Dentre essas algas, as pertencentes ao gênero *Dictyota* Lamouroux (Dictyotales) tem sido as mais amplamente investigadas e levaram ao isolamento de cerca de 300 diferentes diterpenos distribuídos em 17 classes das 35 espécies coletadas em todos os oceanos do mundo (VALLIM et al., 2005).

A maioria destes diterpenos possui esqueletos únicos, encontrados exclusivamente nos organismos marinhos. Estes grupos químicos não são distribuídos igualmente pelos oceanos (TEIXEIRA; KELECOM, 1987). No oceano Atlântico, por exemplo, 61% dos diterpenos conhecidos obtidos de espécies do gênero *Dictyota* possuem esqueleto dolastano ou secodolastano e pertencem ao grupo químico II. Por outro lado, no oceano Pacífico o grupo químico III é quem tem maior representatividade (TEIXEIRA; KELECOM, 1987).

Vallim e colaboradores em 2005 publicaram uma revisão estabelecendo o grupo taxonômico “cervicornis” (*C. cervicornis* = *D. cervicornis* – Figura 2, p.31), o qual inclui populações de algas que produzem exclusivamente diterpenos pertencentes ao grupo Iib (dolastanos e secodolastanos).



Figura 2: Foto de *C. cervicornis*. Fonte: www.algaebase.org

O grupo “cervicornis” inclui populações de *Dictyota cervicornis* Kützinger e *D. pardalis* Kützinger do Brasil (TEIXEIRA et al., 1986a; TEIXEIRA et al., 1986b; KELECOM, TEIXEIRA, 1988; DE-PAULA et al., 2001), *D. divaricata* Lamouroux e *D. linearis* C. Agardh do mar do Caribe (SUN et al., 1981; CREWS et al., 1982), *D. indica* Kützinger do Paquistão (BANO et al., 1990; AHMAD et al., 1991), *Dictyota* sp. Das Ilhas Canárias (GONZALÉZ et al., 1983), *D. furcellata* (C. Agardh) Greville da Austrália (DUNLOP et al., 1989), *D. linearis* do Japão (OCHI et al., 1980a; OCHI et al., 1980b; OCHI et al., 1981; OCHI et al., 1986) e *D. dichotoma* (Hudson) Lamouroux do Paquistão (ALI, PERVEZ, 2003a, 2003b; ALI et al., 2003; ALI et al., 2004), todas quimicamente caracterizadas pela presença de diterpenos dolastanos ou dolastanos e secodolastanos.

Durante parte do desenvolver deste trabalho, a alga estudada (pertencente à família Dictyotaceae), havia sido considerada como sendo *Dictyota pulchella*. Apesar da semelhança morfológica ter direcionado para a classificação como *D. pulchella*, a comparação entre os extratos de amostras coletadas no litoral paraibano e no litoral fluminense, dirimiu nossas dúvidas, trazendo à tona a correta classificação da alga como sendo *C. cervicornis*. Este fato foi reforçado devido à presença exclusiva nesta alga de diterpenos do tipo dolastano e secodolastano.

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi contribuir com a quimiotaxonomia da tribo Dictyoteae, através do esclarecimento acerca da química de *Canistrocarpus cervicornis* (anteriormente denominada *Dictyota pulchella*) por meio do isolamento e identificação de seus metabólitos secundários (diterpenos do tipo dolastano e secodolastanos), os quais são conhecidos como marcadores do gênero *Canistrocarpus*, e não ocorrem em outros gêneros da tribo Dictyoteae.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Contribuir para o estudo fícoquímico e quimiotaxonômico das algas pardas do litoral paraibano pertencentes à tribo Dictyoteae, através do estudo realizado com *Canistrocarpus cervicornis* (Kützinger) De Paula & De Clerck.

3.2 Objetivos específicos

Isolar os constituintes químicos de *C. cervicornis* do litoral paraibano através de métodos cromatográficos convencionais.

Identificar e/ou elucidar as substâncias obtidas a partir de métodos espectroscópicos, como técnicas uni e bidimensionais de ressonância magnética nuclear, infravermelho, rotação ótica.

Comparar os extratos de *C. cervicornis* coletadas no litoral da Paraíba e no litoral do Rio de Janeiro.

Fornecer extratos, fases e substâncias isoladas para avaliações de atividades biológicas.

Experimental

4 EXPERIMENTAL

4.1 Levantamento bibliográfico

O levantamento bibliográfico foi realizado durante todo o decorrer deste estudo nos seguintes bancos de dados: Web of Science, Chemical Abstracts, Biological Abstracts, demais bancos de dados disponíveis na internet, e em anais de eventos nacionais e internacionais.

4.2 Métodos Cromatográficos

Nas cromatografias em coluna (CC) e filtrações a vácuo foram utilizadas como fase estacionária sílica gel 60 ART 7734 da Merck, de partículas com dimensões entre 0,063-0,200 mm para o fracionamento e dimensões 0,016-0,040 mm para purificação das amostras. Os extratos ou frações foram acondicionados sobre o topo da coluna, procedendo-se então a eluição com os solventes hexano (Hex), diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), puros ou em misturas binárias em gradiente crescente de polaridade. Solventes da marca Vetec ou solventes comerciais redistilados no próprio laboratório foram utilizados nos experimentos realizados na Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Nos experimentos desenvolvidos no ALGAMAR foram utilizados solventes Merck. O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras e as quantidades de sílica a serem utilizadas.

As placas de cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) confeccionadas no laboratório de fitoquímica do PPgPNSB/UFPB utilizando sílica-gel 60 PF₂₅₄ ART 7749 da Merck na espessura 0,25 mm, suspensa em água destilada (1:2), distribuída sobre placas de vidro por meio de um cursor “Quick fit”, secas ao ar e ativadas em estufa a 110 °C durante 2 horas. Além destas, também foram utilizadas CCDA da Merck tanto na UFPB quanto na UFF.

As substâncias analisadas por CCDA foram reveladas pela exposição das placas a lâmpada de irradiação ultravioleta em aparelho Mineralight, modelo UVGL-58 com dois comprimentos de onda (254 e 366 nm), por saturação em câmara com vapores de iodo ou pelo

borrifamento de solução de sulfato cérico (CeSO_4) a 2% em ácido sulfúrico (H_2SO_4) nas placas, seguido por aquecimento à 100°C durante 5-8 minutos.

4.3 Identificação estrutural das substâncias isoladas

A identificação e/ou elucidação estrutural das substâncias obtidas foram realizadas após análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) uni e bidimensionais registrados em espectrômetros VARIAN modelo System operando a 500 MHz para hidrogênio (RMN ^1H) e 125 MHz para carbono-13 (RMN ^{13}C) no LMCA/UFPB e operando a 300 MHz para hidrogênio (RMN ^1H) e 75 MHz para carbono-13 (RMN ^{13}C) no LaRemn/UFF, além de comparações com dados da literatura. A dissolução das amostras foi realizada em clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. As multiplicidades dos sinais em RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dd (duplo dubleto), ddd (duplo duplo dubleto), t (triplete) e m (multiplete). Os dados de rotação ótica foram medidos em um polarímetro Jasco P-2000 series.

4.4 Coleta e identificação da alga

Os exemplares do litoral paraibano de *Canistrocarpus cervicornis* foram coletados nas coordenadas $07^\circ04'01''\text{S}$ e $34^\circ49'35''\text{W}$, praia do Bessa, na cidade de João Pessoa - PB, em agosto de 2010 e em dezembro de 2012. A identificação foi feita pelo Prof. George Emmanuel Cavalcanti de Miranda do Departamento de Sistemática e Ecologia da Universidade Federal da Paraíba. Uma exsicata da espécie (registro JPB 41771) está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (CCEN/UFPB).

4.5 Processamento de *C. cervicornis* coletada no litoral da Paraíba

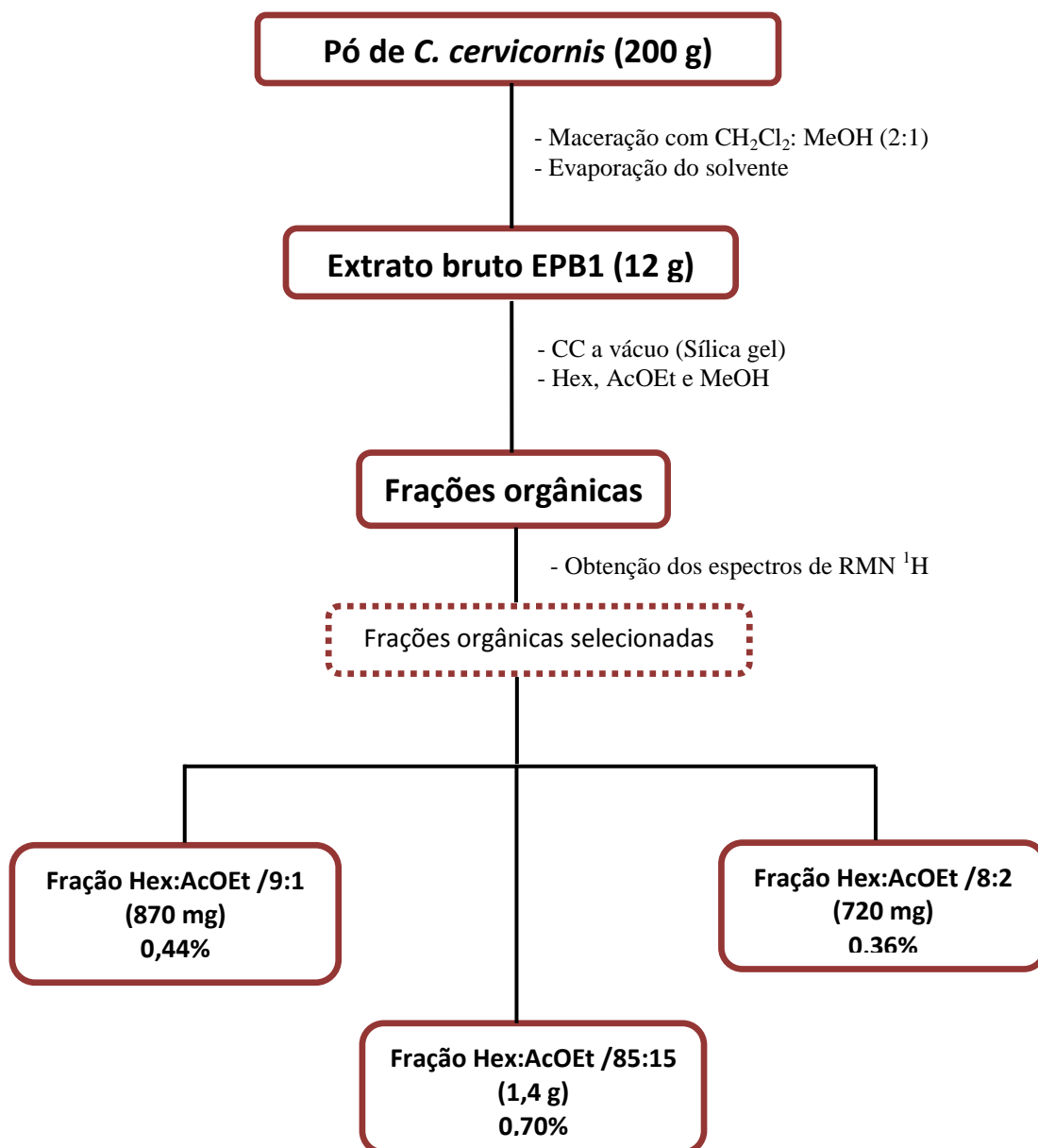
Após cada coleta as algas foram lavadas com água do mar e submetidas à triagem para eliminar prováveis contaminantes epífitas e fauna associada. As amostras foram secas em local arejado e ao abrigo da luz e, então, submetidas aos procedimentos de extração.

4.6 Obtenção dos Extratos Brutos de *C. cervicornis* da Paraíba (EPB1 e EPB2)

Os materiais secos pesando 200 g (coletado em 2010) e 353 g (coletado em 2012) foram extraídos por maceração com mistura a de CH_2Cl_2 e MeOH na proporção 2:1 por 72 horas. Este processo foi repetido para a extração máxima dos constituintes químicos. A solução extrativa foi filtrada e concentrada com o auxílio de evaporador rotativo, sob pressão reduzida, a uma temperatura não superior a 50 °C, o que originou 12 g (EPB1) e 30 g de extrato bruto (EPB2).

4.7 Fracionamento do Extrato Bruto de *C. cervicornis* 1 (EPB1)

O Extrato Bruto de *C. cervicornis* 1 (EPB1) foi submetido à filtração a vácuo utilizando como fase estacionária sílica gel e como eluentes hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias em gradiente crescente de polaridade, o que originou as respectivas frações. Sabendo-se que este grupo de algas é caracterizado pela produção de diterpenos dolastanos e secodolastanos, foram obtidos espectros de RMN ^1H (200 MHz) para escolha das frações mais promissoras para o isolamento destes constituintes químicos. As frações Hex:AcOEt (9:1), Hex:AcOEt (85:15), Hex:AcOEt (8:2) (Esquema 1, página 39) foram selecionadas e submetidas a cromatografias com sílica gel. A fração Hex:AcOEt (85:15), após processo cromatográfico em coluna com sílica gel, forneceu um diterpeno dolastano inédito na literatura.

Esquema 1. Obtenção e fracionamento do Extrato Bruto de *C. cervicornis* 1 (EPB1)

4.7.1 Fracionamento cromatográfico da Fração Hex:AcOEt /85:15

A fração Hex:AcOEt/85:15 (1,4 g) foi submetida à cromatografia em coluna utilizando sílica gel 60 (0,063-0,200 mm/ 70-230 mesh ASTM da Merck) como fase fixa, sendo eluída com hexano e acetato de etila, puros ou em misturas, obedecendo um gradiente crescente de polaridade (Tabela 1, abaixo). Foram obtidas 60 frações, as quais foram monitoradas por CCDA, reveladas com vapor de iodo e reunidas em grupos de acordo com seus R_fs (fatores de retenção).

A fração reunida 8-14 (450 mg) foi selecionada para purificação das substâncias (Esquema 2, p.42).

Tabela 1: Fracionamento cromatográfico da fração Hex:AcOEt /85:15

Sistema de solventes	Frações
Hex:AcOEt (99:1)	1-3
Hex:AcOEt (97:3)	4-6
Hex:AcOEt (95:5)	7-9
Hex:AcOEt (93:7)	10-15
Hex:AcOEt (9:1)	16-25
Hex:AcOEt (85:15)	26-34
Hex:AcOEt (8:2)	35-38
Hex:AcOEt (7:3)	39-40
Hex:AcOEt (6:4)	41-46
Hex:AcOEt (1:1)	47-60

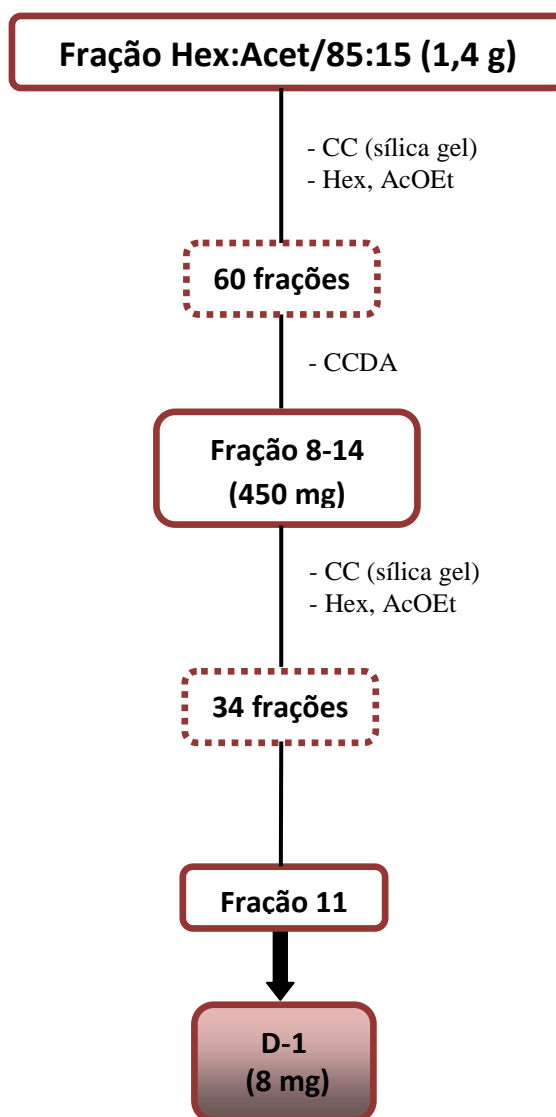
4.7.2 Fracionamento cromatográfico da fração 8-14

A fração 8-14 (450 mg), obtida no processo anterior, foi submetida à cromatografia em coluna com sílica gel 60 (0,016-0,040 mm/ 200-400 mesh ASTM da Merck), sendo eluída com hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas, obedecendo um gradiente crescente de polaridade (Tabela 2, abaixo). Neste processo foram obtidas 34 frações, as quais foram monitoradas por CCDA reveladas com vapor de iodo.

A fração 11 (8 mg) mostrou-se como uma única mancha na placa cromatográfica. Foi codificada como D-1 e encaminhada para análise espectroscópica (Esquema 2, página 42).

Tabela 2: Fracionamento cromatográfico da Fração 8-14

Sistema de solventes	Frações
Hex:AcOEt (99:1)	1
Hex:AcOEt (98:2)	2
Hex:AcOEt (95:5)	3-4
Hex:AcOEt (92:8)	5-6
Hex:AcOEt (9:1)	7-8
Hex:AcOEt (88:12)	9-10
Hex:AcOEt (85:15)	11-12
Hex:AcOEt (8:2)	13
Hex:AcOEt (75:25)	14
Hex:AcOEt (7:3)	15-16
Hex:AcOEt (6:4)	17-19
Hex:AcOEt (1:1)	20-22
Hex:AcOEt (4:6)	23-24
Hex:AcOEt (3:7)	25-26
Hex:AcOEt (2:8)	27
AcOEt	28
AcOEt:MeOH (95:5)	29-30
AcOEt:MeOH (9:1)	31-34

Esquema 2. Fracionamento cromatográfico da fração Hex:AcOEt /85:15

4.8 Comparação dos extratos brutos de *C. cervicornis* coletada no litoral da Paraíba (EPB2) e *C. cervicornis* coletada litoral do Rio de Janeiro (ERJ)

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais de Algas Marinhas (ALGAMAR) localizado na UFF, em Niteroi, em colaboração com a Prof. Dra. Valéria Laneuville Teixeira. Os extratos brutos de *C. cervicornis* coletada no litoral da Paraíba (EPB2) e *C. cervicornis* coletada no litoral do Rio de Janeiro (ERJ), obtidos em CH₂Cl₂:MeOH (2:1) e CH₂Cl₂, respectivamente, foram comparados por meio de uma CCDA utilizando placa de sílica da Merck.

Os exemplares do litoral fluminense de *C. cervicornis* foram coletados na Praia do Velho, em Angra dos Reis-RJ (lat. 23°01'S, long. 44° 00'W), e identificados pelo Professor Joel Campos de Paula. A exsicata (registro HRJ 10754) encontra-se depositada no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). O extrato foi preparado pela aluna de doutorado do programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia da UFF, Caroline de Souza Barros, a qual cedeu gentilmente uma alíquota para comparação com o extrato oriundo do litoral paraibano.

A placa cromatográfica foi eluída em CH₂Cl₂:AcOEt (8:2), revelada com solução de sulfato cérico em ácido sulfúrico, e aquecida por 5-8 minutos em chapa aquecedora. Em seguida a placa foi digitalizada. Também foram obtidos os espectros de RMN de ¹H de ambos os extratos das amostras coletadas em diferentes localidades.

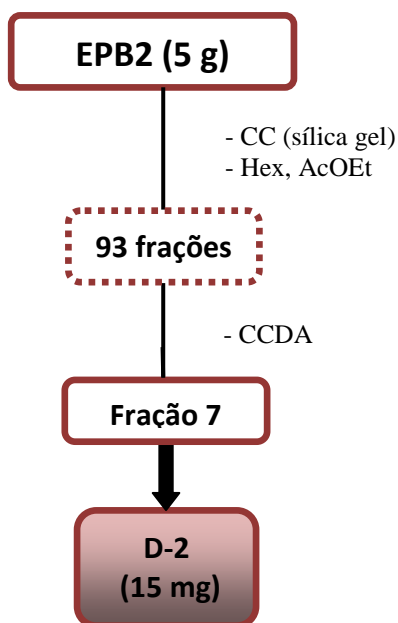
4.9 Fracionamento cromatográfico de EPB2

Uma alíquota de 5 g do extrato bruto de *C. cervicornis* (EPB2) foi submetida à cromatografia em coluna (CC/ 20 x 4 cm) com sílica gel 60 (0,063-0,200 mm/ 70-230 mesh ASTM da Merck), eluída com hexano e acetato de etila (Merck), puros ou em misturas, obedecendo um gradiente crescente de polaridade (Tabela 3, página 44).

Tabela 3: Fracionamento cromatográfico de EPB2.

Sistema de solventes	Frações	Sistema de solventes	Frações
Hex	1-2	Hex:AcOEt (55:45)	56-57
Hex:AcOEt (9:1)	3-4	Hex:AcOEt (1:1)	58-59
Hex:AcOEt (85:15)	5-32	Hex:AcOEt (4:6)	60-63
Hex:AcOEt (8:2)	33-36	Hex:AcOEt (35:65)	64-67
Hex:AcOEt (75:25)	37-41	Hex:AcOEt (3:7)	68-72
Hex:AcOEt (7:3)	42-46	Hex:AcOEt (25:75)	73-74
Hex:AcOEt (65:35)	47-51	Hex:AcOEt (2:8)	75-79
Hex:AcOEt (6:4)	52-55	AcOEt	80-93

As frações obtidas foram monitoradas por CCDA (Merck), as quais foram reveladas com o reagente sulfato cérico em ácido sulfúrico, seguido por aquecimento da placa por 5-8 minutos em chapa aquecedora. A fração **7** (15 mg) foi codificada como D-2 e enviada para análise espectral (Esquema 3, abaixo).

Esquema 3. Fracionamento cromatográfico de EPB2

4.10 Acetilação do extrato bruto de *C. cervicornis* EPB2

Uma alíquota de 10 g do EPB2 foi solubilizada em 50 mL de piridina e adicionou-se 60 mL de anidrido acético. Esta solução foi submetida à agitação magnética por 96 horas. Em seguida, foram adicionados 50 mL de água Mili-Q® e a mistura reacional foi transferida para uma ampola de separação. A extração foi feita com 200 mL de clorofórmio Merck. A fração clorofórmica foi concentrada em rotaevaporador obtendo-se 11 g do extrato bruto acetilado (EPBA).

4.11 Fracionamento cromatográfico do EPBA

O extrato bruto acetilado de *C. cervicornis* (EPBA) pesando 12 g foi submetido à cromatografia em coluna (CC/ 25 x 4 cm) com sílica gel 60 (0,063-0,200 mm Merck), a qual foi eluída com hexano e acetato de etila, puros ou em misturas binárias, obedecendo um gradiente crescente de polaridade (Tabela 4, abaixo).

Tabela 4: Fracionamento cromatográfico de EPBA

Sistema de solventes	Frações	Sistema de solventes	Frações
Hex	1-7	Hex:AcOEt (8:2)	145-159
Hex:AcOEt (99:1)	8-10	Hex:AcOEt (75:25)	160-170
Hex:AcOEt (97:3)	11-12	Hex:AcOEt (7:3)	171-177
Hex:AcOEt (95:5)	13-15	Hex:AcOEt (6:4)	178-183
Hex:AcOEt (93:7)	16-53	Hex:AcOEt (1:1)	184-190
Hex:AcOEt (92:8)	54-69	Hex:AcOEt (4:6)	191-197
Hex:AcOEt (9:1)	70-99	Hex:AcOEt (3:7)	198-203
Hex:AcOEt (88:12)	100-114	Hex:AcOEt (2:8)	204-212
Hex:AcOEt (85:15)	115-144	AcOEt	213

As frações obtidas foram monitoradas por CCDA e reveladas com solução de sulfato cérico em ácido sulfúrico, sendo as placas submetidas à aquecimento.

As frações 113-115 (38 mg) e 130-132 (50 mg) foram submetidas, cada uma, a colunas cromatográficas em sílica gel para purificação dos compostos.

A fração 191 (170 mg) foi codificada como D-4 e enviada para análise espectroscópica. Após identificação, alíquotas da amostra foram disponibilizadas para testes biológicos, que serão realizados por alunos de mestrado e doutorado dos Programas de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia ou no Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha/UFF.

4.11.1 Fracionamento cromatográfico da fração 113-115

A fração 113-115 (38 mg) foi submetida à cromatografia em coluna com sílica gel 60 (0,016-0,040 mm/ 200-400 mesh ASTM da Merck), sendo eluída com diclorometano e acetato de etila conforme descrito na Tabela 5 (abaixo). Foram obtidas 43 frações, as quais foram monitoradas por CCDA reveladas com solução de sulfato cérico em ácido sulfúrico, seguido por aquecimento da placa por 5-8 minutos em chapa aquecedora.

A fração 7 (1,8 mg) mostrou-se como uma única mancha na placa cromatográfica. Foi codificada como D-3 e encaminhada para análise espectroscópica (Esquema 4, página 48).

Tabela 5: Fracionamento cromatográfico da Fração 113-115

Sistema de solventes	Frações
CH ₂ Cl ₂	1-38
CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (1:1)	39
AcOEt	42-43

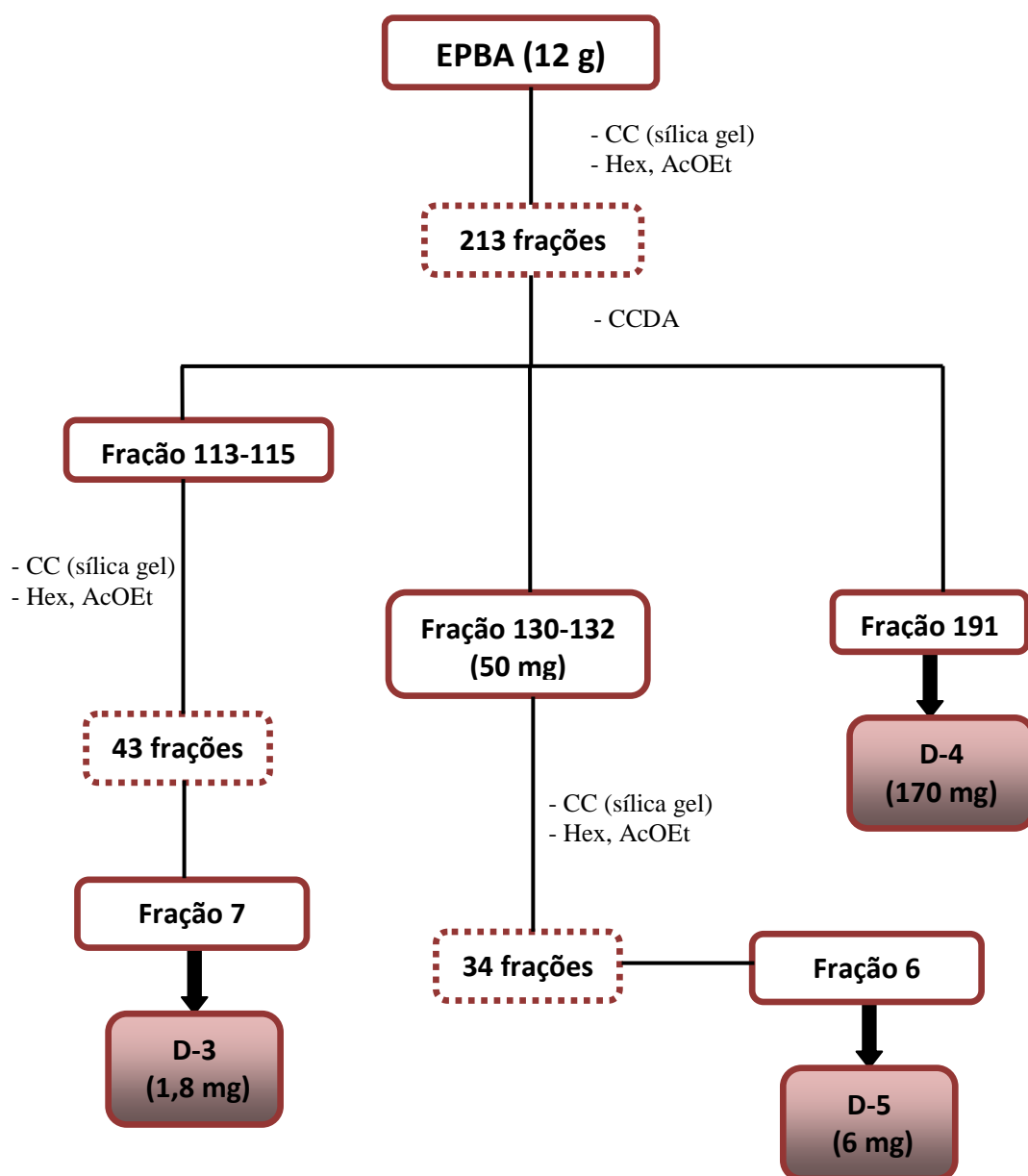
4.11.2 Fracionamento cromatográfico da fração 130-132

A fração 130-132 (50 mg) reunida foi submetida à cromatografia em coluna com sílica gel 60 (0,016-0,040 mm/ 200-400 mesh ASTM da Merck), sendo eluída com hexano e acetato de etila conforme descrito na Tabela 6, abaixo. Foram obtidas 34 frações, as quais foram monitoradas por CCDA reveladas com solução de sulfato cérico em ácido sulfúrico, seguido por aquecimento da placa por 5-8 minutos em chapa aquecedora.

A fração 6 (6,0 mg) mostrou-se como uma única mancha na placa cromatográfica. Foi codificada como D-5 e encaminhada para análise espectroscópica (Esquema 4, página 48).

Tabela 6 : Fracionamento cromatográfico da Fração 130-132

Sistema de solventes	Frações
Hex:	1
Hex:AcOEt (95:5)	2-3
Hex:AcOEt (92:8)	4-5
Hex:AcOEt (9:1)	6-7
Hex:AcOEt (88:12)	8-11
Hex:AcOEt (85:15)	12-17
Hex:AcOEt (8:2)	18-20
Hex:AcOEt (7:3)	21-22
Hex:AcOEt (6:4)	23-25
Hex:AcOEt (1:1)	26-27
Hex:AcOEt (3:7)	28-29
Hex:AcOEt (2:8)	30-31
AcOEt	32-34

Esquema 4. Fracionamento cromatográfico de EPBA

Resultados

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Identificação estrutural de D-1

A substância codificada como D-1 foi isolada como um sólido branco (8 mg), solúvel em CHCl_3 e $[\alpha]_D -80,0^\circ$ (CHCl_3). O espectro na região do IV (Figura 3, p.54) de D-1 apresentou bandas de absorção em 3.456 cm^{-1} característica de estiramento de ligação OH de hidroxila, em 2.962 cm^{-1} característica de estiramento assimétrico da ligação CH sp³, em 1739 e 1701 cm^{-1} observaram-se duas bandas de absorção que remetem à deformação axial de grupo carbonílico de éster e cetona conjugada, respectivamente. Em 1230 cm^{-1} característica de ligação C-O.

Na Tabela 7 (página 52) é possível visualizar os deslocamentos químicos obtidos em CDCl_3 nos espectros de RMN de ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC, HMBC, COSY (Figuras 4-17, páginas 55 a 61).

Os espectros de RMN de ^1H de D-1 (Figuras 4-7, p.55-56) quando comparados com dados da literatura (Ali et al., 2003) permitiram propor que a substância D-1 poderia tratar-se de um diterpeno do tipo dolastano encontrado em *C. cervicornis*. Esta proposta fundamentou-se na presença de dois singletos (Figuras 4 e 5, p. 55) em δ_H 0,86 (s), referente a Me-16, e em δ_H 1,59 (s), atribuído a Me-20 da estrutura proposta. Estas informações, acrescidas de um multipletto em δ_H 2,68 (Figura 6, p. 56) atribuído ao H-17, que acopla com dois dupletos em δ_H 1,11 (d, $J = 7,0\text{ Hz}$) e δ_H 1,13 (d, $J = 7,0\text{ Hz}$), atribuídos aos hidrogênios das metilas CH₃-18 e CH₃-19, respectivamente, evidenciam a existência de em D-1 de uma unidade isopropila, presente na estrutura típica de diterpenos dolastano.

Outros sinais que fortalecem a proposta de que D-1 pode tratar-se de um dolastano foram um singleto em δ_H 4,80 e um singleto largo em δ_H 4,92 (Figura 7, p. 56) atribuídos aos hidrogênios H-15a e H-15b, respectivamente, de uma dupla ligação exocíclica na posição C-1 e uma hidroxila na posição C-14. O outro hidrogênio do singleto largo em δ_H 4,79 (sl) que integra para dois hidrogênios refere-se ao hidrogênio oximetínico (H-4), sugerindo, portanto, em conjunto com dados da literatura (Tabela 8, p. 53), que C-4 possui como substituinte um grupo acetato, uma vez que, quando o C-4 possui como substituinte uma hidroxila, o hidrogênio oximetínico (H-4) absorverá em torno de δ_H 3,3-3,5 (ALI et al., 2003.)

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 8, p. 57) foi possível visualizar os sinais em: δ_C 18,24 e δ_C 26,52, os quais foram atribuídos as Me-16 e Me-20, respectivamente, sinais em δ_C

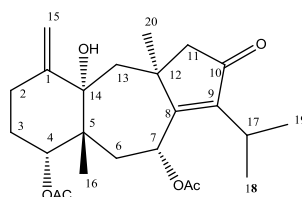
19,54 (Me-18) δ_C 19,87 (Me-19) e δ_C 25,65 (C-17), referentes à unidade isopropila (Figura 9, p. 57); e os sinais em δ_C 149,65 (C-1) e δ_C 110,39 (C-15) (Figura 11, p. 58) os quais compõem a dupla ligação terminal existente na molécula. A análise do espectro de RMN ^{13}C juntamente com os dados de referência da dichotenona-A na literatura (ALI et al., 2003) auxiliaram na determinação do esqueleto dolastano para esta substância.

Outros sinais importantes observados no espectro de RMN ^{13}C de D-1 foram os deslocamentos referentes à dupla ligação entre os carbonos C-8 (δ_C 170,79) e C-9 (δ_C 147,76), o sinal atribuído a uma carbonila de cetona no C-10 (δ_C 207,42), além das duas carbonilas das unidades acetato em δ_C 169,53 (–OAc-7) e δ_C 168,98 (–OAc-4) (Figura 11, p.58), sinais de carbono oxigenado em δ_C 81,87, δ_C 67,00, δ_C 78,64, atribuídos aos C-4, C-7 e C-14, respectivamente (Figura 10, p.58). Os demais sinais foram relacionados aos $-CH_2$ do anel dolastano e podem ser visualizados na Tabela 7 (página 52). As correlações no espectro de HMQC (Figura 12, p. 59) de D-1 também estão compiladas na Tabela 7.

No espectro COSY de D-1 (Figura 13, p. 59) foi possível visualizar correlações entre o sinal em δ_H 2,08, atribuído a H-2 e o sinal em δ_H 2,63 (H-2). Já 2,63 (H-2) mostrou correlação com δ_H 1,83, o qual foi atribuído ao H-3. Na sequência, H-3 correlacionou-se com δ_H 4,79 (s), que foi definido como H-4. Observou-se também correlações entre os H-6 [δ_H 1,68 (dd, $J = 14,0$ e $7,0$) e δ_H 2,79 (dd, $J = 14,0$ e $11,0$)], entre si, e com δ_H 6,04 (dd, $J = 11,0$ e $7,0$), o qual foi atribuído ao H-7.

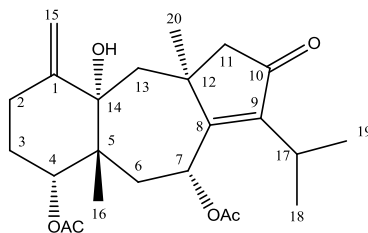
No espectro de HMBC (Figuras 14-17, p. 60 e 61) pode-se observar correlações do H-2 (δ_H 2,63) com C-1 (δ_C 149,65), C-15 (δ_C 110,39) e com o sinal em δ_C 27,06, que foi atribuído a C-3. Correlações entre o H-17 (δ_H 2,68), e os carbonos em δ_C 170,79 (C-8), δ_C 147,76, (C-9), asseguram a dupla ligação entre estes carbonos e a correlação com δ_C 207,42 inferiu a posição da cetona no C-10. A Me-16 teve sua posição confirmada através de correlações com os carbonos C-4, C-5, C-6, C-7, visualizadas na Tabela 7 (página 52).

Assim, após análise dos dados de RMN uni e bidimensionais e comparações com dados da literatura, concluiu-se que D-1 trata-se de uma substância inédita na literatura, a qual foi denominada 4,7-diacetoxi A devido às comparações com a dichotenona A (ALI et al., 2003). Diferenças nos deslocamentos químicos das duas substâncias podem ser visualizadas na Tabela 8 (página 53).



4,7- diacetoxi de dichotenona A

Tabela 7. Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz) da substância **D-1**



	HMQC		COSY	HMBC
	δ_{H}	δ_{C}		
1	-			
2	2,08 (1H,m) 2,63 (1H, m)	149,65		C-1, C-3, C-15
3	1,83(1H) 1,86 (1H)	42,65		
4	4,79 (1H, sl)	170,79		
5	-	147,76		
6	1,68 (1H, m, 14,0 e 7,0) 2,79 (1H, dd, 14,0 e 11,0)	207,42		C-5, C-7, C-14, C-16
7	6,04 (dd, 11,0 e 7,0)	44,14		C-6, C-8, C-9, C-12, 7-O $\underline{\text{C}}$ OC $\underline{\text{H}}_3$
8	-	78,64		
9	-			
10	-	81,87		
11	2,30 (1H) 2,32 (1H)	67,00	H-6	C-8, C-10
12	-	25,65	H-19	
13	1,76 (1H, d, 14,5) 2,11 (1H)			C-5, C-8, C-11, C-12, C-14, C-20
14	-	26,31	H-2, H-3	
15	4,80 (1H, s) 4,92 (1H, s)	27,06	H-4	C-1, C-2, C-14
16	0,86 (3H, s)	33,18	H-7	C-4, C-5, C-6, C-14
17	2,68 (1H, s)	56,19		C-8, C-9, C-10, C-18, C-19
18	1,11 (3H, d, 7,0)	47,80	H-13	C-17, C-19
19	1,13 (3H, d, 7,0)	110,39		C-18, C-17
20	1,59 (3H, s)			C-8, C-12, C-13
4-C$\underline{\text{O}}$OC$\underline{\text{H}}_3$	-	18,24		
4-C$\underline{\text{O}}$OC$\underline{\text{H}}_3$	2,14 (3H, s)	19,54		4-C $\underline{\text{O}}$ OC $\underline{\text{H}}_3$
7-C$\underline{\text{O}}$OC$\underline{\text{H}}_3$	-	19,87	H-17	
7-C$\underline{\text{O}}$OC$\underline{\text{H}}_3$	2,04 (3H, s)	26,52		7-C $\underline{\text{O}}$ OC $\underline{\text{H}}_3$

D-1

Dichotenona A

Número	D-1	Dichotenona-A (ALI et al., 2003)	D-1	Dichotenona-A (ALI et al., 2003)
	δ_H	δ_H	δ_C	δ_C
1	-	-	149,7	151,2
2	2,08 (1H,m) 2,63 (1H, m)	n.o	26,3	26,0
3	1,83(1H) 1,86 (1H)	n.o	27,1	29,0
4	4,79 (1H, s)	3,34 (1H, t, 2,5 e 2,4)	81,8	79,5
5	-	-	42,7	42,0
6	1,68 (1H, m) 2,79 (1H, m)	n.o	33,2	37,5
7	6,04 (dd, 11,0 e 7,0)	4,67 (1H, dd, 11,2 e 6,7)	67,0	64,9
8	-	-	170,8	176,6
9	-	-	147,7	145,9
10	-	-	207,4	209,4
11	2,30 (1H) 2,32 (1H)	n.o	56,1	56,0
12	-	n.o	44,1	44,0
13	1,76 (1H, d, 14,5)	n.o	47,8	48,3
14	-	n.o	78,6	79,4
15	4,80 (1H, s) 4,92 (1H, s)	4,60 (s) 4,76 (s)	110,4	109,2
16	0,86 (3H, s)	0,55 (s)	18,2	17,2
17	2,68 (1H, s)	2,69 (m)	25,6	25,2
18	1,11 (3H, d, 7,0)	1,01 (3H, d, 7,0)	19,5	19,7
19	1,13 (3H, d, 7,0)	1,00 (3H, d, 7,0)	19,8	19,4
20	1,59 (3H, s)	1,46 (3H, s)	26,5	25,7
4-COOCH ₃	-	-	168,9	-
4-COOCH ₃	2,14 (3H, s)	-	21,3	-
7-COOCH ₃	-	-	169,5	-
7-COOCH ₃	2,04 (3H, s)	-	21,1	-

n.o. : não observado

ESPECTROS D-1

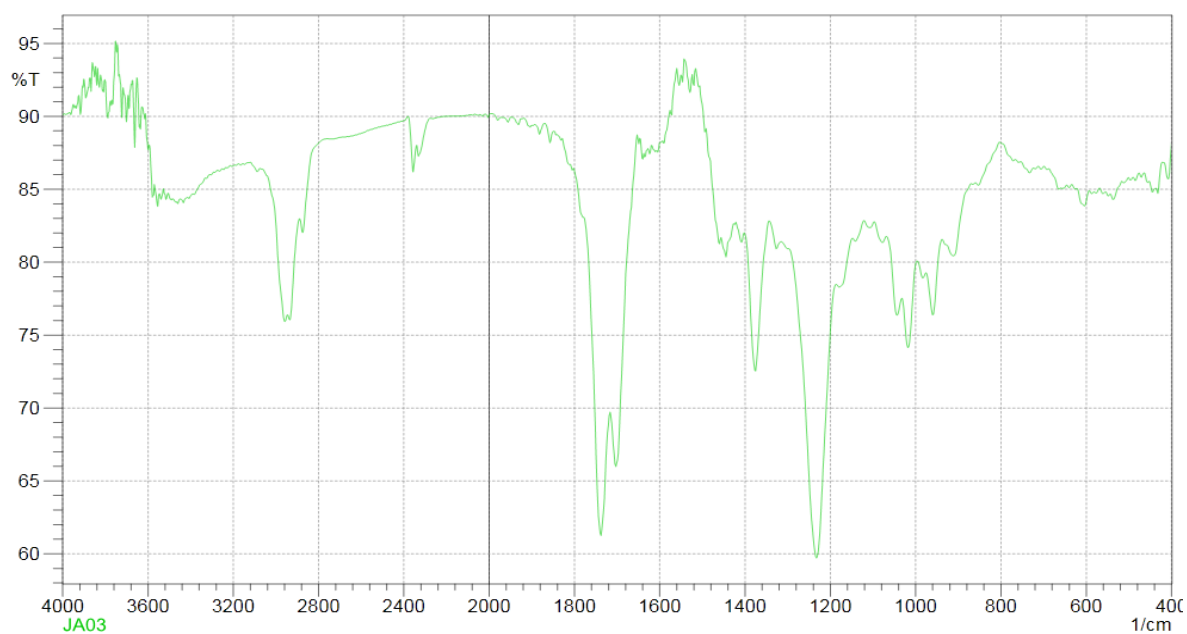
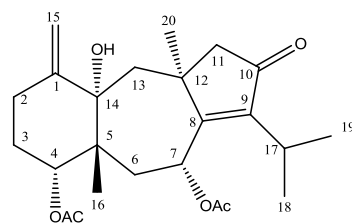


Figura 3. Espectro de IV de D-1 (pastilha de KBr).

