



Universidade Federal Fluminense

Departamento de Biologia Marinha

Programa de Pós-graduação em Biologia Marinha

**A química de *Plocamium brasiliense* (Greville) Howe &
Taylor: abordagens sistemáticas e ecológicas**

Marcelo Augusto Vasconcelos Gomes

MARCELO AUGUSTO VASCONCELOS GOMES

**A química de *Plocamium brasiliense* (Greville) Howe & Taylor: abordagens
sistemáticas e ecológicas**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Biologia Marinha da Universidade
Federal Fluminense, como requisito parcial para a
obtenção do Grau de Mestre em Biologia Marinha.**

Orientador: Prof.^a Dr.^a Valéria Laneuville Teixeira

Co-Orientador: Prof. Dr. Renato Crespo Pereira

Niterói
Fevereiro/2007

G 633 Gomes, Marcelo Augusto Vasconcelos

A química de *Plocamium brasilense* (Greville) Howe & Taylor: abordagens sistemáticas e ecológicas/ Marcelo Augusto Vasconcelos Gomes.—Niterói : [s.n], 2007. 95f. : il.

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Biologia Marinha. Universidade Federal Fluminense, 2007.

1. Alga vermelha (*Plocamium brasiliense*) 2. Monoterpenos halogenados. 3. Alga marinha-Ecologia-Cabo Frio (RJ). 4. Alga vermelha - Análise química. I. Título.

CDD 589.41

MARCELO AUGUSTO VASCONCELOS GOMES

A química de *Plocamium brasiliense*(Greville) Howe & Taylor: abordagens sistemáticas e ecológicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de

DATA DE APROVAÇÃO

27 / 02 / 2007

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Maria Tereza Menezes Széchy
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Prof.^a. Dr.^a. Mutue Toyota Fujii
Instituto de Botânica de São Paulo

Prof.^a Dr.^a Valéria Laneuville Teixeira – Orientador (a)
Universidade Federal Fluminense (UFF)

Prof.^a. Dr.^a. Diana Negrão Cavalcanti
FIOCRUZ
(Suplente)

AGRADECIMENTOS

Como não poderia ser diferente, em primeiro lugar agradeço a meus pais Augusto César Miñan Gomes e Rosiléia Vasconcelos Gomes por sempre estarem ao meu lado, me incentivando e me apoiando. Não poderia deixar de ser grato, pelo suporte que sempre me foi dado.

Aos meus orientadores Prof^a. Dr^a. Valéria Laneuville Teixeira e Prof. Dr. Renato Crespo Pereira por mais uma vez me aceitarem como aluno e permitir que desenvolva-se esse projeto. Obrigado pela paciência e pela atenção principalmente em meus momentos de dúvida.

A Prof^a Dr^a. Claudia de Moraes Resende (IQ-UFRJ) por viabilizar a realização das análises por CG/EM e a Dr^a. Diana Negrão Cavalcanti pela realização das mesmas e por todo auxílio com minhas dúvidas.

A nossa querida secretária Eunice, por sempre me atender de forma solícita mesmo que estivesse atolada de trabalho. Não posso deixar de agradecer também ao maravilhoso cafézinho de todos os dias.

A um grande “parceiro” que fiz durante essa jornada, Ecidine Barbosa que mesmo sem ser sua, obrigação participou comigo das atividades de campo. Obrigado por toda ajuda na coleta de “*Procani*”, nas coletas de ouriço ou quando tínhamos que passar pelos perrengues de pegar água.

A Aline Santos de Oliveira, a adorável Baianinha, grande companheira de todas as horas, seja pra cerva, sushis ou apenas uma boa conversa ao som de Tool. Obrigado por toda ajuda desde as coletas, aos experimentos com acontecimentos bizarros e inexplicáveis e pela paciência durante minha T. P. D. Não posso deixar de agradecer principalmente pelas revisões em meu texto. Seus conselhos foram sempre muito sábios e úteis.

A Éverson Miguel Bianco, pela companhia as inúmeras idas ao Sunsaki e pela ajuda nas colunas. Tudo bem que até começarmos a coluna discutíamos sem limites, mas não é que deu certo.

A Frederico Sobrinho da Silva por me deixar *invadir* sua casa e por me ajudar nas revisões finais.

A Joel Campos de Paula pela revisão final da introdução, justamente naquele momento em que não se enxerga mais nada.

A Yasmin Appelhans pela ajuda na redação do abstract já nos momentos finais.

A toda equipe do laboratório de Produtos Naturais Marinhos e Ecologia Química Marinha, por tornarem nosso laboratório um local de trabalho prazeroso e agradável por toda ajuda prestada ao desenvolvimento deste trabalho.

A turma de mestrado de 2005 pelos momentos divertidos durante as aulas. Em especial, a Wagner Fortes e Thiago Mendes.

A minha grande grande família, aos meus inúmeros tios e primos pelos momentos agradáveis e divertidos de convívio principalmente, no Chapadão.

Ao meu grande amigo irmão gêmeo Cabelinho (Marcelo Lago), pelo ótimos momentos. Valeu por me impregnar seriamente para sair, tomar umas cervas e jogar “só uma” partidinha de sinuca. *Irmãos gêmeos ativar!*

A equipe de chacoteiros de plantão : Ricardo Gomes, Luciana Gomes, Marcella Miranda, Simone Pennafirme, Roberto Filho, Carol Nikita, Frederico Sobrinho, Thaís Floreal, Kiko, Aline Nunes, Renata Bastos, Cabelinho, Baianinha, Bruno, Felipe Cabeça, Aline Areal, Tico, Tiago Porto. Valeu pelos ótimos momentos de descontração! Nossas festas e viagens foram ótimas!

Aos queridos “afórmicos”, Marcio Felix, Felipe Gomes, Aline Areal e Tico Bolpetti. A experiência musical do Aforma é indescritível e inspiradora. Sem ritmo não haveria vida. *Hoje brilha o sol em mim... obrigado!*

Ao *Cósmico*, por toda benção que me foi concedida e por toda que ainda será. *Assim seja!*

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| LISTA DE FIGURAS..... | VII |
| LISTA DE TABELAS..... | X |
| 1. INTRODUÇÃO | |
| 1.1. Produtos Naturais Marinhos Halogenados..... | 1 |
| 1.2. Considerações sobre a Química de Produtos Naturais de <i>Plocamium</i>..... | 3 |
| 1.3. Considerações sobre a espécie <i>Plocamium brasiliense</i>..... | 18 |
| 2. OBJETIVOS | |
| 2.1. Objetivos gerais..... | 20 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 20 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | |
| 3.1. Coleta das Macroalgas..... | 21 |
| 3.2. Caracterização dos locais de coleta | |
| Enseada do Forno..... | 23 |
| Praia Rasa..... | 24 |
| 3.3. Elaboração da tabela de substância..... | 25 |
| 3.4 Procedimentos Experimentais | |
| Obtenção dos extratos brutos..... | 25 |
| Análise em cromatografia em camada delgada (CCD)..... | 25 |

| | |
|--|----|
| Análise em ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H)..... | 25 |
| Análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM)... | 26 |
| Fracionamento do extrato bruto..... | 26 |
| Ensaio biológico..... | 27 |
| Coleta dos consumidores | |
| Coleta do ouriço-do-mar <i>Lytechinus variegatus</i> | 27 |
| Coleta de <i>Acanthonyx scutiformis</i> | 28 |
| Preparação dos alimentos artificiais..... | 29 |
| Desenho experimental..... | 31 |
| Análise estatística dos resultados..... | 32 |
| | |
| 4. RESULTADOS | |
| Monoterpenos halogenados do gênero <i>Plocamium</i> | 33 |
| Análise química dos extratos de <i>P. brasiliense</i> | 58 |
| Defesas químicas de <i>P. brasiliense</i> | 71 |
| | |
| 5. DISCUSSÃO | 74 |
| | |
| 6. CONCLUSÕES | 82 |
| | |
| 7. REFERÊNCIAS | |
| BIBLIOGRÁFICAS | 83 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Monoterpenos isolados de <i>P.cartilagineum</i> | 4 |
| Figura 2. Monoterpenos isolados de populações de <i>P. violaceum</i> de Monterey Bay California..... | 8 |
| Figura 3. Proposta taxonômica para as populações de <i>P. violaceum</i> em Monterey Bay, Califórnia (EUA)..... | 10 |
| Figura 4. Monoterpenos cíclicos encontrados em espécimes de <i>P. cartilagineum</i> de populações da costa chilena..... | 11 |
| Figura 5. Proposta de agrupamento quimiotaxonomico proposto por Rovirosa et al. (1988) para populações de <i>P. cartilagineum</i> da costa chilena..... | 13 |
| Figura 6. Variação química entre populações de <i>P. hamatum</i> coletadas ao longo da Grande Barreira de Recifes de Corais (Austrália)..... | 15 |
| Figura 7. Localização geográfica dos pontos de coleta (a partir do mapa do Brasil modificado de http://www.ib.usp.br/algamare-br e o mapa da região de Búzios modificado de Souza,1995)..... | 22 |
| Figura 8. Enseada do Forno..... | 23 |
| Figura 9. Praia Rasa..... | 24 |
| Figura 10. Ouriço-do-mar <i>Lytechinus variegatus</i> | 27 |
| Figura 11. <i>Acanthonyx scutiformis</i> associado a tufos de <i>P. brasiliense</i> | 28 |
| Figura 12. Preparação do alimento artificial para o bioensaio com <i>L. variegatus</i> , onde (A) mostra a forma utilizada para preparação do alimento e (B) estrutura com as duas opções de alimento (com tratamento e sem tratamento) utilizada no bioensaio..... | 30 |