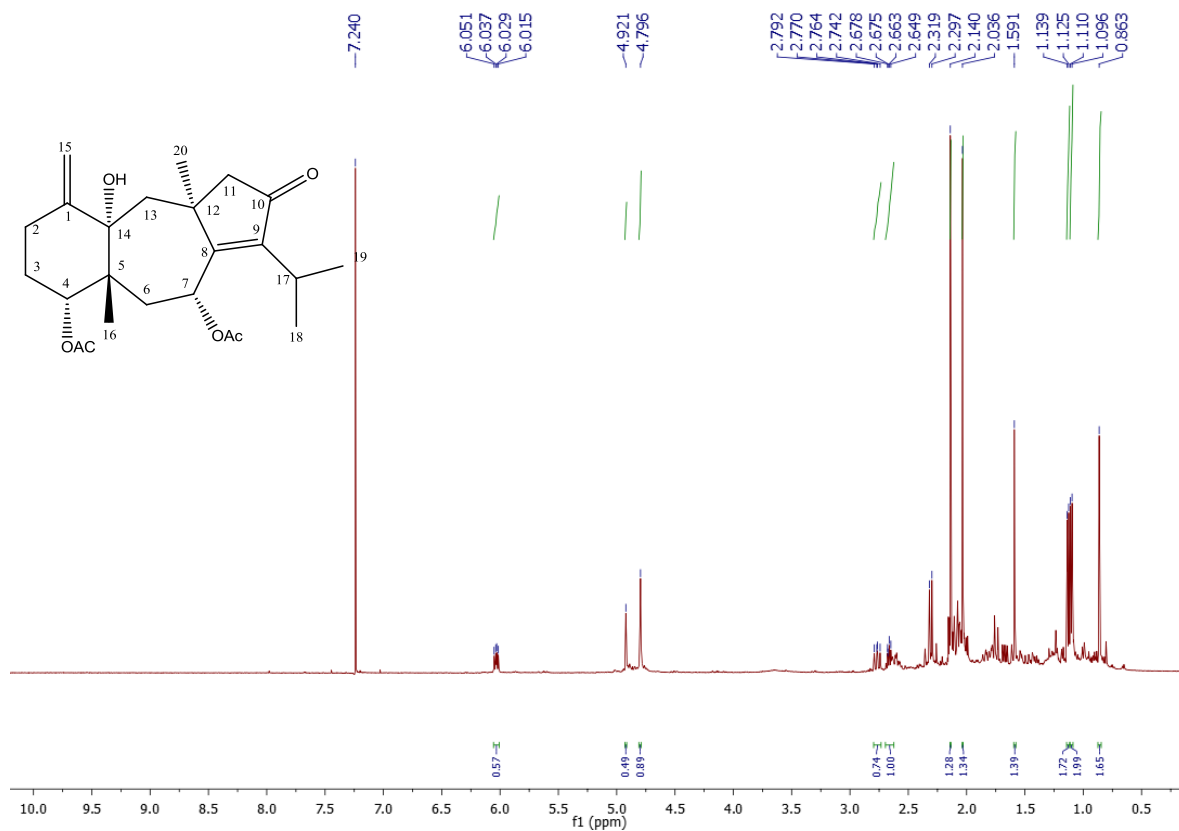


Figura 4. Espectro de RMN ^1H de D-1 (CDCl_3 , 500 MHz).

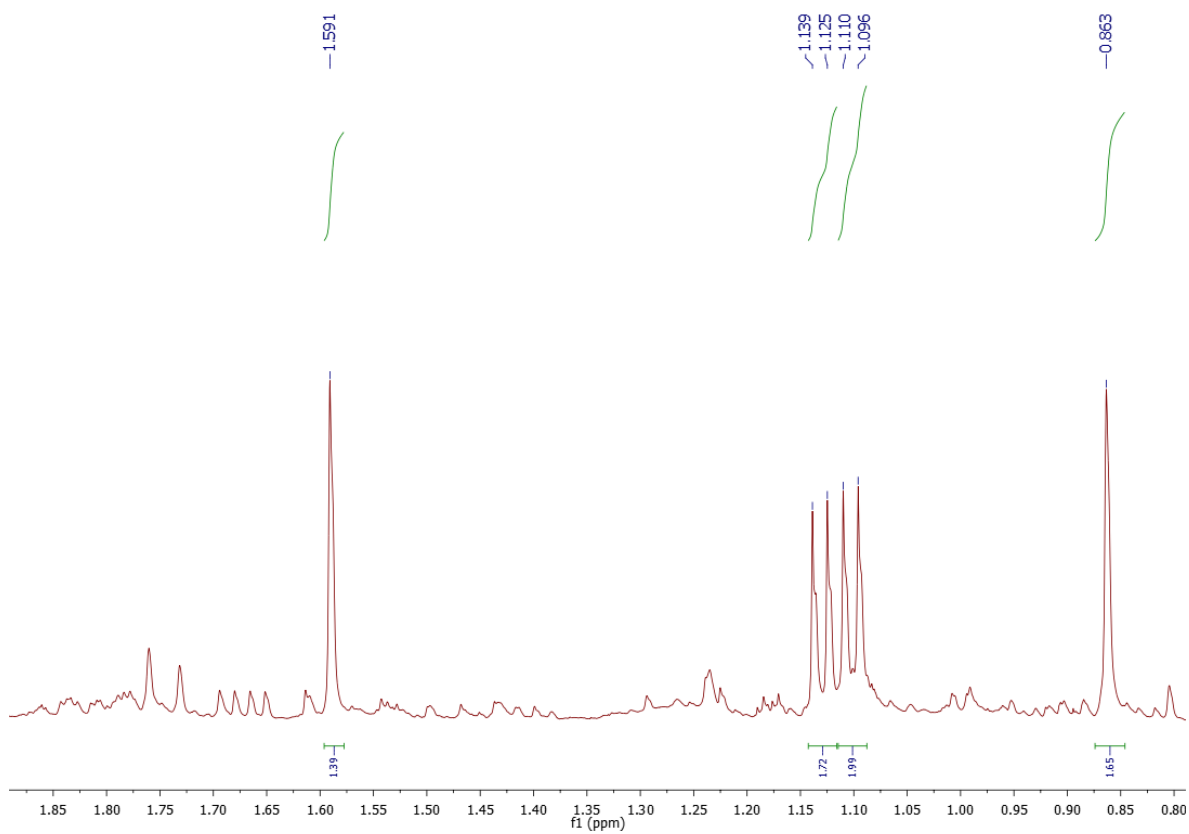


Figura 5. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-1 da região entre 1,90-0,80 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

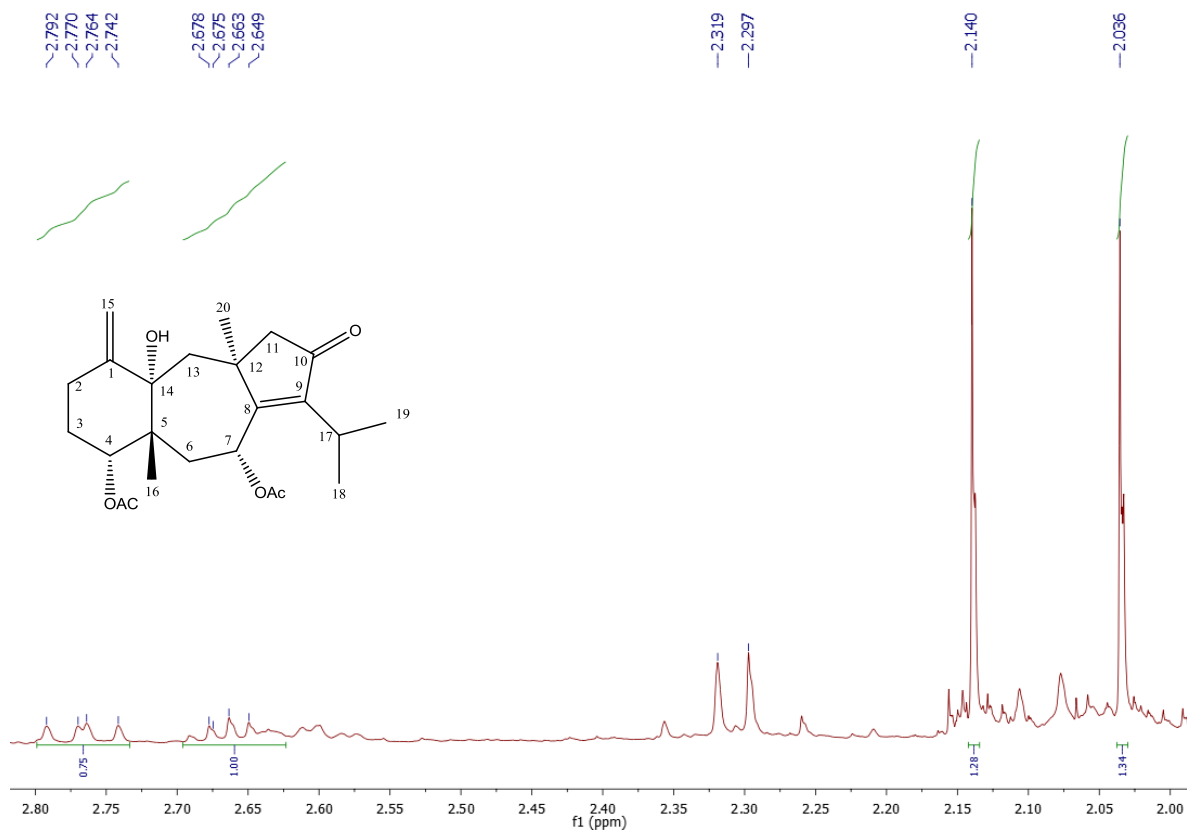


Figura 6. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-1 da região entre 2,90-2,00 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

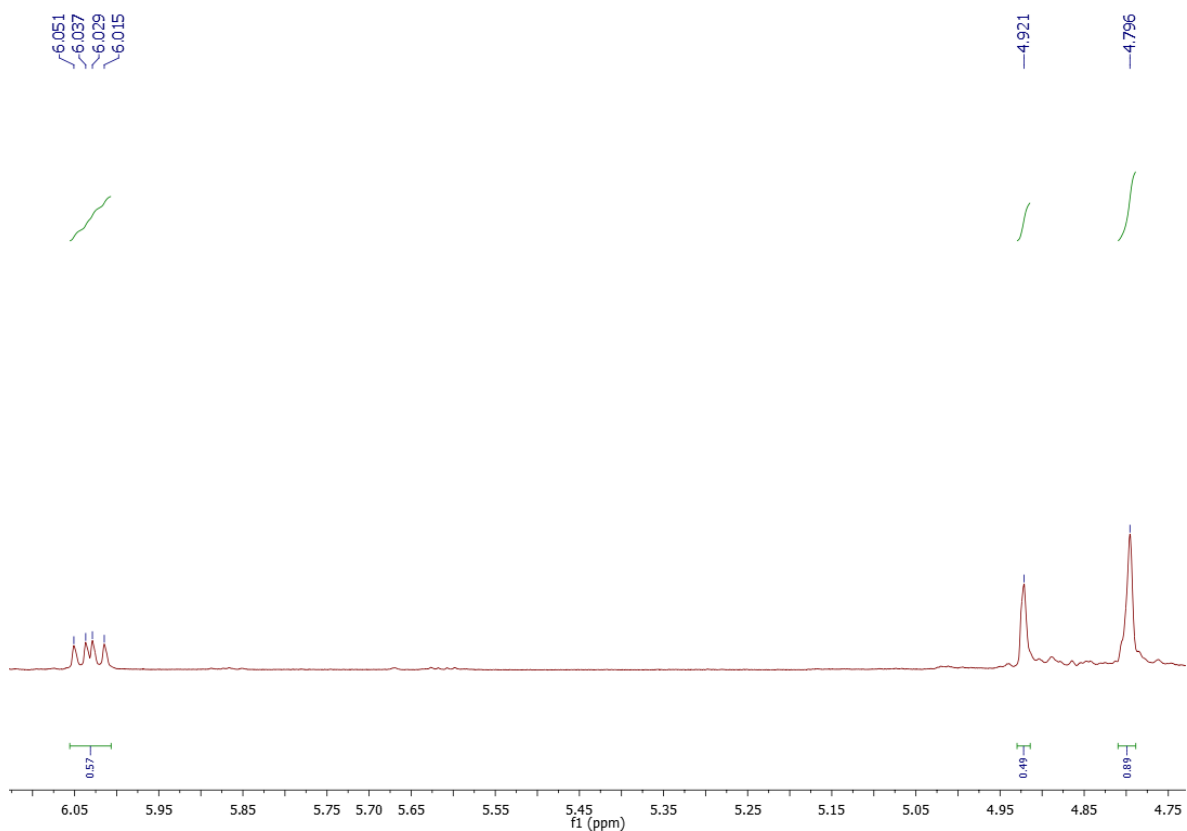


Figura 7. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-1 da região entre 6,10-4,75 ppm (CDCl_3 , 500 MHz).

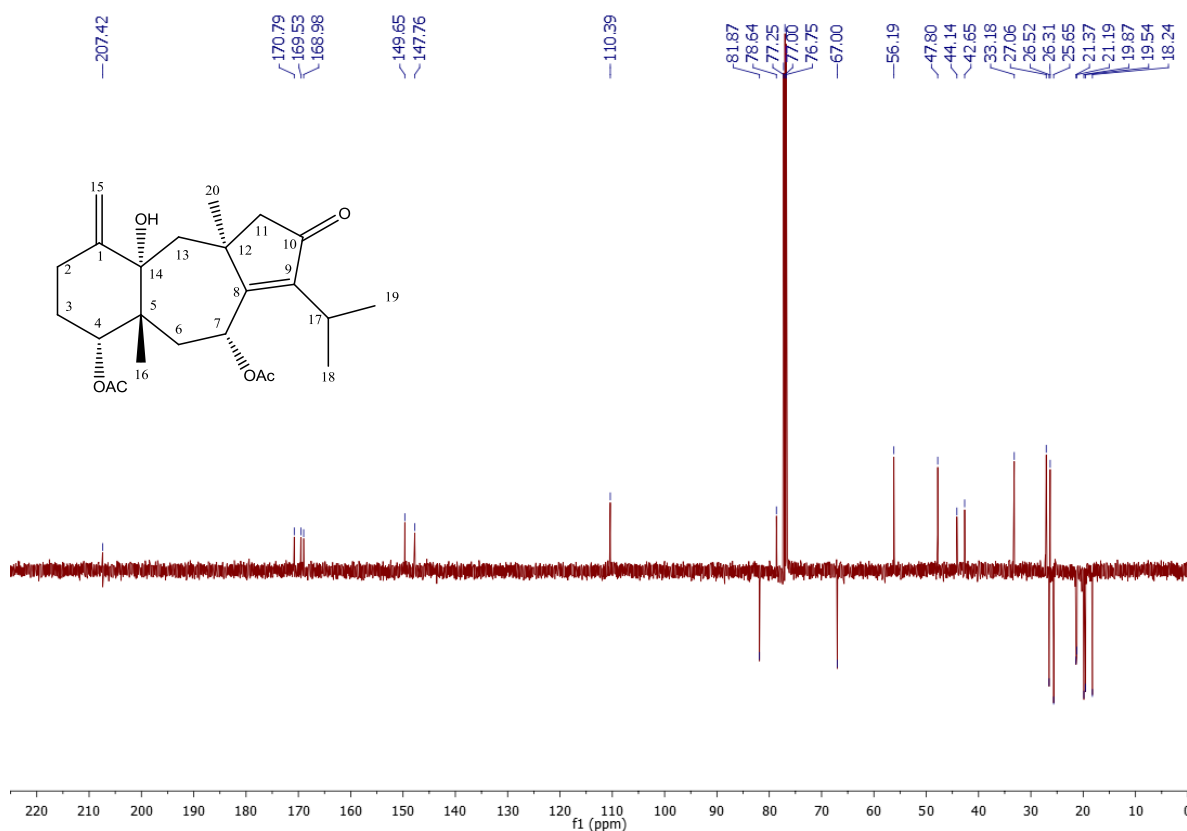


Figura 8. Espectro de RMN ^{13}C de D-1 (CDCl_3 , 125 MHz).

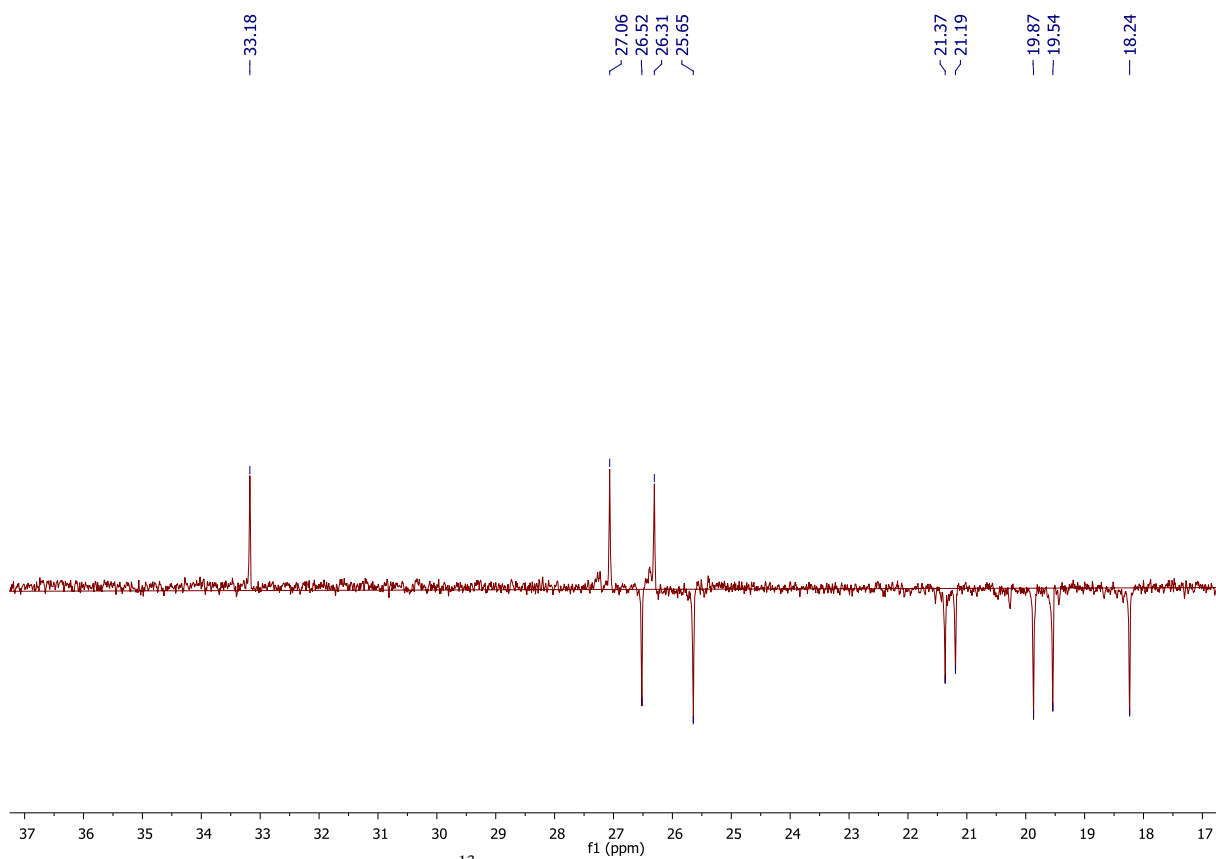


Figura 9. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-1 da região entre 37-17 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).

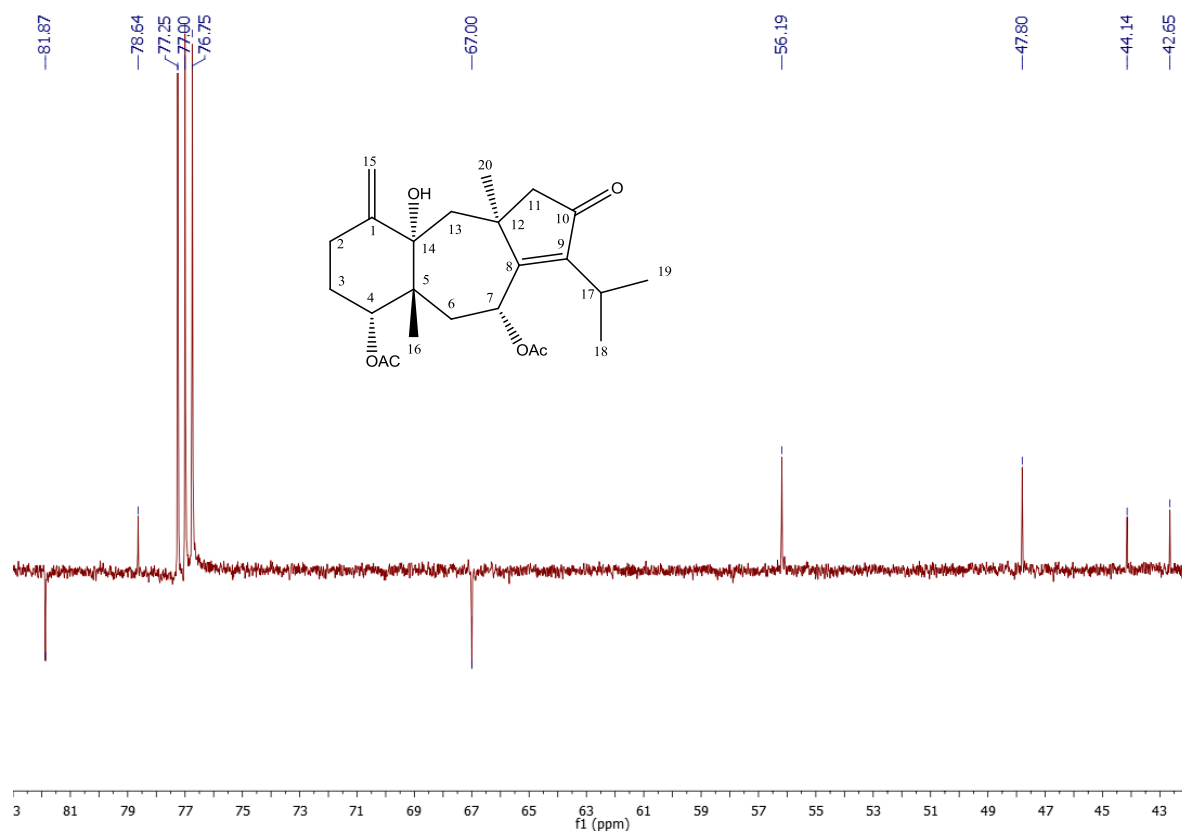


Figura 10. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-1 da região entre 83-42 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).

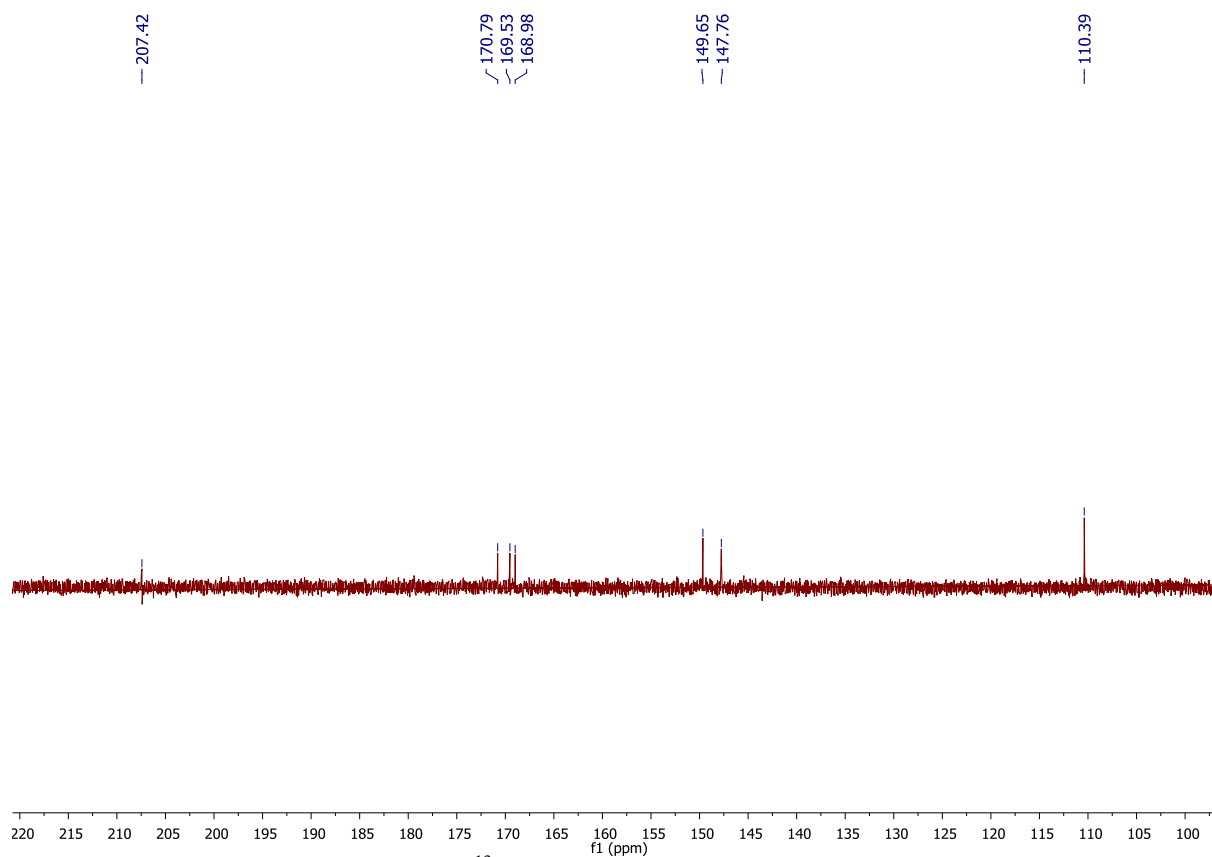


Figura 11. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-1 na região entre 220 e 100 ppm (CDCl_3 , 125 MHz).

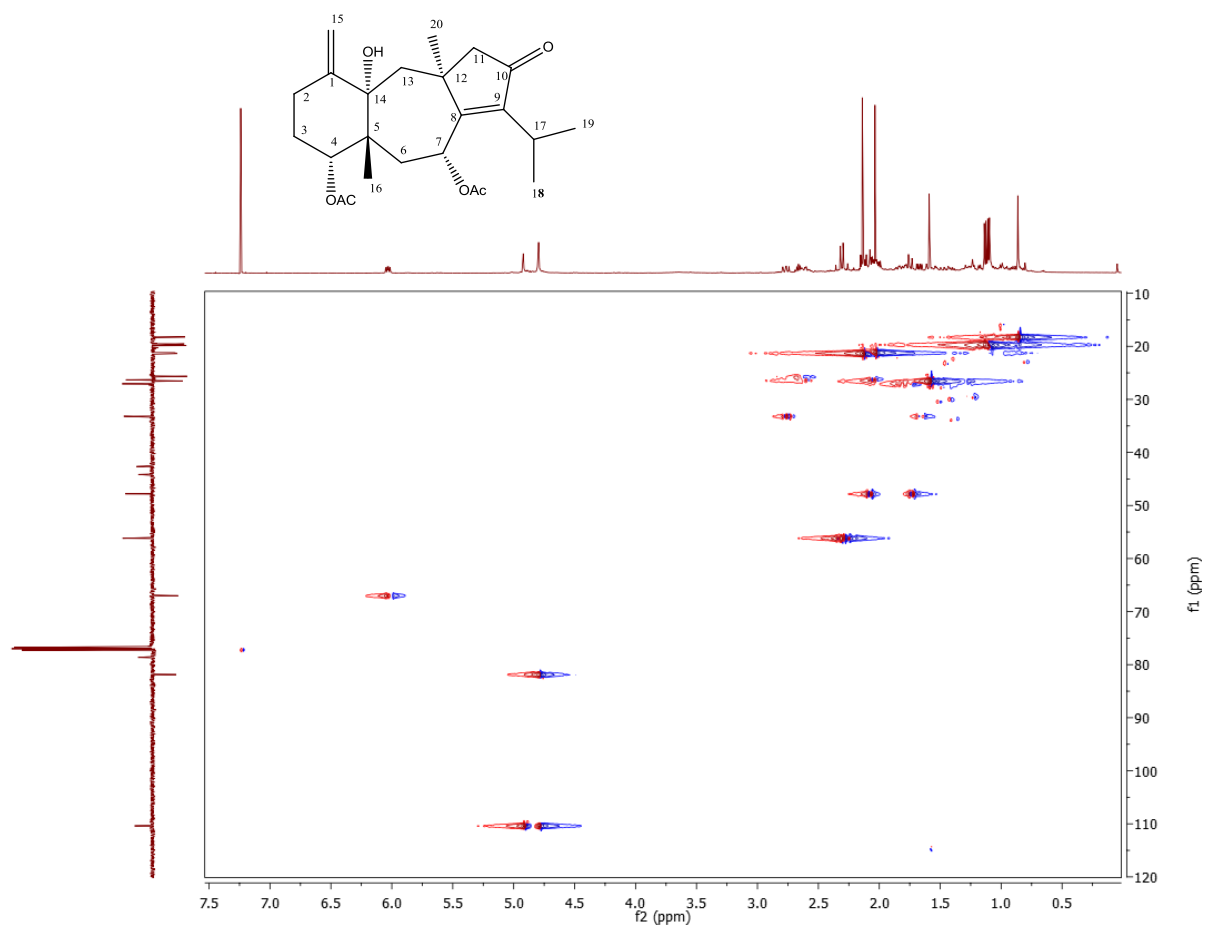


Figura 12. Espectro de correlação ^1H x ^{13}C HMQC de D-1 (CDCl_3 , 500 MHz e 125 MHz).

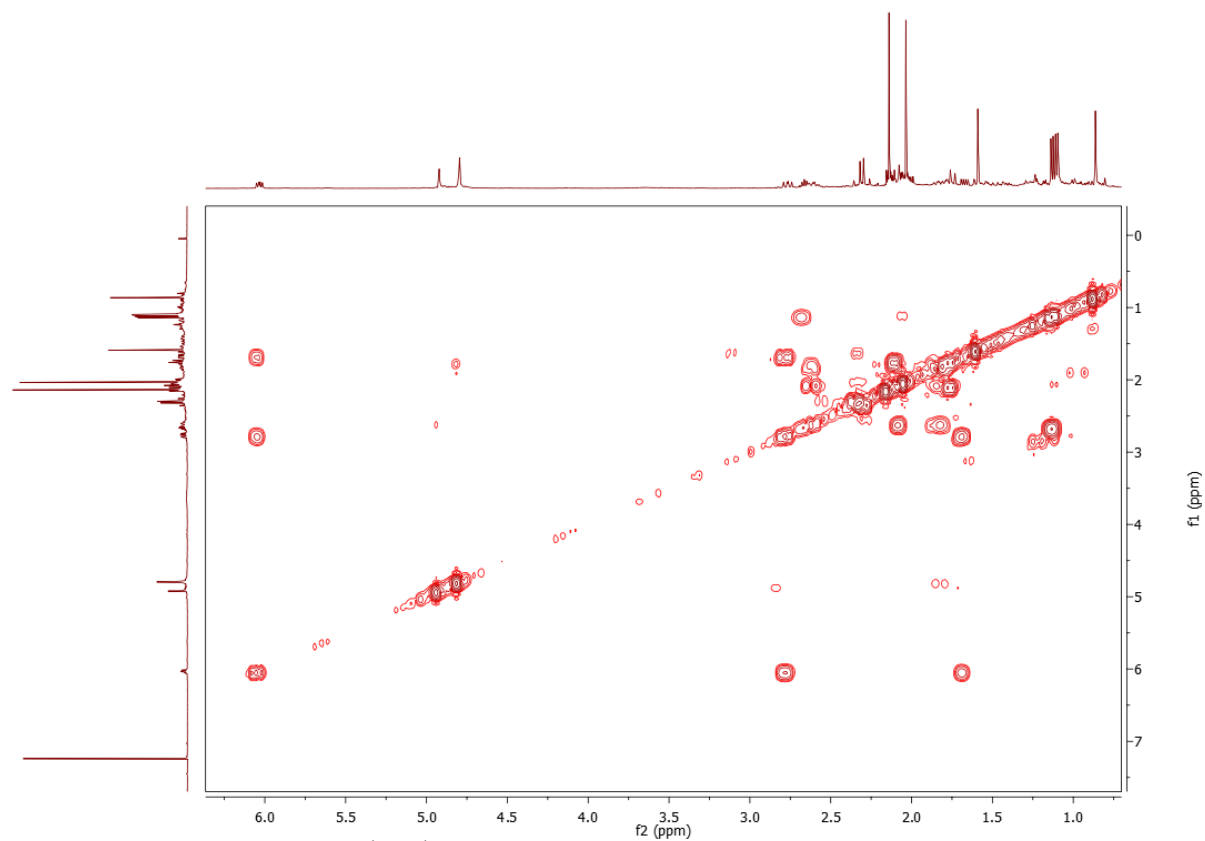


Figura 13. Espectro de correlação ^1H x ^1H -COSY de D-1 (CDCl_3 , 500 MHz).

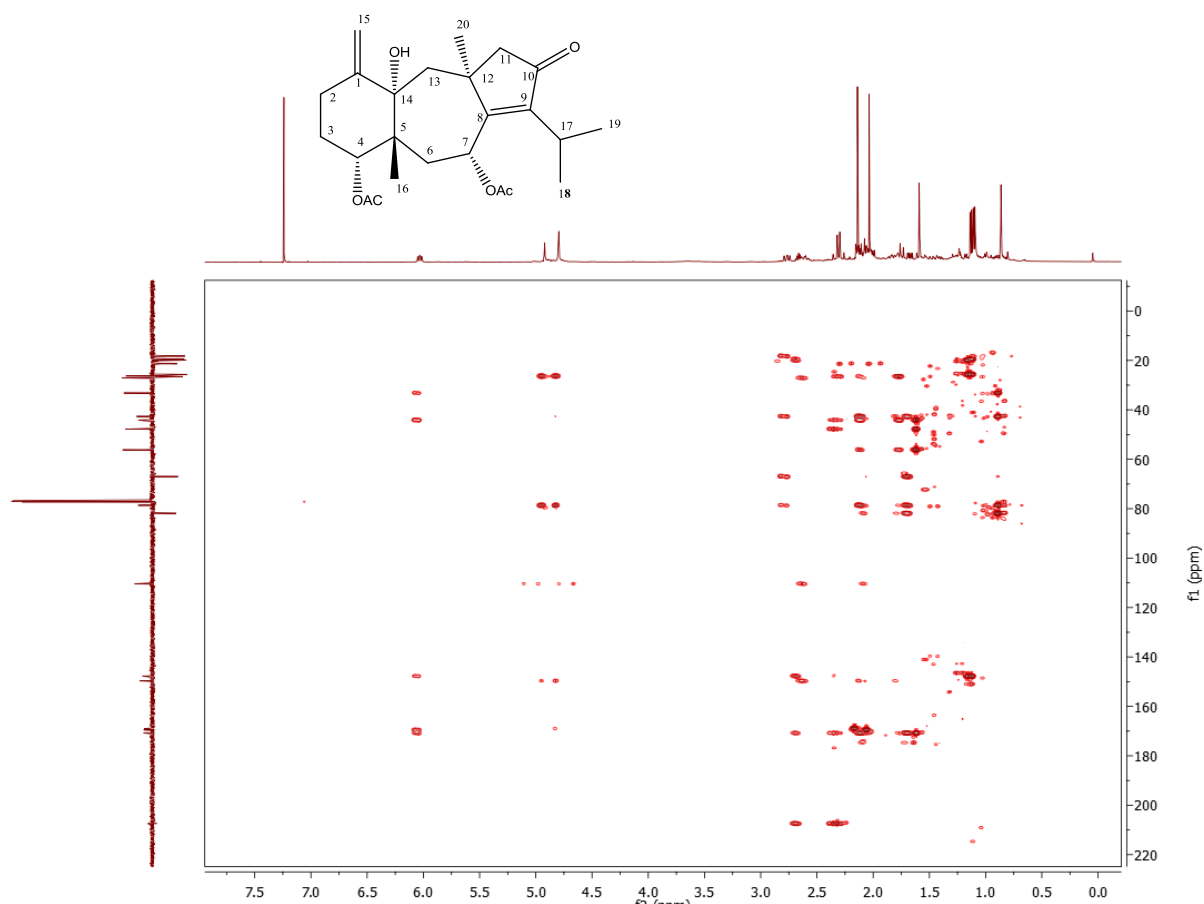


Figura 14. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-1 (CDCl_3 , 500 MHz e 125 MHz).

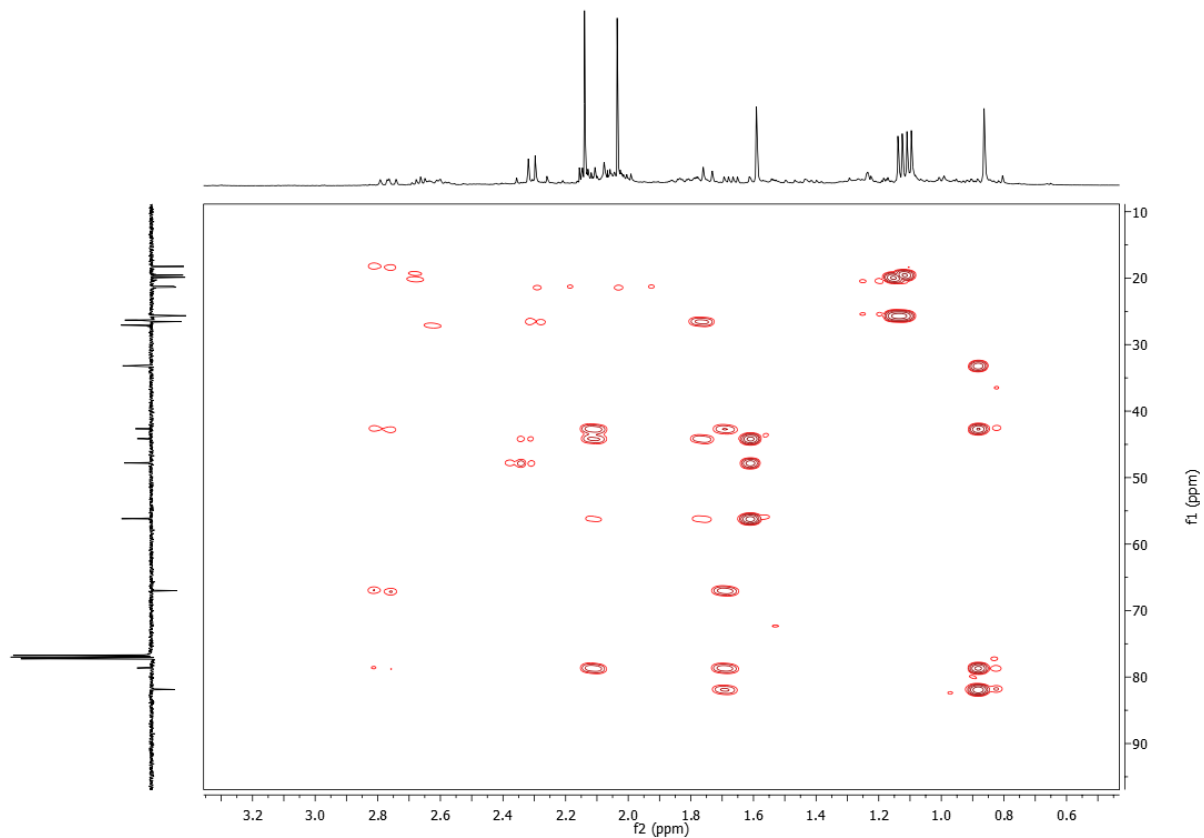


Figura 15. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-1 na região entre 90 e 10 ppm (CDCl_3 , 500 MHz e 125 MHz).