| | |
|---|----|
| Figura 13. Preparação do alimento artificial para ensaio com <i>A. scutiformis</i> | 30 |
| Figura 14. Bioensaio com <i>L. variegatus</i> | 31 |
| Figura 15. Aquários utilizados no bioensaio com <i>A. scutiformis</i> | 32 |
| Figura 16. Regiões biogeográficas estabelecidas por Luning, 1990, onde as regiões na qual ocorreram os estudos sobre a química de produtos naturais do gênero <i>Plocamium</i> encontram-se marcadas de vermelho (modificado de Luning, 1990)..... | 57 |
| Figura 17. Análise comparativa em CCD dos extratos brutos das populações..... | 59 |
| Figura 18. Espectro de RMN ¹ H do extrato bruto de <i>P. brasiliense</i> da Enseada do Forno..... | 60 |
| Figura 19. Espectro de RMN ¹ H do extrato bruto de <i>P. brasiliense</i> da Praia Rasa..... | 61 |
| Figura 20. Cromatograma (CG/EM) do extrato bruto da Enseada do Forno..... | 62 |
| Figura 21. Cromatograma (CG/EM) do extrato bruto da Praia Rasa..... | 63 |
| Figura 22. Representação gráfica da abundância relativa dos principais grupos de substâncias encontradas nos extratos brutos das populações das duas praias..... | 65 |
| Figura 23. Fluxograma representativo do primeiro fracionamento do extrato bruto da Praia Rasa..... | 66 |
| Figura 24. Fluxograma representativo do segundo fracionamento do extrato bruto da Praia Rasa..... | 69 |

| | |
|--|----|
| Figura 25. Consumo médio dos alimentos artificiais por <i>L. variegatus</i> (%) nos bioensaios. X+DP, Teste de Wilcoxon $\alpha = 00,5$ | 71 |
| Figura 26. Consumo médio dos alimentos artificiais por <i>A. scutiformis</i> (%) nos bioensaios. X+DP, Teste de Wilcoxon $\alpha = 00,5$ | 72 |
| Figura 27. Consumo médio dos alimentos artificiais por <i>L. variegatus</i> (%) nos bioensaios. X+DP, Teste de Wilcoxon $\alpha = 00,5$ | 73 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela I. Variações quantitativas observadas em diferentes estádios de vida em <i>P. violaceum</i> | 8 |
| Tabela II. Variação quantitativa (%) na composição de monoterpenos entre os estádios de vida de duas populações de <i>P. carilagineum</i> | 12 |
| Tabela III. Variação na produção de três monoterpenos* (1×10^{-7} g/100g de peso seco) em <i>P. cartilagineum</i> sob condições diferenciadas de iluminação (PDF) e temperatura..... | 16 |
| Tabela IV. Relação entre as substâncias conhecidas, as espécies produtoras e os respectivos locais de coleta..... | 33 |
| Tabela V. Relação entre a massa de alga extraída e a massa de extrato bruto obtida..... | 58 |
| Tabela VI. Relação entre as substâncias presentes no extrato bruto de <i>P. brasiliense</i> da Enseada do Forno, seus tempos de retenção e suas proporções relativas (onde Tr = tempo de retenção, A= área do pico no cromatograma, CR = composição relativa)..... | 64 |
| Tabela VII. Relação entre as substâncias presentes no extrato bruto de <i>P. brasiliense</i> da Praia Rasa, seus tempos de retenção e suas proporções relativas (onde Tr = tempo de retenção, A= área do pico no cromatograma, CR = composição relativa)..... | 64 |

RESUMO

Macroalgas vermelhas se caracterizam pela produção de metabolitos halogenados pertencentes a diversas classes químicas, desde hidrocarbonetos de baixo peso molecular ($C_3 - C_7$), cetonas simples, fenóis, acetogeninas e terpenos. Algas do gênero *Plocamium* se destacam pela produção de monoterpenos polihalogenados cíclicos e acíclicos, sendo relatadas variações geográficas marcantes na produção destas substâncias. Os monoterpenos halogenados têm se mostrado efetivos como marcadores populacionais e, em um contexto ecológico são potenciais mediadores de interações ecológicas no ambiente marinho. No Brasil, a espécie *Plocamium brasiliense* (Greville) Howe & Taylor distribui-se desde o Estado do Espírito Santo até o Rio Grande do Sul. Em face da carência de informações sobre a química de produtos naturais de *P. brasiliense*, este estudo propõe a caracterização química da espécie e, em um contexto ecológico, a investigação da atividade defensiva de seus monoterpenos frente a consumidores. No presente trabalho foram realizadas análises qualitativas e quantitativas nos extratos brutos de *P. brasiliense* coletadas na Praia Rasa e na Enseada do Forno, Armação de Búzios (RJ). Para a identificação dos metabolitos secundários foram utilizadas as técnicas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN 1H) e Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG/EM). Ensaios biológicos, com alimentos artificiais onde foram incorporados os extratos, foram utilizados para a avaliação da presença de defesas químicas nas populações estudadas. Além disso, através de revisão bibliográfica foi possível elaborar uma tabela com os monoterpenos halogenados descritos para o gênero *Plocamium*. Os extratos brutos das populações estudadas apresentaram similaridade em seus constituintes, no entanto, variações quantitativas puderam ser detectadas. Foi possível isolar o monoterpeno pentaclorado (1) e o monoterpeno oregoneno A descritos para *P. cartilagineum*, e identificar o monoterpeno 2 descrito para *P. cartilagineum*. Estes resultados indicam similaridades químicas entre *P. brasiliense* e *P. cartilagineum*. Além destes foi possível identificar os monoterpenos inéditos (3) e (5), sendo o último majoritário nos extratos das populações estudadas e o monoterpeno previamente descrito (4). Do ponto de vista biogeográfico estes são os primeiros relatos da ocorrência destas substâncias no Atlântico Sul. Através dos bioensaios foi possível demonstrar que *P. brasiliense* possui defesas químicas contra consumidores e que o monoterpeno pentaclorado (1) é uma das substâncias ativas no extrato.

ABSTRACT

Red algae are known to produce halogenated metabolites including terpenes, acetogenins, ketones, phenolic compounds and low molecular weight hydrocarbons (C₃ – C₇). *Plocamium* species produce a variety of polyhalogenated cyclic and acyclic monoterpenes, with significant geographical variation. *Plocamium* polyhalogenated monoterpenes seem to be effective as populational markers and potential mediators of ecological interactions in the marine environment. *Plocamium brasiliense* (Greville) Howe & Taylor can be found in Brazil, from Espírito Santo state to Rio Grande do Sul state and no information about its monoterpenes is available. In this work, the chemistry of *P. brasiliense* monoterpenes was characterized and the effectiveness as a chemical defense against consumers was assessed. Two crude extracts of closely related populations of *P. brasiliense* from Rio de Janeiro (Praia Rasa and Enseada do Forno) were investigated. Secondary metabolites were identified by Thin Layer Chromatography (TLC), Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen (¹H NMR) and Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS) techniques. A table was made with the halogenated monoterpenes known for *Plocamium*. The crude extracts were similar in quality but quantitative differences could be detected. It was possible to isolate the acyclic pentachlorinated monoterpene (1) and oregonene A previously described for *P. cartilagineum*. Additionally the previously unreported acyclic polyhalogenated monoterpenes (3) and (5) were identified, with (5) being the major part in both crude extracts and the previously reported acyclic monoterpene (4). These are the first reported occurrences of halogenated monoterpenes in the South Atlantic. The bioassays show that *P. brasiliense* monoterpenes could act as chemical defenses against consumers and the acyclic pentachlorinated monoterpene (1) is an active substance.