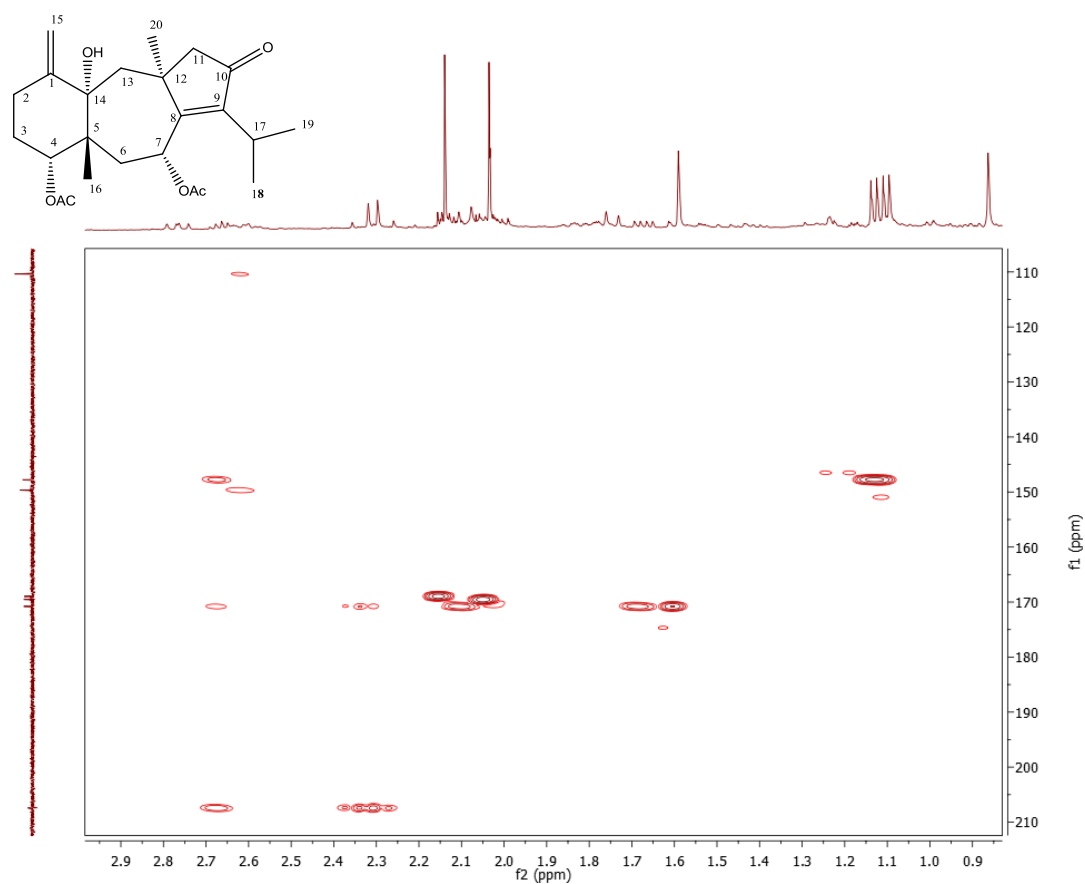


Figura 16. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-1 na região entre 210 e 110 ppm (CDCl_3 , 500 MHz e 125 MHz).

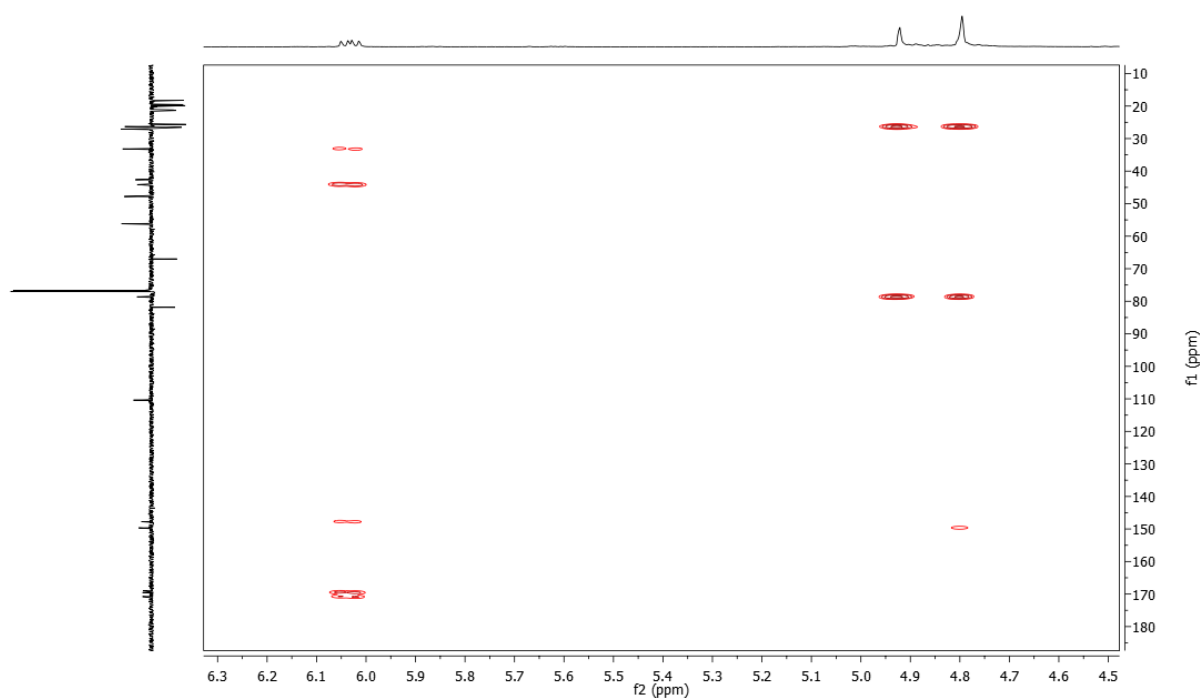


Figura 17. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-1 na região entre 180 e 10 ppm (CDCl_3 , 500 MHz e 125 MHz).

5.2 Identificação estrutural de D-2

A substância codificada como D-2 foi isolada sob a forma de um óleo amarelado (15 mg). O espectro na região do IV (Figura 18, p. 66) de D-2 apresentou bandas de absorção em 3.421 cm^{-1} , correspondente a estiramento de ligação O-H de hidroxila, em 2.954 cm^{-1} característica de estiramento assimétrico da ligação C-H de grupos CH_2 , em 1743 cm^{-1} uma absorção que remete à deformação axial de grupo carbonílico de éster. Em 1637 cm^{-1} foi observada absorção característica de ligação C=C, em 1375 cm^{-1} observou-se uma deformação característica de grupos metila e em 1230 cm^{-1} há um pico intenso, característico de ligação C-O.

Na Tabela 9 (página 64) pode-se visualizar os deslocamentos químicos obtidos em CDCl_3 nos espectros de RMN de ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), HSQC, HMBC e COSY (Figuras 19-33, p. 67-74). A substância apresentou $[\alpha]_{\text{D}} -225^\circ$ (CHCl_3).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 19, p. 66) de D-2 foi caracterizado pela presença de dois dupletos referentes a duas metilas em δ_{H} 1,06 e em δ_{H} 1,10, ambas com $J = 6,9\text{ Hz}$ (Figura 20, p. 67) e um multipletto em δ_{H} 2,38 (Figura 21, p. 68). O conjunto desses sinais indicou a presença de uma unidade isopropila na estrutura. Outras duas metilas foram detectadas pelos simpletos em δ_{H} 0,90 (CH_3 -16) e δ_{H} 1,33 (CH_3 -20) (Figuras 20, p. 67). Os sinais em δ_{H} 4,80 (s) e δ_{H} 4,90 (sl) fazem parte de uma dupla ligação exocíclica (H-15) na molécula (Figura 22, p. 68). Esses sinais, em conjunto com os dados da literatura, direcionam para uma estrutura de diterpeno do tipo dolastano, compostos tipicamente encontrados em *C. cervicornis* (SUN et al., 1981; CREWS et al., 1982).

Outros sinais que chamaram a atenção neste espectro foram: o duplo dubleto em δ_{H} 5,35 ($J = 9,3$ e $4,5\text{ Hz}$), referente a um hidrogênio olefínico (definido como H-7) e o singleto em δ_{H} 5,60 atribuído ao H-10 olefínico. O sinal em δ_{H} 4,84 (t, $J = 4,8\text{ Hz}$) foi atribuído ao H-4 em carbono oximetínico (Figura 22, p. 68), e δ_{H} 2,15 (s, 4-OAc) foi atribuído a uma metila de unidade acetato, que se encontra inserida no C-4 (CREWS et al., 1982; SUN et al., 1981).

A partir de comparação com a literatura (CREWS et al., 1982; SUN et al., 1981) e análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 23, p.69) foi possível confirmar a hipótese do esqueleto do tipo dolastano (já sugeridas no espectro de RMN ^1H) através dos seguintes sinais: cinco C metílicos em δ_{C} 19,86 (CH_3 -16), δ_{C} 22,02 (CH_3 -18), δ_{C} 22,04 (CH_3 -19), δ_{C} 27,49 (CH_3 -20), δ_{C} 21,36 (4-OAc), seis sinais metilênicos nos deslocamentos δ_{C} 28,26 (C-2), δ_{C} 26,74 (C-3), δ_{C} 30,61 (C-6), δ_{C} 41,68 (C-11), δ_{C} 50,87 (C-13) e δ_{C} 109,40 (C-15) (Figuras 24 e 25, p. 69 e 70). Este sinal em C-15 compõe a dupla ligação exocíclica, juntamente com o

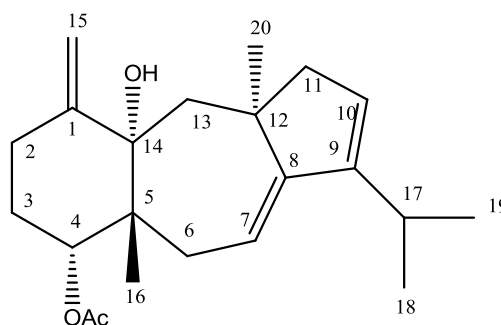
C quaternário em δ_C 151,39 (C-1). Os sinais em δ_C 112,32 e δ_C 154,84 localizaram uma dupla ligação entre C-7 e C-8, respectivamente. Já os sinais em δ_C 149,45 e δ_C 125,54 apontaram para a presença de outra dupla ligação entre C-9 e C-10, formando a conjugação endocíclica no diterpeno dolastano em questão (Figura 25, p. 70). Os sinais em δ_C 82,22, δ_C 25,51 foram atribuídos aos carbonos metínicos C-4 e C-17, respectivamente.

Os carbonos quaternários de D-2 tiveram suas atribuições confirmadas baseado nas comparações com a literatura (CREWS et al., 1982; SUN et al, 1981) e análise do espectro de HSQC (Figuras 26, 27 e 28, p. 70 e 71), sendo assim definidos: C-5 (δ_C 43,77), C-8 (δ_C 151,39), C-9 (δ_C 149,45), C-12 (δ_C 45,57), C-14 (δ_C 79,96) (Figura 25, p. 70).

Na análise do espectro COSY de D-2 foi possível observar as correlações entre o H-7 (δ_H 5,35) e os sinais em δ_H 3,21 e δ_H 1,58, os quais foram atribuídos aos H-6. O sinal em δ_H 5,60 (H-10) correlacionou-se com o sinal em δ_H 2,31, atribuído ao H-11. O hidrogênio da metila 19 (δ_H 1,10) mostrou correlação com o sinal em δ_H 2,38, que foi atribuído ao H-17. O H-4 mostrou correlação com δ_H 1,73, definido como H-3 (Figura 29, p. 72).

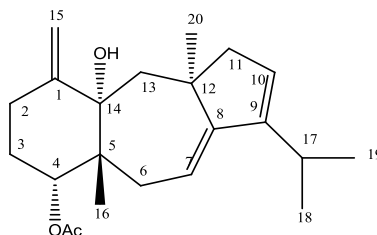
A análise dos dados do espectro de HMBC de D-2 permitiu assegurar a inserção do grupo acetato na posição 4 do diterpeno uma vez que o sinal em δ_H 4,84 (t, $J = 4,5$ Hz), atribuído ao H-4 correlacionou-se com o C-3 (δ_C 26,74), C-14 (δ_C 79,96). Confirmou também o deslocamento químico da CH_3 -20 em δ_H 1,36 através das correlações com os C-11 (δ_C 41,72), C-12 (δ_C 45,57) e C-13 (δ_C 50,86) (Figuras 30-33, p. 72-74).

Assim, após análise dos dados de RMN uni e bidimensionais e comparações com a literatura pode-se concluir que D-2 trata-se do 4-acetoxi-14-hidroxi-1(15),7,9-trieno (CREWS et al., 1982; SUN et al., 1981). As análises de RMN permitiram, ainda, a determinação inequívoca dos deslocamentos químicos dos carbonos C-1, C-2, C-6, C-8, C-18 e 4- $OCOCH_3$. Dados de comparação dos deslocamentos químicos obtidos de D-2, D-1, e a relatada na literatura podem ser visualizados na Tabela 10 (página 65).



4-acetoxi-14-hidroxi-1(15),7,9-trieno

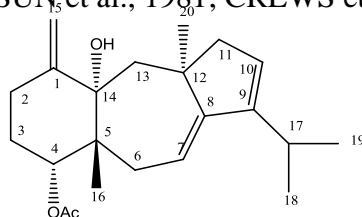
Tabela 9. Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) uni e bidimensionais de **D-2** em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz).



Número	HSQC		COSY	HMBC
	δ_{H}	δ_{C}		
1	-	151,38*		
2	1,86 (1H, s) 1,73 (1H, m)	28,26**		C-14
3	2,75 (1H, ddd, 14,1; 14,1 e 5,4) 2,08 (1H, m)	26,74		
4	4,84 (1H, t, 4,8)	82,22		C-3, C-14
5	-	43,77		
6	3,21 (dd, 15,9 e 2,1) 1,58 (dd, 15,3 e 9,6)	30,61**		C-7, C-8, C-14
7	5,35 (dd, 9,3 e 4,5)	112,32		
8	-	154,84*		
9	-	149,45	H-3	
10	5,60 (sl)	125,54	2 H-6	
11	1,86 (1H, sl)	41,68	H-11	C-8, C-12, C-13, C-20
12	-	45,57	H-19	
13	2,27 (1H, sl) 2,21 (1H, sl)	50,87		
14	-	79,96		
15	4,90 (sl) 4,80 (sl)	109,40		C-2, C-14
16	0,90 (s)	19,86		C-4, C-5, C-6, C-14
17	2,38 (m)	25,51	H-10	C-10
18	1,06 (d, 6,9)	22,02 [#]		C-9
19	1,10 (d, 6,6)	22,04		C-9
20	1,33 (s)	27,49		C-8, C-11, C-12, C-13
4-COOCH ₃		169,44		
4-COOCH ₃	2,15 (s)	21,36 [#]		4-COOCH ₃
14-OH	3,75 (sl)		H-17	

*, **, [#] deslocamentos químicos reassinalados com base nas análises dos espectros HSQC, HMBC

Tabela 10. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz) de **D-2** em CDCl_3 com **D-1** (RMN de ^1H 500 MHz e ^{13}C 125 MHz) e dados de RMN de ^1H (220 MHz) e ^{13}C (25 MHz) de referência da literatura (SUN₅ et al., 1981; CREWS et al., 1982).



Número	D-2	D-1	Referência (SUN et al., 1981)	D-2	D-1	Referência (CREWS et al., 1982)
	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	-	-		151,3*	149,7	155,0
2	1,86 (1H, s) 1,73 (1H, m)	2,08 (1H, m) 2,63 (1H, m)	n.o	28,2**	26,3	30,8
3	2,75 (1H, ddd, 14,1; 14,1 e 5,4) 2,08 (1H, m)	1,83 (1H) 1,86 (1H)	n.o	26,7	27,1	26,9
4	4,84 (1H, t, 4,8)	4,79 (1H, s)	4,86 (1H, sl)	82,2	81,8	82,3
5	-	-		43,7	42,7	43,9
6	3,21 (dd, 15,9 e 2,1) 1,58 (dd, 15,3 e 9,6)	1,68 (1H, m) 2,79 (1H, m)	3,22 (1H, dd, 14,0 e 4,0) 1,59 (1H, dd, 19,0 e 9,0)	30,6**	33,2	28,4
7	5,35 (dd, 9,3 e 4,5)	6,04 (dd, 11,0 e 7,0)	5,39 (1H, dd, 9,0 e 4,0)	112,3	67,0	112,5
8	-	-		154,8*	170,8	151,6
9	-	-		149,4	147,7	149,6
10	5,60 (sl)	-	5,64 (1 H, sl)	125,5	207,4	125,6
11	1,86 (1H, sl)	2,30 (1H) 2,32 (1H)	n.o	41,6	56,1	41,9
12	-	-		45,5	44,1	45,8
13	2,27 (1H, sl) 2,21 (1H, sl)	1,76 (1H, d, 14,5)	n.o	50,8	47,8	50,1
14	-	-		79,9	78,6	80,1
15	4,90 (sl) 4,80 (sl)	4,80 (1H, s) 4,92 (1H, s)	4,95 (s) 4,83 (s)	109,4	110,4	109,4
16	0,90 (s)	0,86 (3H, s)	0,95 (s)	19,8	18,2	20,0
17	2,38 (m)	2,68 (1H, s)	2,41 (1H, hp, 6,5)	25,5	25,6	25,7
18	1,06 (d, 6,9)	1,11 (3H, d, 7,0)	1,07 (3H, d, 6,5)	22,0 [#]	19,5	21,3
19	1,10 (d, 6,6)	1,13 (3H, d, 7,0)	1,11 (3H, d, 6,5)	22,1	19,8	22,1
20	1,33 (s)	1,59 (3H, s)	1,36 (3H, s)	27,4	26,5	27,6
4-COOCH ₃		-		169,4	168,9	169,4
4-COOCH ₃	2,15 (s)	2,14 (3H, s)	2,18 (3H, s)	21,36 [#]	21,3	22,1
14-OH	3,75 (sl)	-	3,79 (1H, sl)			
7-COOCH ₃					169,5	
7-COOCH ₃		2,04 (3H, s)			21,1	

n.o. : não observado

*, **, [#] deslocamentos reassinalados com base nas análises dos espectros HSQC, HMBC

ESPECTROS D-2

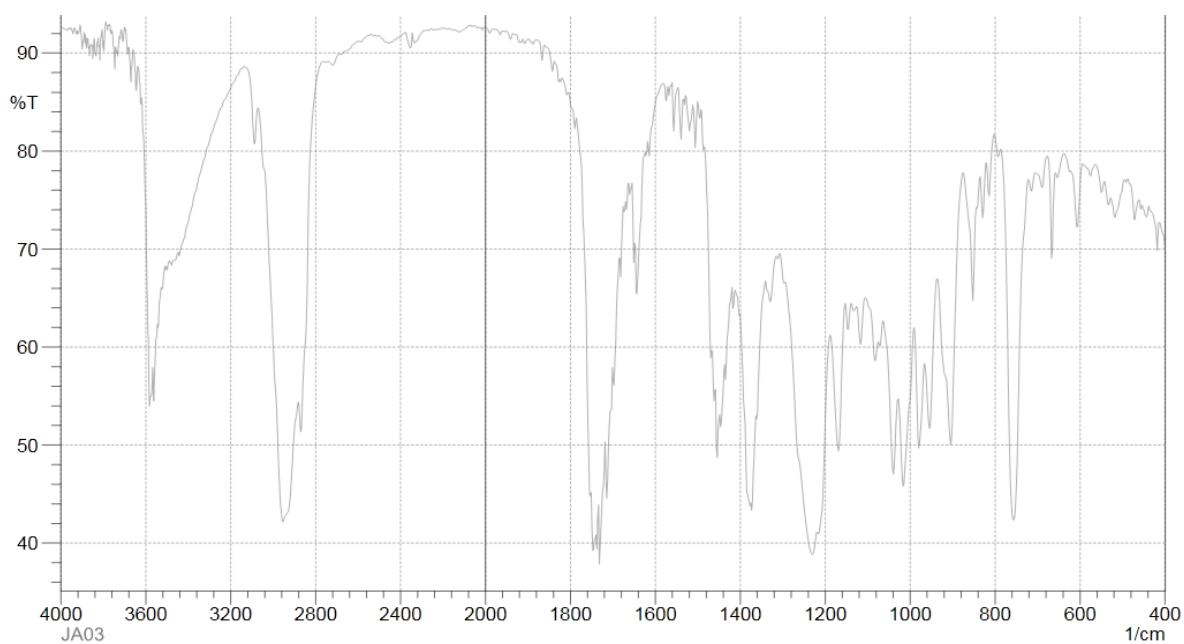
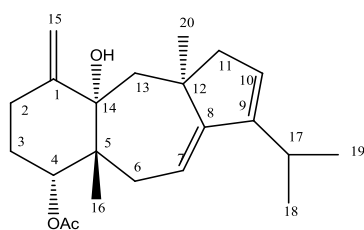


Figura 18. Espectro de IV de D-2 (pastilha de KBr).

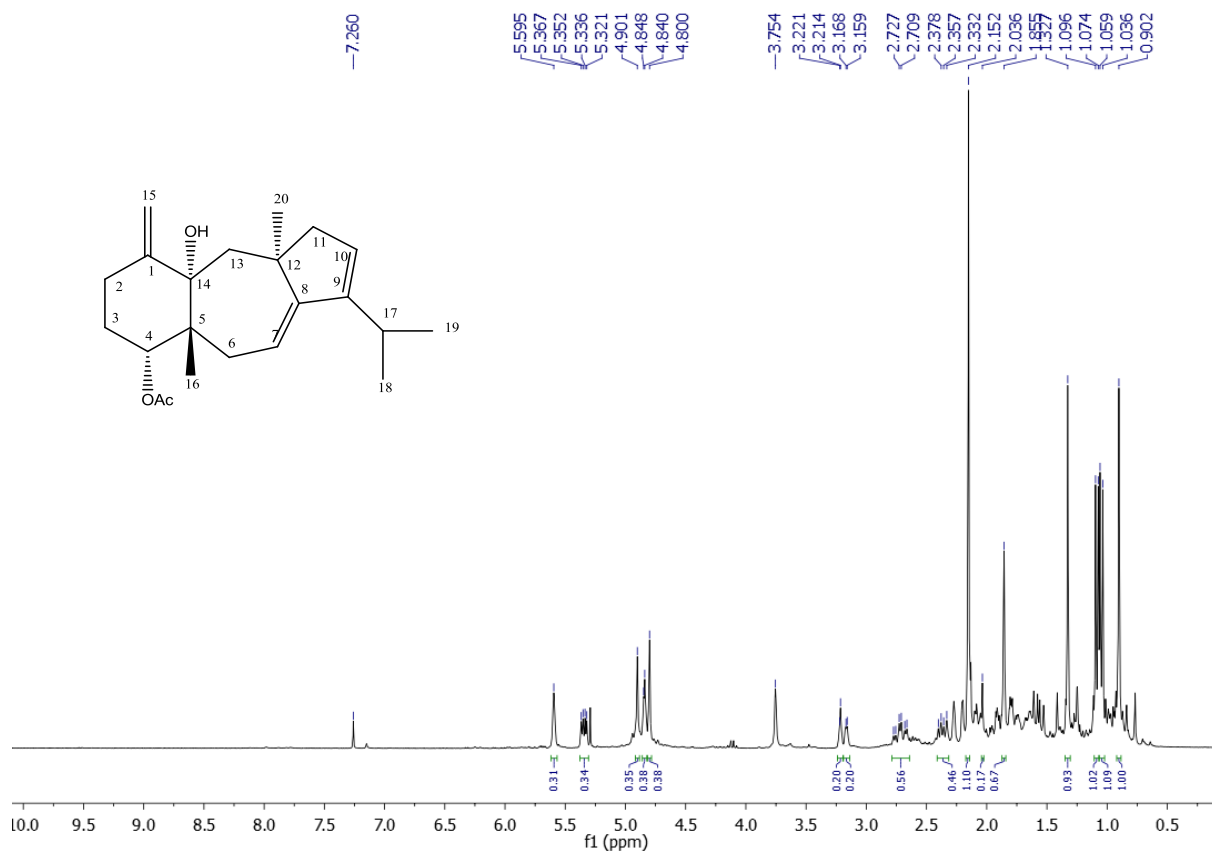


Figura 19. Espectro de RMN ¹H de D-2 (CDCl₃, 300 MHz).

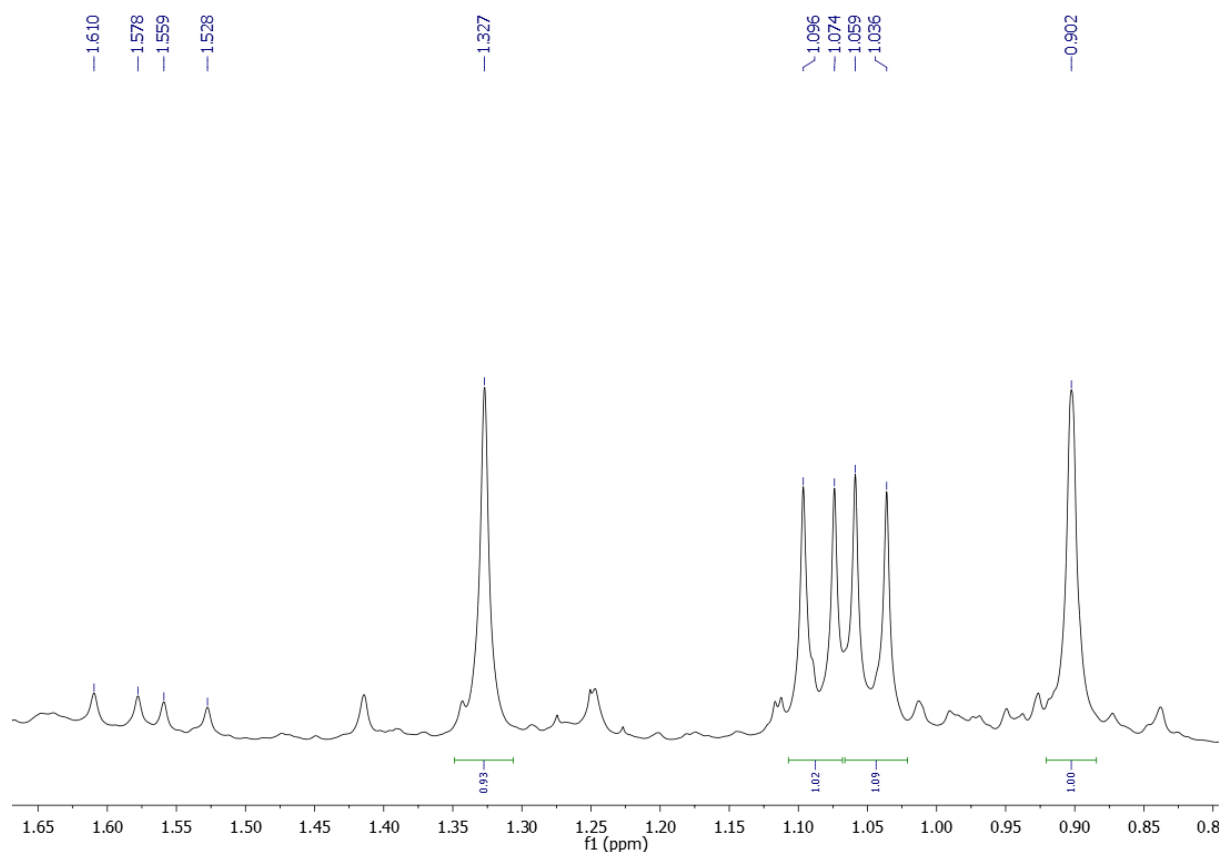


Figura 20. Expansão do espectro de RMN ¹H de D-2 na região entre 1,65 e 0,8 ppm(CDCl₃, 300 MHz).

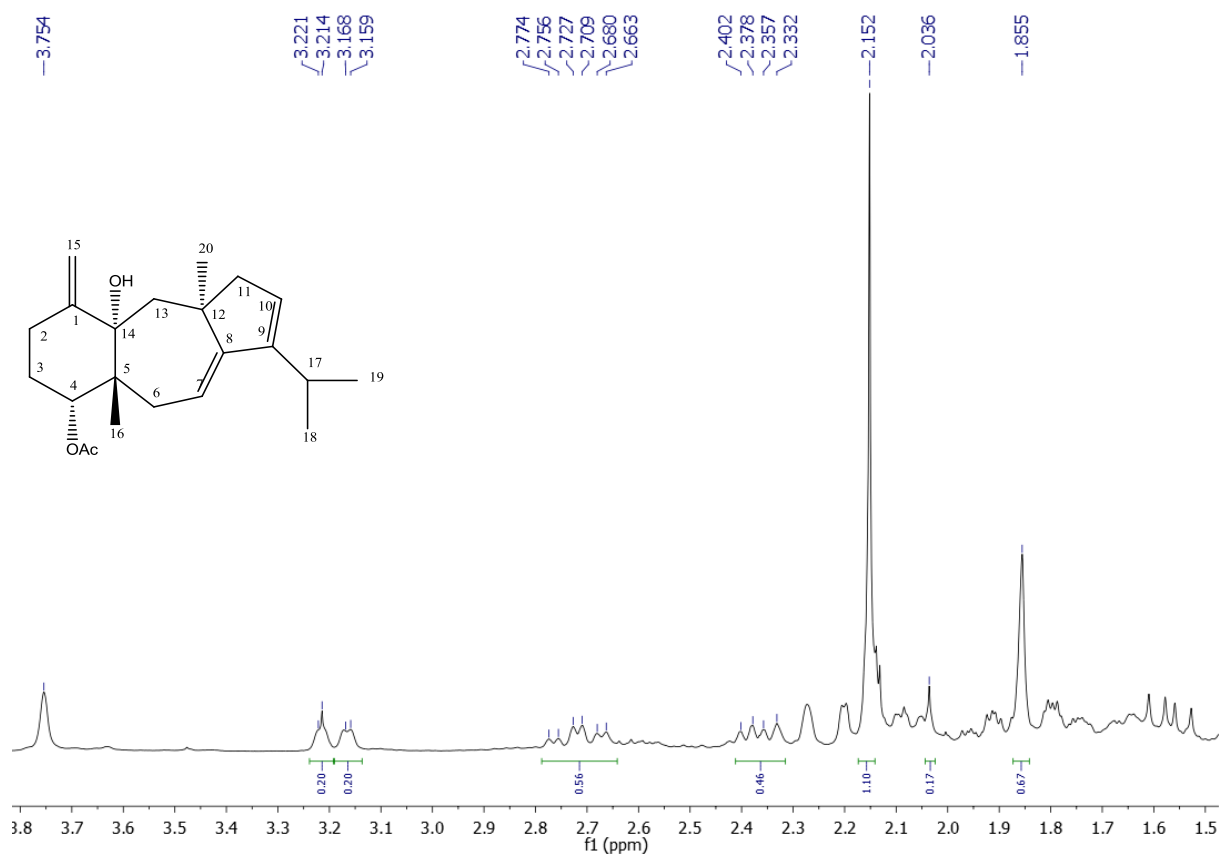


Figura 21. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-2 na região entre 3,8 e 1,5 ppm (CDCl₃, 300 MHz).

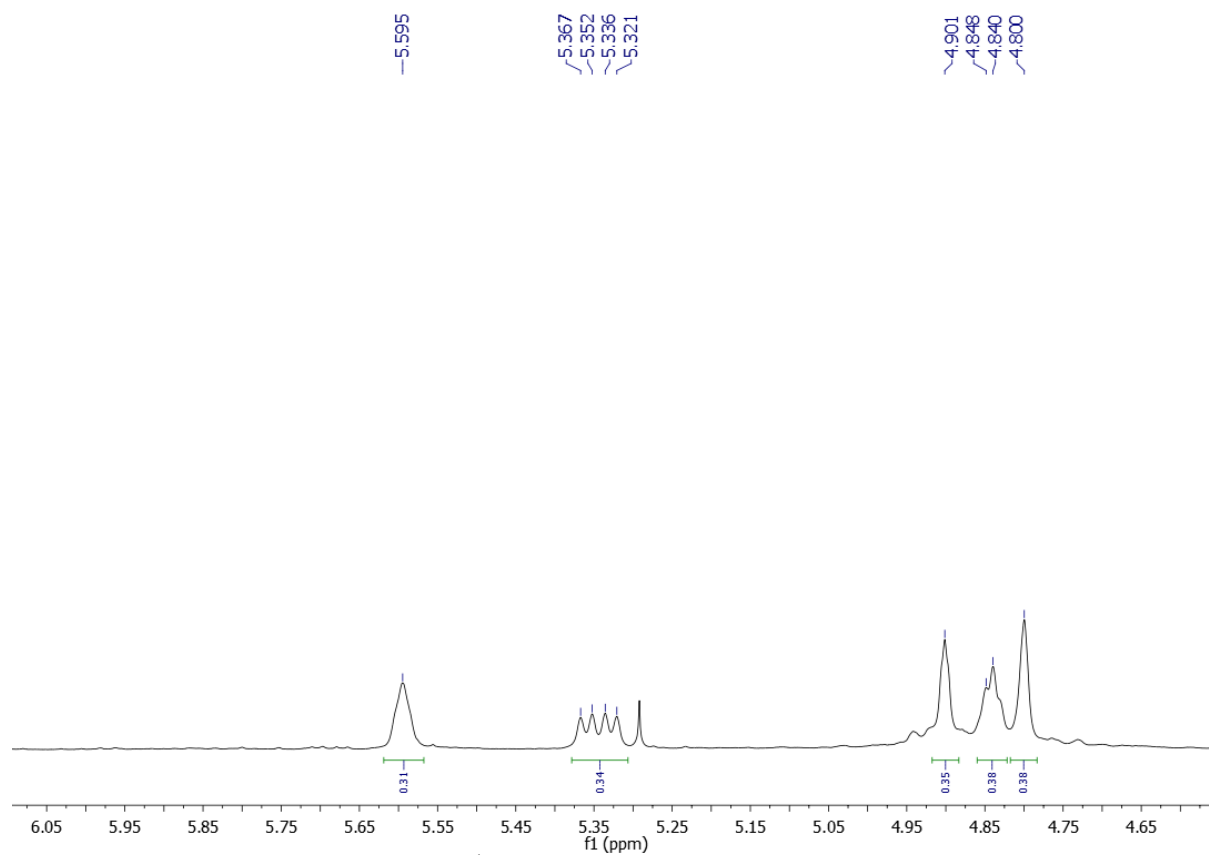


Figura 22. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-2 na região entre 6,05 e 4,65 (CDCl₃, 300 MHz).

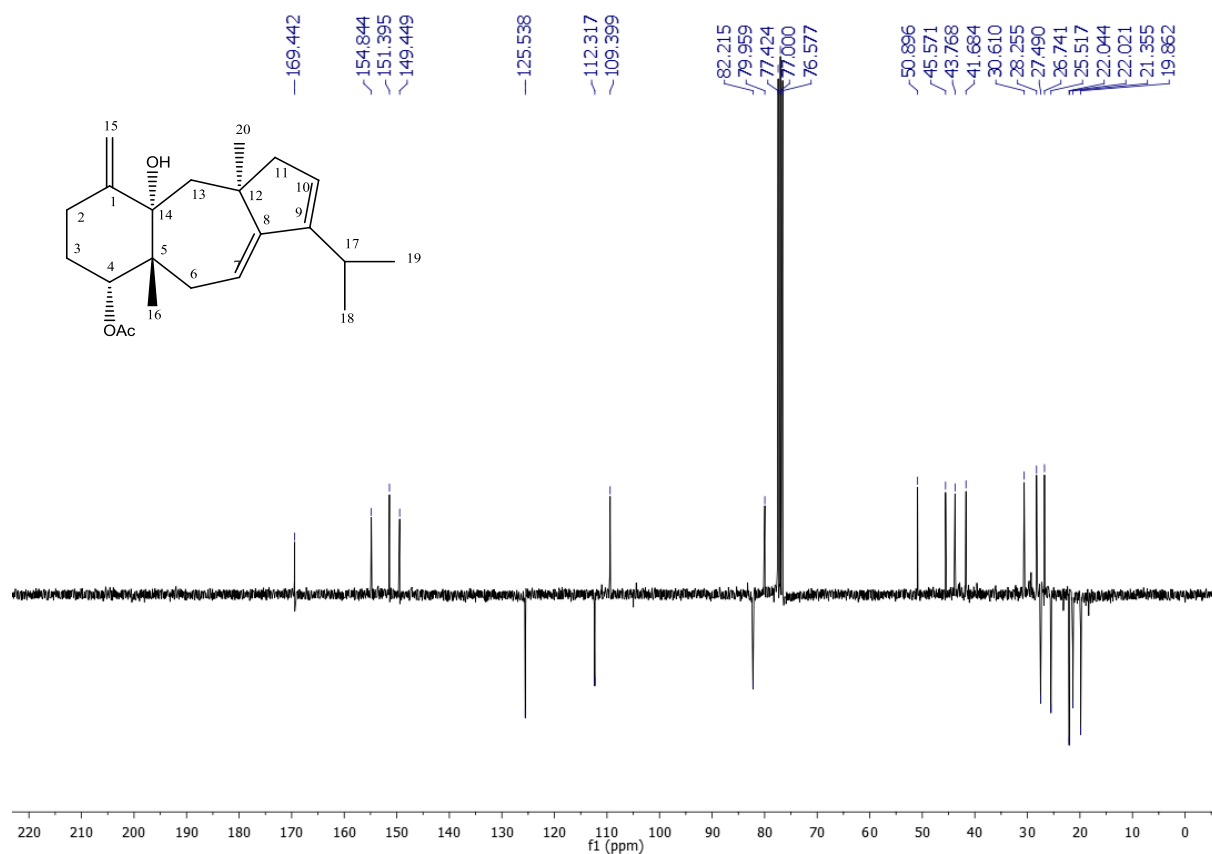


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C de D-2 (CDCl_3 , 75 MHz).

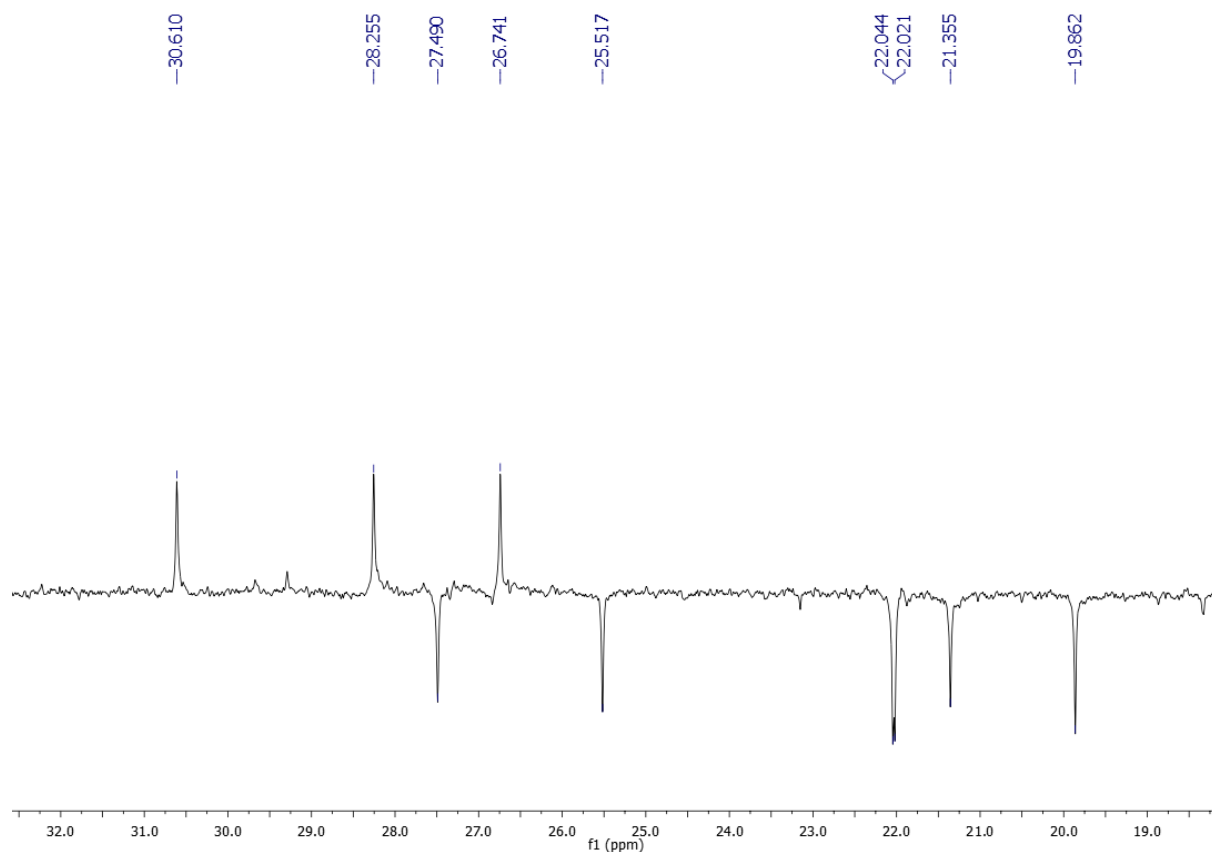


Figura 24. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-2 na região entre 32 e 19 ppm (CDCl_3 , 75 MHz).

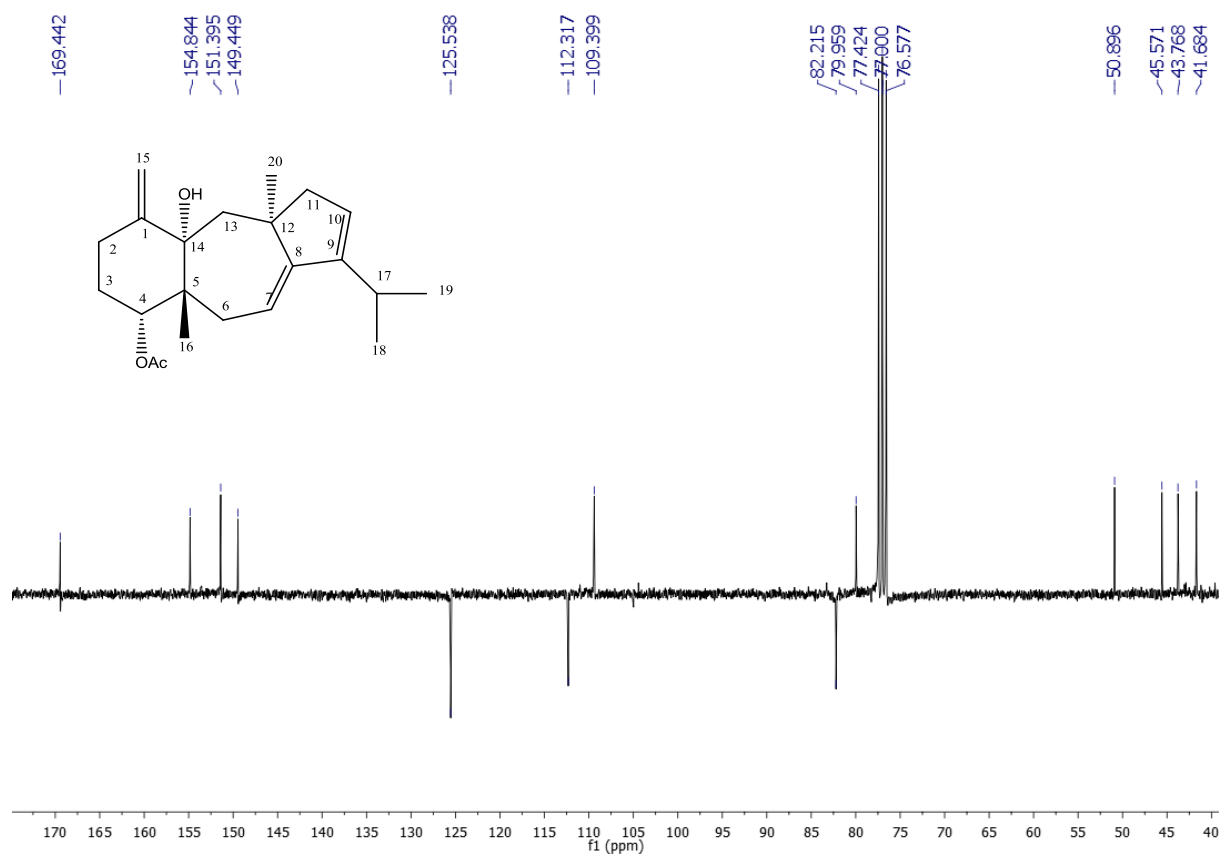


Figura 25. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-2 na região entre 170 e 40 ppm (CDCl_3 , 75 MHz).

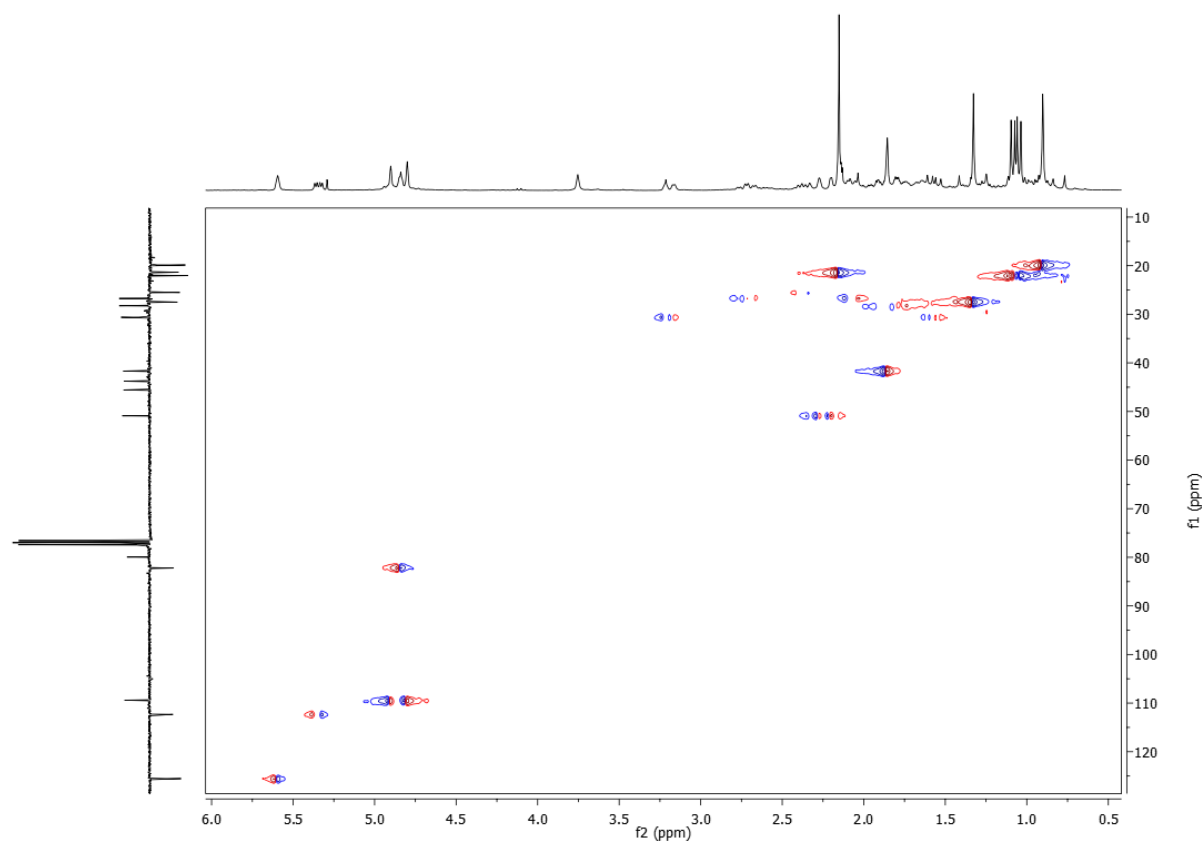


Figura 26. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC de D-2 (CDCl_3 , 300 MHz).

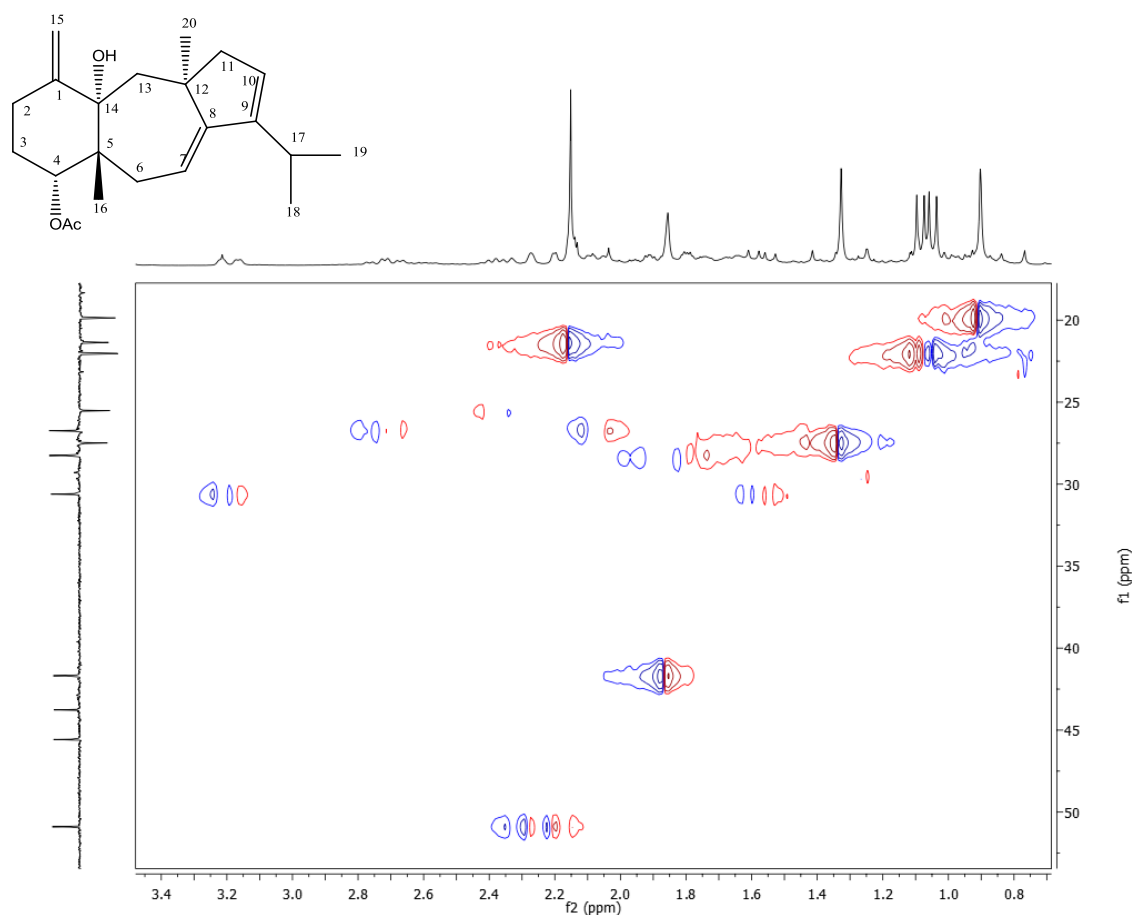


Figura 27. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C HSQC de D-2 na região entre 50 e 17 ppm (CDCl_3 , 300 MHz e 75 MHz).

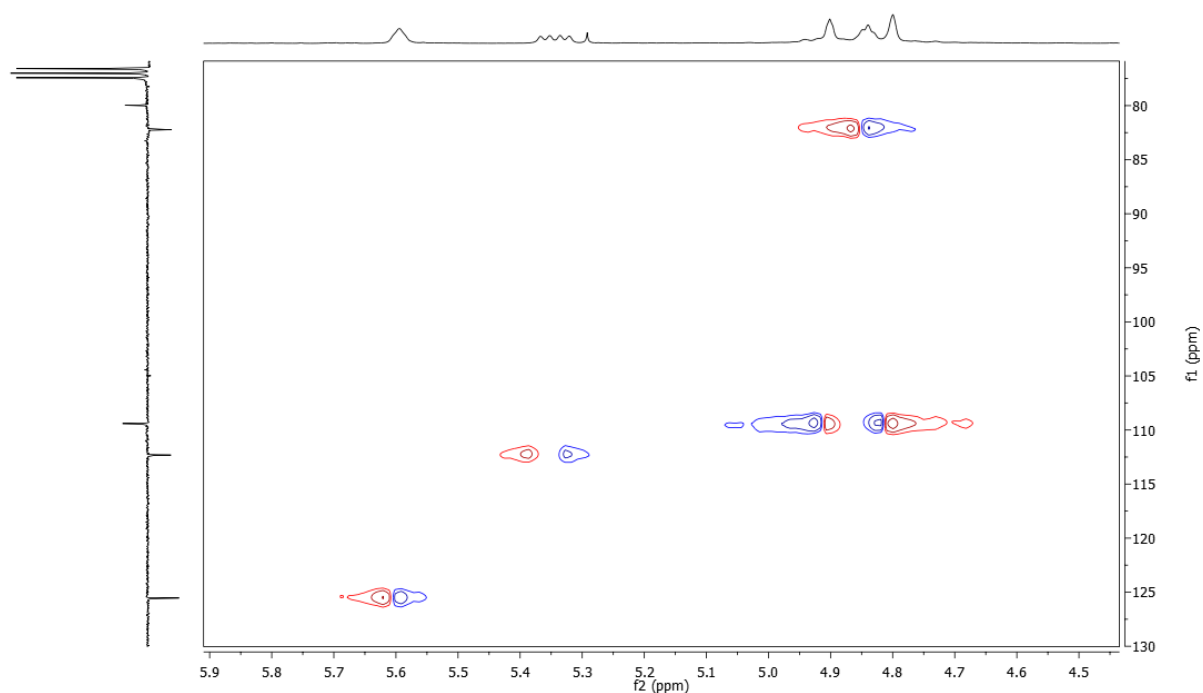


Figura 28. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C HSQC de D-2 na região entre 130 e 75 ppm (CDCl_3 , 300 MHz e 75 MHz).

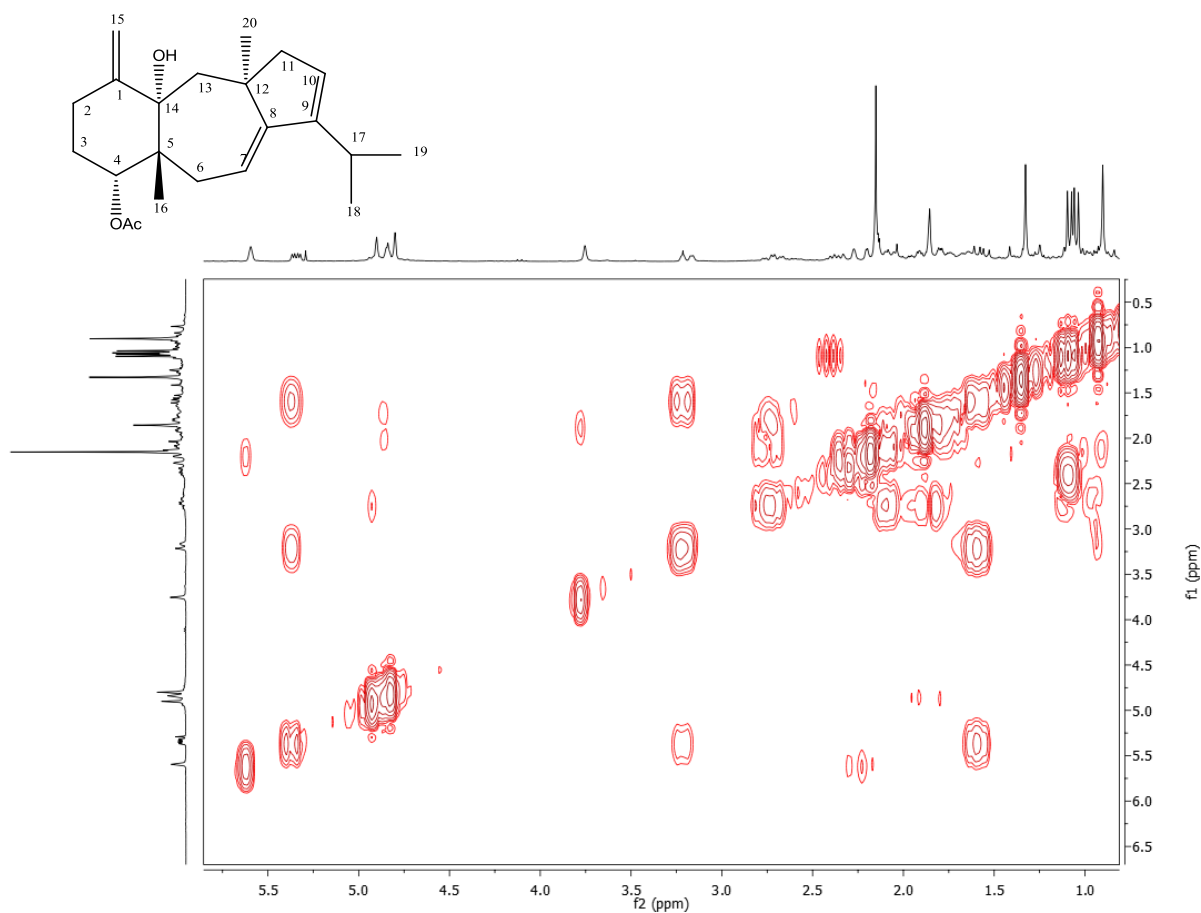


Figura 29. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ COSY de D-2 (CDCl_3 , 300 MHz).

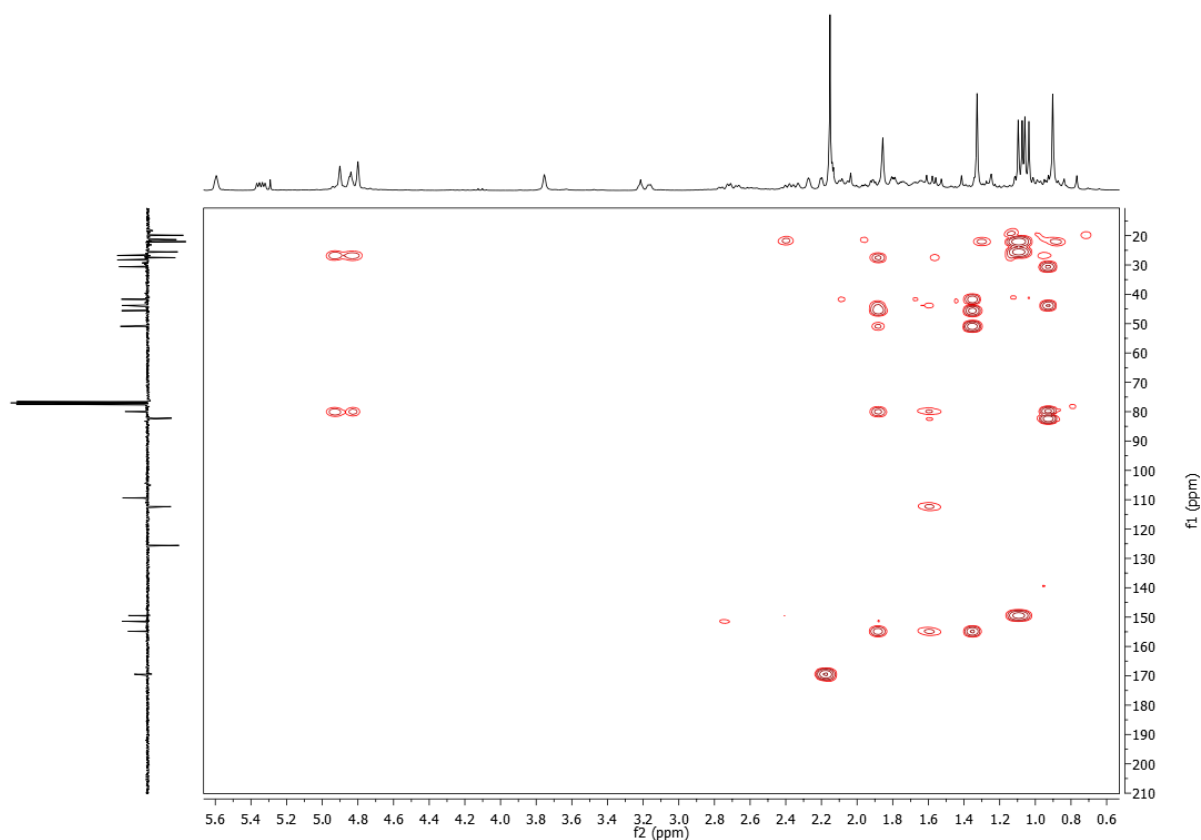


Figura 30. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-2 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).

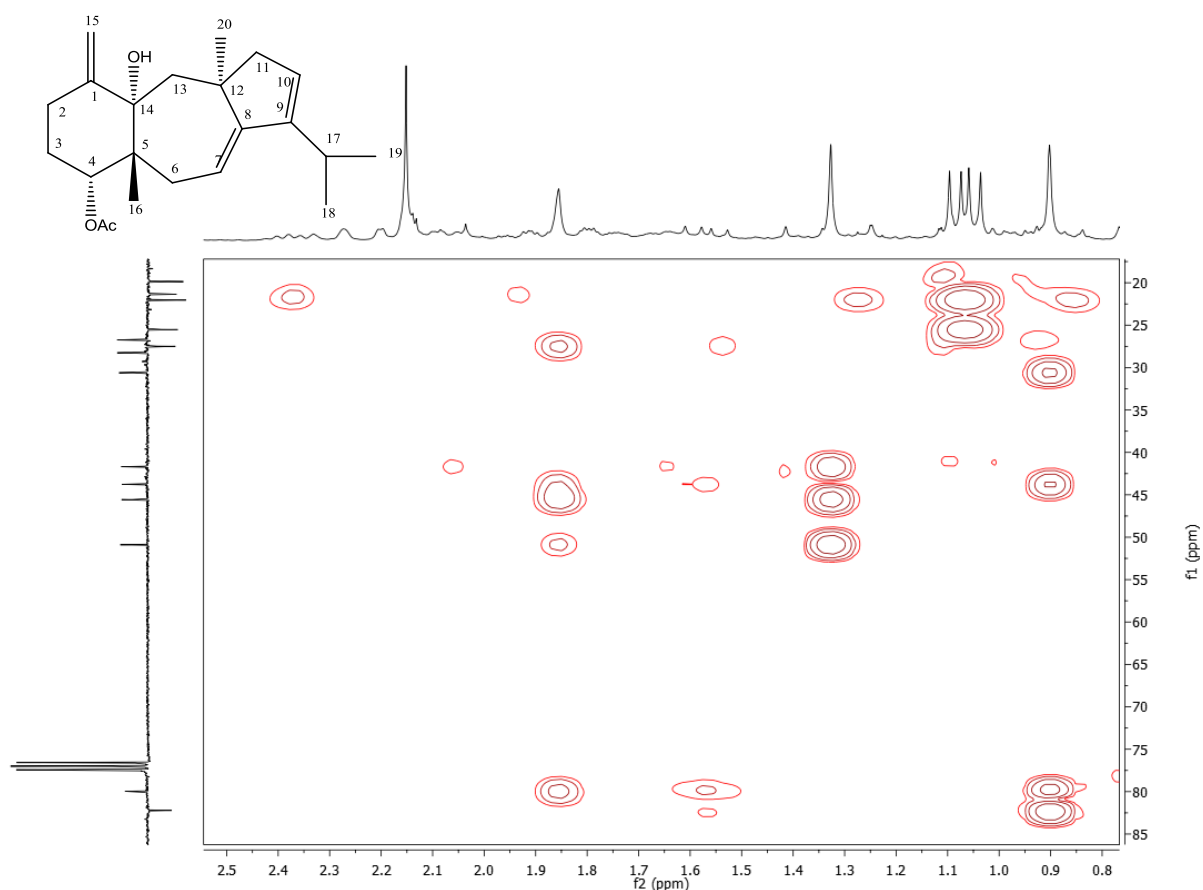


Figura 31. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-2 na região entre 85 e 17 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).

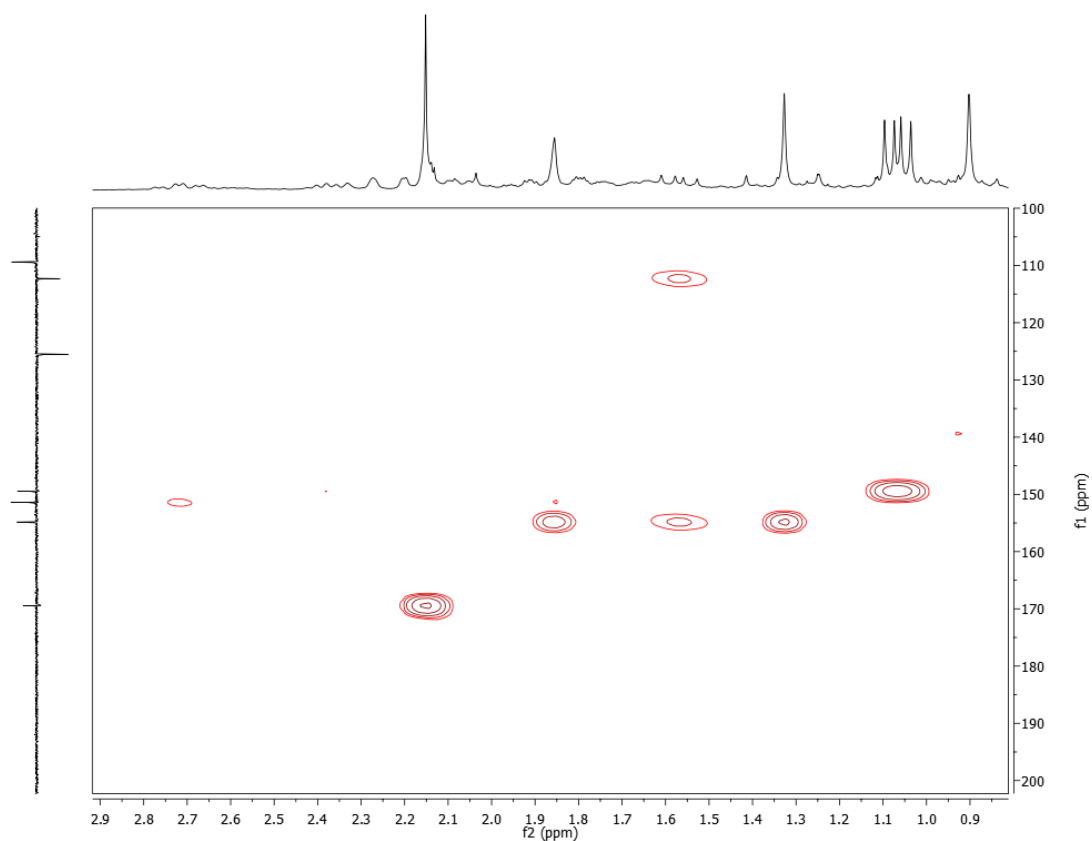


Figura 32. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-2 na região entre 200 e 130 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).

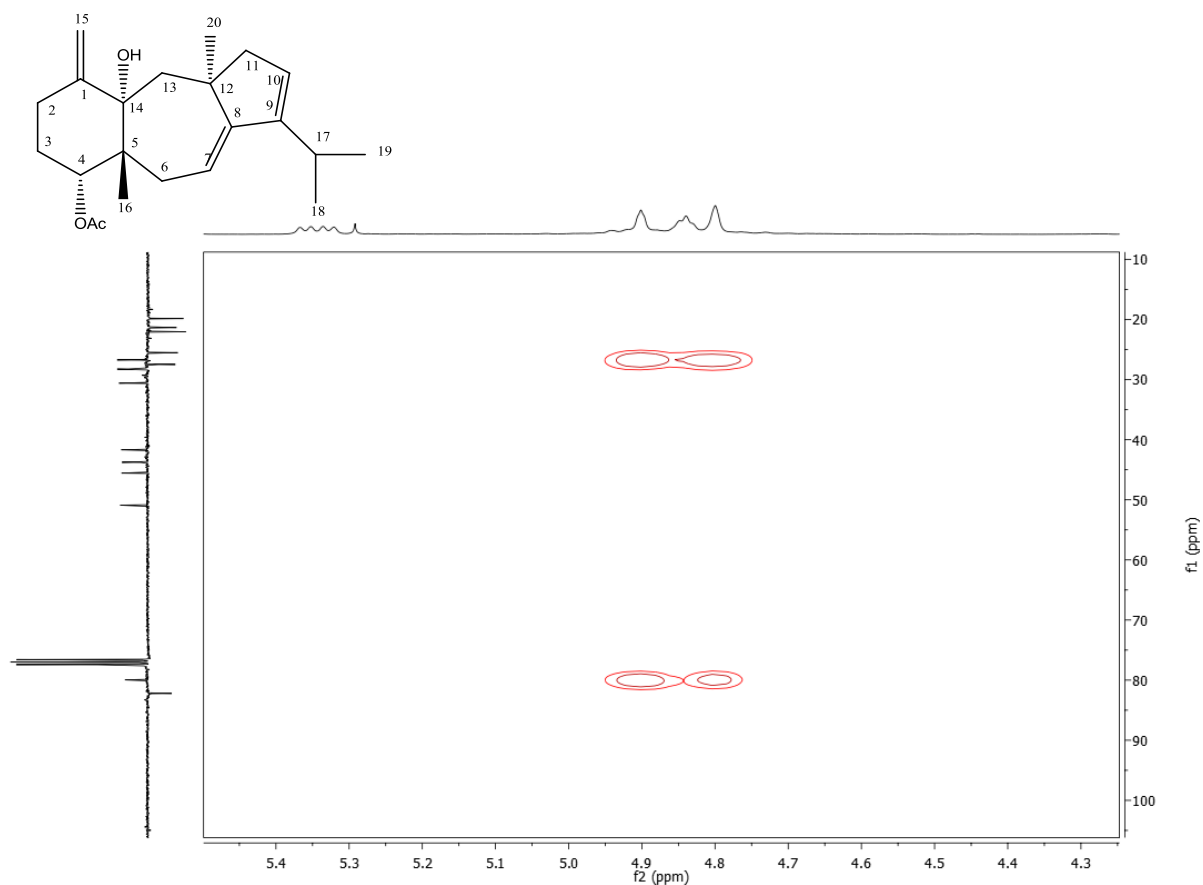


Figura 33. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-2 na região entre 110 e 20 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).

5.3 Identificação estrutural de D-3

A substância D-3 foi isolada como um pó branco (1,8 mg). Na Tabela 11 (página 77) é possível visualizar os deslocamentos químicos obtidos em CDCl_3 nos espectros de RMN de ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), COSY, HSQC e HMBC (Figuras 34-47, p. 77-83).

No espectro de RMN de ^1H de D-3 (Figura 34, p. 79) notou-se o padrão de diterpenos dolastanos, como visualizado em D-1, através da presença de quatro metilas em δ_{H} 0,96 (d, $J = 6,9$ Hz), δ_{H} 1,02 (d, $J = 6,9$ Hz), δ_{H} 0,76 (CH_3 -16) e δ_{H} 1,53 (CH_3 -20), um multiplete em δ_{H} 2,77, e sinais indicativos da dupla ligação exocíclica (H-15) em δ_{H} 4,74 (s) e δ_{H} 4,85 (sl) (Figuras 34 e 35, p. 79). Foi possível observar ainda a presença de 2 grupos acetato através dos sinais de duas metilas em δ_{H} 2,04 (10- OCOCH_3) e em δ_{H} 2,06 (7- OCOCH_3) (Figura 36, p. 80) e de dois sinais de hidrogênios em carbonos oximetínicos em δ_{H} 5,82 (1H, dd, $J = 7,8$ e 5,7), atribuído ao H-10 e em δ_{H} 5,89 (1H, dd, $J = 11,1$ e 7,2), referente ao H-7 (Figura 37, p. 80).

A análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 38, página 81) permitiu confirmar a hipótese do esqueleto do tipo dolastano e da presença dos dois grupamentos acetato (visualizados no espectro de RMN ^1H) através dos sinais referentes a quatro carbonos metílicos em δ_{C} 17,79 (CH_3 -16), δ_{C} 19,57 (CH_3 -18), δ_{C} 22,48 (CH_3 -19) e δ_{C} 27,95 (CH_3 -20), e dois sinais referentes à grupos metílicos de unidade acetato em δ_{C} 21,49 (7- OCOCH_3) e δ_{C} 21,53 (10- OCOCH_3), sete sinais metilênicos nos deslocamentos δ_{C} 31,69 (C-2), δ_{C} 22,23 (C-3), δ_{C} 37,59 (C-4), δ_{C} 36,88 (C-6), δ_{C} 50,94 (C-11), δ_{C} 49,43 (C-13) e δ_{C} 109,33 (C-15) (Figuras 39 a 41, p. 81 e 82). Este sinal em C-15 compõe a dupla ligação exocíclica, juntamente com o C quaternário em δ_{C} 152,60 (C-1) (Figura 42, p. 83). Os sinais em δ_{C} 144,51 e δ_{C} 145,15 localizaram uma dupla ligação entre C-8 e C-9, respectivamente (Figura 42, p. 83). Os sinais em δ_{C} 40,15, δ_{C} 48,89 e δ_{C} 78,08 foram atribuídos aos C-5, C-12 e C-14, respectivamente (Figuras 40 e 41, p.82). O sinal em δ_{C} 26,74 foi atribuído ao C-17 da unidade isopropila, de acordo com a comparação com dados da literatura (OCHI et al., 1980).

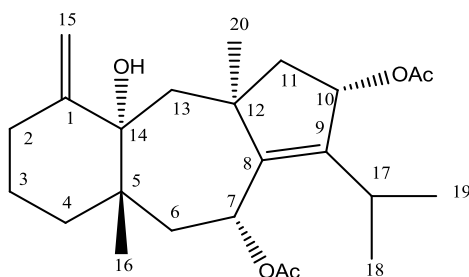
Outros dois sinais de carbonos oxigenados em δ_{C} 67,30 e δ_{C} 78,01 foram atribuídos aos C-7 e C-10, respectivamente. A presença de duas unidades acetato nas posições sete e dez da molécula foram confirmadas através dos sinais de carbonilas em δ_{C} 170,76 e δ_{C} 170,15 e comparação com o amijidictyol (OCHI et al., 1980).

As correlações diretas entre hidrogênios e seus respectivos carbonos podem ser visualizadas no espectro HSQC de D-3 (Figuras 43-46, p.83 a 85) e estão compiladas na Tabela 11 (página 77).

Na análise do espectro COSY (Figuras 47 e 48, p. 85 e 86) de D-3 foi possível observar as correlações entre o H-7 (δ_H 5,89) e os sinais em δ_H 2,61 e δ_H 1,53, os quais foram atribuídos aos H-6. O sinal em δ_H 5,82 (H-10) correlacionou-se com o sinal em δ_H 2,31, referente ao H-11. E este mostrou correlação com δ_H 1,54, que foi atribuído ao outro H-11. Os hidrogênios das metilas 18 (δ_H 0,96) e 19 (δ_H 1,02) mostraram correlação com o sinal em δ_H 2,77, atribuído ao H-17.

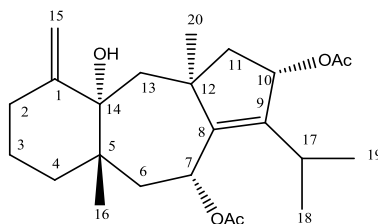
No espectro de HMBC (Figuras 49 - 52, p. 86 a 88) foi possível visualizar correlação entre os hidrogênios (δ_H 2,06) da metila da unidade acetato inserida no C-10 e a carbonila desse grupamento em δ_C 170,76. Também foi visualizada correlação entre a metila em δ_H 2,04 e a carbonila em δ_H 170,14, ambas pertencentes ao grupamento acetato inserido no C-7. Correlações entre as metilas Me-18 (δ_H 0,96) e Me-19 (δ_H 1,02) e o sinal em δ_C 145,06 definiram este como sendo o C-9, assim como correlações entre Me-20 (δ_H 1,53) e o sinal em δ_C 144,51 (C-8) asseguram a dupla ligação posicionada entre C-8 e C-9. O H-15 (δ_H 4,85) correlacionou-se com dois sinais: δ_C 78,08, que foi atribuído ao C-14, e o sinal em δ_C 31,69, o qual foi atribuído ao C-2. O sinal em δ_H 1,94 foi atribuído ao H-13, devido sua correlação com o C-20 (δ_C 27,85). O outro H-13, δ_H 1,71, foi determinado a partir da sua correlação com o C-14 (δ_C 78,08). O sinal da Me-20 correlacionou-se com o δ_C 49,43, referente ao C-13 e C-11 (δ_C 50,94). Já a Me-16 (δ_H 0,77) teve seu deslocamento confirmado através das correlações com o C-5 (δ_C 40,14) e C-6 (δ_C 36,88). Também foram observadas correlações entre os H-7 (δ_H 5,89) e H-10 (δ_H 5,84) e os carbonos das posições 8 (δ_C 144,51) e 9 (δ_C 145,06).

Assim, após análise dos dados de RMN uni e bidimensionais e comparações com a literatura concluiu-se que D-3 trata-se de uma substância inédito na literatura, a qual foi denominada 4-desoxi-amijidictyol devido às comparações com o conhecido amijidictyol (OCHI et al., 1980). Na Tabela 12 (p. 78) é possível visualizar e comparar os deslocamentos químicos das substâncias D-3 e D-1.



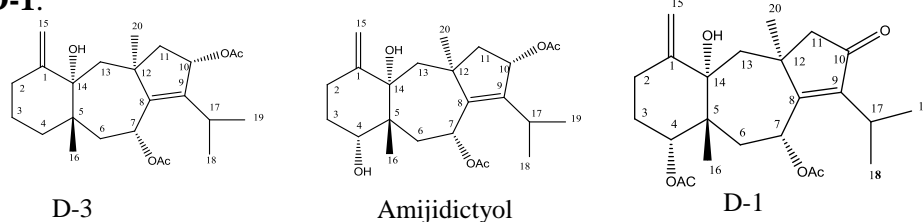
4-desoxi-Amijidictyol

Tabela 11. Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) de D-3 em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz)



Número	HSQC		COSY	HMBC
	δ_{H}	δ_{C}		
1	-	152,60		
2	2,02 2,51 (m)	31,69	2 H-2	
3	1,08	22,23		
4	1,07 (m)	37,60	2 H-4	C-4, C-16
5	-	40,15		
6	1,53 2,61 (m)	36,88	H-7	
7	5,89 (1H, dd, 11,1 e 7,2)	67,30	2 H-6	
8	-	144,51		
9	-	145,15		
10	5,82 (1H, dd, 7,8 e 5,7)	78,01	H-11	C-8
11	2,31 (1H, dd, 13,2 e 7,8) 1,54 (1H, m)	50,94	H-10 2 H-11	
12	-	48,89		
13	1,94 (sl)	49,43	2 H-2	C-14
14	-	78,08		
15	4,74 (1H, s) 4,85 (1H, sl)	109,33	2 H-4	C-2, C-14
16	0,76 (3H, s)	17,79		C-5, C-6, C-14
17	2,77 (1H, m)	26,74	H-18; H-19	
18	0,96 (3H, d, 6,9)	19,57	H-17	C-5, C-6, C-9, C-17
19	1,02 (3H, d, 6,9)	22,48	H-17	C-9, C-18
20	1,53 (3H, s)	27,95		C-8, C-11, C-12, C-13
14-OH				
7-COOCH ₃	-	170,76		
7-COOCH ₃	2,06 (3H, s)	21,49		7-COOCH ₃
10-COOCH ₃	-	170,15		
10-COOCH ₃	2,04 (3H, s)	21,53		10-COOCH ₃

Tabela 12. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz) de **D-3** em CDCl_3 com dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 MHz) da literatura para o Amijidictyol em CDCl_3 (OCHI et al., 1980) e com **D-1**.



	D-3	Amijidictyol (OCHI et al., 1980)	D-1	D-3	Amijidictyol (OCHI et al., 1980)	D-1
Número	δ_{H}	δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	-	-	-	152,6	152,2	149,7
2	2,02 2,51 (m)	n.o.	2,08 (1H,m) 2,63 (1H, m)	31,6	30,5	26,3
3	1,08	n.o.	1,83(1H) 1,86 (1H)	22,2	26,5	27,1
4	1,07 (m)	3,45 (m)	4,79 (1H, sl)	37,6	80,7	81,8
5	-	-	-	40,1	43,0	42,7
6	1,53 2,61 (m)	n.o.	1,68 (1H, m, 14,0 e 7,0) 2,79 (1H, dd, 14,0 e 11,0)	36,8	34,3	33,2
7	5,89 (1H, dd, 11,1 e 7,2)	5,86 (dd, 11,3 e 7,0)	6,04 (dd, 11,0 e 7,0)	67,3	68,0	67,0
8	-	-	-	144,5	145,0	170,8
9	-	-	-	145,1	146,5	147,7
10	5,82 (1H, dd, 7,8 e 5,7)	5,78 (1H, dd, 7,3 e 5,7)	-	78,01	78,4	207,4
11	2,31 (1H, dd,13,2 e 7,8) 1,54 (1H, m)	n.o.	2,30 (1H) 2,32 (1H)	50,9	51,4	56,1
12	-	-	-	48,8	49,3	44,1
13	1,94 (sl)	n.o.	1,76 (1H, d, 14,5) 2,11 (1H)	49,4	49,7	47,8
14	-	-	-	78,0	81,0	78,6
15	4,74 (1H, s) 4,85 (1H, sl)	4,78 (1H, sl) e 4,89 (1H, sl)	4,80 (1H, s) 4,92 (1H, s)	109,3	110,7	110,4
16	0,76 (3H, s)	0,70 (3H, s)	0,86 (3H, s)	17,7	18,0	18,2
17	2,77 (1H, m)	2,72 (1H, m)	2,68 (1H, s)	26,7	27,1	25,6
18	0,96 (3H, d, 6,9)	0,95 (3H, d, 7,0)	1,11 (3H, d, 7,0)	19,5	19,8	19,5
19	1,02 (3H, d, 6,9)	1,01 (3H, d, 7,0)	1,13 (3H, d, 7,0)	22,4	22,6	19,8
20	1,53 (3H, s)	1,52 (3H, s)	1,59 (3H, s)	27,9	28,1	26,5
7-COOCH ₃	-	-	-	170,7	171,7*	168,9
7-COOCH ₃	2,06 (3H, s)	2,05 (3H, s)	2,14 (3H, s)	21,4	21,58*	21,3
10-COOCH ₃	-	-	-	170,1	171,2*	169,5
10-COOCH ₃	2,04 (3H, s)	2,04 (3H, s)	2,04 (3H, s)	21,5	21,63*	21,1
4-OH		3,89	-			149,7
14-OH		3,45 (s)	2,08 (1H,m) 2,63 (1H, m)			26,3

n.o. : não observado

* sinais que podem estar trocados

ESPECTROS D-3

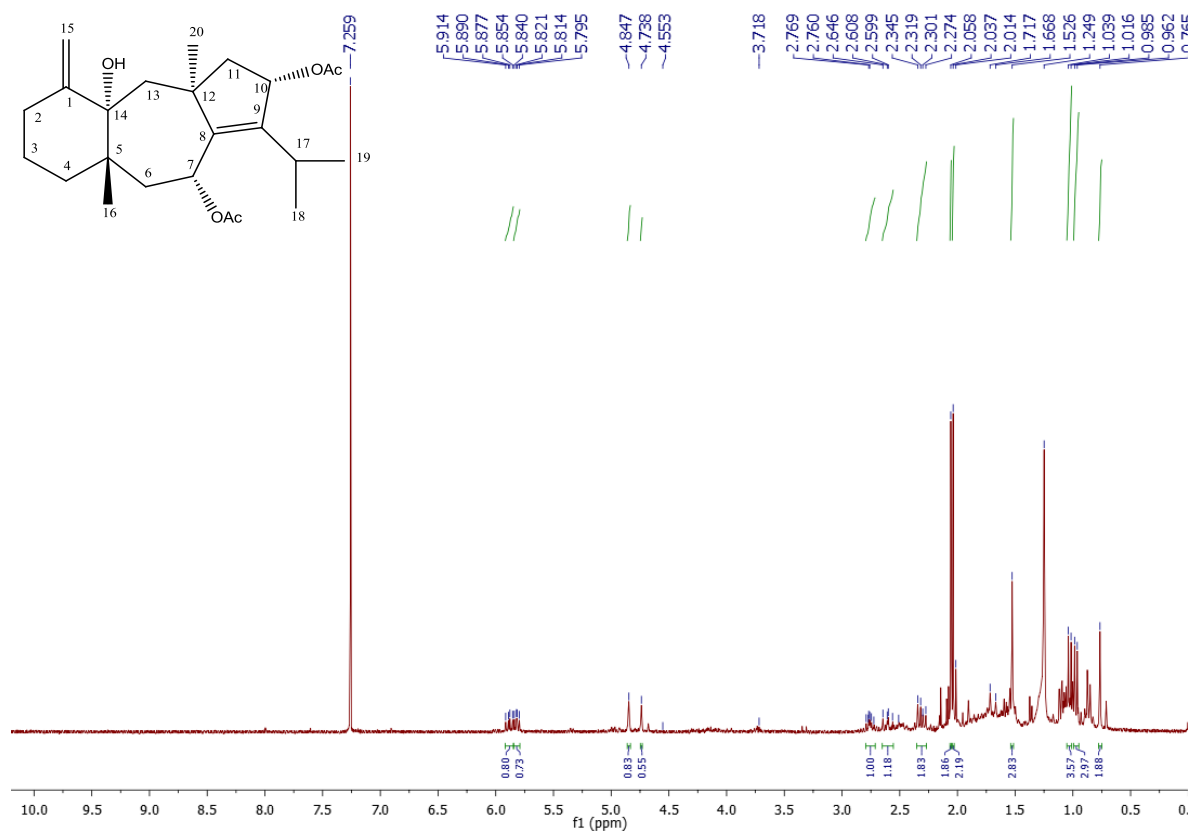


Figura 34. Espectro de RMN ^1H de D-3 (CDCl_3 , 300 MHz).