1. Introdução

1.1. Produtos Naturais Marinhos Halogenados

Os oceanos são o resultado de uma gigantesca reação ácido-base, onde os ácidos que afloram do interior da Terra reagem com as bases que estão sendo liberadas constantemente das rochas. Suas águas são comparadas a um meio de cultura de composição quase constante desde sua origem, o que é verdadeiro para a quase totalidade de seus parâmetros (Carvalho & Roque, 2000). Estima-se que uma amostra de 1000g de água do mar contém, em média, aproximadamente 35g de substâncias dissolvidas (Soares-Gomes, 2002).

O material dissolvido nos oceanos é composto, em sua maioria, por sais inorgânicos presentes em sua forma iônica. Dentre os íons dissolvidos encontram-se altas concentrações de halogênios como cloretos (19mg/L), brometos (65mg/L) e iodetos (0,06mg/L). Uma vez que a vida surgiu e evoluiu nos oceanos, não é surpreendente encontrarmos organismos que tenham desenvolvido mecanismos de assimilação e incorporação de halogênios em substâncias orgânicas (Faulkner, 1975).

Enquanto raras no ambiente terrestre, substâncias halogenadas são comuns no ambiente marinho e podem ser encontradas em diversos grupos de organismos como esponjas, moluscos, macroalgas, bactérias e entre grupos de vermes marinhos. A incorporação de halogênios à moléculas orgânicas por estes organismos está associada a presença de enzimas especializadas, as haloperoxidases, sendo, possivelmente, as bromoperoxidases as mais comuns, uma vez que substâncias contendo bromo são encontradas com maior frequência em relação aquelas com outros halogênios (Kladi *et al.* 2004).

As substâncias halogenadas fazem parte dos produtos naturais ou metabolitos secundários (especiais ou complementares) e podem pertencer as mais diversas classes de substâncias orgânicas. A denominação metabolito secundário refere-se ao fato de que estas substâncias não estão envolvidas nas funções básicas do ser vivo, ou seja, não fazem parte dos processos primários de sobrevivência (Teixeira, 2002).

Dentre os organismos marinhos produtores destas substâncias deve-se dar destaque às algas vermelhas (Divisão Rhodophyta), capazes de sintetizar metabolitos halogenados pertencentes a diversas classes químicas, desde hidrocarbonetos de baixo peso molecular ($C_3 - C_7$), cetonas simples, fenóis, acetogeninas e terpenos (Faulkner, 1975; Carvalho & Roque, 2000; Kladi et al., 2004). Dentre as algas vermelhas, merece destaque o gênero *Laurencia* Lamouroux por sintetizar uma enorme variedade de terpenos (sesquiterpenos C_{15} , diterpenos C_{20} e triterpenos C_{30}) e acetogeninas, sendo considerado um dos gêneros mais ricos em produção de metabolitos secundários (Faulkner, 2001, Teixeira, 2002, Blunt et al. 2003).

A compreensão do papel que as substâncias halogenadas podem desempenhar no ambiente marinho foi alvo de intensa investigação científica, uma vez que este conhecimento gera subsídios para o entendimento dos sistemas naturais (Teixeira, 2002). A produção destas substâncias é geralmente relatada como parte de uma estratégia evolutiva que contribuiu para o sucesso dos organismos que as produzem, sendo elas ativas como defesa contra microrganismos, consumidores, competidores e epibiontes, dentre outras funções (ver Kladi et al. 2004, para revisões).

Apesar de exibirem uma grande diversidade estrutural, os produtos naturais halogenados de algas vermelhas exibem uma relativa homogeneidade de distribuição entre os componentes de um táxon, sendo apontadas como potenciais marcadores taxômicos,

filogenéticos e biogeográficos (Teixeira, 2002). Por exemplo, Fenical e Norris (1975), após analisarem a composição de substâncias halogenadas de três populações de *Laurencia pacifica* Kylin do Golfo da Califórnia, e constatarem que as mesmas eram qualitativamente heterogêneas, propuseram que mais de uma espécie foi classificada sob este nome. Da mesma forma, para Masuda e Suzuki (1997), o triterpenóide halogenado callicladol, constituinte majoritário de populações de *L. calliclada* Masuda do Vietnã, seria um bom marcador taxonômico para esta espécie, uma vez que não foi observado em outras espécies de *Laurencia*.

1.2. Considerações sobre a Química de Produtos Naturais de *Plocamium*

O gênero *Plocamium* J.V. Lamouroux é descrito como sendo característico de clima temperado a frio, podendo algumas poucas espécies, como *P. hamatum* J. Agardh e *P. brasiliense* (Greville) Howe & Taylor, ocorrerem em áreas tropicais. Os indivíduos são geralmente pequenos, podendo algumas espécies atingir 50cm de comprimento, com talos lineares e aplainados e com ramificações simpodiais. Cerca de 89 espécies foram descritas para o gênero, das quais apenas 40 são usualmente reconhecidas (Algaebase, 2006).

Plocamium constitui um gênero rico e interessante para a investigação de substâncias provenientes do metabolismo secundário. Estas algas são caracterizadas pela produção de monoterpenos polihalogenados cíclicos e acíclicos, apresentando um surpreendente grau de halogenação, incomum para moléculas contendo apenas dez átomos de carbono (Diaz-Marrero et al., 2002b). Vários estudos fícoquímicos foram realizados, abrangendo populações dos Oceanos Pacífico norte e sul, Índico, Antártico e Atlântico norte, sendo conhecidas cerca de 105 substâncias (ver Kladi et al., 2004 para revisões).

Para as populações de *Plocamium* da costa da Califórnia foi constatada uma grande diversidade de monoterpenos e uma grande variabilidade de metabolitos entre as populações estudadas. Em trabalho pioneiro, Mynderse e Faulkner (1975) caracterizaram a química de produtos naturais de espécimes de uma população de *P. cartilagineum* (Linnaeus) P.S. Dixon coletados no sublitoral (0,2 a 1,0m) de Bird Rock, La Jolla, Califórnia (Figura 1). A riqueza de substâncias isoladas e sua possível transformação química durante os procedimentos de laboratório, levaram a suspeita de que o método empregado nas análises (Cromatografia a gás) poderia estar gerando artefatos de manipulação.