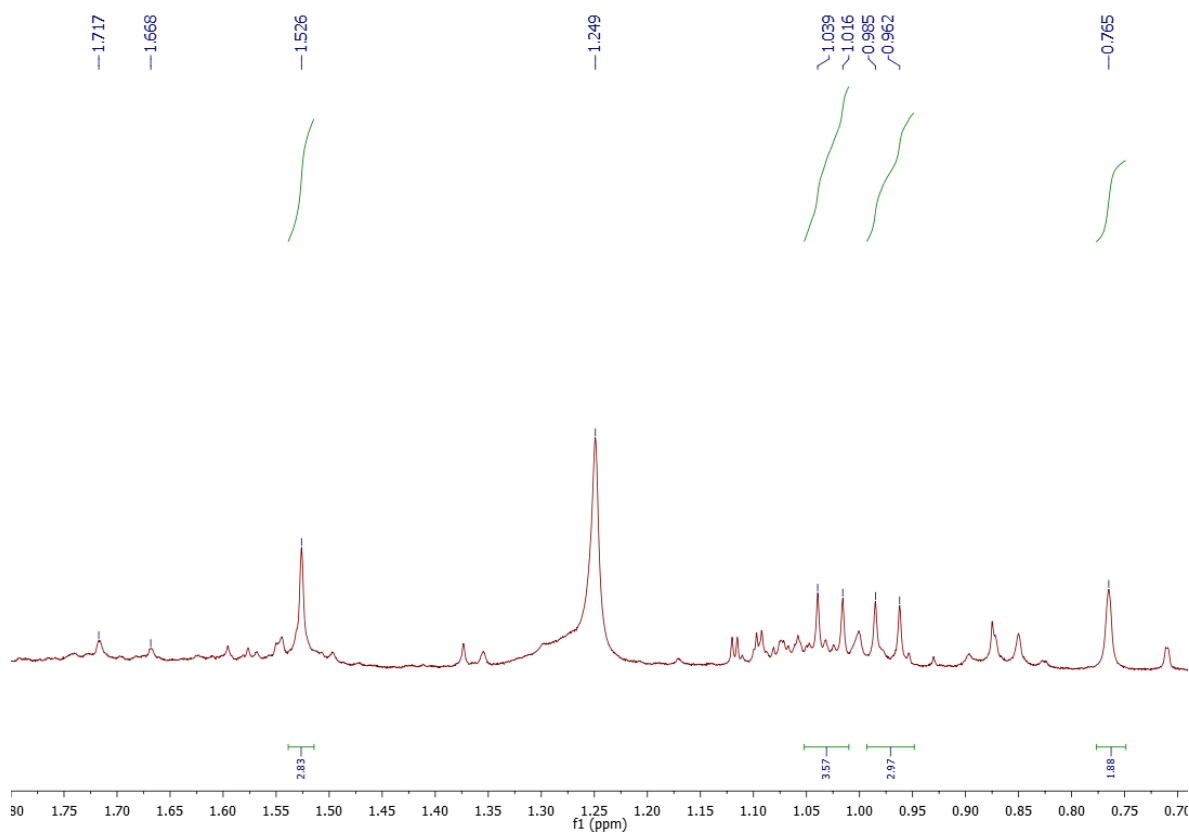


Figura 35. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-3 na região entre 1,80 e 0,7 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).

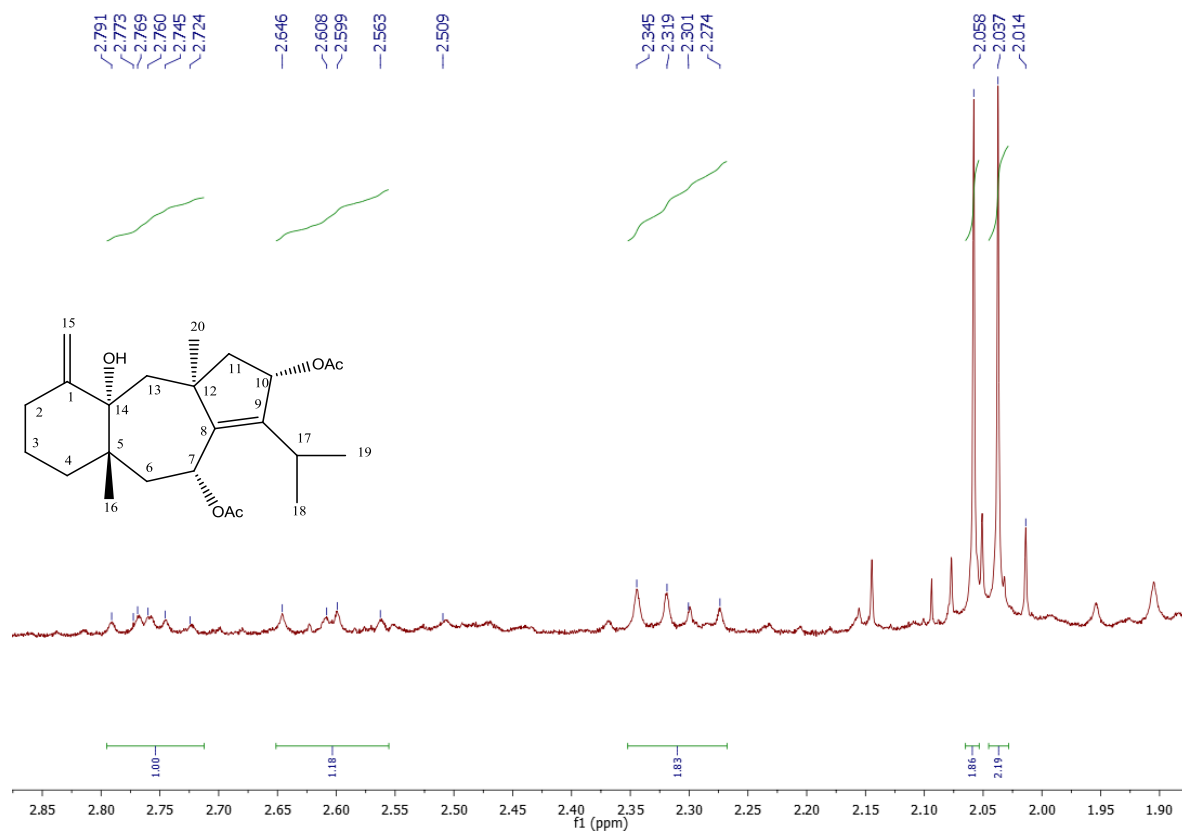


Figura 36. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-3 na região entre 2,85 e 1,90 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).

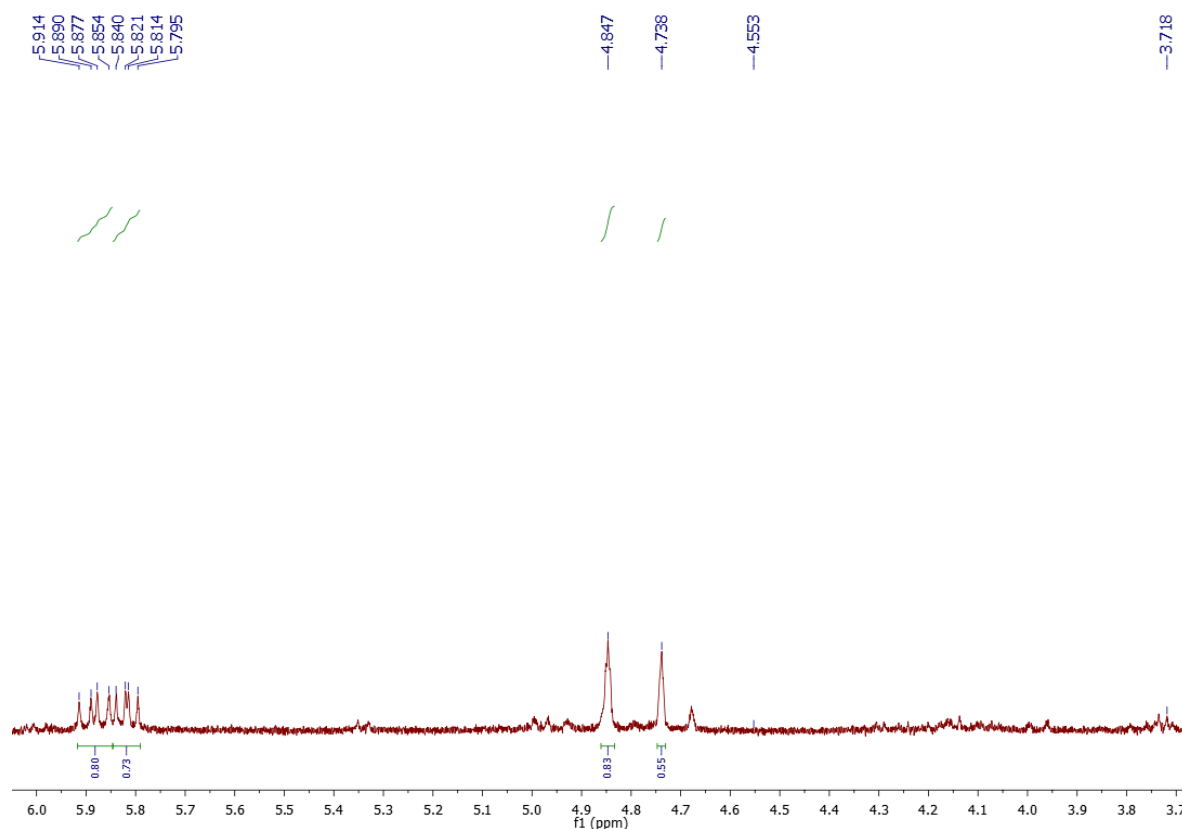


Figura 37. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-3 na região entre 6,0 e 3,7 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).

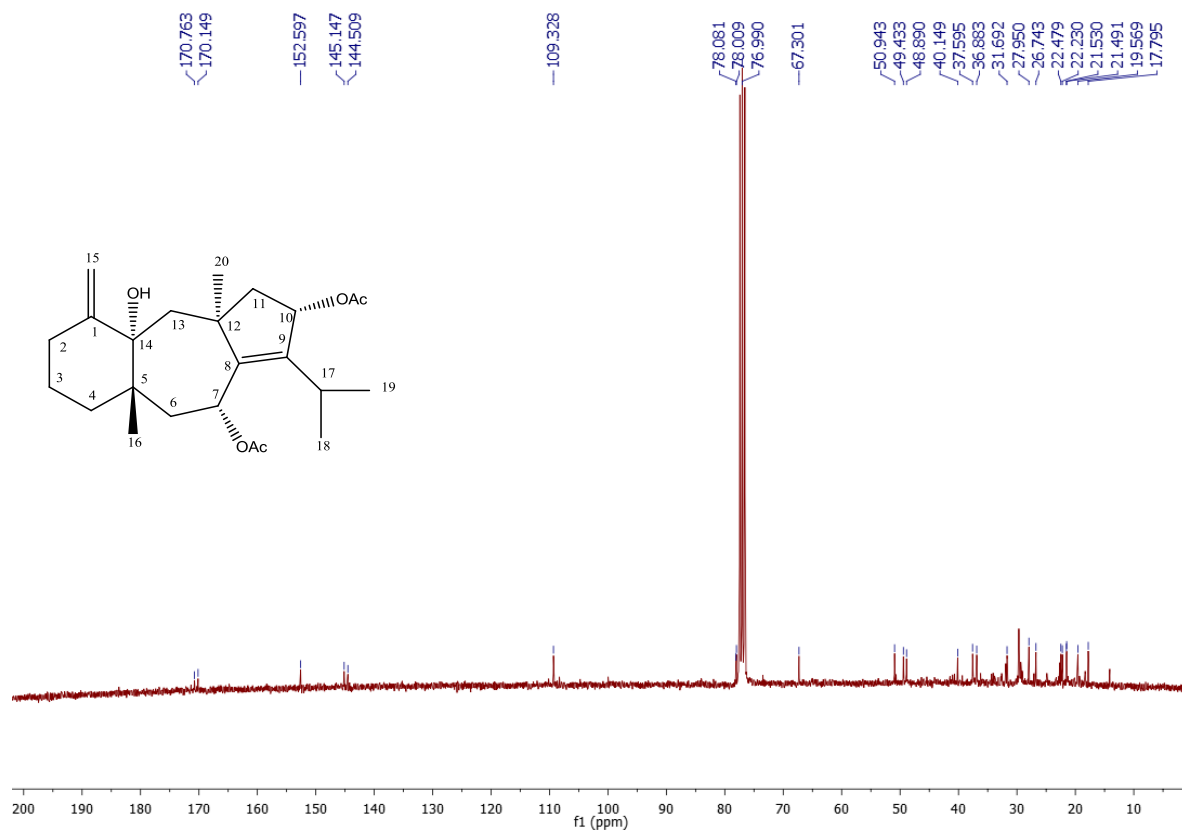


Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C de D-3 (CDCl₃, 75 MHz).

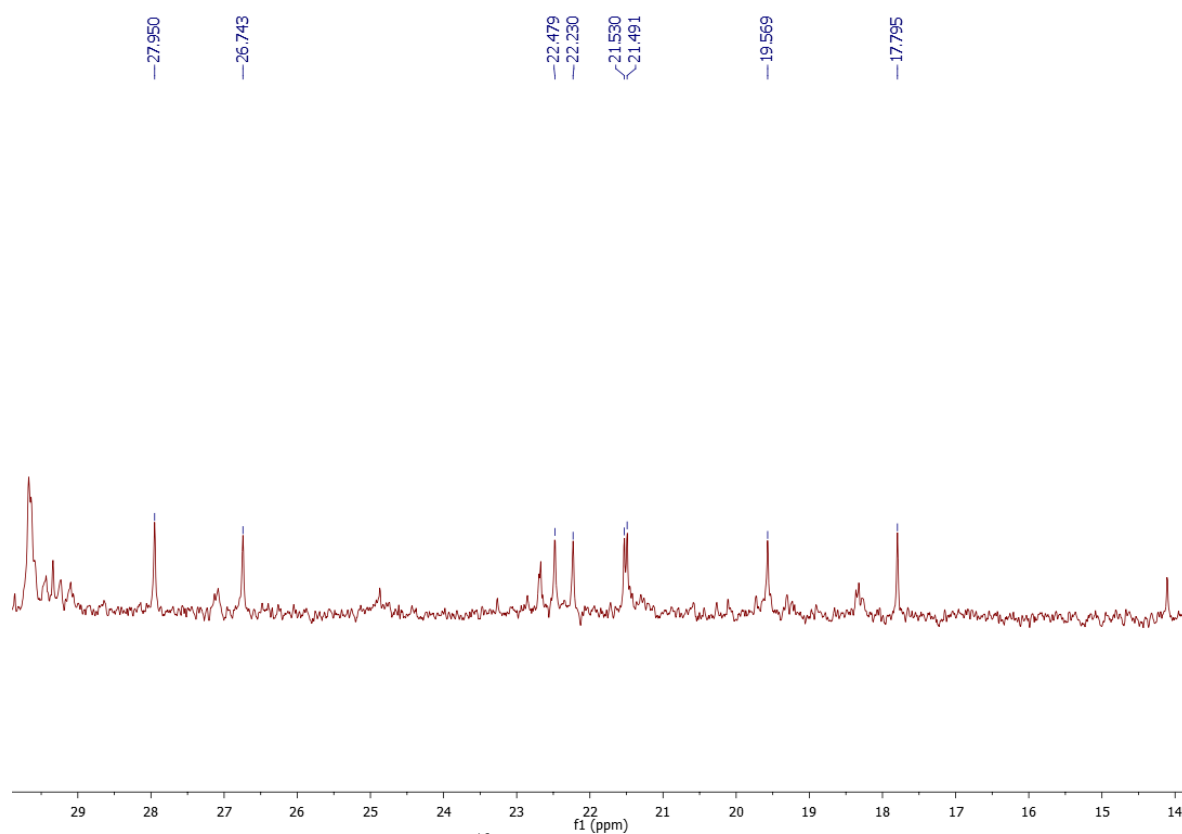


Figura 39. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-3 na região entre 30 e 14 ppm (CDCl₃, 75 MHz).

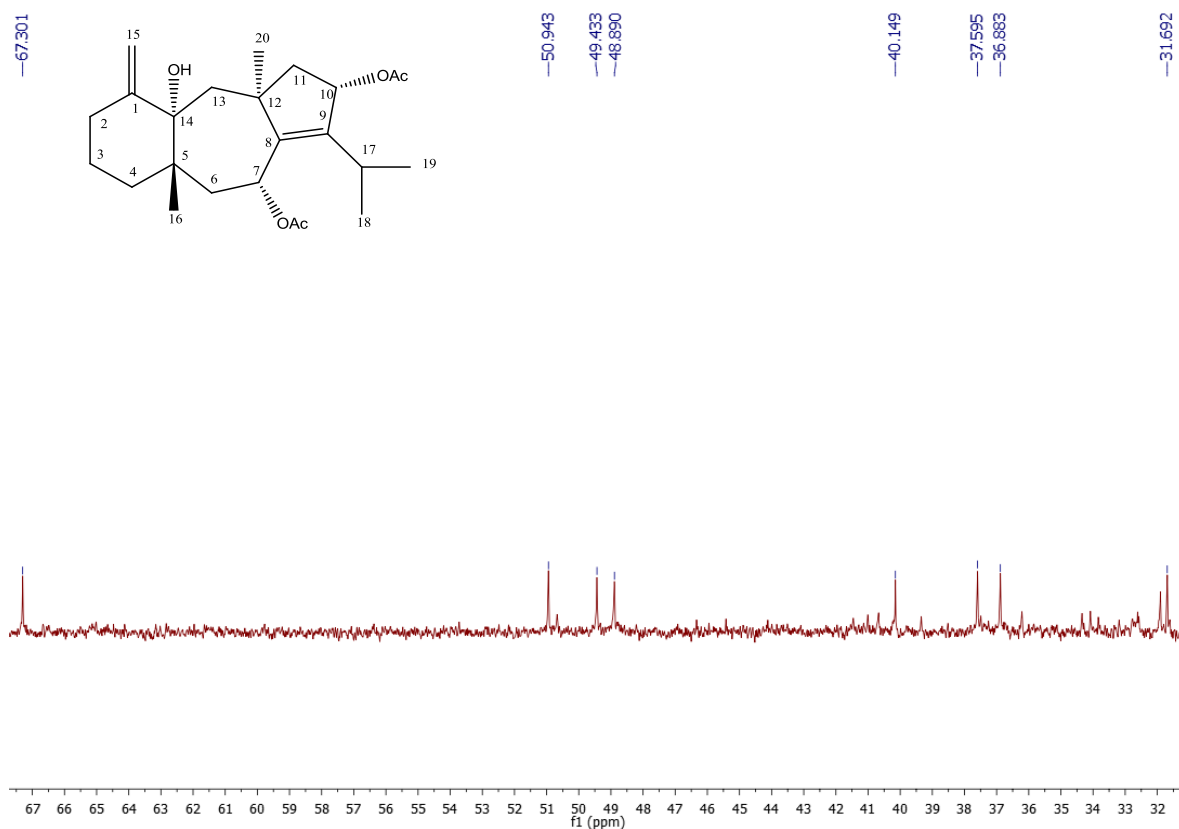


Figura 40. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-3 na região entre 68 e 31 ppm (CDCl_3 , 75 MHz).

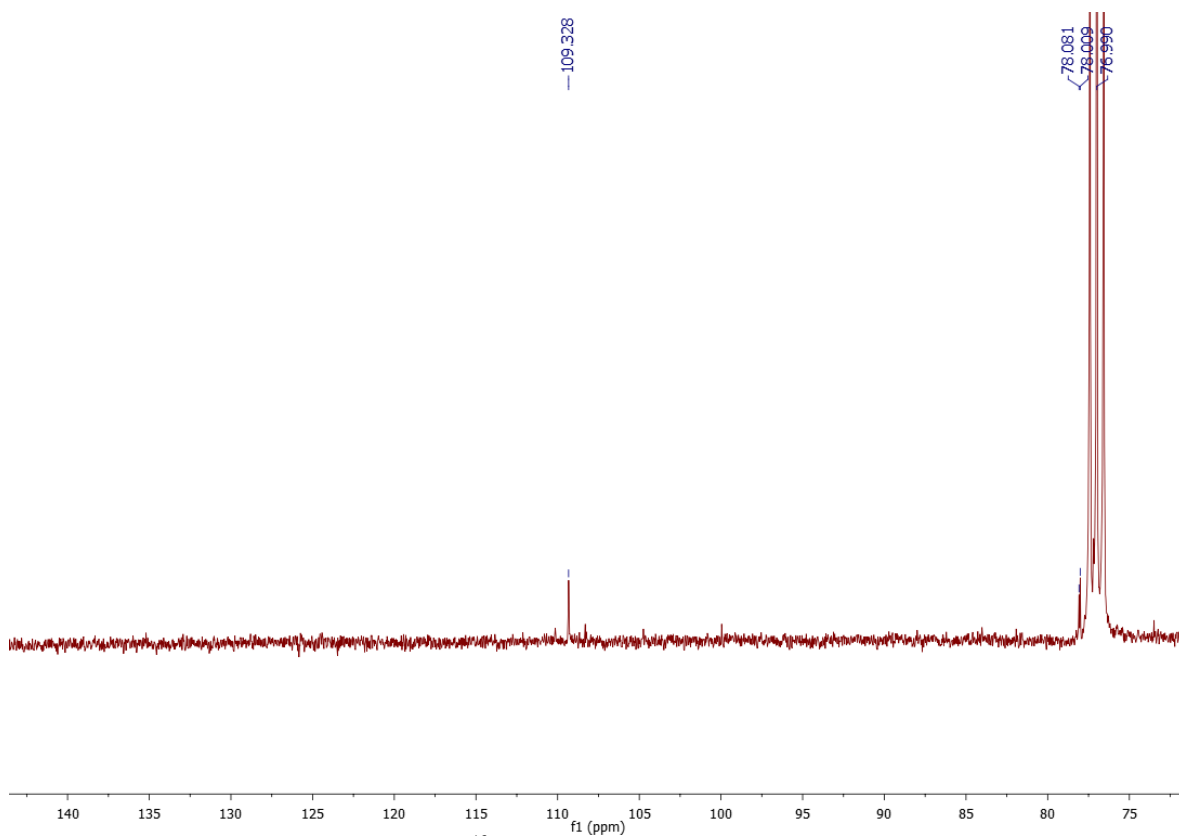


Figura 41. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-3 na região entre 140 e 75 ppm (CDCl_3 , 75 MHz).

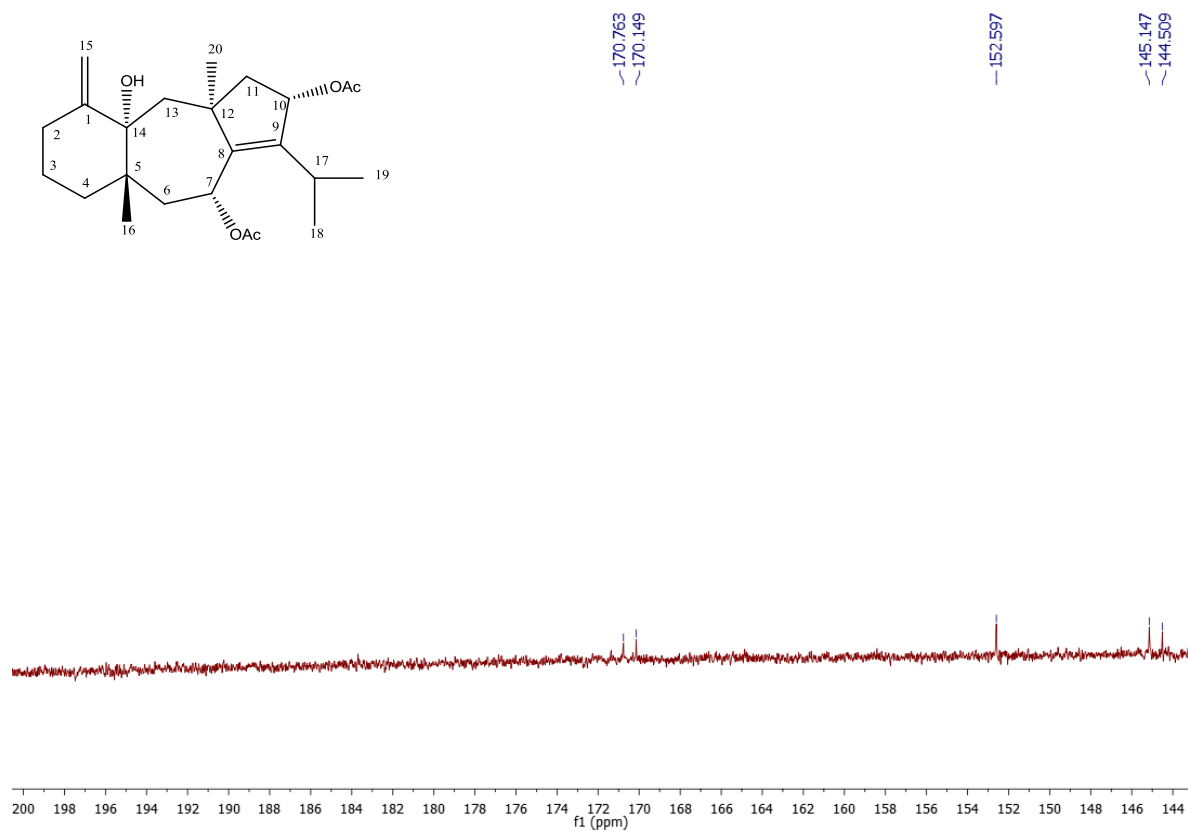


Figura 42. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-3 na região entre 200 e 144 ppm (CDCl_3 , 75 MHz).

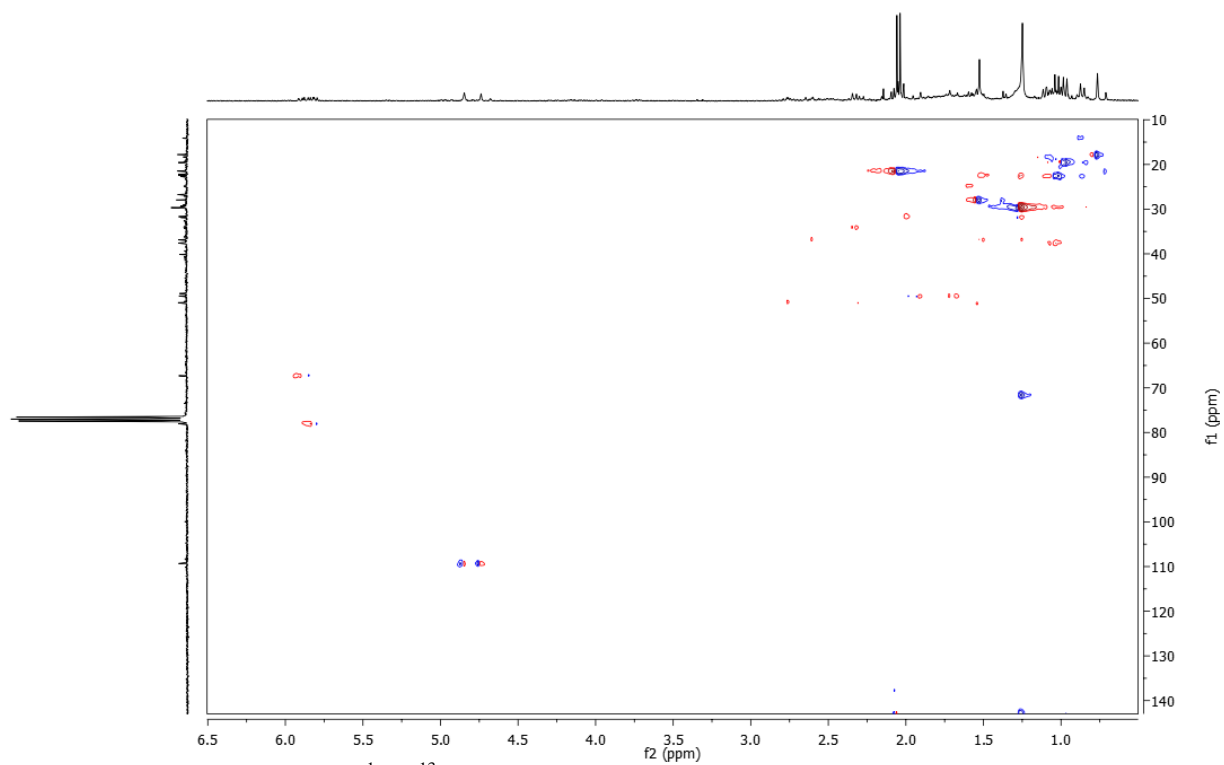


Figura 43. Espectro de correlação ^1H x ^{13}C HSQC de D-3 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).

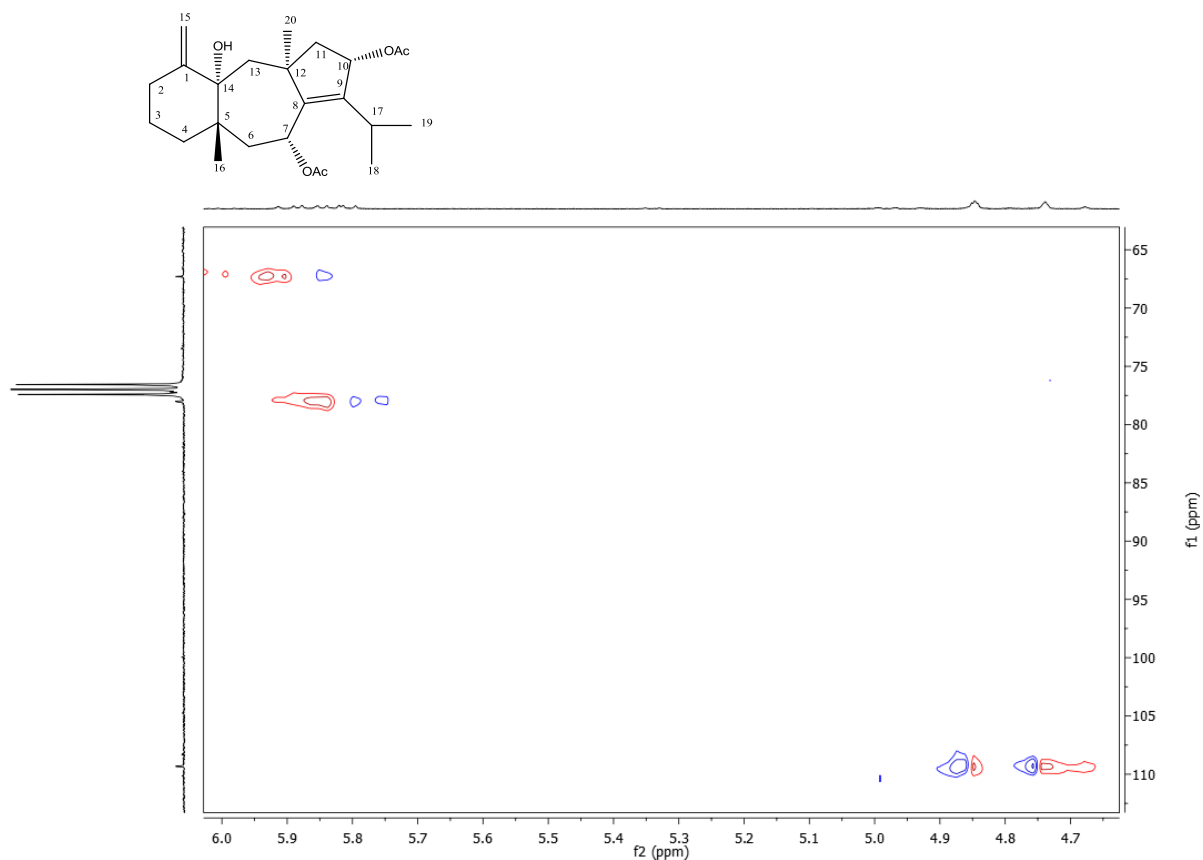


Figura 44. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C HSQC de D-3 na região entre 110 e 65 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).

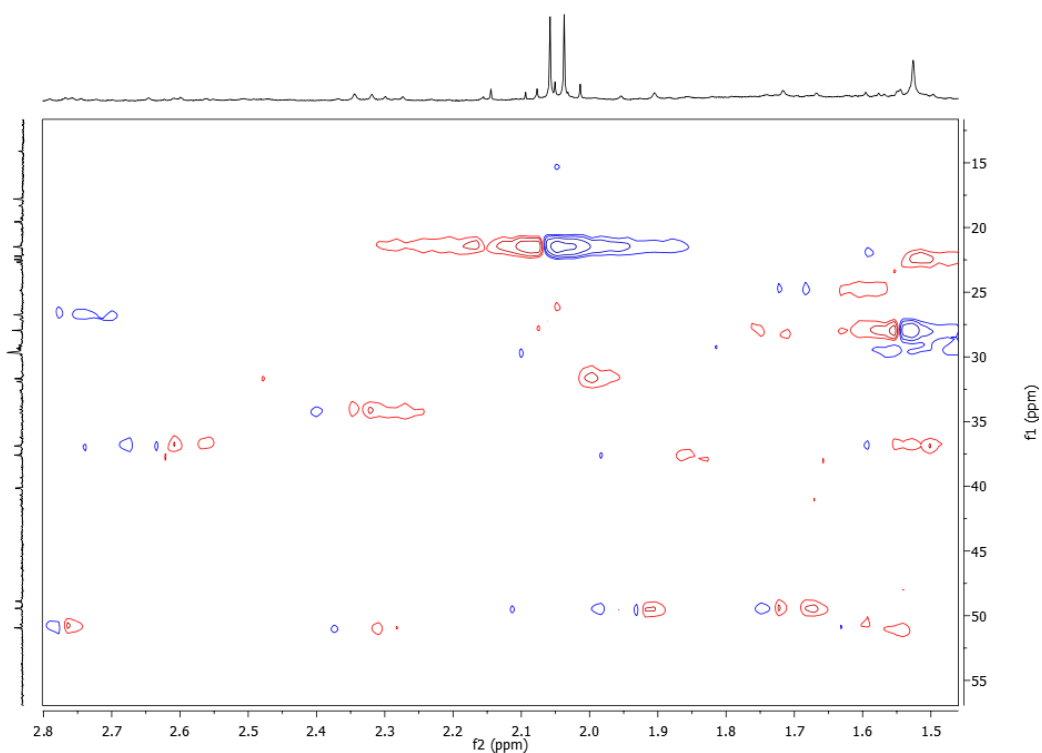


Figura 45 Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C HSQC de D-3 na região entre 55 e 15 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).

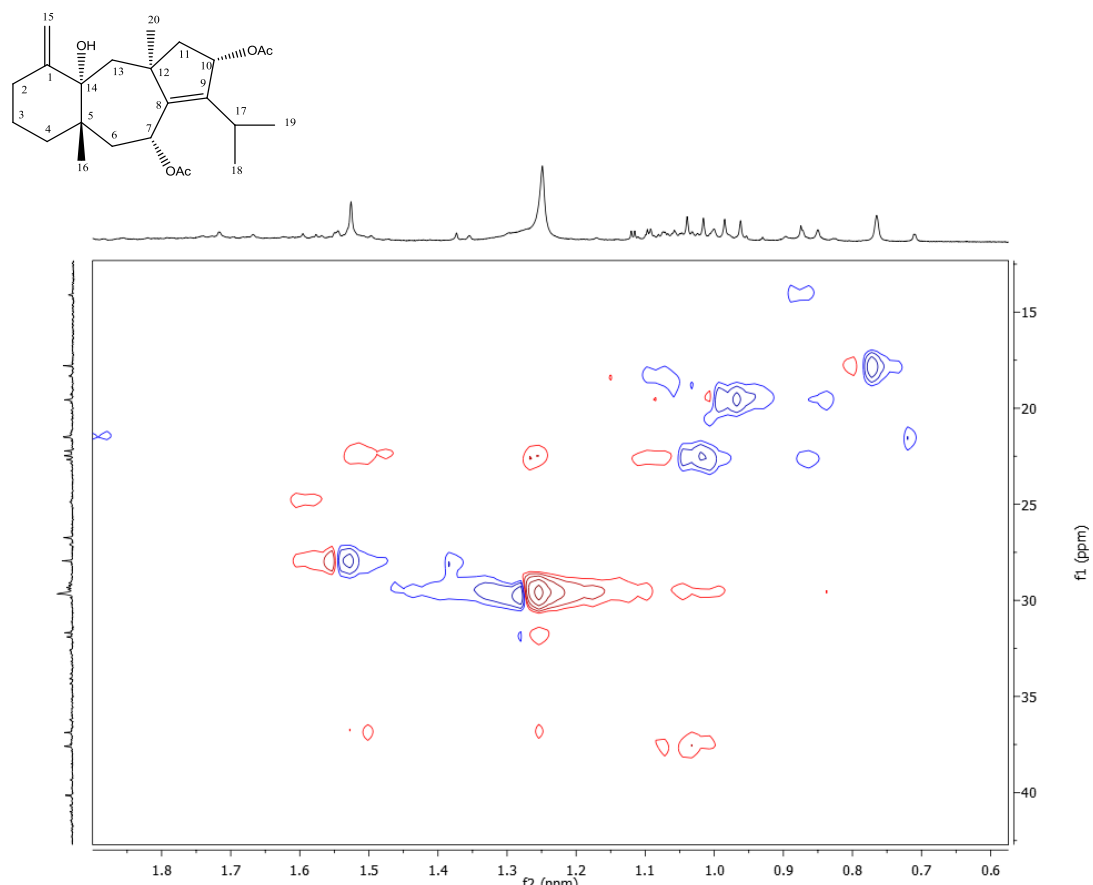


Figura 46. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC de D-3 na região entre 40 e 15 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).