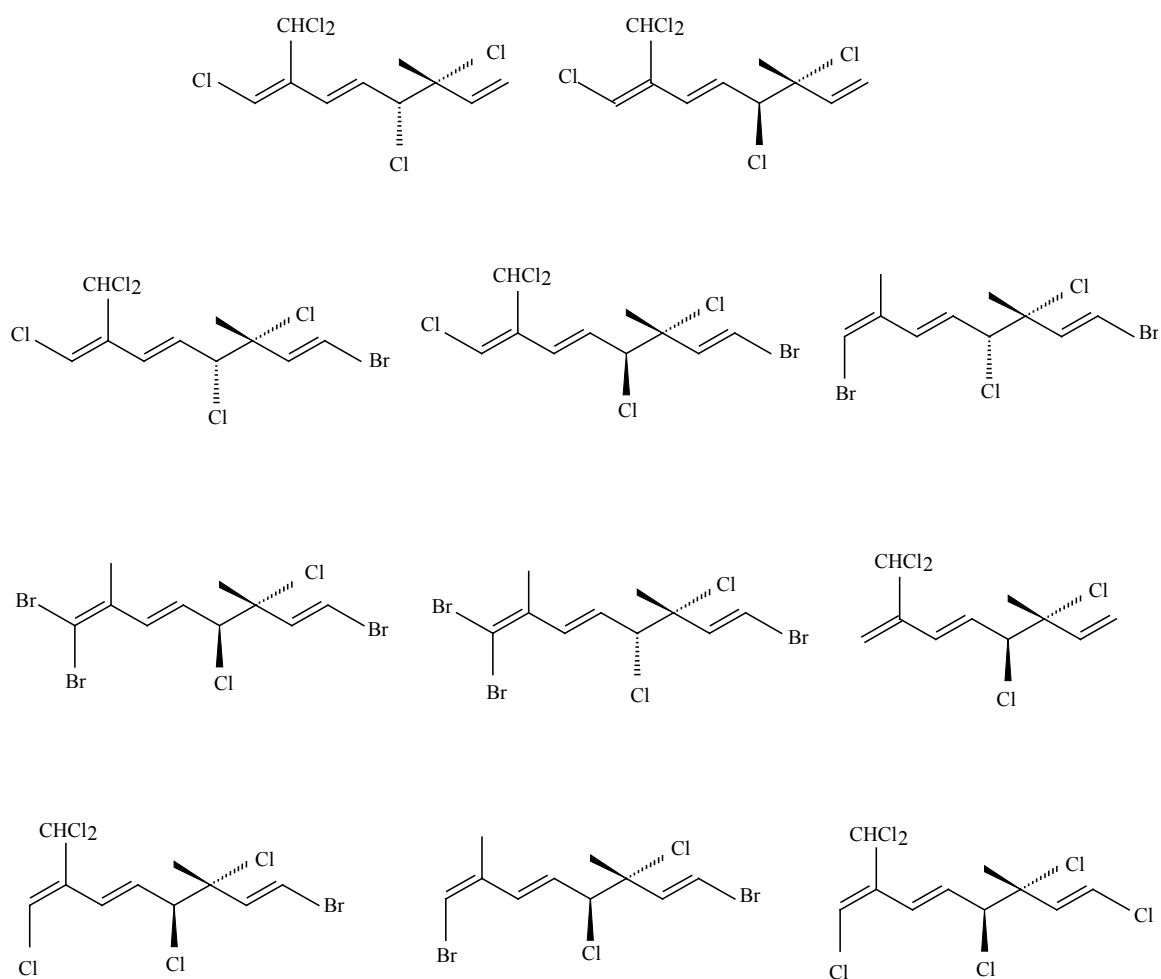


Figura 1. Monoterpenos isolados de *P. cartilagineum* (Mynderse e Faulkner, 1975).

Antes de considerar possíveis causas da variabilidade química descrita para as populações de *P. cartilagineum* e *P. violaceum* Farlow, Mynderse e Faulkner (1978) testaram os diferentes métodos de extração para eliminar a hipótese de formação de artefatos.

As algas foram, então, divididas em três grupos e processadas de formas distintas:

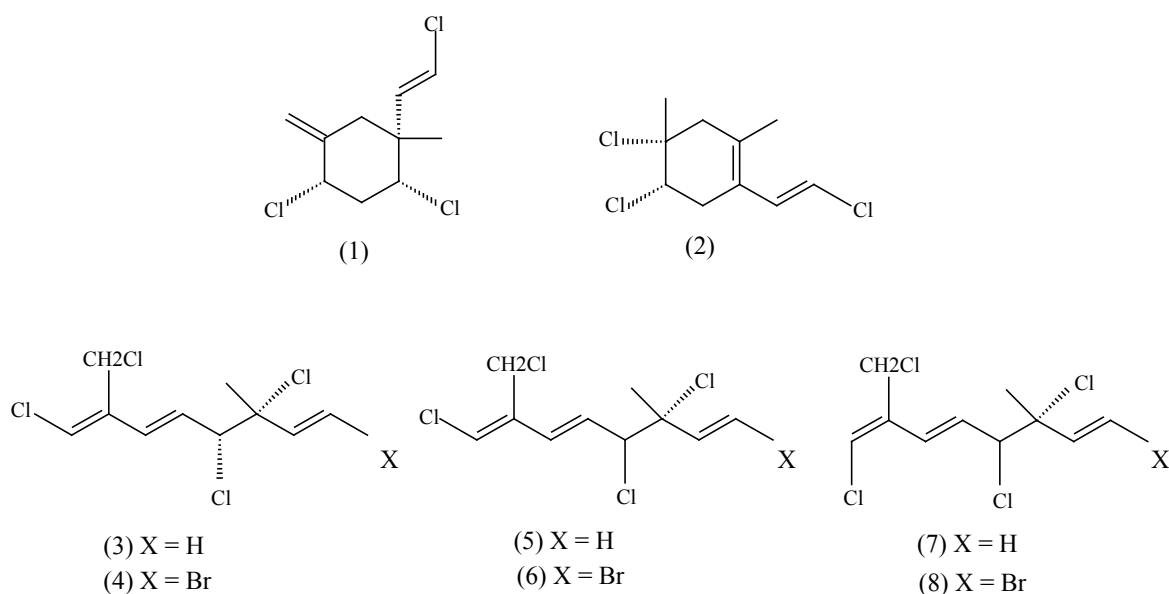
1. Extração a partir de algas úmidas com hexano em atmosfera de N₂ (baixa pressão e temperatura). Tal procedimento poderia evitar ou reduzir a desidro-halogenação, que é autocatalítica;
2. Extração a partir de algas úmidas com uma mistura de CHCl₃/MeOH (1:1);
3. Extração a partir de algas secas com Et₂O (100%).

Os três extratos de *P. cartilagineum* e *P. violaceum*, quando analisados em CG/MS, possuíam o mesmo padrão qualitativo e quantitativo das substâncias anteriormente isoladas.

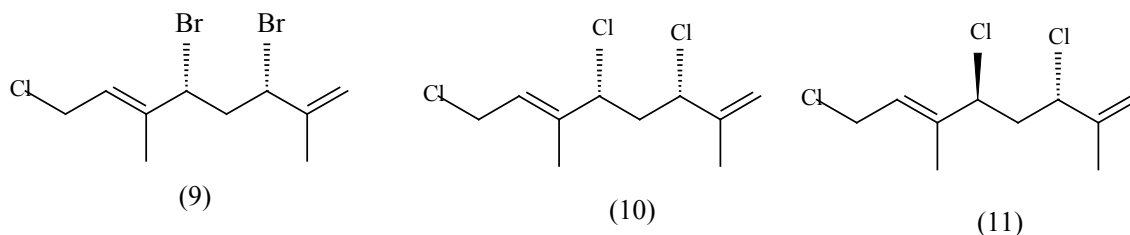
Uma vez descartada a hipótese de geração de artefatos durante os procedimentos de extração, Mynderse e Faulkner (1978) analisaram os extratos das algas em vários períodos, de setembro de 1974 a março de 1975, indivíduo por indivíduo, ressaltando que cada exemplar foi diagnosticado pelo taxonomista.

Os espécimes de *P. violaceum* (28 indivíduos) e *P. cartilagineum* (21 indivíduos) foram analisados e nenhuma evidência quanto a variações sazonais na composição de monoterpenos foi observada. No entanto, o padrão de distribuição individual dos monoterpenos se mostrou variável. O monotерpo cíclico violaceno (1) se caracterizou como substância majoritária de *P. violaceum* e as substâncias (2) e (3) entre as mais abundantes. A análise química detalhada dos indivíduos de *P. cartilagineum* revelou a ocorrência de

três isômeros de fórmula molecular $C_{10}H_{11}Cl_5$ (4, 5, 6) e três isômeros de fórmula molecular $C_{10}H_{10}BrCl_5$ (7, 8, 9) que se distribuíam de forma diferencial nos indivíduos analisados. Segundo os autores, estas observações sugeriam que as diferenças observadas entre os indivíduos podem estar relacionadas a variações em processos enzimáticos individuais (Mynderse e Faulkner, 1978).



Crews & Kho-Wiseman (1977) descreveram uma grande diversidade e variabilidade química para populações de *P. violaceum* da Califórnia. Nesse estudo, os extratos brutos das populações de Point Joe, Pescadero Point e Asilomar Beach (Monterey Bay, California) foram comparados através de CG/MS, revelando padrões diferenciados de substâncias. As algas coletadas em Point Joe possuíam como produto majoritário o monoterpene 1-cloro-4,6-dibromo-3,7-dimetil-2,7-octadieno (9) enquanto as populações de Pescadero Point e Asilomar Beach apresentavam como produtos majoritários os isômeros 1,4,6-tricloro-3,7-dimetil-2,7-octadieno (10,11).



Segundo Crews *et al.* (1977) a variabilidade química observada entre populações de *P. violaceum* (Figura 2) poderia estar relacionada ao estágio de vida que se encontrava os indivíduos ou a variações sazonais. Para testar esta hipótese foram realizadas coletas de espécimes de *P. violaceum* morfologicamente similares em seis populações na Baía Monterey, sendo Pigeon Point, Danverport Landing, Bonny Doon e Four Mile Beach localizadas ao norte e Point Joe e Pescadero Point localizadas ao sul da baía. Foram realizadas coletas periódicas ao longo de um ano em Point Joe (sul) e Pigeon Point (norte) para acompanhamento de uma possível variação sazonal. Para testar a hipótese de variações químicas entre os estádios de vida, foram feitas análises separando os indivíduos em tetrasporófitos, gametófitos femininos e estéreis. Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram não haver variações químicas qualitativas sazonais, nem entre os estádios de vida, ou seja, as populações apresentavam um mesmo padrão qualitativo de produção de substâncias, independente da época do ano e do estágio de vida. No entanto, deve ser destacado que uma variação quantitativa, considerada pelo autor como não significativa foi observada entre as fases do ciclo de vida.

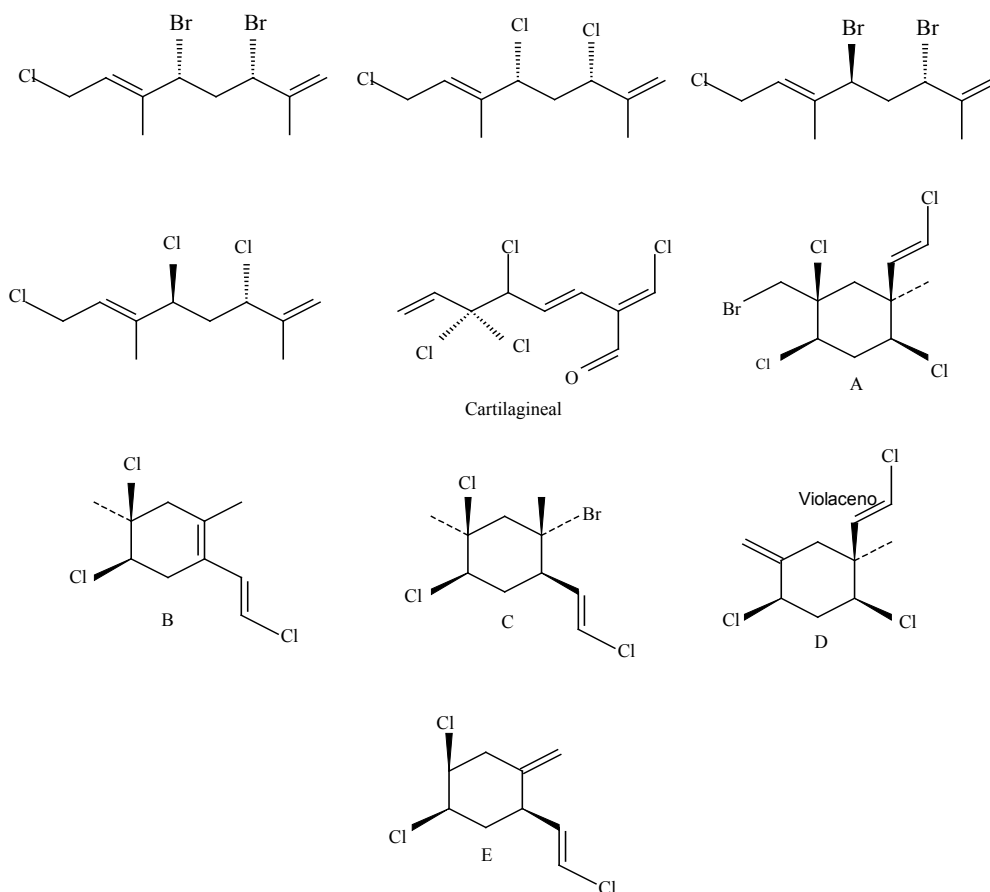


Figura 2. Monoterpenos isolados de populações de *P. violaceum* de Monterey Bay, Califórnia (Crew *et al.* 1977).

Tabela 1. Variações quantitativas observadas em diferentes estádios de vida em *P. violaceum* onde os valores apresentados se encontram em porcentagem (Crews *et al.* 1977).

| Monoterpenos observados ** | | | | | |
|----------------------------|------|------|------|-----|-----|
| Fases do ciclo | A | B | C | D | E |
| tetrasporófito | 17,1 | 59,2 | 16,4 | 3,2 | 4,2 |
| gametófito feminino | 26,3 | 42,1 | 17,6 | 8,7 | 5,3 |
| estéril | 17,3 | 54,2 | 21 | 3,1 | 4,2 |
| sem separação | 26,1 | 42,1 | 21,5 | 5,6 | 4,8 |

** A estrutura molecular das substâncias A-E estão na Figura 2

Levando em consideração a análise em CG/MS dos extratos brutos das populações de *P. violaceum*, foi possível observar uma variação qualitativa dos monoterpenos entre as populações do norte e do sul da baía, podendo ser separadas em dois grupos taxonômicos. Utilizando proposta de classificação utilizada em estudos de botânica terrestre, as populações do norte (Pigeon Point, Danverport Landing, Bonny Doon e Four Mile Beach), caracterizadas pela produção de monoterpenos cíclicos, foram classificadas como quimiotipo α , enquanto as populações do sul (Point Joe e Pescadero Point) caracterizando-se pela produção de monoterpenos alicíclicos, foram classificadas como quimiotipo β (Figura 3). Essas observações constituíram a primeira abordagem quimiotaxonômica dos monoterpenos halogenados de *Plocamium* como ferramenta para classificação de populações homomórficas (Crews et al., 1977).

Faulkner (1977) alertou que, assim como foram identificados dois quimiotipos entre populações de *P. violaceum*, uma revisão cuidadosa dos monoterpenos isolados de populações de *P. cartilagineum* de La Jolla, Califórnia, pode revelar a ocorrência de no mínimo três quimiotipos nesta região.

A ocorrência de quimiotipos entre populações de *P. cartilagineum* também foi observada em uma escala geográfica mais ampla. Como descrito por Higgs et al. (1977), populações de *P. cartilagineum* coletadas em Bembridge, Wisle of Wight (Inglaterra) diferem qualitativamente das populações de La Jolla. Enquanto as populações de La Jolla se caracterizaram principalmente pela síntese de monoterpenos acíclicos, a população de Bembridge caracterizou-se pela produção de monoterpenos alicíclicos, entre eles o violaceno e plocameno B (Figura 2). O autor ressaltou a similaridade química entre esta população e as populações de *P. violaceum* encontradas no norte da Baía Monterey.