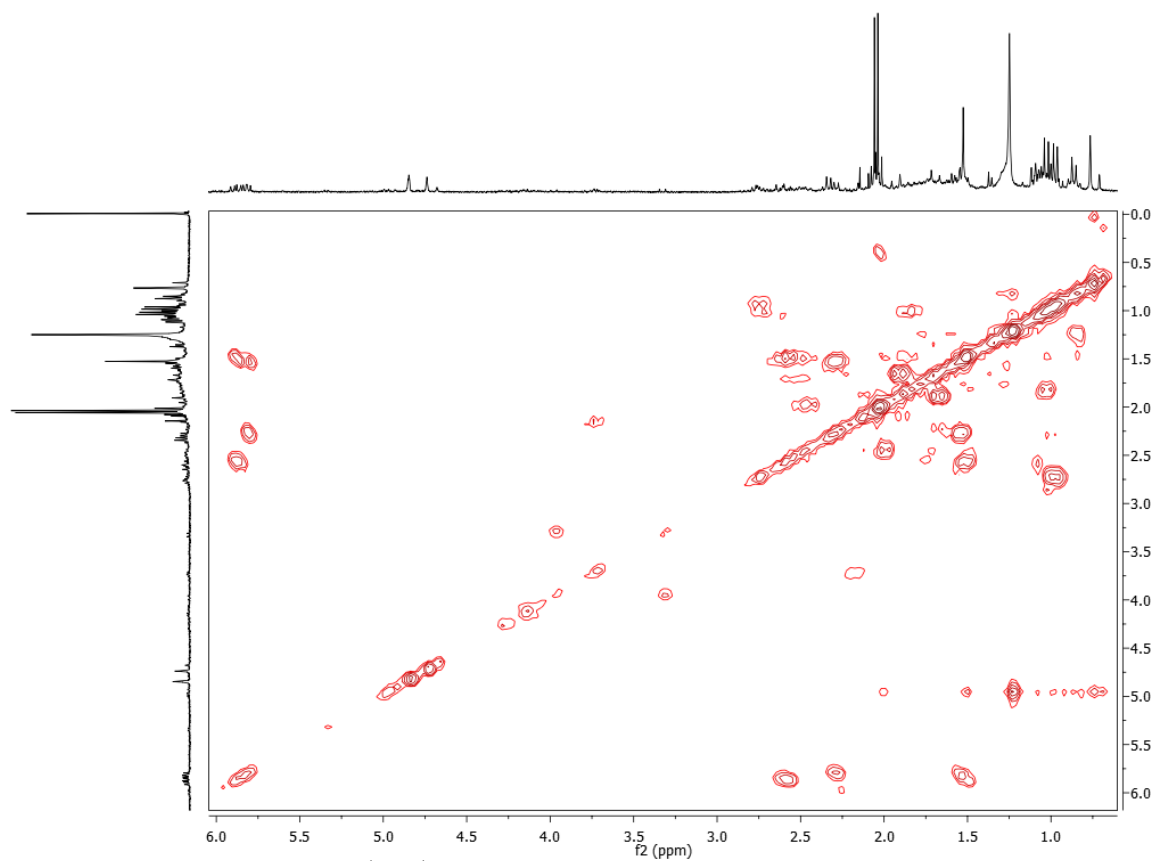


Figura 47. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de D-3 (CDCl_3 , 300 MHz).

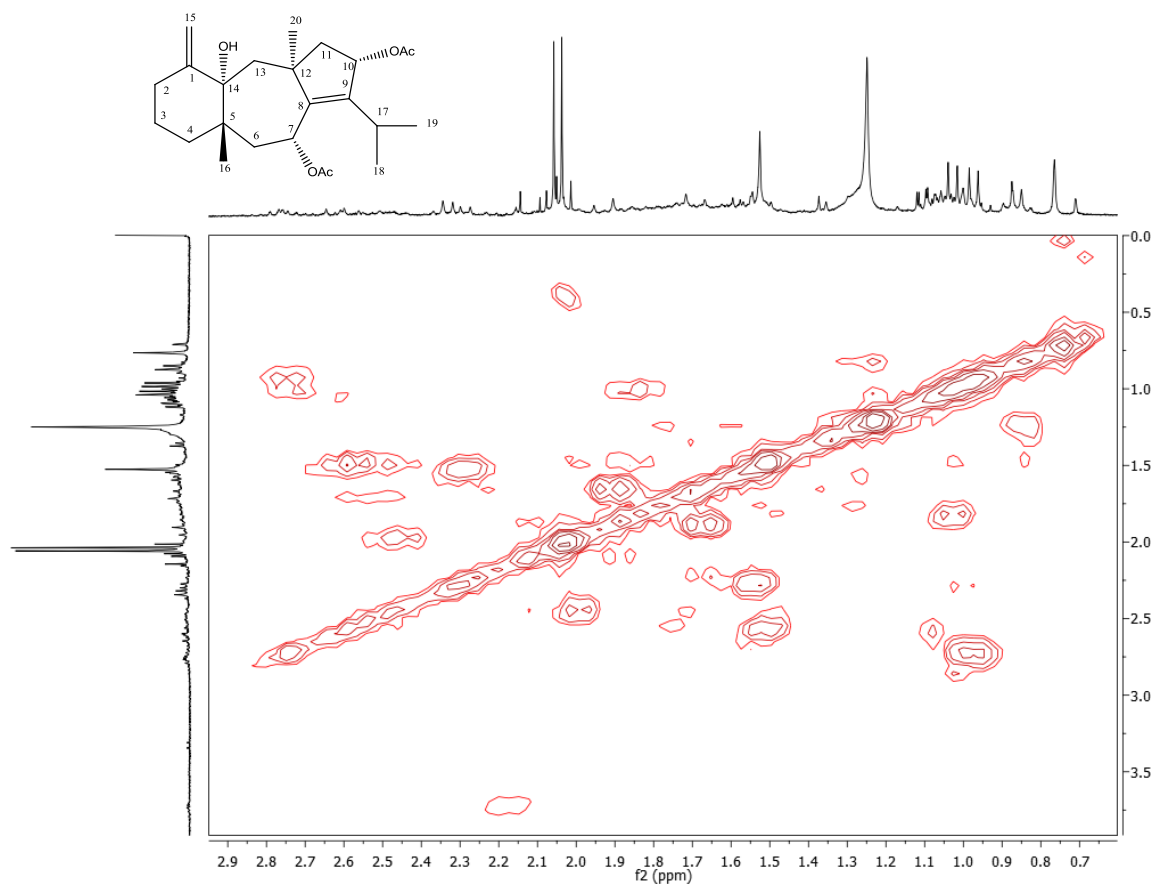


Figura 48. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de D-3 na região entre 2,5 e 0 ppm. (CDCl_3 , 300 MHz).

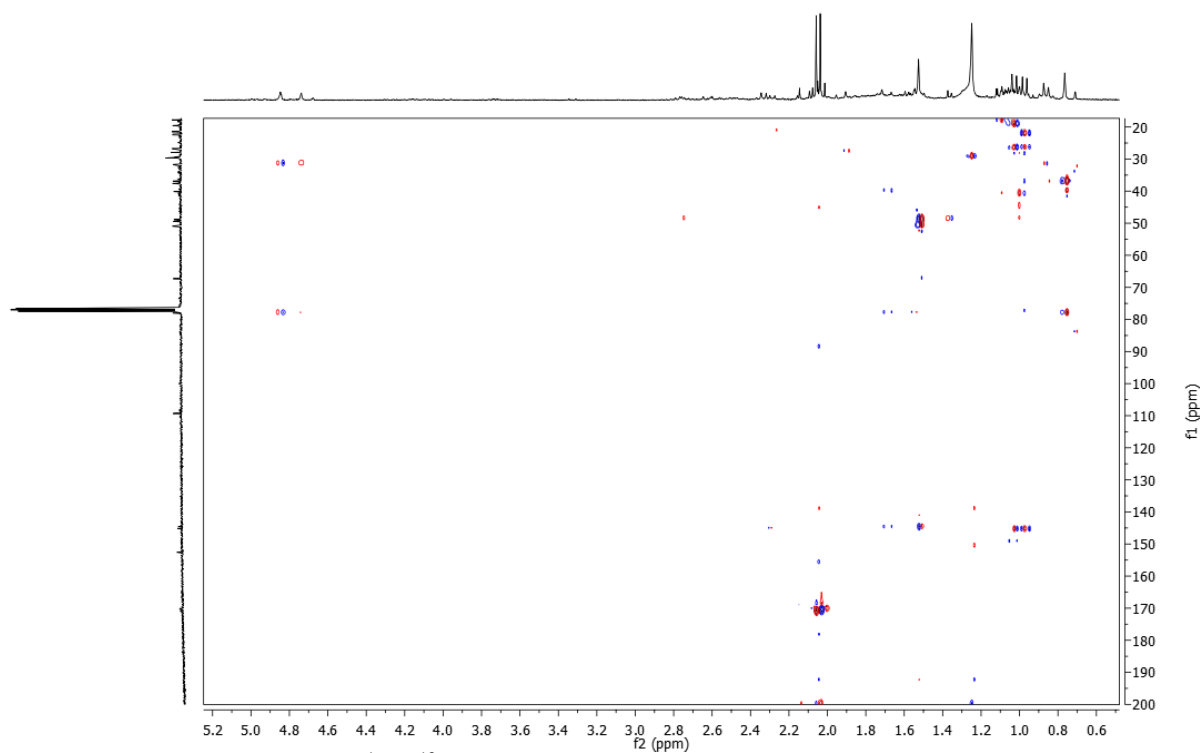


Figura 49. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-3 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).

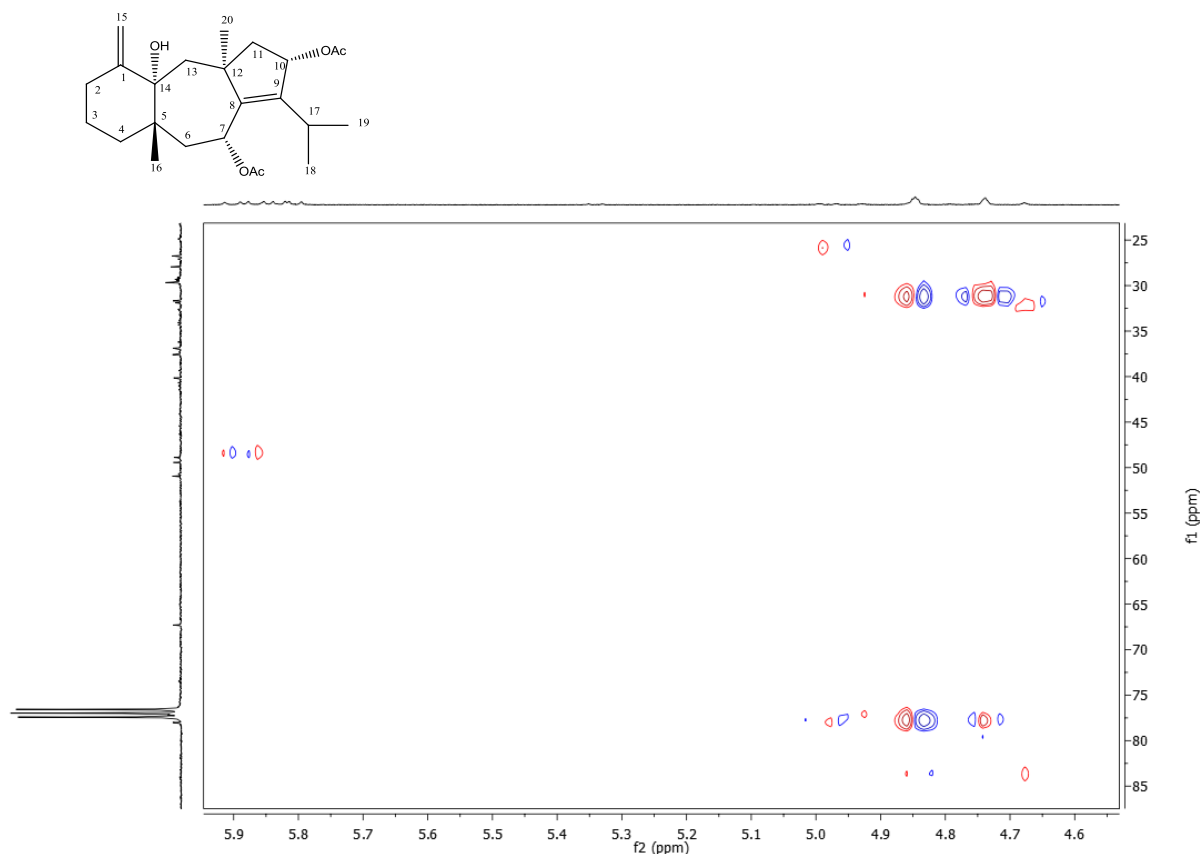


Figura 50. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-3 na região entre 85 e 25 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).

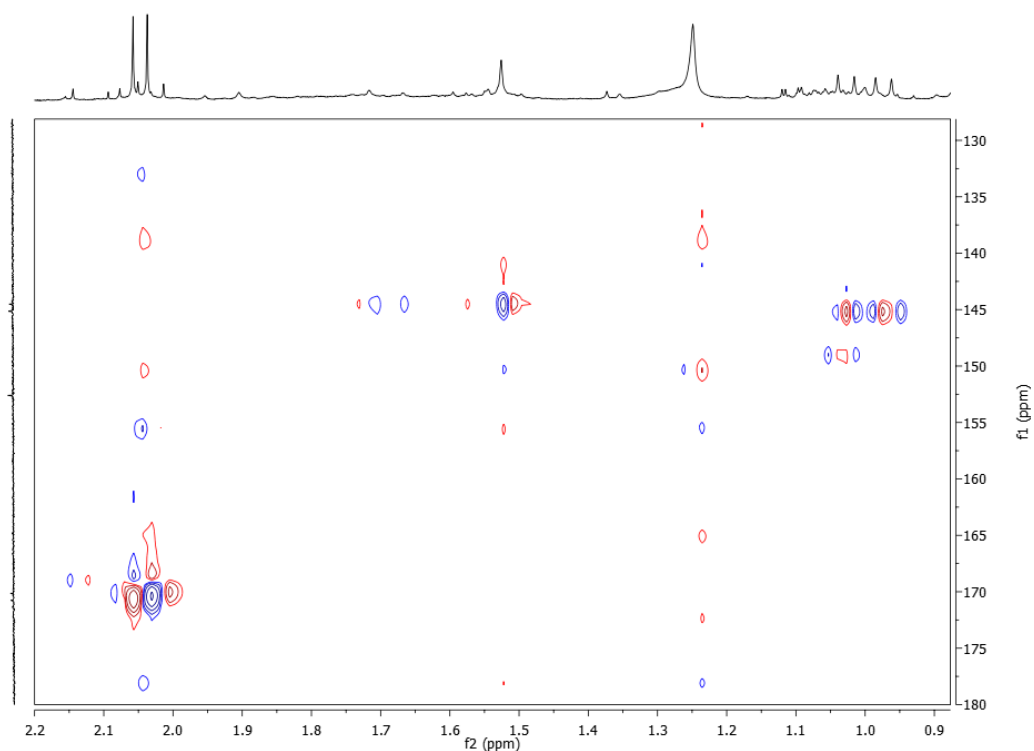


Figura 51. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-3 na região entre 180 e 130 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).

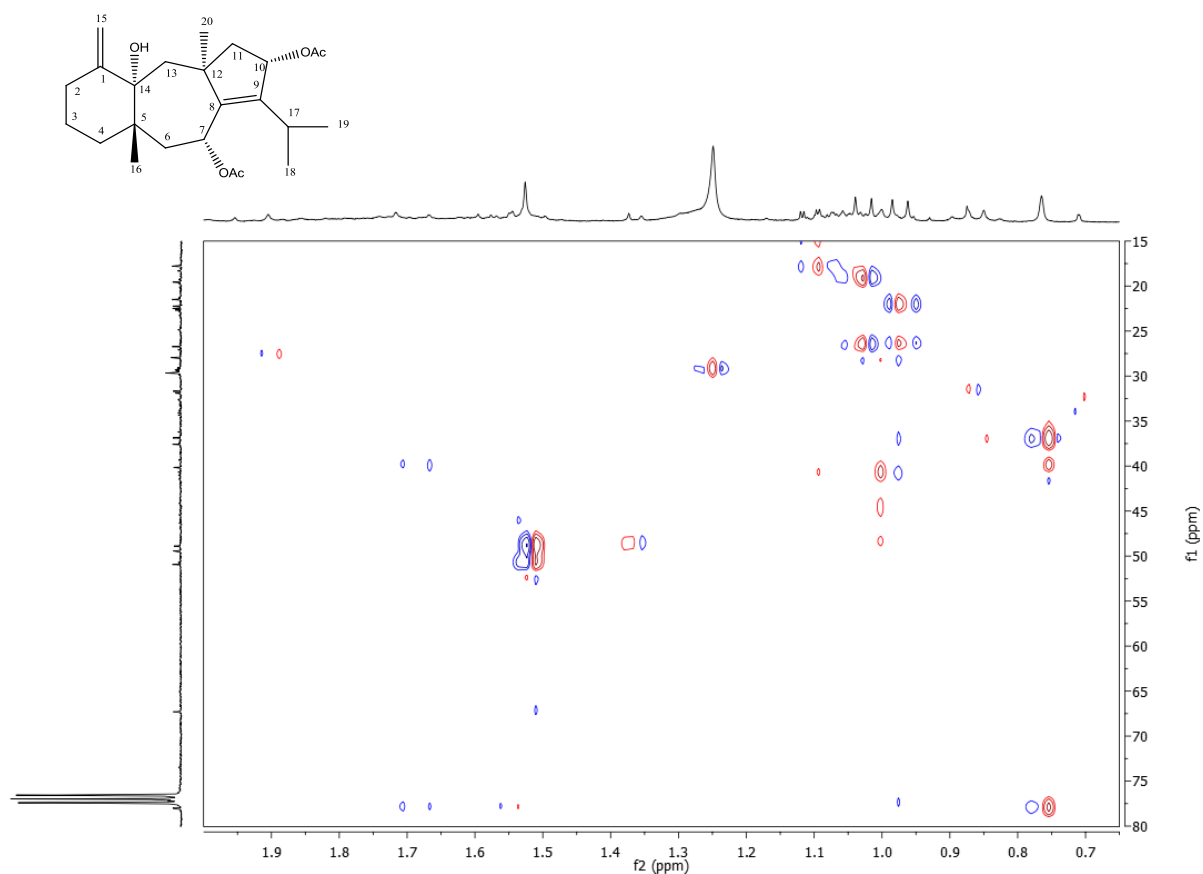


Figura 52. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C HMBC de D-3 na região entre 80 e 15 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).

5.4 Identificação estrutural de D-4

A substância D-4 foi isolada como um óleo escuro (150 mg). A substância apresentou $[\alpha]_D - 55,0^\circ$ (CHCl_3). O espectro na região do IV (Figura 53, p.93) de D-4 apresentou bandas de absorção em 3.415 cm^{-1} , correspondente a estiramento de ligação OH de hidroxila, e em 2.924 cm^{-1} característica de estiramento assimétrico da ligação CH de grupos CH_2 e CH_3 , em 1734 cm^{-1} uma absorção de grupo carbonílico de éster e em 1715 cm^{-1} uma carbonila de grupo cetona. Em 1248 cm^{-1} há uma absorção indicativa de ligação C-O.

Na Tabela 13 (p. 89) é possível visualizar os deslocamentos químicos obtidos em CDCl_3 nos espectros de RMN de ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), COSY e HMBC (Figuras 54-65, p. 94-99).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 54, p.94) de D-4 foi possível observar a presença de duas metilas em carbono quaternário, em $\delta_{\text{H}} 0,76$ (s), referente a Me-16, e em $1,00$ (s), atribuído a Me-20, e duas metilas de unidade isopropila indicada pela presença de dois dupletos em $\delta_{\text{H}} 1,08$ (d, $J = 6,9$) e $\delta_{\text{H}} 1,10$ (d, $J = 6,9$) e um multipletto em $\delta_{\text{H}} 2,63$ (Figuras 55 e 56, p. 94 e 95). Os sinais em $\delta_{\text{H}} 4,80$ (s) e $\delta_{\text{H}} 4,94$ (sl) indicaram a presença de uma dupla ligação exocíclica (H-15) na molécula. Foi possível visualizar ainda um sinal em $\delta_{\text{H}} 4,83$ (t, $J = 4,5$), atribuído a hidrogênio em carbono oximetínico (Figura 56, p. 96) e um sinal de metila de unidade acetato em $\delta_{\text{H}} 2,12$ (s), além do envelope de sinais indicativos de esqueleto de terpenoide (ALI, PERVEZ, 2003).

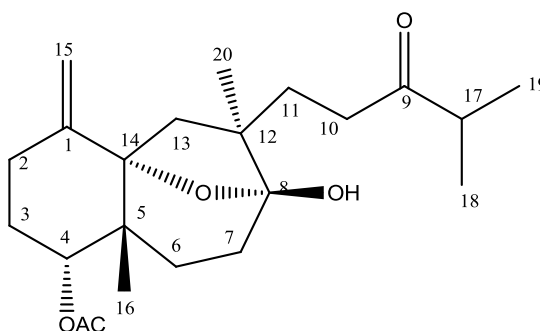
A análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 58, p. 96) permitiu visualizar os sinais em $\delta_{\text{C}} 23,14$ e $\delta_{\text{C}} 21,83$ atribuídos as Me-16 e Me-20, respectivamente; $\delta_{\text{C}} 18,30$ (Me-18) $\delta_{\text{C}} 18,30$ (Me-19) e $\delta_{\text{C}} 41,14$ (C-17), referentes à unidade isopropila (Figuras 59, p. 96). A diferença que surge neste esqueleto diterpênico em relação ao esqueleto dolastano descrito em D-1, D-2 e D-3 é a desproteção do C-17, explicada pela presença de uma carbonila de cetona em C-9 ($\delta_{\text{C}} 214,78$) (Figura 60, p. 97). Os sinais em $\delta_{\text{C}} 104,50$ e $\delta_{\text{C}} 83,31$ foram atribuídos a carbono hemiacetal (C-8) e quaternário oxigenado (C-14), respectivamente. A dupla terminal teve sua presença confirmada com os sinais em $\delta_{\text{C}} 146,98$ (C-1) e $\delta_{\text{C}} 109,55$ (C-15). O conjunto de sinais visualizados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C juntamente com os dados de referência na literatura (Tabelas 13 e 14, p. 91 e 92) permitiram inferir que D-4 pertence à classe de diterpeno do tipo seco-dolastano, tipicamente encontrado em *C. cervicornis*.

No espectro de correlações heteronucleares HMBC (Figura 61, p. 97) de D-4 foram observadas correlações entre os H-15 ($\delta_{\text{H}} 4,94$ e $\delta_{\text{H}} 4,80$) com C-14 ($\delta_{\text{H}} 83,31$) e C-2 ($28,18$) (Figura 62, p. 98). Os hidrogênios da metila 20 ($\delta_{\text{H}} 1,00$) correlacionaram-se com $\delta_{\text{C}} 43,65$

(C-12) δ_C 40,01 (C-13) e δ_C 104,50 (C-8) (Figura 63, p.98). A posição dos hidrogênios da metila 16 foi confirmada através de correlações com C-4 (δ_C 78,24), C-5 (δ_C 39,50), C-6 (δ_C 32,20), C-14 (δ_C 83,31) (Figura 63, p.98). O H-17 (δ_C 2,63) correlacionou-se com C-18 (δ_C 18,31) e C-19 (δ_C 18,31) e com δ_C 214,78, confirmando a presença da carbonila em C-9. Correlações entre a metila (δ_H 2,12) e a carbonila (δ_C 171,11) da unidade acetato também foram detectadas (Figura 64, p.99).

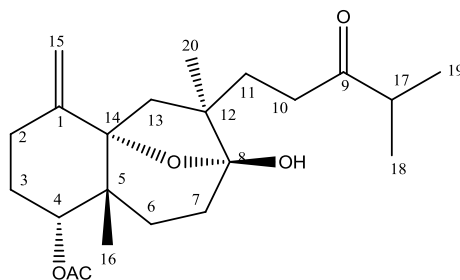
No espectro COSY de D-4 (Figura 65, p. 99) foi possível visualizar correlações entre H-17 (δ_H 2,63) δ_H 1,08 (H-18 e H-19). O sinal em δ_H 4,83 (H-4) correlacionou-se com δ_H 1,80, que foi atribuído a H-3. E este mostrou correlação com o sinal em δ_H 2,76, atribuído a H-2.

Assim, após análise dos dados de RMN uni e bidimensionais e comparações com dados da literatura, visualizados na Tabela 14 (página 92), foi possível identificar D-4 como o diterpeno secodolastano acetato de isolinearol, substância já isolada de *C. cervicornis* (TEIXEIRA et al., 1986).



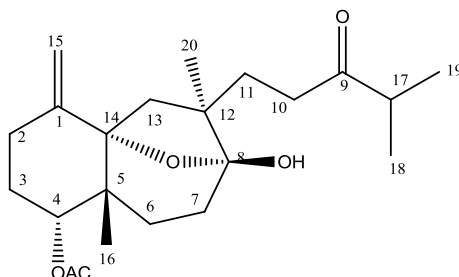
Acetato de Isolinearol

Tabela 13. Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) em CDCl_3 (δ em ppm e J em Hz) da substância **D-4**.



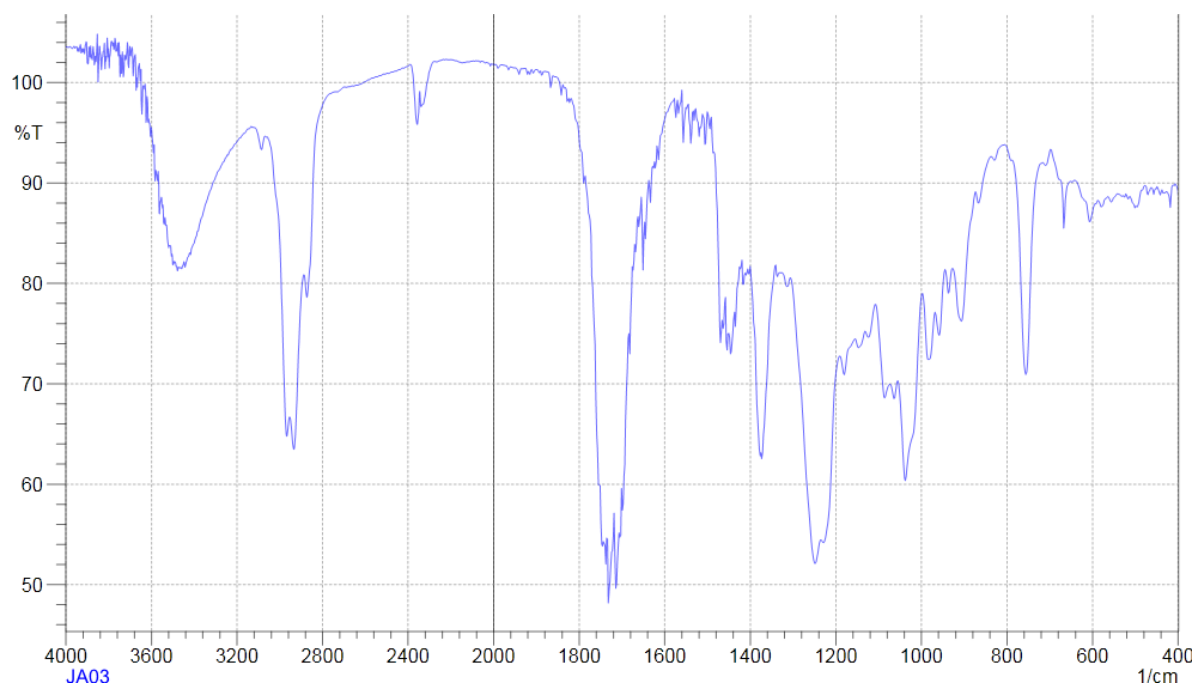
	RMN		COSY	HMBC
	δ_{H}	δ_{C}		
1		146,98		
2	2,70 (1H, m)	28,18	H-3	
3	1,81 (1H, m)	31,18		
4	4,83 (1H, t, 2,7)	78,24	H-3	
5	-	39,60		
6		32,20		
7		29,61		
8	-	104,50		
9	-	214,78		
10	2,48 (2H)	29,26		
11		36,00		
12	-	43,65		
13	1,97 (1H, sl) 1,71 (1H, sl)	40,01		C-1, C-8, C-12, C-14
14	-	83,31		
15	4,80 (1H, s) 4,94 (1H, sl)	109,55		C-2, C-14
16	0,76 (3H, s)	23,14		C-4, C-5, C-6, C-14
17	2,63 (1H, m)	41,14		C-9, C-18
18	1,08 (3H, d, 6,9)	18,31	H-17	
19	1,10 (3H, d, 6,9)	18,31		C-9
20	1,00 (3H, s)	21,83		C-8, C-12, C-13
4-COOCH₃		171,11		
4-COOCH₃	2,12 (3H, s)	22,58		

Tabela 14. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz) de **D-4** em CDCl_3 com dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 MHz) da literatura em CDCl_3 e CD_3OD (ALI, PERVEZ, 2003).



Número	D-4	Referência (ALI, PERVEZ, 2003)	D-4	Referência (ALI, PERVEZ, 2003)
	δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
1		-	146,9	146,8
2	2,70 (1H, m)	n.o	31,2	31,0
3	1,81 (1H, m)	n.o	28,2	27,9
4	4,83 (1H, t, 2,7)	4,84 (1H, t, 4,5)	78,2	78,3
5	-	-	39,6	39,4
6		n.o	32,2	32,1
7		n.o	29,6	29,2
8	-	-	104,5	104,2
9	-	-	214,8	215,8
10	2,48 (2H)	n.o	29,3	29,1
11		n.o	36,0	36,1
12	-	-	43,65	43,5
13	1,97 (sl) 1,71 (sl)	n.o	40,0	40,9
14	-	-	83,31	83,3
15	4,80 (1H, s) 4,94 (1H, sl)	4,79 (1H, s) 4,98 (1H, s)	109,5	109,5
16	0,76 (3H, s)	0,75 (3H, s)	23,1	23,0
17	2,63 (1H, m)	2,62 (1H, hp, 6,9)	41,1	40,9
18	1,08 (3H, d, 6,9)	1,08 (3H, d, 6,9)	18,3	18,1
19	1,10 (3H, d, 6,9)	1,09 (3H, d, 6,9)	18,3	18,1
20	1,00 (3H, s)	0,99 (3H, s)	21,8	21,4
4-COOCH ₃			171,1	171,8
4-COOCH ₃	2,12 (3H, s)	2,11 (3H, s)	22,6	22,6

n.o. : não observado

ESPECTROS D-4**Figura 53:** Espectro de IV de D-4 (pastilha de KBr)

ESPECTROS D-4

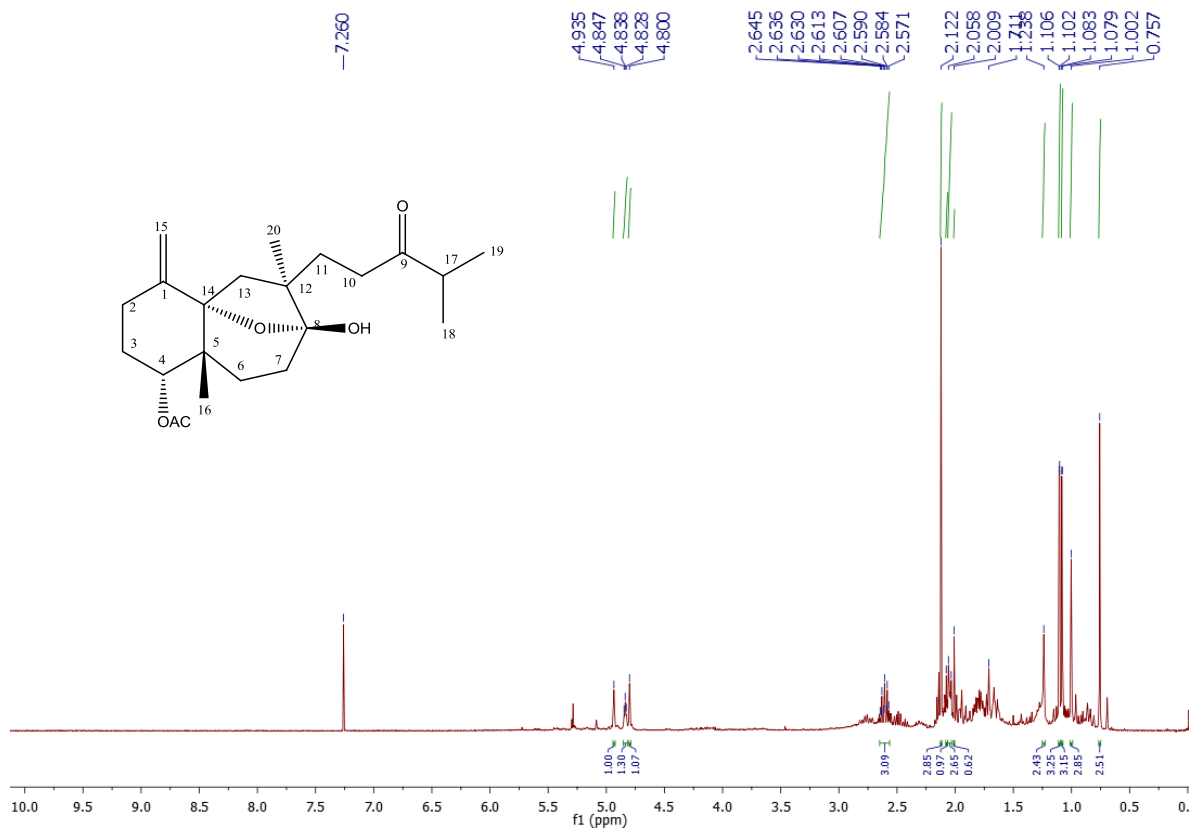


Figura 54. Espectro de RMN ^1H de D-4 (CDCl_3 , 300 MHz).

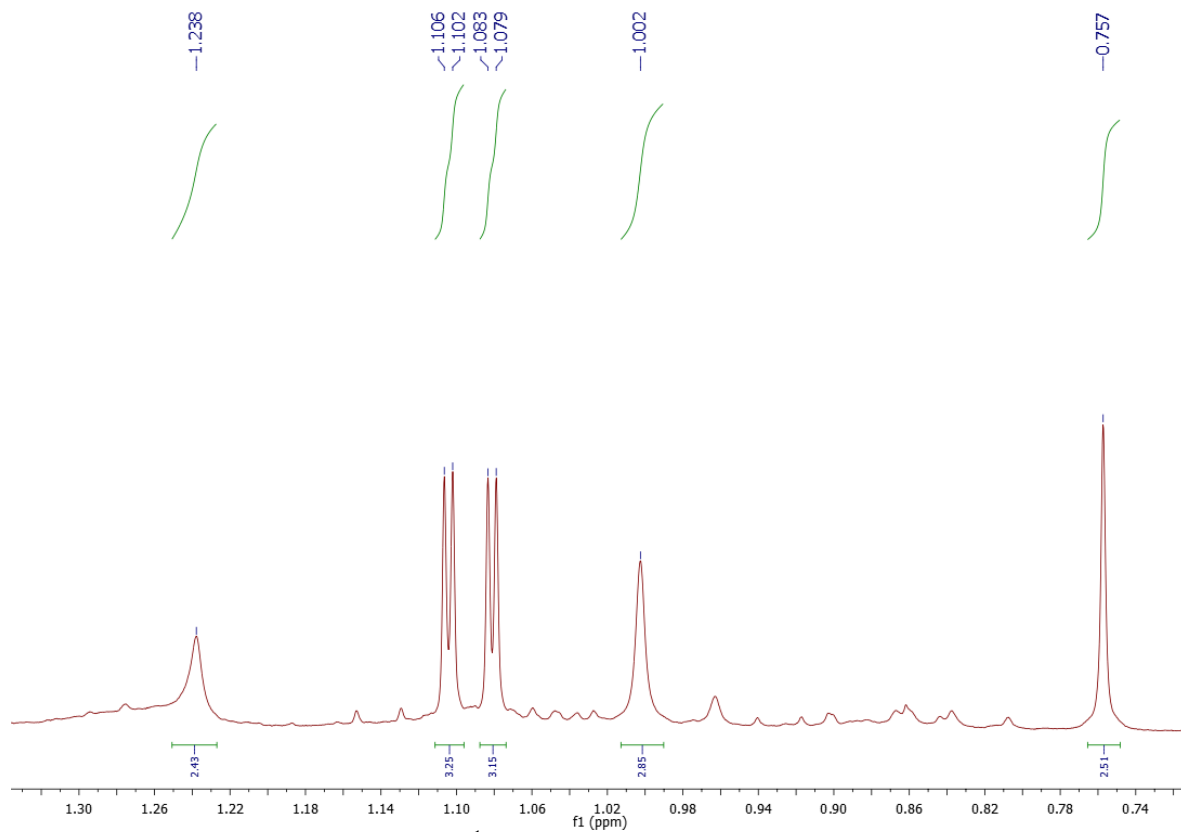


Figura 55. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-4 na região entre 1,30 e 0,74 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).

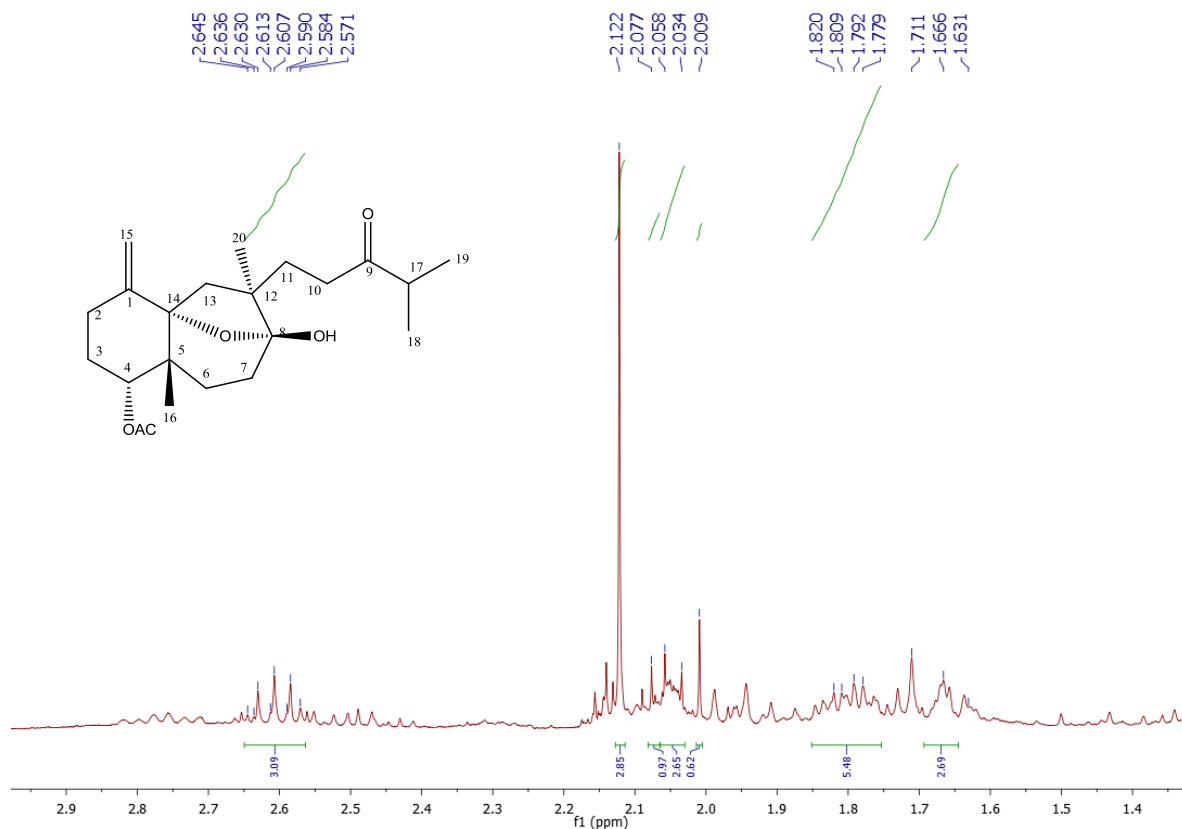


Figura 56. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-4 na região entre 2,9 e 1,4 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).

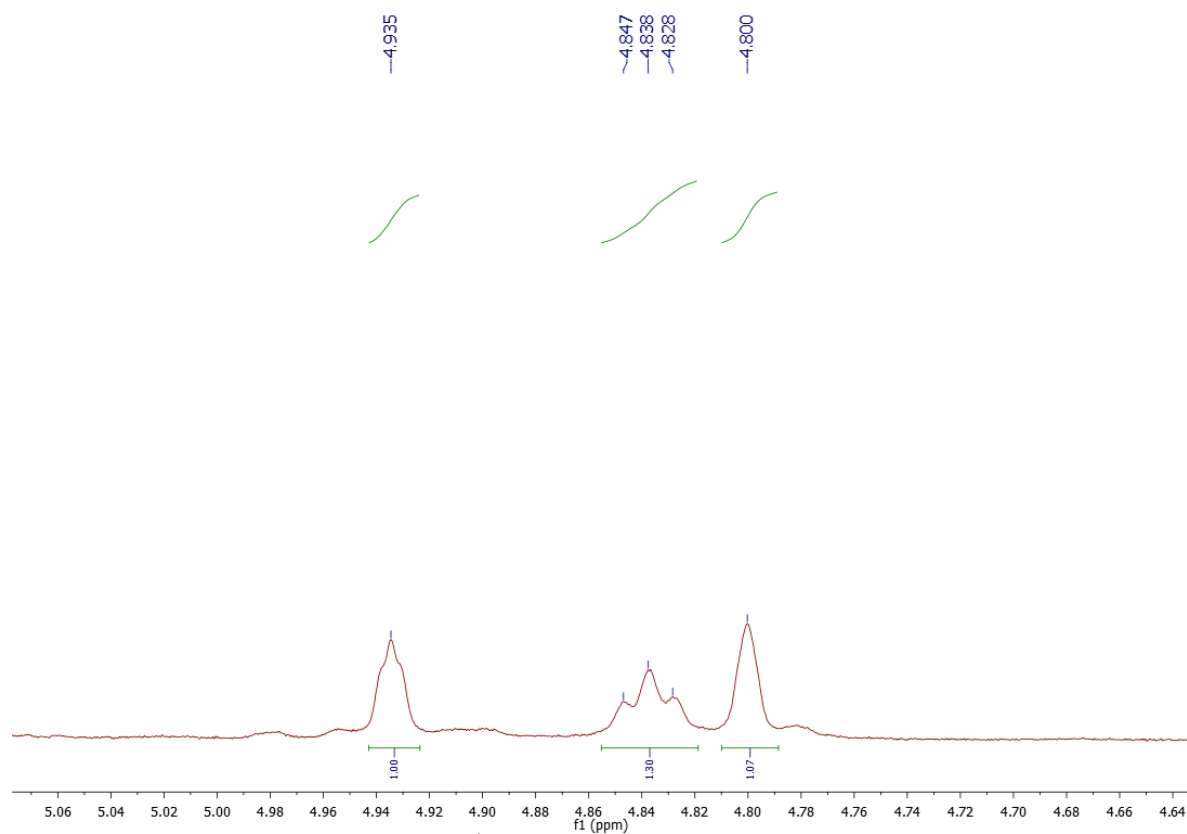


Figura 57. Expansão do espectro de RMN ^1H de D-4 na região entre 5,0 e 4,6 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).

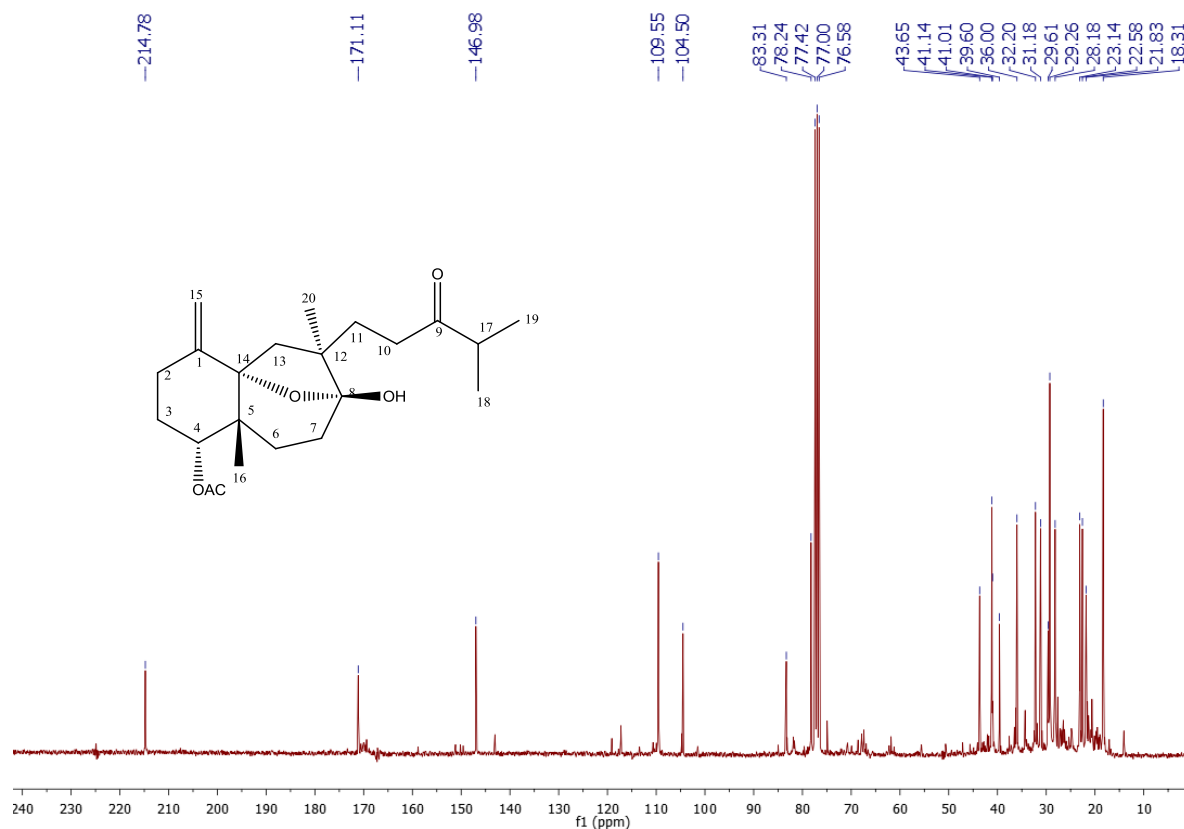


Figura 58. Espectro de RMN ¹³C de D-4 (CDCl₃, 75 MHz).

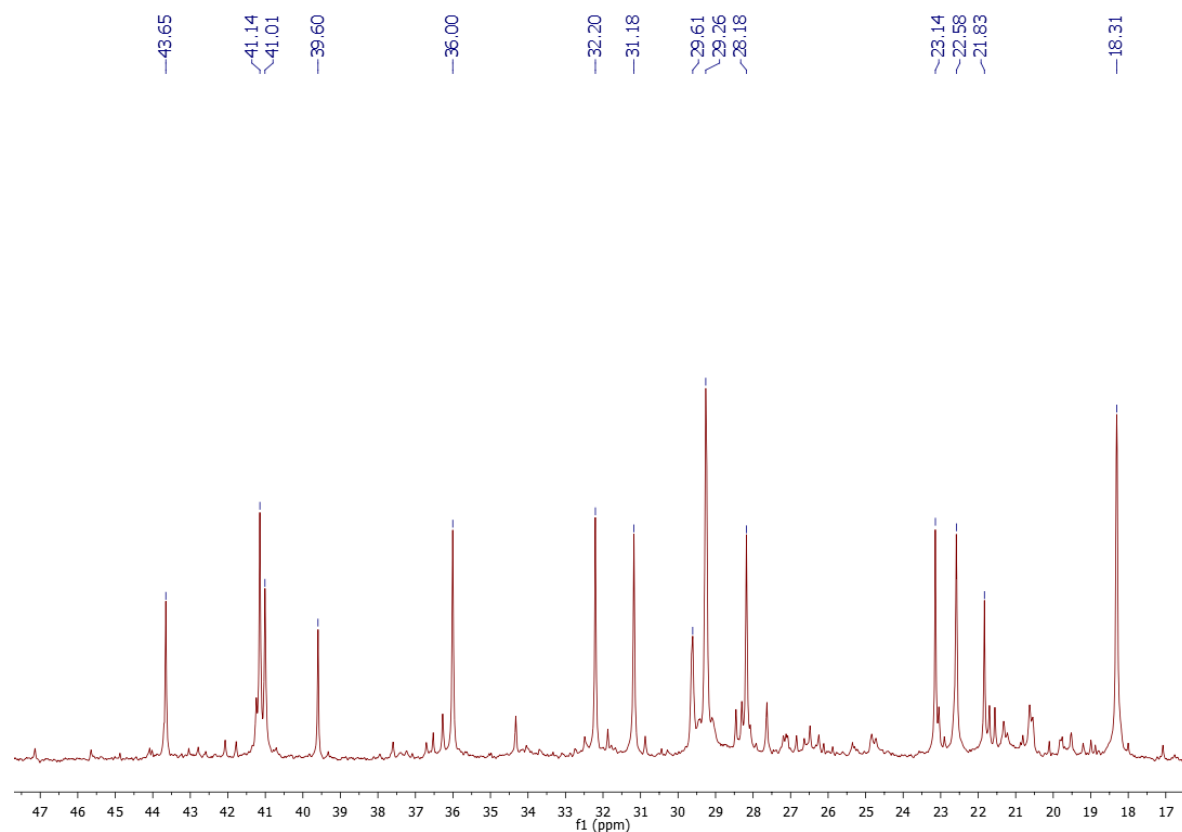


Figura 59. Expansão do espectro de RMN ¹³C de D-4 na região entre 47 e 17 ppm (CDCl₃, 75 MHz).

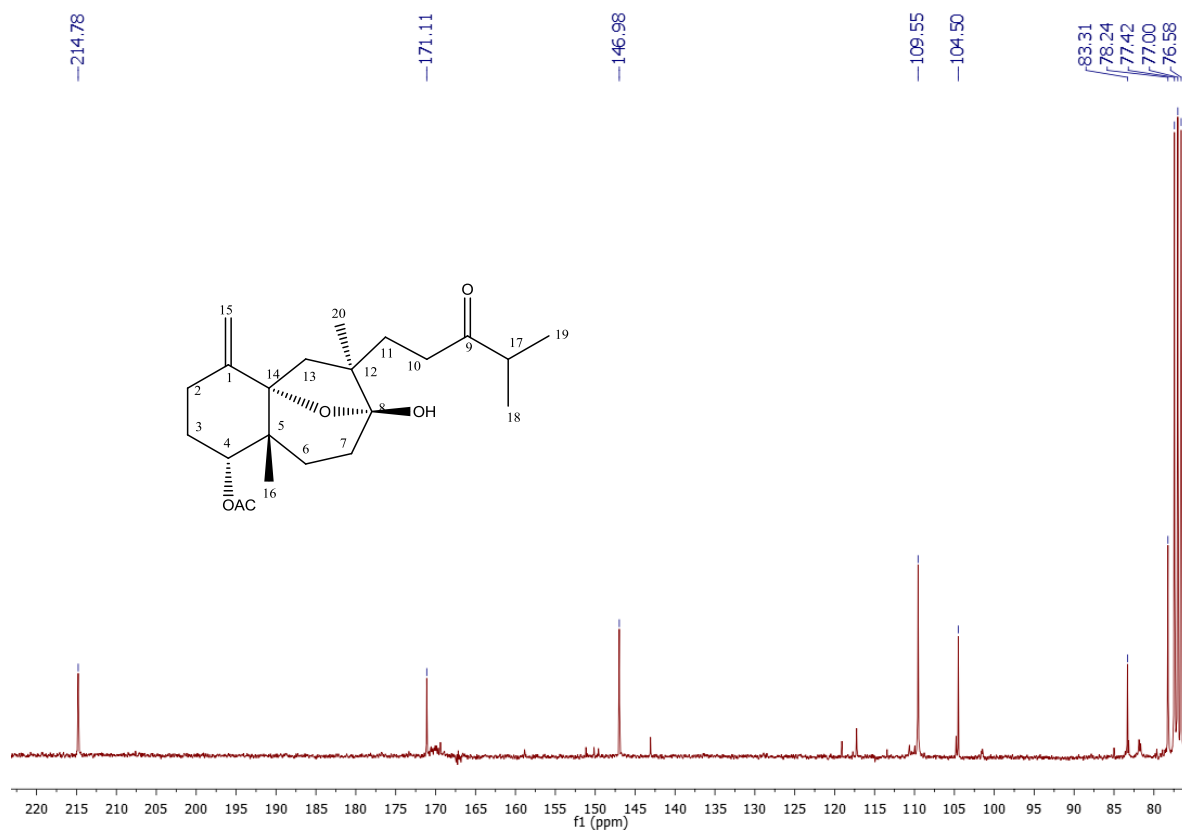


Figura 60. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-4 na região entre 220 e 80 ppm (CDCl_3 , 75 MHz).

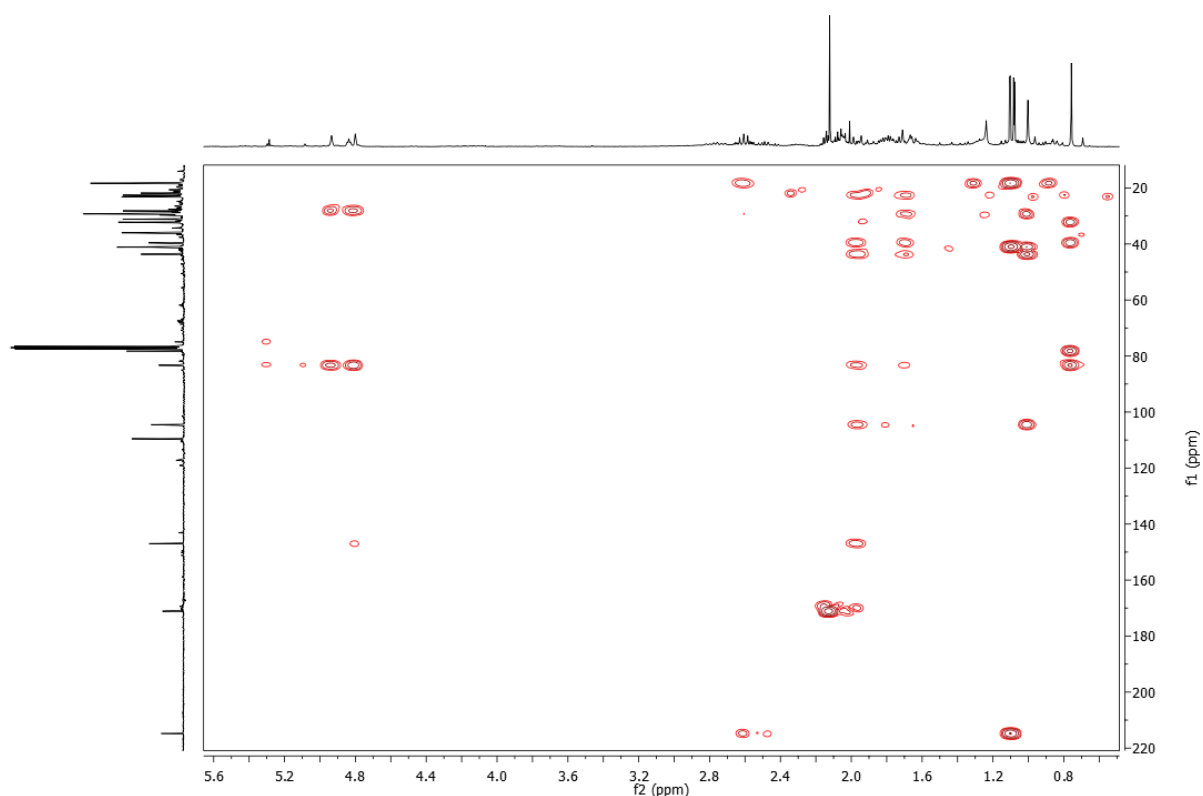


Figura 61. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-4 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).

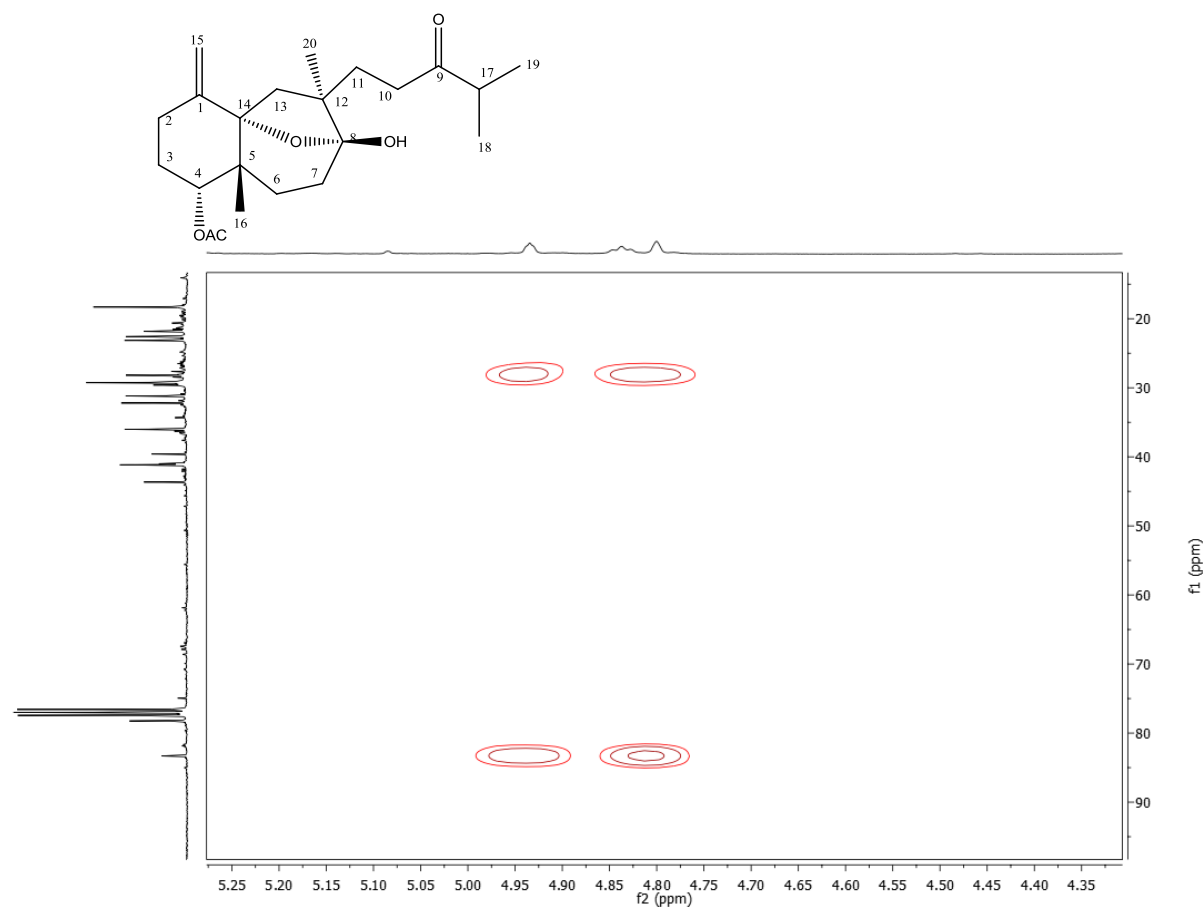


Figura 62. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-4 na região entre 90 e 20 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).

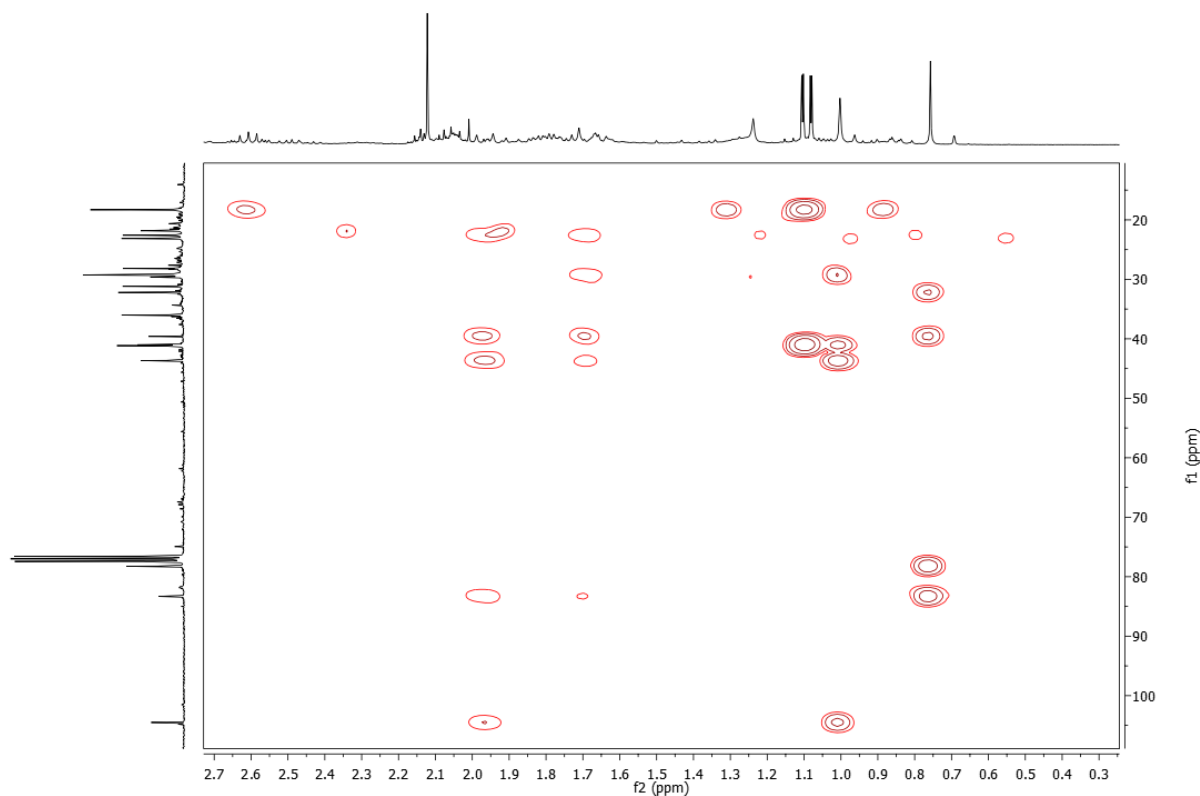


Figura 63. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-4 na região entre 100 e 20 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).

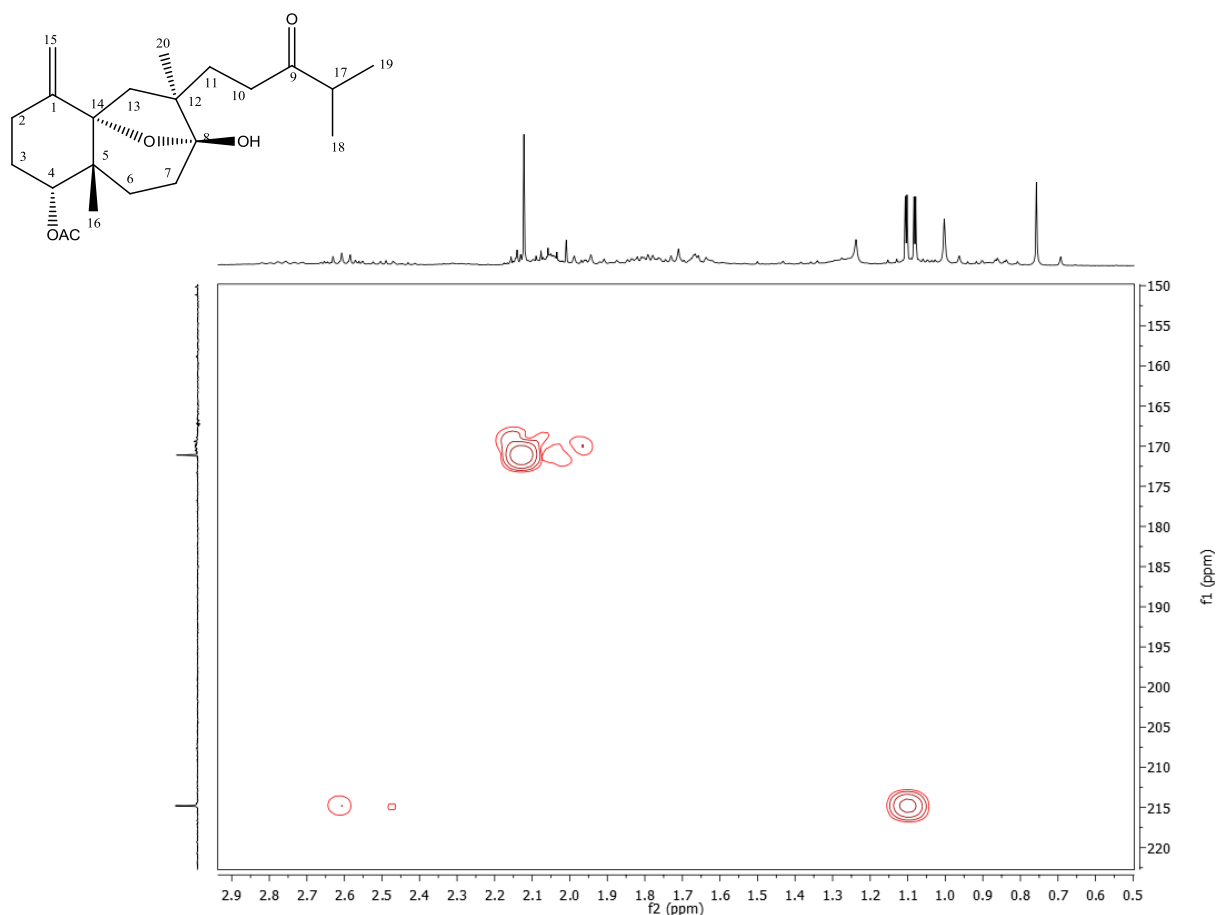


Figura 64. Expansão do espectro de correlação ^1H x ^{13}C HMBC de D-4 na região entre 220 a 155 ppm (CDCl_3 , 300 e 75 MHz).

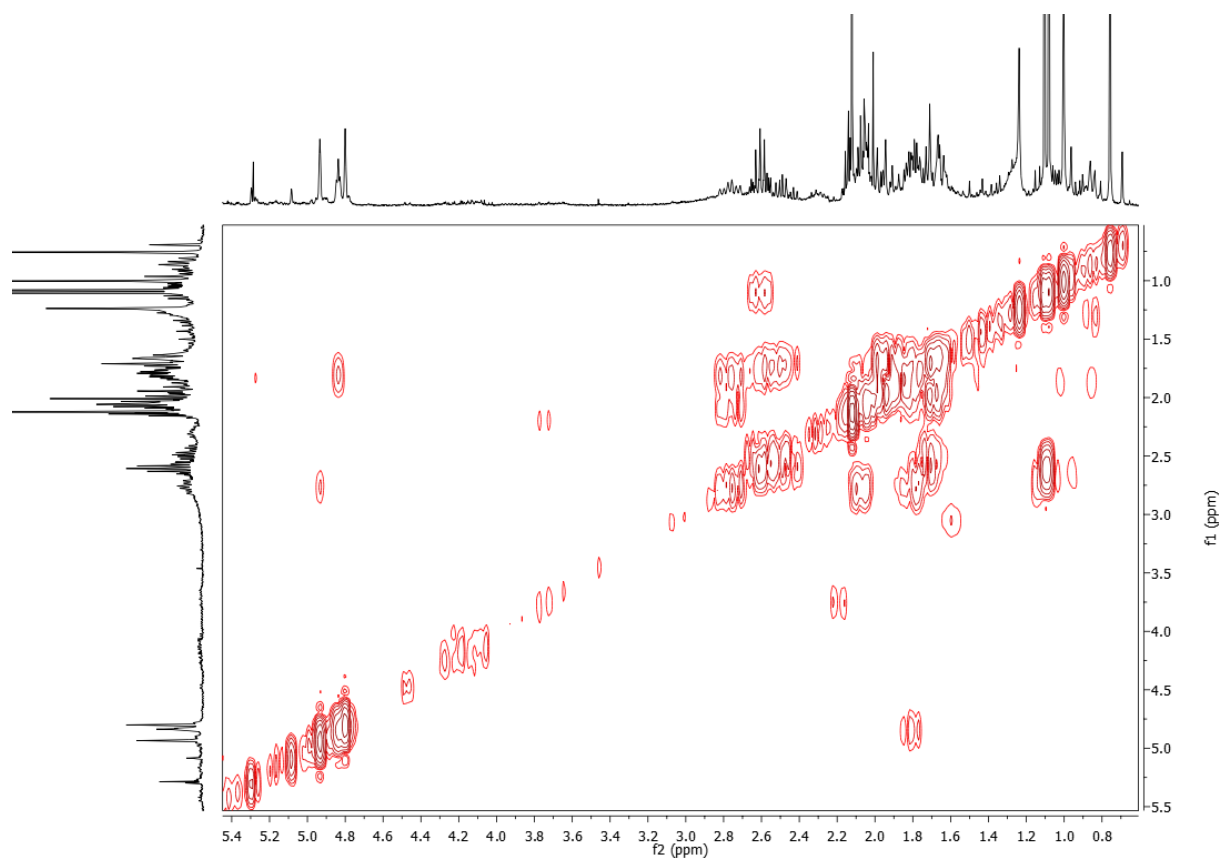


Figura 65. Espectro de correlação ^1H x ^1H COSY de D-4 (CDCl_3 , 300MHz).

5.5 Identificação estrutural de D-5

A substância D-5 foi isolada sob a forma de um óleo incolor (6 mg). Na Tabela 15 (p. 101) é possível visualizar os deslocamentos químicos obtidos em CDCl_3 nos espectros de RMN de ^1H (300 MHz), ^{13}C (75 MHz), HSQC, HMBC (Figuras 66-73, p.102-105). A substância apresentou $[\alpha]_D - 31,0^\circ$ (CHCl_3).

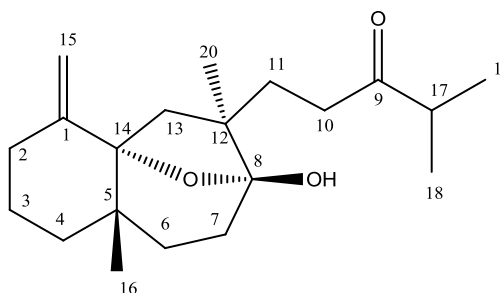
O espectro de RMN de ^1H de D-5, assim como observado em D-4, exibiu os quatro sinais característicos para metilas: em δ_{H} 0,71 (s) e em 1,00 (s), atribuído às Me-16 e Me-20, respectivamente, além das duas metilas da unidade isopropila δ_{H} 1,10 (d, $J = 7,2$ Hz) e δ_{H} 1,12 (d, $J = 6,9$ Hz) e um multiplete em δ_{H} 2,63 (H-17) (Figuras 66 e 67, p.102). Sinais para hidrogênios olefínicos (H-15) foram visualizados em δ_{H} 4,85 (s) e em δ_{H} 4,68 (s) (Figura 67, p. 102). A redução no valor de um dos H-15 foi devido à ausência de oxigenação no anel de seis membros. Foi possível visualizar ainda envelope de sinais indicativos de esqueleto de terpenoide (BANO et al., 1990).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 68, p. 103) exibiu os sinais em δ_{C} 21,51 e δ_{C} 22,83 os quais, por comparação com a literatura (BANO et al., 1990) foram atribuídos as Me-16 e Me-20, respectivamente. A presença de unidade isopropila nos deslocamentos: δ_{C} 18,33 (Me-18), δ_{C} 18,37 (Me-19) e δ_{C} 41,14 (C-17) (Figura 69, p.103), e da dupla terminal em: δ_{C} 146,98 (C-1) e δ_{C} 109,55 (C-15) também foram confirmadas com base na literatura. Sinais de grupo carbonila em C-9 (δ_{C} 214,78), um carbono hemiacetal em δ_{C} 104,84 (C-14), e um quaternário oxigenado em δ_{C} 84,09 (C-) sugeriram a presença esqueleto de diterpeno do tipo secodolastano para D-5 (Figura 70, p.104).

Na análise do espectro HMBC (Figura 71, p. 104) de D-5 foi possível visualizar correlações entre o H-18 (δ_{H} 1,10) e o carbono em δ_{C} 214,84, confirmando a presença da carbonila no C-9 (Figura 72, p.105). O H-15 (δ_{H} 4,68) correlacionou-se com δ_{C} 84,09 e δ_{C} 32,60, atribuídos a C-14 e C-2, respectivamente (Figura 73, p. 105).

Assim, após análise dos dados de RMN uni e bidimensionais e comparações com dados da literatura (BANO et al., 1990), os quais podem ser visualizados na Tabela 15 (p. 101), foi possível identificar D-5 como sendo o diterpeno secodolastano indicol, isolado em *C. cervicornis*.

Tabela 15. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 MHz) de **D-5** em CDCl_3 com dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 MHz) da literatura em CDCl_3 (BANO et al., 1990).



Número	D-5	Referência (BANO et al., 1990)	D-5	Referência (BANO et al., 1990)	D-5
	δ_{H}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}	HMBC
1	-		148,57	148,70	
2	2,11(1H, m)	n.o	32,60	34,42	
3	1,45 (m)	n.o	34,38	32,66	
4	1,37 (m)	n.o	23,28	23,31	
5	-		37,06	37,07	
6	1,75	n.o	31,91	32,63	
7	1,26 (1H)	n.o	29,91	29,95	
8	-		104,84	104,84	
9	-		214,84	214,98	
10	1,81	n.o	28,68	28,70	
11	2,47	n.o	36,22	36,26	
12	-		44,15	44,18	
13	1,76 (1H)	n.o	40,71	40,73	
14	-		84,09	84,10	
15	4,68 (1H, s) 4,85 (1H, s)	4,66 (1H, s) 4,84 (1H, s)	108,35	108,37	
16	0,71 (3H, s)	0,70 (3H, s)	21,51	21,53	C-5, C-14
17	2,63 (1H, m)	2,60 (1H, m)	41,02	41,04	C-9, C-18, C-19
18	1,10 (3H, d, 6,9)	1,09 (3H, d, 6,9)	18,33	18,35	C-9
19	1,12 (3H, d, 7,1)	1,10 (3H, d, 6,9)	18,37	18,38	
20	1,00 (3H, s)	0,99 (3H, s)	22,93	22,95	

n.o. : não observado

ESPECTROS D-5

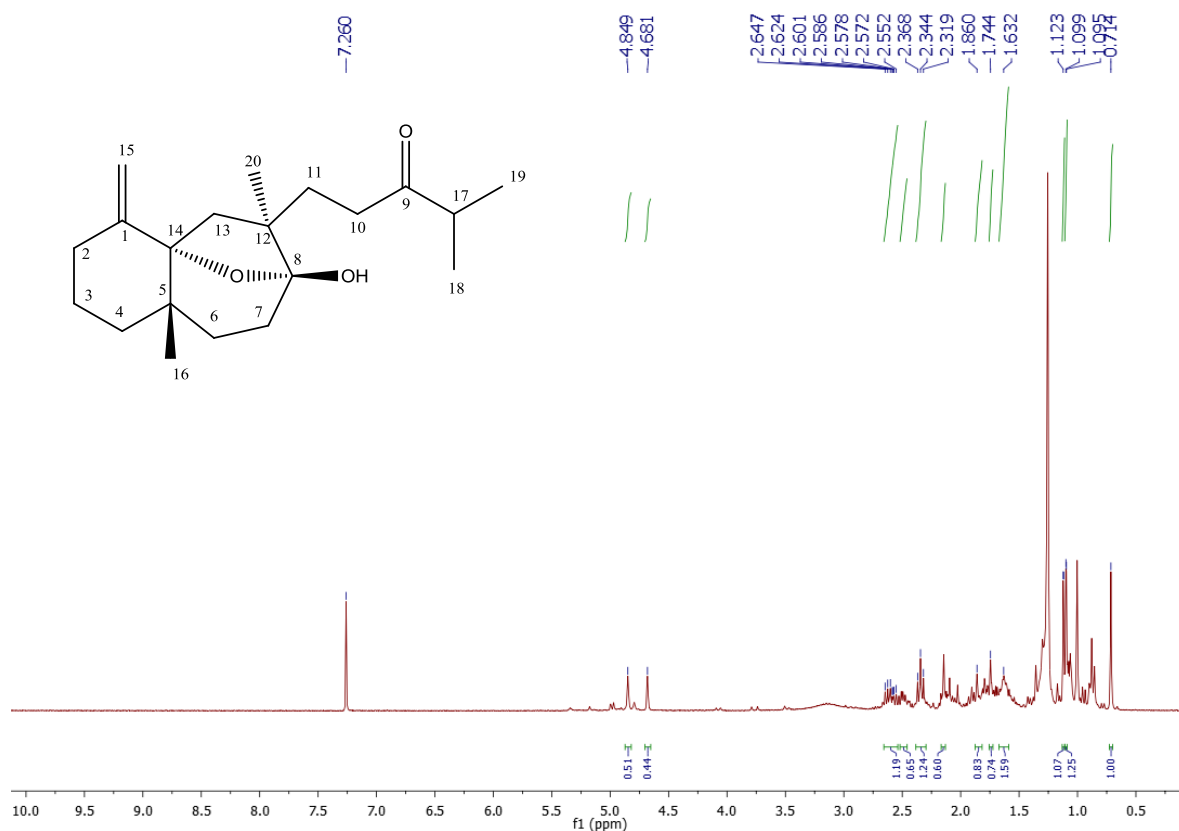


Figura 66. Espectro de RMN ¹H de D-5 (CDCl₃, 300 MHz).

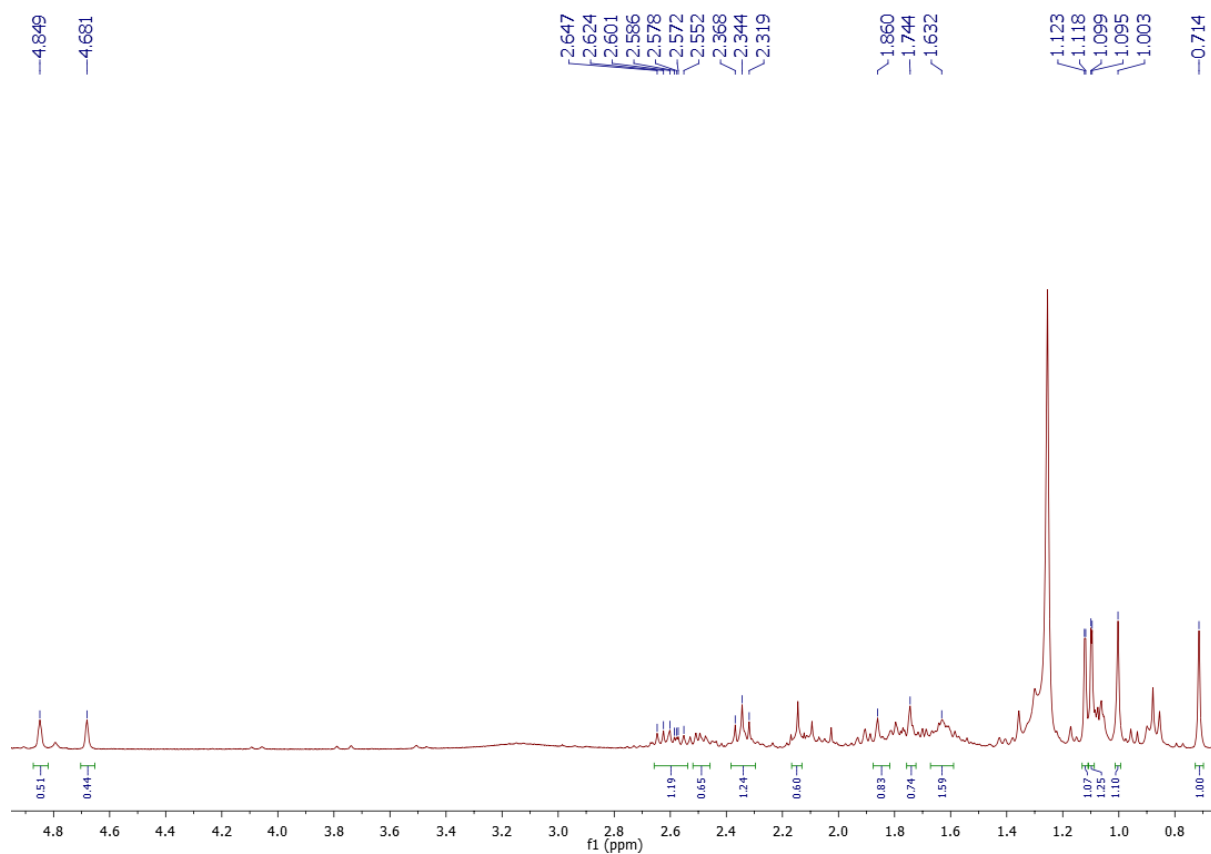


Figura 67. Expansão do espectro de RMN ¹H de D-5 na região entre 5,0 e 0,7 ppm (CDCl₃, 300 MHz).

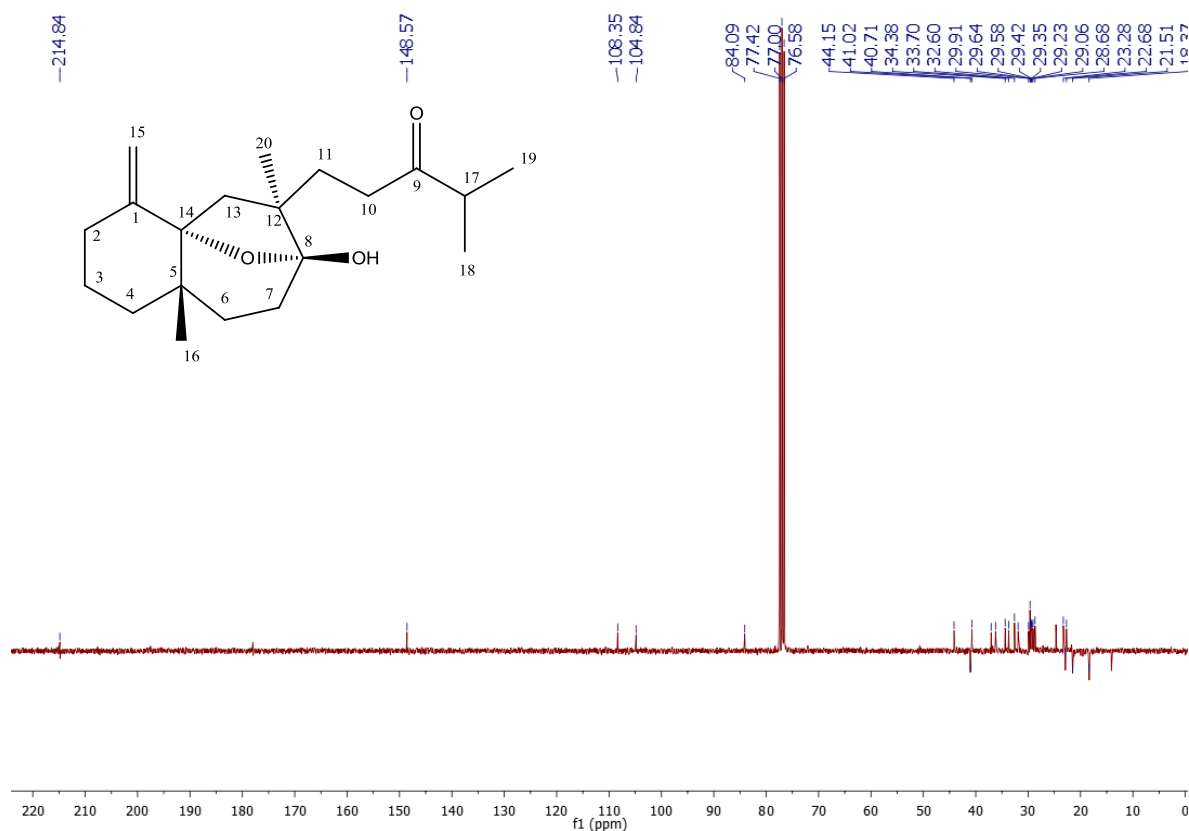


Figura 68. Espectro de RMN ^{13}C de D-5 (CDCl_3 , 75 MHz).