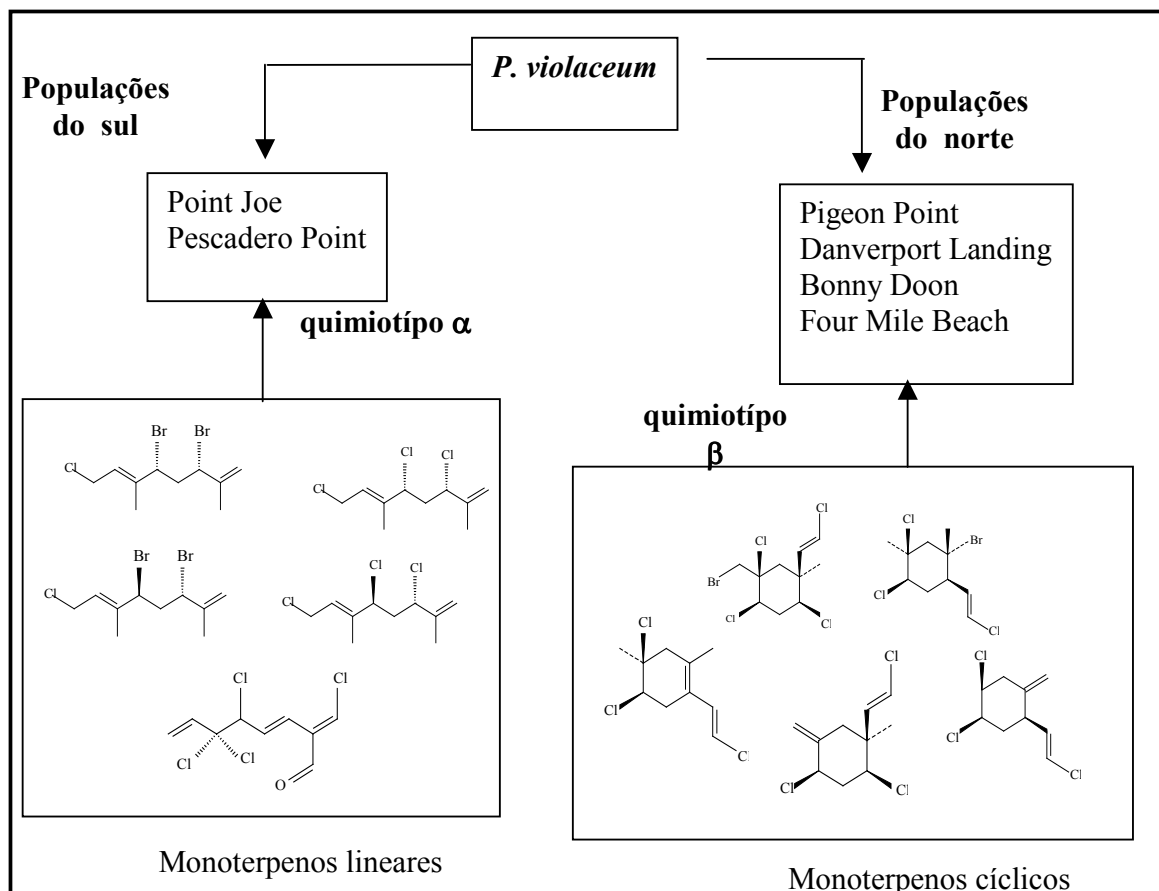


Figura 3. Proposta taxonômica para as populações de *P. violaceum* em Monterey Bay, Califórnia (EUA) (Crews et al. 1977).

San-Martin & Roviroso (1986) analisaram a composição de monoterpenos de espécimes de populações de *P. cartilagineum* coletados em regiões geográficas distintas ao longo da costa central do Chile. Os autores buscavam identificar quimiotipos similares aos observados em populações de *P. violaceum* e *P. cartilagineum* da Califórnia. Com o intuito de caracterizar os monoterpenos e possíveis variações químicas, os autores analisaram os extratos utilizando as técnicas de CG e de RMN ^1H de indivíduos de *P. cartilagineum* de seis populações coletadas em La Herradura (IV Região), Montemar, El Tabo (V Região), La Boca, Punta de Perros (VI Região) e Chiloé (X Região), abrangendo uma área de

160km. As análises espectroscópicas revelaram somente a presença de monoterpenos cíclicos e possibilitou a divisão das populações em dois grupos. O primeiro grupo, formado pelas populações de La Boca e Punta de Perro, indistinguíveis morfologicamente entre si, possuía apenas monoterpenos clorados; no segundo grupo, formado pelas populações de El Tabo, Montemar e La Herradura, foram encontrados somente monoterpenos clorados e bromados (Figura 4).

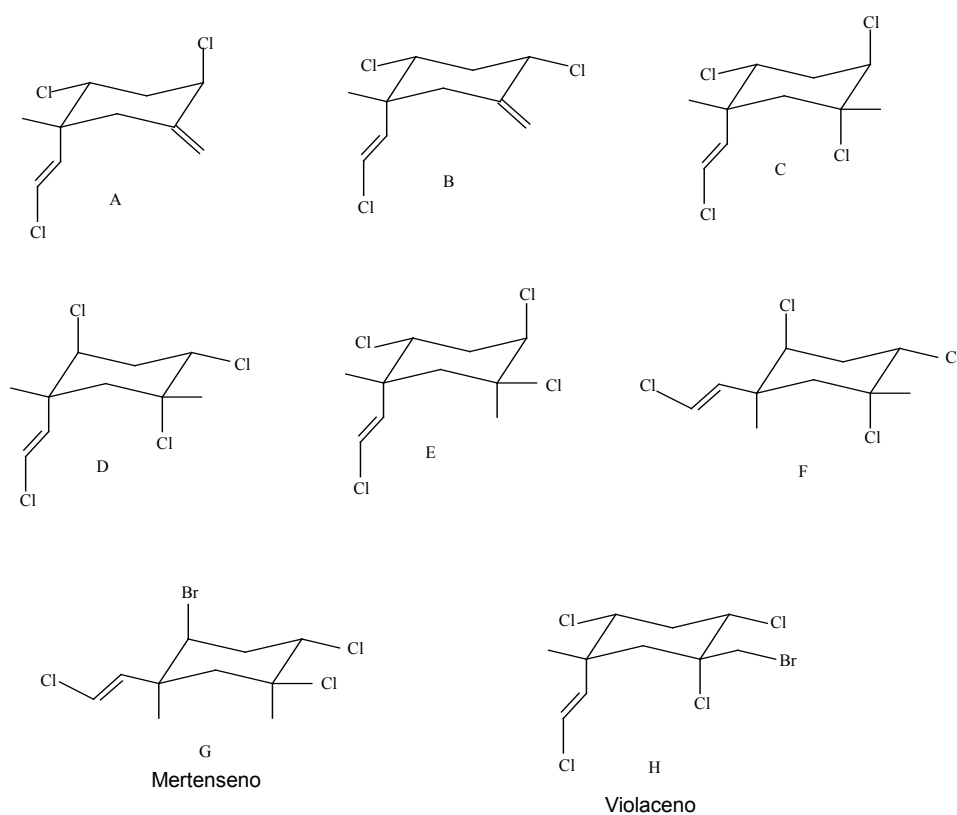


Figura 4: Monoterpenos cíclicos encontrados em espécimes de *P. cartilagineum* de populações da costa chilena (San-Martin & Rovirosa, 1986) .

Prosseguindo com os estudos sobre os produtos naturais de *P. cartilagineum* na costa do Chile, Rovirosa et al. (1988) analisaram as populações de La Boca (VI Região) e Quintay (V Região), separando os indivíduos em carposporófitos, tetrasporófitos e

gametófitos, uma vez que as variações descritas por San-Martin e Rovirosa (1986) poderiam ser originadas de uma diferença nas diferentes fases do ciclo de vida das populações. Os resultados obtidos não mostraram variações qualitativas, sendo observada apenas pequenas variações quantitativas em alguns monoterpenos nas diferentes fases (Tabela II). Os resultados obtidos quanto às variações qualitativas entre as fases mostradas neste trabalho, levaram à proposição de dois quimiotipos para a costa do Chile. O quimiotipo α , formado pelas populações cujos indivíduos não possuem enzimas bromoperoxidase (La Boca e Punta de Perro) e o quimiotipo β , com uma distribuição geográfica mais ampla, formado pelas populações cujos indivíduos apresentam em sua composição monoterpenos bromados além dos bromados- El Tabo, Montemar e La Herradura e Quintay (Figura 5).

Tabela II. Variação quantitativa (%) na composição de monoterpenos entre as fases do ciclo de vida de duas populações de *P. carilagineum** (onde C= carposporófito, T=tetrasporófito e G= gametófito).

| Substância** | Quintay | | | La Boca | | |
|--------------|---------|-------|------|---------|-------|-------|
| | C | T | G | C | T | G |
| A | | | | 13,21 | 9,77 | 10,38 |
| B | | | | 3,01 | 2,69 | 2,84 |
| C | | | | 5,43 | 4,36 | 4,76 |
| D | 1,59 | 3,39 | 1,95 | 22,01 | 24,22 | 21,26 |
| E | 1,01 | 1,98 | 1,49 | 28,18 | 31,44 | 36,32 |
| F | 4,66 | 7,8 | 6,79 | 19,74 | 19,76 | 18,82 |
| G | 15,63 | 6,36 | 26,2 | | | |
| H | 26,89 | 47,69 | 36,9 | | | |

* Modificado de Rovirosa et al. 1988

** As estruturas moleculares das substâncias A-H estão listadas na Figura 4

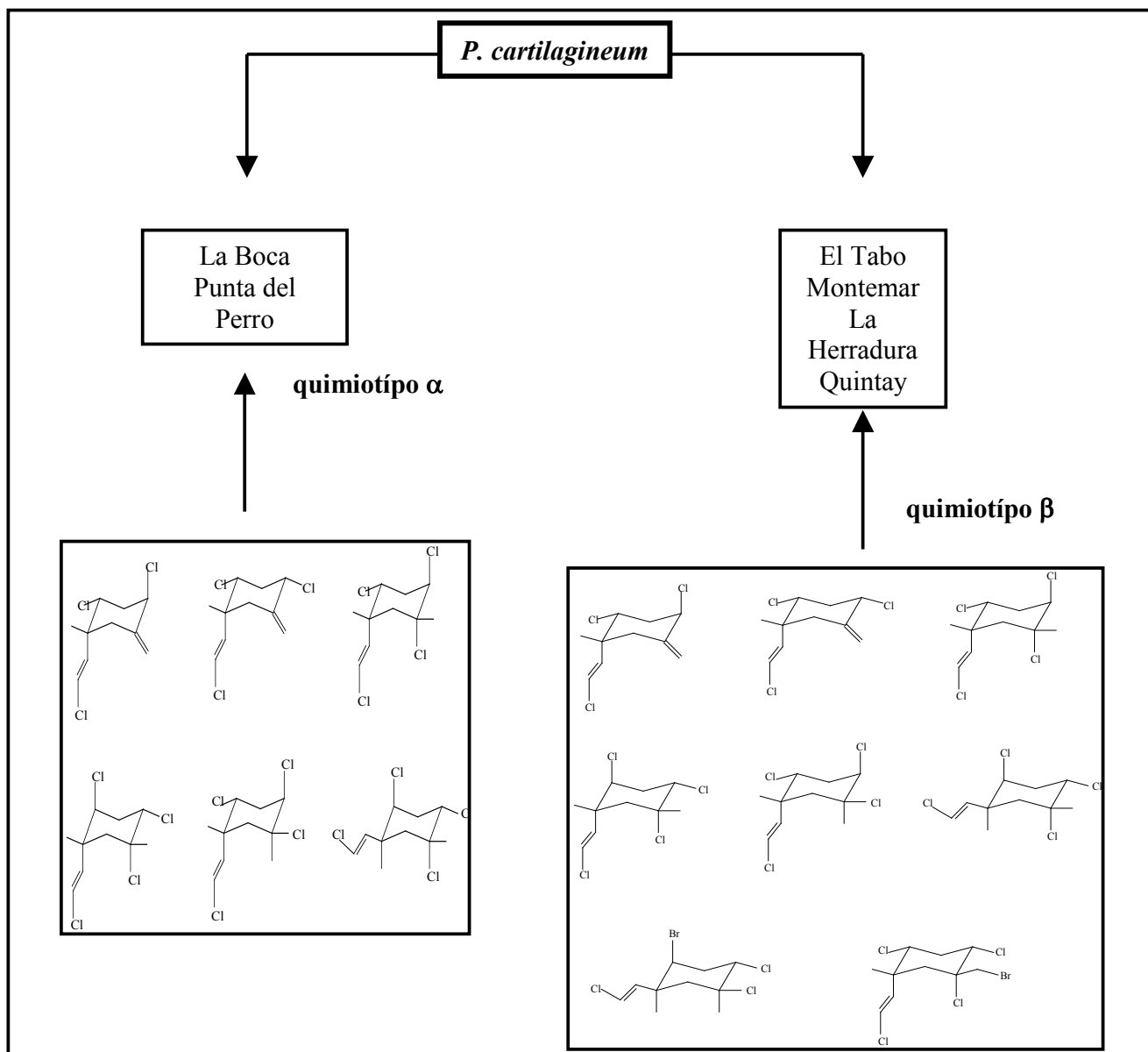


Figura 5: Proposta de agrupamento quimiotaxonomico proposto por Rovirosa et *al.* (1988) para populações de *P. cartilagineum* da costa chilena.

Em estudo realizado na costa nordeste da Espanha, Castedo et *al.* (1984) analisaram indivíduos de *P. coccineum* (Hudson) Lyngbye de 5 populações durante o período de abril

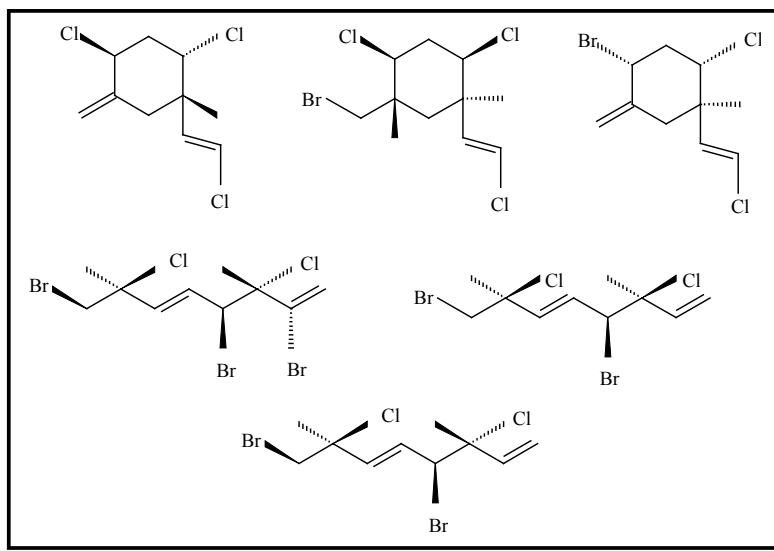
a outubro de 1984. Os indivíduos das populações de Bastigueiro, Aguiño, La Lanzada e em Patos foram coletados diretamente do substrato no sublitoral, enquanto que os de Ría de Arosa foram obtidos a partir de material arribado. Através de análises dos monoterpenos por CLAE foi possível constatar que os indivíduos de todas as populações possuíam a mesma composição de monoterpenos, sendo exclusivamente alicíclicos.

A variabilidade química entre populações foi relatada para a espécie tropical e subtropical *P. hamatum*. Estudos realizados com seis populações representando as regiões sul, central e norte da Grande Barreira de Corais na Austrália indicaram variações qualitativas entre os monoterpenos (Coll et al., 1988; König et al. 1990). As populações variavam qualitativamente em sua composição terpenoídica, com exceção daqueles das populações de Milne Reef e Telford Reef (região norte). Os autores chamam a atenção para a população de Orpheu Island (região central) que foi a única a ter predominância de uma única substância representando mais de 95% do extrato bruto dos indivíduos (Figura 6).

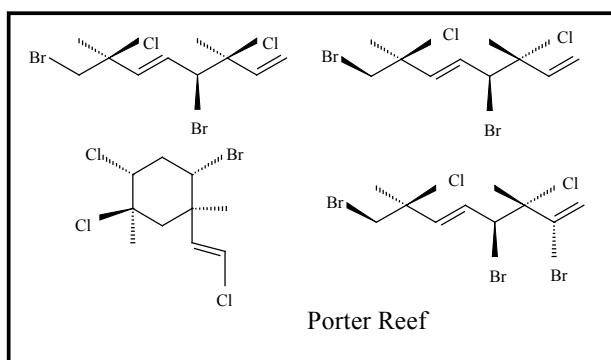
Por mais que existam trabalhos descrevendo a variabilidade química entre populações de *Plocamium*, pouco se conhece sobre a influência que os fatores abióticos podem exercer sobre a produção dos monoterpenos.

Em trabalho recente, Palma et al. (2004) avaliaram a influência da luminosidade (fluxo de luz) e da temperatura sobre a produção dos monoterpenos violaceno, mertenseno e o monoterpeno denominado pelos autores como substância 1. Indivíduos de *P. cartilagineum* foram cultivados sob três intensidades luminosas e três temperaturas distintas durante 16 dias. Após este período, as algas foram secas a sombra, extraídas em CH₂Cl₂ e os extratos analisados em CG. Os resultados obtidos apontaram que apenas a produção da substância 1 foi significativamente afetada por alterações na luminosidade e na temperatura, enquanto que o violaceno e mertenseno, majoritários, sofreram pequenas

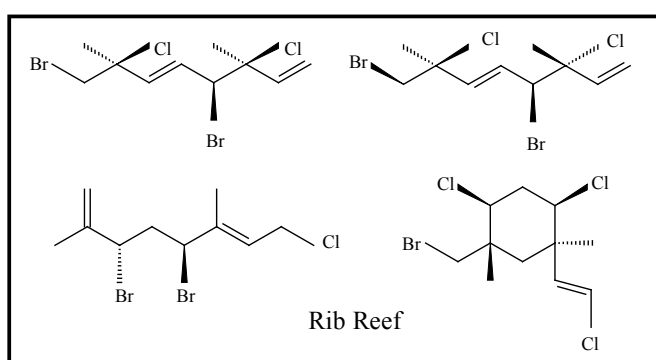
tendências de modificação quantitativa (Tabela III). Levando em consideração a ampla distribuição geográfica de algumas espécies do gênero, em especial *P. cartilagineum*, este trabalho demonstrou a necessidade de investigações profundas e mais detalhadas sobre influência dos fatores abióticos sobre a produção de monoterpenos.