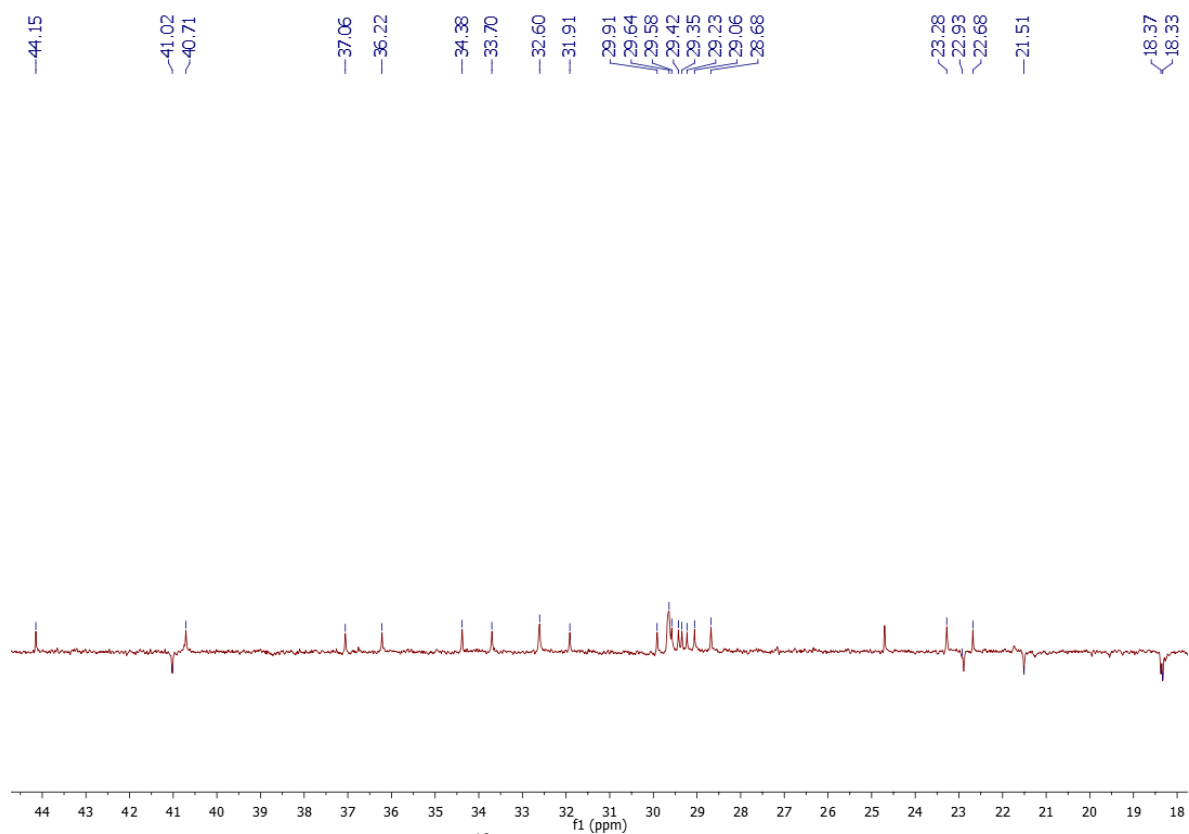


Figura 69. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-5 (CDCl_3 , 75 MHz).

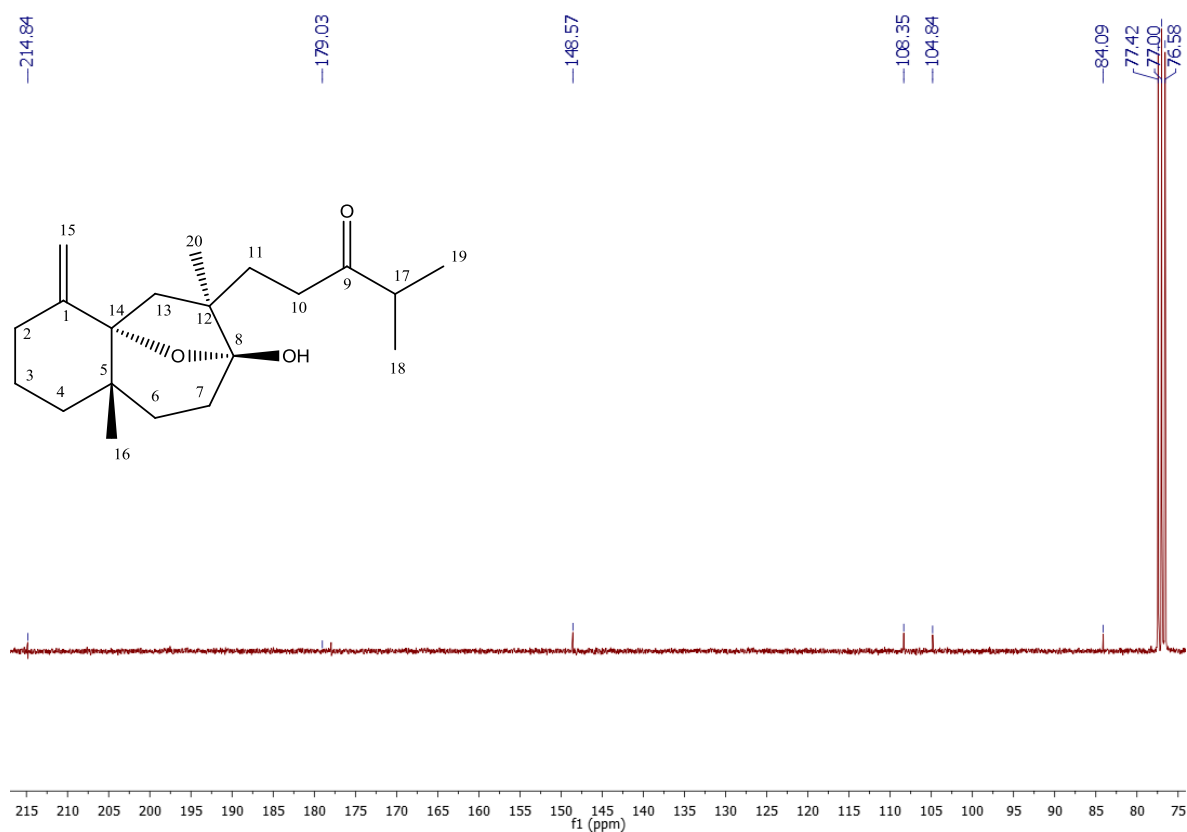


Figura 70. Expansão do espectro de RMN ^{13}C de D-5 na região entre 215 e 77 pm (CDCl_3 , 75 MHz).

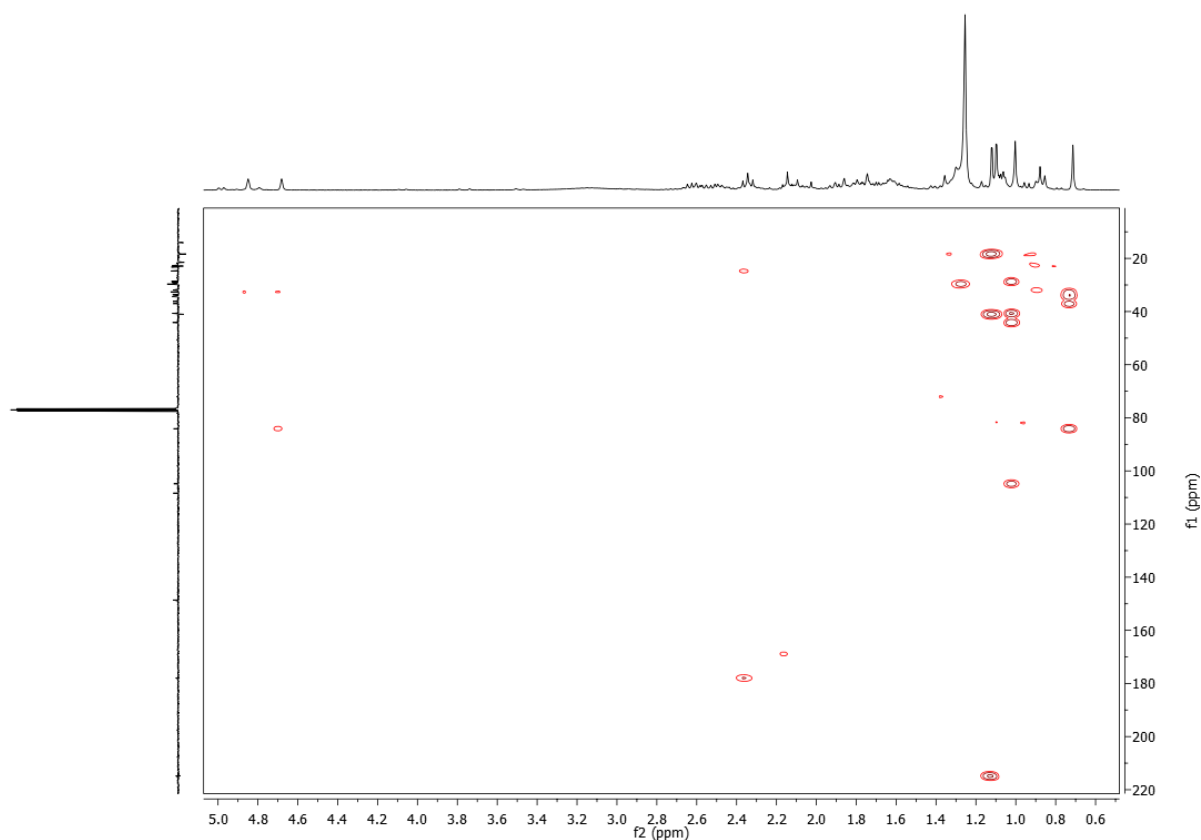


Figura 71. Espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-5 (CDCl_3 , 300 MHz).

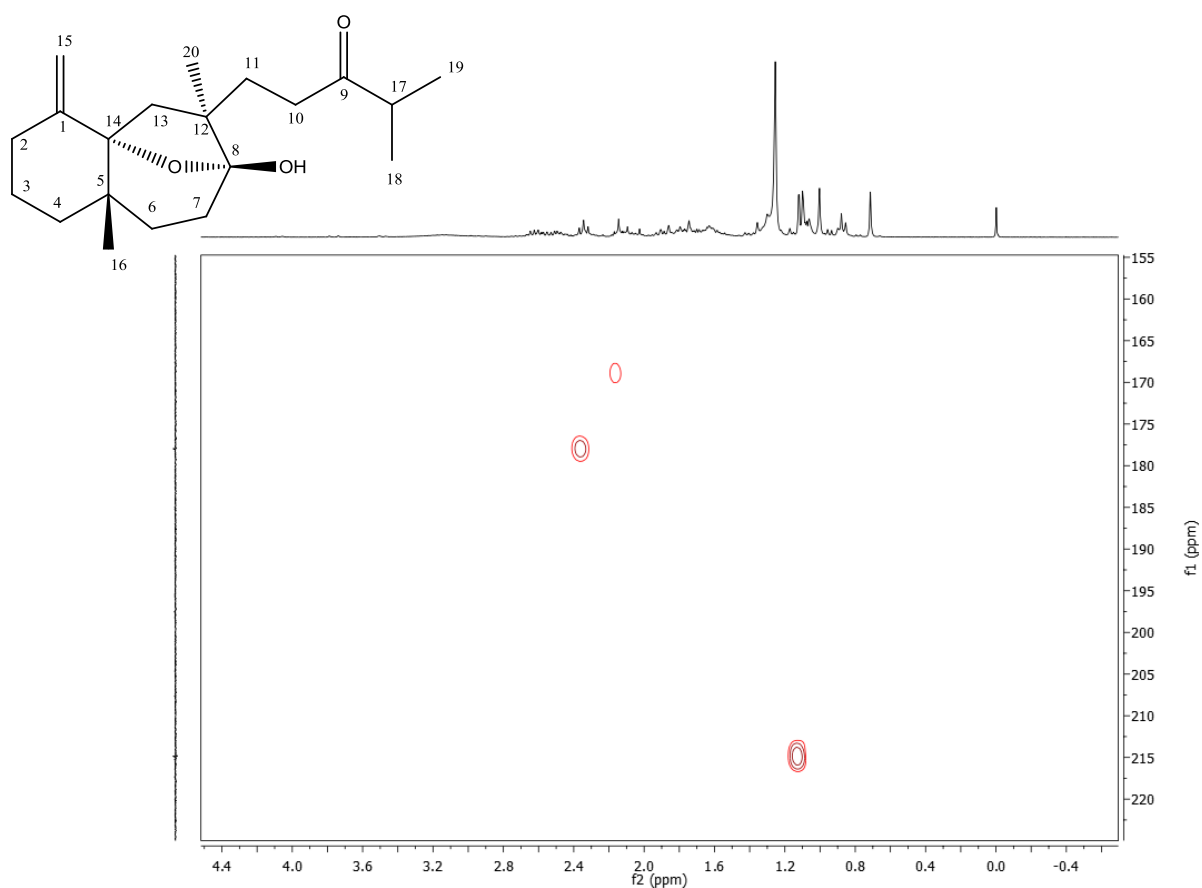


Figura 72. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-5 na região entre 110 e 20 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).

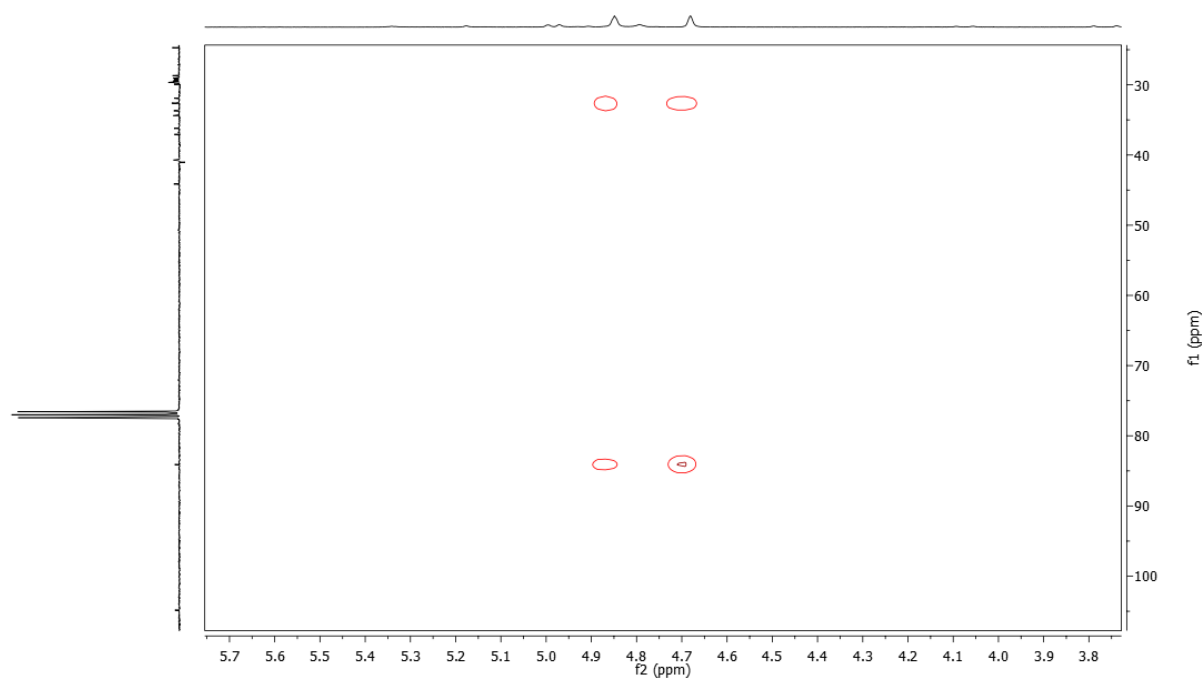


Figura 73. Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HMBC de D-5 na região entre 110 e 17 ppm (CDCl_3 , 300 MHz).

dos diterpenos como marcadores quimiotaxonômicos do gênero, uma vez que não ocorrem em outros gêneros da tribo Dictyoteae.

A análise dos espectros de RMN ^1H da alga coletada na Paraíba (EPB2, Figura 77, p.108) e da alga coletada no Rio de Janeiro (ECC, figura 78, p. 108) mostrou muitas semelhanças, assim como foi visualizado na CCDA realizada com os extratos (Figura 75, p.107).

Para reforçar a hipótese da reclassificação de *D. pulchella* em *C. cervicornis*, os diterpenos isolados da alga pertenceram exclusivamente à classe dos dolastanos e secodolastanos, os marcadores quimiotaxonômicos de *Canistrocarpus*, esclarecendo, assim, nossas dúvidas.

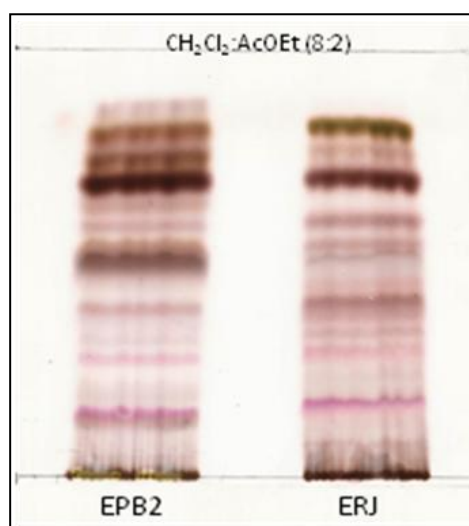


Figura 75: Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) dos extratos brutos de *C. cervicornis* coletada no litoral da Paraíba (EPB2) e *C. cervicornis* coletada no litoral do Rio de Janeiro (ERJ) eluída em diclorometano e acetato de etila (8:2).

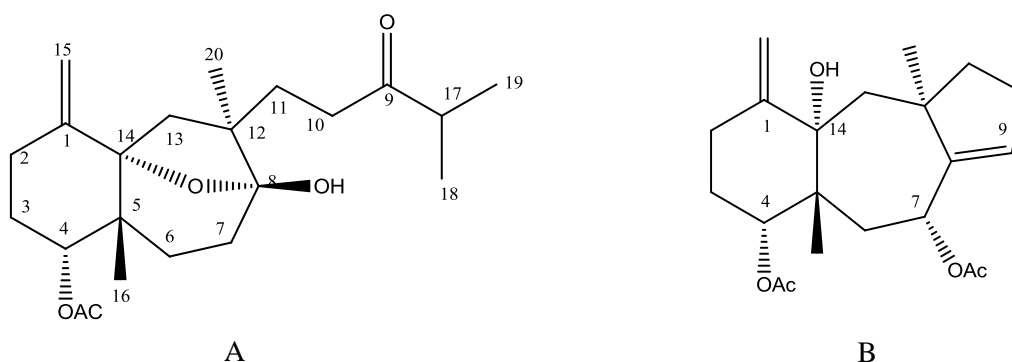


Figura 76. Diterpenos majoritários em *C. cervicornis* coletada no litoral da Paraíba (A) e no litoral do Rio de Janeiro (B).

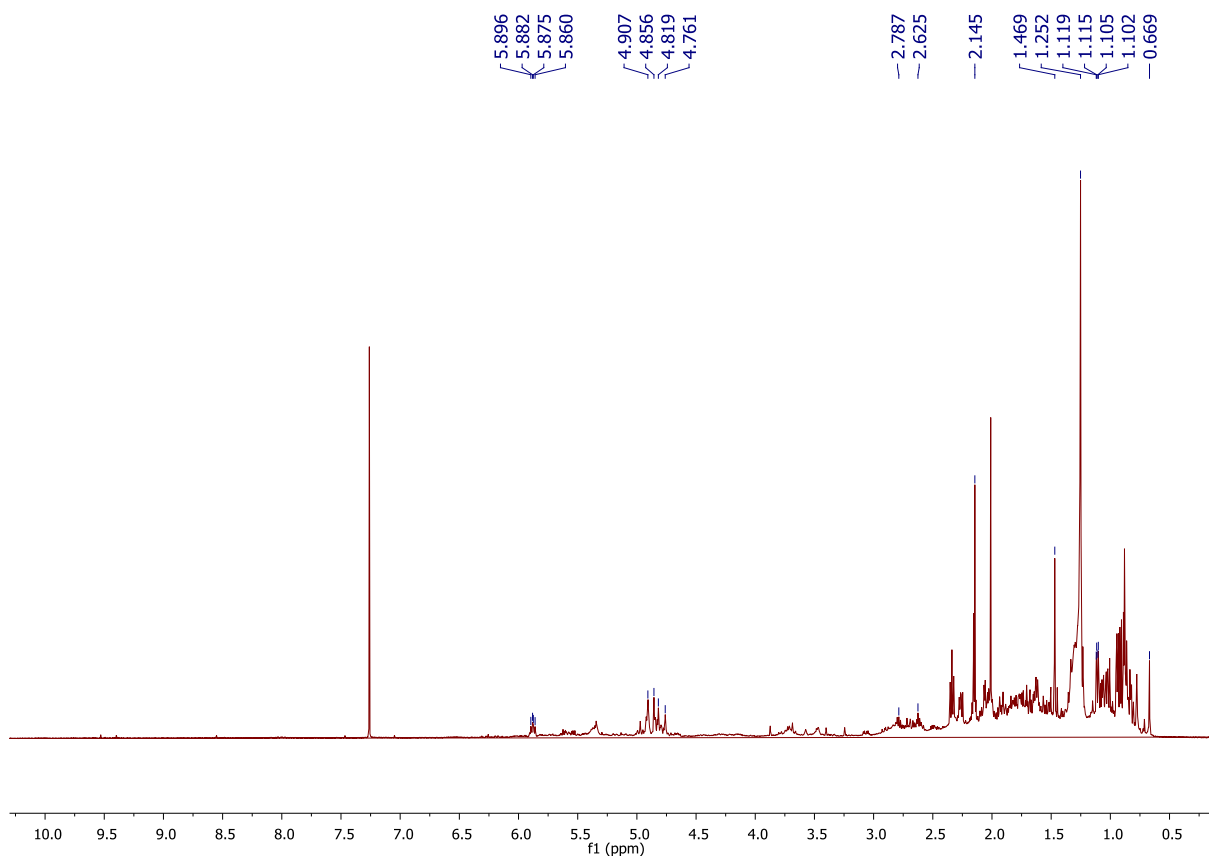


Figura 77. Espectro de RMN ^1H do extrato diclorometano (ECC) de *C. cervicornis* coletada no litoral do Rio de Janeiro (CDCl_3 , 300 MHz).

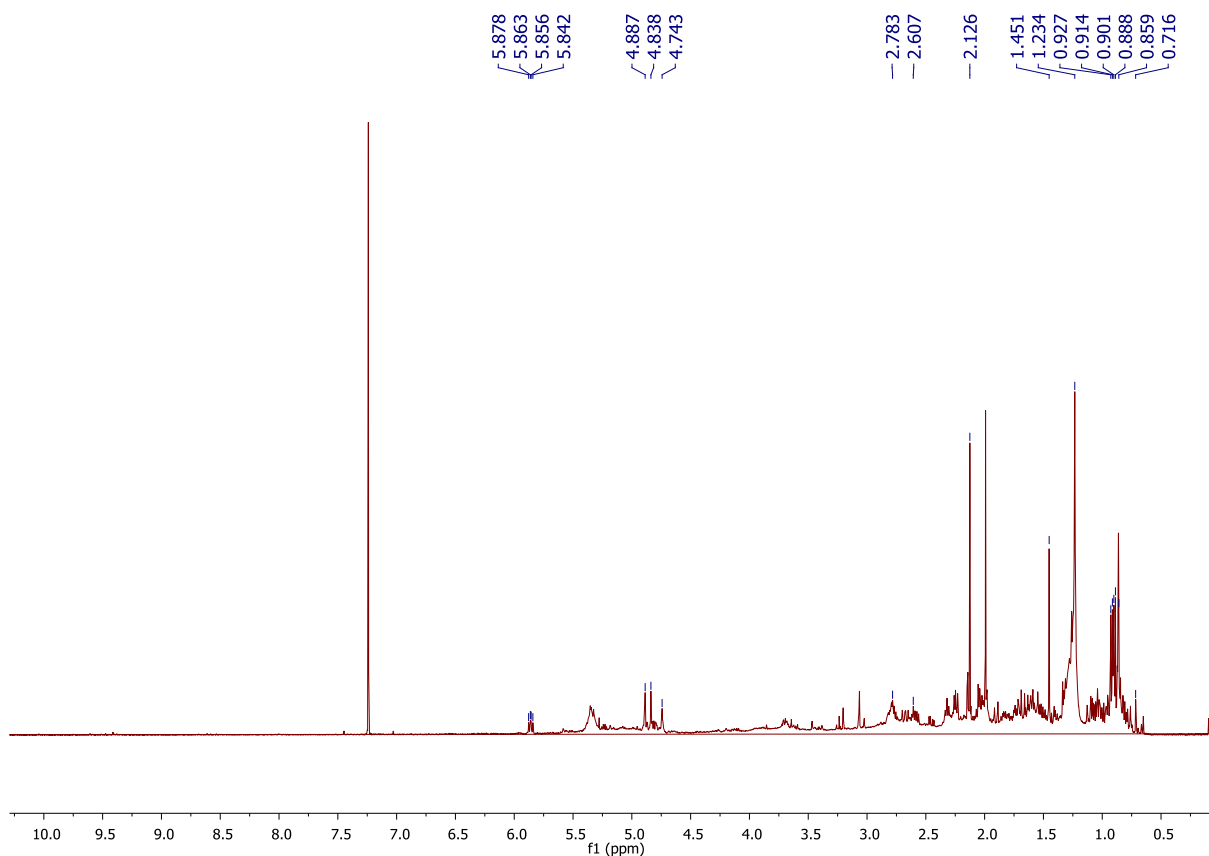


Figura 78. Espectro de RMN ^1H do extrato diclorometano:metanol (2:1) (EPB2) de *C. cervicornis* coletada no litoral da Paraíba (CDCl_3 , 300 MHz).

Conclusão

6 CONCLUSÃO

O estudo fícoquímico de *C. cervicornis* do litoral da Paraíba resultou no isolamento de cinco diterpenos, sendo três do tipo dolastano, D-2 (4-acetoxi-14-hidroxi-dolasta-1(15),7,9-trieno), D-1 (4,7-diacetoxi de dichotenona A) e D-3 (4-desoxi-amijidictol), estes dois últimos inéditos na literatura, e dois secodolastanos, D-4 (acetato de isolinearol) e D-5 (indicol). O gênero *Canistrocarpus* é reconhecido como produtor de diterpenos do tipo dolastano e secodolastano, assim, o isolamento dessas substâncias, aliado a comparação dos extratos entre as algas coletadas na Paraíba e no Rio de Janeiro, reforçou a taxonomia da espécie e demonstrou o valor dos diterpenos dolastano e secodolastano como marcadores quimiotaxonômicos do gênero. A substância D-4 foi disponibilizada para estudos biológicos: testes com *Leishmania amazonensis* (serão realizados pela aluna de mestrado Raphaella Lopes, orientada pela Prof. Dra. Verônica Amaral), testes antivirais com HSV-1 (vírus Herpes simples - serão realizados pela aluna de doutorado Caroline Barros, orientada pelas Profa.Dra. Izabel Paixão e Prof. Dra. Valéria Teixeira) e testes contra veneno de cobra serão realizados no Laboratório de Venenos e Toxinas de Animais e Avaliação de Inibidores coordenado pelo Prof. Dr. André Fully.

Referências

REFERÊNCIAS

- AHMAD, V. U.; PARVEEN, S.; BANO, S.; SHAIKH, W.; SHAMEEL, M. Dolastane diterpenoids from the brown alga *Dictyota indica*. **Phytochemistry**, 30, 1015-1018, 1991.
- ALI, M.S.; PERVEZ, M.K. Seco-dolastanes from the marine brown alga *Dictyota dichotoma* (Huds.) Lamour. **Zeitschrift für Naturforschung**, 58b, 438-442, 2003a.
- ALI, M.S.; PERVEZ, M. K. Ring-A hydroxylated dolastanes from the marine brown alga *Dictyota dichotoma* (Huds.) Lamour. **Natural Product Research**, 17, 281-283, 2003b.
- ALI, M. S.; PERVEZ, M.K.; SALEEM, M.; AHMED, F. Dichotenone-A and -B: two new enones from the marine brown alga *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamour. **Natural Product Research**, 17, 301-306, 2003.
- ALI, M.S.; PERVEZ, M.K.; AHMED, F.; SALEEM, M. Dichotenol-A, B and C: the C-16 oxidized seco-dolastanes from the marine brown alga *Dictyota dichotoma* (Huds.) Lamour. **Natural Product Research**, 18, 543-549, 2004.
- BANO, S.; PARVEEN, S.; AHMAD, U. Marine natural products, XIV.¹ Secodolastane diterpenoids of *Dictyota indica* from the Arabian Sea. **Journal of Natural Products**, 53, 2, 492-495, 1990.
- BERLINCK, R. G.; HAJDU, E.; ROCHA, R. M.; OLIVEIRA, J. H. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, 67, 510-522, 2004.
- BIANCO, M. B.; TEIXEIRA, V. L.; PEREIRA, R.C.; SOUZA, A. M. T.; NUCCI, P.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Brown seaweed defensive chemicals: a structure-activity relationship approach for the marine environment. **Natural Products Report**, 4, 2, 173-178, 2009.
- BONGIORNI, L.; PIETRA, F. Marine natural products for industrial applications. **Chemistry & Industry**, 2, 54-58, 1996.
- BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTEC P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, 27, 2, 165-237, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana de Saúde. Ministério da Ciência e Tecnologia. Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia Marinha do Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 134 p.
- BULA-MEYER, G. Notas sobre *Dictyota pfaffii* y *D. humifusa* (Dictyotales, Phaeophyta). *Anales del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras*, Punta Betin, 23, 177-181, 1994.
- CIRNE-SANTOS, C. C.; SOUZA, T. M.; TEIXEIRA, V. L.; FONTES, C. F. L.; REBELLO, M. A.; CASTELLO-BRANCO, L. R. R.; ABREU, C. M.; TANURI, A.; FRUGULHETTI, I. C. P. P.; BOU-HABIB, D.C. The dolabellane diterpene Dolabelladienetriol is a typical

noncompetitive inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase enzyme
Antiviral research, 77, 1, 64-71, 2008.

CREWS, P.; KLEIN, T.E.; HOGUE, E.R.; MYERS, B.L. Tricyclic diterpenes from the brown algae *Dictyota divaricata* and *Dictyota linearis*. **Journal of Organic Chemistry**, 47, 811-815, 1982.

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

DE-PAULA, J. C; VALLIM, M. A; TEIXEIRA, V. L. What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from Dictyotaceae (Phaeophyceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 21, 2, 216-228, 2011.

DE-PAULA, J. C.; CASSANO, V.; YONESHIGUE-VALENTIM, Y.; TEIXEIRA, V. L. Diterpenes from the brazilian brown alga *Dictyota crispata* (Dictyotaceae, Phaeophyta). **Natural Product Communications**, 2, 135-137, 2007.

DE-PAULA, J. C.; PEDRINI, A.G.; PINHEIRO, M. D.; PEREIRA, R. C.; TEIXEIRA, V.L. Chemical similarity between the brown algae *Dictyota cervicornis* and *D. pardalis* (Dictyotales, Phaeophyta). **Biochemical Systematics and Ecology**, 29, 425–427, 2001.

DOS-SANTOS, A. O.; BRITTA, E. A.; BIANCO, E. V.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. 4-Acetoxydolastane diterpene from the brazilian brown alga *Canistrocarpus cervicornis* as antileishmanial agent. **Marine Drugs**, 9, 2369-2383, 2011.

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

DUNLOP, R.W.; GHISALBERTI, E.L.; JEFFERIES, P.R.; SKELTON, B.W.; WHITE, A.H. Structure of a new dolastane diterpene from *Dictyota furcellata*. **Australian Journal of Chemistry**, 42, 315-319, 1989.

ENOKI, N.; FURUSAKI, K.; SUEMIRO, R. I.; MATSUMOTO, T. **Tetrahedron Letters**, 24, 4341, 1983.

FIGUEIREDO, C. S. Diterpenos dolastanos de *Dictyota pulchella* Hörnig & Schnetter (Dictyotaceae, Phaeophyceae), 149 p. Dissertação .Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

FINER, J.; CLARDY, J.; FENICAL, W.; MINALE, L.; RICCIO, R.; BATTAILE, J.; KIRKUP, M.; MOORE, R. E. **Journal of Organic Chemistry**, 44, 2044, 1979.

GONZÁLES, A.G.; MARTÍN, J.D.; NORTE, M.; RIVERA, P.; PERALES, A.; FAYOS, J. Structure and absolute configurations of *Dictyota* sp. diterpenes. **Tetrahedron**, 39, 20, 3355-3357, 1983.

HAY, M.E.; DUFFY, J. E.; FENICAL, W.; GUSTAFSON, K. Chemical defense in the seaweed *Dictyopteris delicatula*: Differential effects against reef fishes and amphipods. **Marine Ecology Progress Series**, 48, 185-192, 1988.

HIRSCHFELD, D. R.; FENICAL, W.; LIN, G. M. Y.; WING, R. M.; RADLICK, P.; SIMS, J. J. **Journal of the American Chemical Society**, 95, 4049, 1973.

HU, G-P.; YUAN, J.; SUN, L.; SHE, Z-G.; WU, J-H.; LAN, X-J.; ZHU, X.; LIN, Y-C.; CHEN, S-P. Statistical Research on Marine Natural Products Based on Data Obtained between 1985 and 2008. **Marine Drugs**, 9, 4, 514-525, 2011.

IRELAND, C.; FAULKNER, D. J. Diterpenes from *Dolabella californica*. **Journal of Organic Chemistry**, 42, 3157-3162, 1977.

KASMMAN, Y; GROWEISS, A. **Journal of Organic Chemistry**, 45, 3814, 1980.

KELECOM, A.; TEIXEIRA, V. L. Dolastane diterpenes from the marine brown alga *Dictyota cervicornis*. **Phytochemistry**, 27, 2907-2909, 1988.

LEI, J.; ZHOU, J. A marine natural products database. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, 42, 742-748, 2002.

LITTLER, D. S.; LITTLER, M. M. *Caribbean reef plants. An identification guide to the reef plants of the Caribbean, Bahamas, Florida and Gulf of Mexico*, Washington, Offshore Graphics, 1-542, 2000.

MENEZES-SILVA, S. M. P. Potencial antibacteriano e modulador de resistência a drogas de extratos e constituintes de algas marinhas, 79 p. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2013. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; acesso dia 10 de setembro de 2013.

OCHI, M.; WATANABE, M.; MIURA, I.; TANIGUCHI, M.; TOKOROYAMA, T. Amijol, isoamijiol, and 14-deoxyamijiol, three new diterpenoids from the brown seaweed *Dictyota linearis*. **Chemistry Letters**, 1229-1232, 1980a.

OCHI M, WATANABE M, KIDO M, ICHIKAWA Y, MIURA I, TOKOROYAMA T. Amijidietylol, a new diterpenoid from the brown seaweed *Dictyota linearis*: X-ray crystal and molecular structure. **Chemistry Letters**, 1233-1234, 1980b.

OCHI M, MIURA I, TOKOROYAMA T. Structure of linearol, a novel diterpenoid from the brown seaweed *Dictyota linearis*. **Journal of Chemical Society, Chemical Communications**, 100, 1981.

OCHI M, ASAO K, KOTSUKI H, MIURA I, SHIBATA K. Amijitrienol and 14-Deoxyisoamijiol, two new diterpenoids from the brown seaweed *Dictyota linearis*. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, 59, 661-662, 1986.

OLIVEIRA, A. S. Variação qualitativa e quantitativa e ação defensiva de metabólitos secundários em macroalgas marinhas do gênero *Dictyota* Lamouroux (Phaeophyta, Dictyotales), 92p. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Biologia Marinha)-Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2006.

OVENDEN, S. P. B; JONATHAN L. NIELSON, J. L.; LIPROT, C. H.; WILLIS, R. H.; TAPIOLAS, D. M.; WRIGHT, A. D.; MOTTI, C. A. Update of Spectroscopic Data for 4-Hydroxydictyolactone and Dictyol E Isolated from a *Halimeda stuposa* — *Dictyota* sp. Assemblage. **Molecules**, 17, 2929-2938, 2012.

PAUL, V. J.; CRUZ-RIVEIRA, E.; THACKER, R. W. Chemical mediation of macroalgal-herbivore interactions: ecological and evolutionary perspectives. In: J. B. McClintock and B. J. Baker, Eds. *Marine Chemical Ecology*, Boca Raton: CPC Press, 227-265, 2001.

PAUL, V. J.; VAN ALSTYNE, K. L. Use of ingested algal diterpenoids by *Elysia halimeda* Macnae (Opisthobranchia, Ascoglossa) as antipredator defenses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 119, 1, 15-29, 1988.

PEREIRA, R. C.; CAVALCANTI, D. N.; TEIXEIRA, V.L. Effects of secondary metabolites from the tropical Brazilian brown alga *Dictyota menstrualis* on the amphipod *Parhyale hawaiiensis*. **Marine Ecology Progress Series**, 205, 95-100, 2000.

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

PETTIT, G. R.; ODE, R. H.; HERALD, R. B.; VON DREELE; MICHEL, C. J. **Journal of the American Chemical Society**, 98, 4677, 1976.

QUEIROZ, T. M.; 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. Vasorelaxation, Induced by *Dictyota pulchella* (Dictyotaceae), a Brown Alga, Is Mediated via Inhibition of Calcium Influx in Rats. **Marine Drugs**, 9, 2075-2088, 2011.

RAGAN, M.A.; GLOMBITZA, K. W. Plorotannins, brown algal polyphenols. **Progress in Phycological Research**, 4, 129-241, 1986.

REVIERS, B.; ROUSSEAU, F; DRAISMA, S.G.A. Classification of the Phaeophyceae from past to present and current challenges. In: BRODIE, J; LEWIS, J (Ed). *Unravelling the algae, the past, present and future of algae molecular systematic*. Systematics Association Special Volumes. New York: CRC Press, 75, 265-282, 2007.

- SOUZA, T. M. L.; DE SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, V. F.; CANUTO, C. V. B. S.; MARQUES, I. P.; FONTES, C. F. L.; FRUGULHETTI, I. C. P. P. Inhibition of HSV-1 replication and HSV DNA polymerase by the chloroquinolinic ribonucleoside 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-(β -D-ribofuranosyl) quinoline-3-carboxylic acid and its aglycone. *Antiviral Research*, 77,1, 20-27, 2008.
- SOLÉ, M. A.; FOLDATS, E. El género Dictyota (Phaeophyceae, Dictyotales) en el Caribe Venezolano. *Acta Botánica Venezuelica*, 26, 1, 41-82, 2003.
- STEINBERG, P. D. *Ecological Monographs*, 55,333, 1985.
- SUN, H. H.; FENICAL, W. *Journal of Organic Chemistry*, 44, 1354, 1979.
- SUN, H.H.; MCCONNELL, O. J.; FENICAL, W.; HIROTSU, K.; CLARDY, J. Tricyclic diterpenoids of the dolastane ring system from the marine alga *Dictyota divaricata*. *Tetrahedron*, 37, 1237-1242, 1981.
- TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas bentônicas. *Revista Virtual de Química*, 5, 3, 343-362, 2013.
- TEIXEIRA, V. L.; ALMEIDA, S. A. S.; KELECOM, A. Chemosystematic and biogeographic studies of the diterpenes from the marine brown alga *Dictyota dichotoma*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 18, 2/3, 87-92, 1990.
- TEIXEIRA, V. L.; KELECOM, A.; GOTTLIEB, O. T. Produtos naturais de algas marinhas. *Química Nova*, 14, 2, 83-90, 1991.
- TEIXEIRA, V. L.; KELECOM, A. A chemotaxonomic study of diterpenes from marine brown algae of the genus *Dictyota*. *The Science of the Total Environment*, 75, 271-283, 1988.
- TEIXEIRA, V. L.; KELECOM, A. Geographic distribution of the diterpenes from the marine brown alga *Dictyota Lamouroux* (Dictyotales, Phaeophyta). *Neritica*, Pontal do Sul, PR, 2, 179-200, 1987.
- TEIXEIRA, V.L.; TOMASSINI, T.; FLEURY, B. G.; KELECOM, A. Dolastane and secodolastane diterpenes from the marine brown alga *Dictyota cervicornis*. *Journal of Natural Products*, 49, 570-575, 1986.
- TEIXEIRA, V.L.; TOMASSINI, T.; KELECOM, A. Cervicol, a further secodolastane diterpene from the marine brown alga *Dictyota cervicornis* Kützinger (Phaeophyceae, Dictyotaceae). *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges*, 95, 263-268, 1986.
- TEIXEIRA, V. L.; TOMASSINI, T.; KELECOM, A.; Produtos naturais de organismos marinhos: uma revisão sobre os diterpenos da alga *Dictyota* sp. *Química Nova*. 8, 302-313, 1985.
- VALLIM, M. A.; DE PAULA, J. C.; PEREIRA, R. C.; TEIXEIRA, V. L. The diterpenes from Dictyotacean marine brown alga in the Tropical Atlantic region. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 1-16, 2005.

VANDERAH, D. J.; STEUDLER, P. A.; CIERESZKO, L. S.; SCHMITZ, F. J.; EKSTRAND, J. D.; VAN DER HELM, D. Marine Natural Products. Xenicin: a Diterpenoid Possessing a Nine-Membered Ring from the Soft Coral, *Xenia elongata*. **Journal of the American Chemical Society**, 99, 5780, 1977.

VIDOTTI, E. C.; ROLEMBERG, M. C E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química Nova**, 27,1, 139-145, 2004.

WYNNE, M. J. A check-list of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: **Nova Hedwigia Beihefte**, 129, 1-152, 2005.

WYNNE, M.J. The benthic marine algae of the tropical and subtropical Western Atlantic: changes in our understanding in the last half century. **Algae**, 26, 2, 109-140, 2011.

WYSOR, B.; DE CLERCK, O. An updated and annotated list of marine brown algae (Phaeophyceae) of the caribbean coast of the Republic of Panama. **Botanica Marina**, 46, 2, 151-160, 2003.