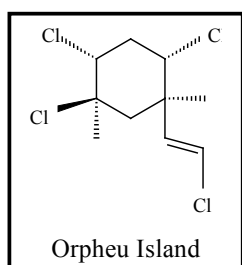
Milne Reef e Telford Reef (norte)



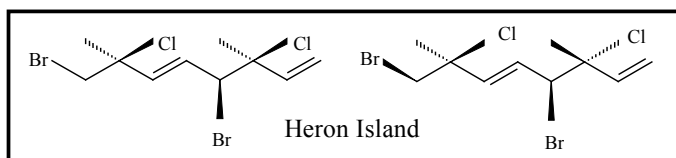
Porter Reef



Rib Reef



Orpheu Island



Heron Island

Figura 6. Variação química entre populações de *P. hamatum* coletadas ao longo da Grande Barreira de Recifes de Corais (Austrália) (König et al. 1990).

Tabela III. Variação na produção de três monoterpenos* (1×10^{-7} g/100g de peso seco) em *P. cartilagineum* sob condições diferenciadas de iluminação (PDF) e temperatura**

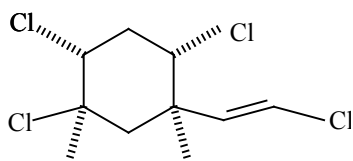
| PDF | 11°C | | | 15°C | | | 18°C | | |
|-----|------|------|-------|------|------|------|------|------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| 41 | 1,03 | 0,41 | 0,001 | 1,29 | 0,57 | 0,04 | 1,09 | 0,92 | 0,01 |
| 65 | 1,26 | 0,73 | 0,04 | 1,76 | 0,95 | 0,04 | 1,17 | 0,67 | 0,068 |
| 120 | 1,14 | 0,54 | 0,01 | 1,51 | 0,59 | 0,11 | 1,36 | 0,39 | 0,036 |

* Modificado de Palma et al. (2004).

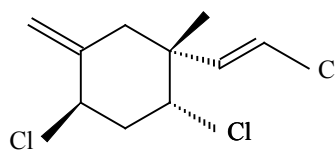
** As substâncias 1, 2 e 3 são, respectivamente, as substâncias C (Figura 2), o violaceno e o mertenseno.

Alguns poucos estudos sugerem que estas substâncias podem atuar como defesa frente a consumidores. Por exemplo, Sakata *et al.* (2000) demonstraram que o monoterpeno aplysiaterpenoide A (12), isolado de *P. leptophyllum* Kützinger da costa do Japão, atua como defesa química frente ao ouriço-do-mar *Strongylocentrotus intermedius*, o gastrópode *Turba comutus*, assim como *Haliotis discus* e *Omphalius pfeifferi*.

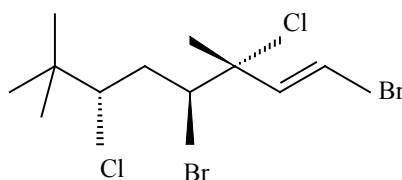
Existem evidências na literatura que a espécie *P. cartilagineum* também possui defesas químicas contra herbívoros. Em bioensaios realizados na Antártica, os alimentos artificiais com o extrato da alga *P. cartilagineum* foram negligenciados pelo anfípoda *Gondogeneia antartica* (Ankisetty et al., 2004). Neste estudo, os autores demonstraram que a atividade defensiva estava relacionada à presença dos monoterpenos epi-plocameno - D (13) e anvereno (14).



(12)



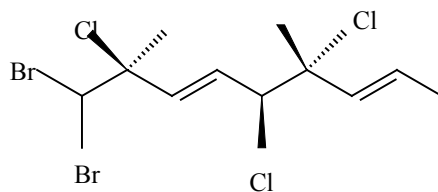
(13)



(14)

Os monoterpenos de *Plocamium* também são mediadores de interações entre competidores. De Nys *et al.* (1991) concluíram que o monoterpene acíclico mertenseno (Figura 4), presente na superfície do talo de *P. hamatum*, causava necrose nos tecidos do octocoral *Simularia cruciata* quando em contato com esta alga. Neste estudo, os autores sugerem que esta substância pode desempenhar um papel multifuncional no ambiente, atuando também como defesa frente a consumidores e epibiontes.

Estudos realizados com *P. costatum* (C. Agardh) J.D. Hooker & Harvey revelaram que o extrato bruto diclorometânico, assim como a substância isolada (15), foram capazes de inibir o assentamento de larvas de craca em ensaios de laboratório, sugerindo que estas substâncias podem atuar como defesa frente a epibiontes (Konig *et. al.*, 1999a).



(15)

Uma vez que os estudos que avaliaram possíveis variações químicas sazonais ou ao longo do ciclo de vida de espécies de *Plocamium* em regiões geográficas distintas mostraram resultados negativos, um intrigante quebra-cabeça emerge. Que fatores estariam determinando a grande variação geográfica observada? As populações estudadas seriam na verdade espécies diferentes? Estaria a química de monoterpenos apontando para a necessidade de revisão taxonômica do gênero? Por mais que não existam repostas conclusivas para estes questionamentos, vemos que os monoterpenos de *Plocamium* podem auxiliar como marcadores químicos de populações (Faulkner, 1975; Crews & Kho-Wiseman, 1977; Crews et al., 1977; Higgs et al., 1977; San-Martin & Roviroso., 1986; Roviroso et al., 1988; König et al., 1990).

Além de eficientes como marcadores de populações, os monoterpenos halogenados de *Plocamium* são potenciais mediadores de interações ecológicas no ambiente marinho (Kladi et al, 2004).

1.3. Considerações sobre a espécie *Plocamium brasiliense*

A espécie *Plocamium brasiliense* é descrita como uma espécie de regiões tropicais encontrada na América do Sul (Brasil e Venezuela), Ilhas Caribenhas (Antilhas Holandesas e Trinidad e Tobago) e América do Norte (Carolina do Norte e Carolina do Sul, EUA) (Algaebase, 2006). Ela é a única espécie de *Plocamium* descrita para a costa brasileira. Sua distribuição estende-se entre do norte do estado do Espírito Santo até o Rio Grande do Sul (Algamare, 2006). Os indivíduos são descritos como plantas eretas, medindo 5-7cm, crescendo em tufos, de cor vermelha escura, constituídas de uma porção rizomatosa cilíndrica, fixa ao substrato, da qual nascem ramos eretos, achatados, medindo 1mm de largura, que por sua vez possuem ramificações simpodiais alterna pinada-dística, muito

regulares. Pode ser encontrada habitando costões rochosos de praias batidas, distribuindo-se da região entre marés até 35m de profundidade, em média (Joly, 1965).

Em face da carência de informações sobre a química de produtos naturais de *P. brasiliense*, este estudo propõe a caracterização química da espécie e, em um contexto ecológico, a investigação da atividade defensiva de seus monoterpenos frente a consumidores. Através da caracterização da química de produtos naturais de *P. brasiliense* estaremos descrevendo a ocorrência destas substâncias na região do Atlântico Sul e contribuindo para o conhecimento da variabilidade geográfica que os monoterpenos de *Plocamium* exibem.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Investigar a química de produtos naturais de *P. brasiliense*

2.2. Objetivos Específicos

- Elaborar um catálogo de substâncias conhecidas para o gênero *Plocamium* a partir de revisão bibliográfica;
- Caracterizar a química de monoterpenos de *P. brasiliense*;
- Investigar a ocorrência de variações qualitativas e/ou quantitativas na química de monoterpenos entre duas populações de *P. brasiliense* de locais distintos no Estado do Rio de Janeiro;
- Investigar a ação defensiva dos monoterpenos de *P. brasiliense* frente consumidores;

3. Materiais e Métodos

3.1. Coleta das macroalgas

Os espécimes de *P. brasiliense* foram coletados em novembro de 2005 no sublitoral da Praia Rasa e da Enseada do Forno, Armação de Búzios (RJ), durante período de maré baixa (0,1m), com auxílio de técnicas de mergulho livre, em profundidades entre 50 cm a 3,5 m, respectivamente. Após as coletas, as algas foram triadas para remoção de sedimento e organismos associados, sendo posteriormente acondicionadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório de Produtos Naturais e Ecologia Química do Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense.

Em laboratório os exemplares foram novamente triados e secos à sombra em temperatura ambiente.

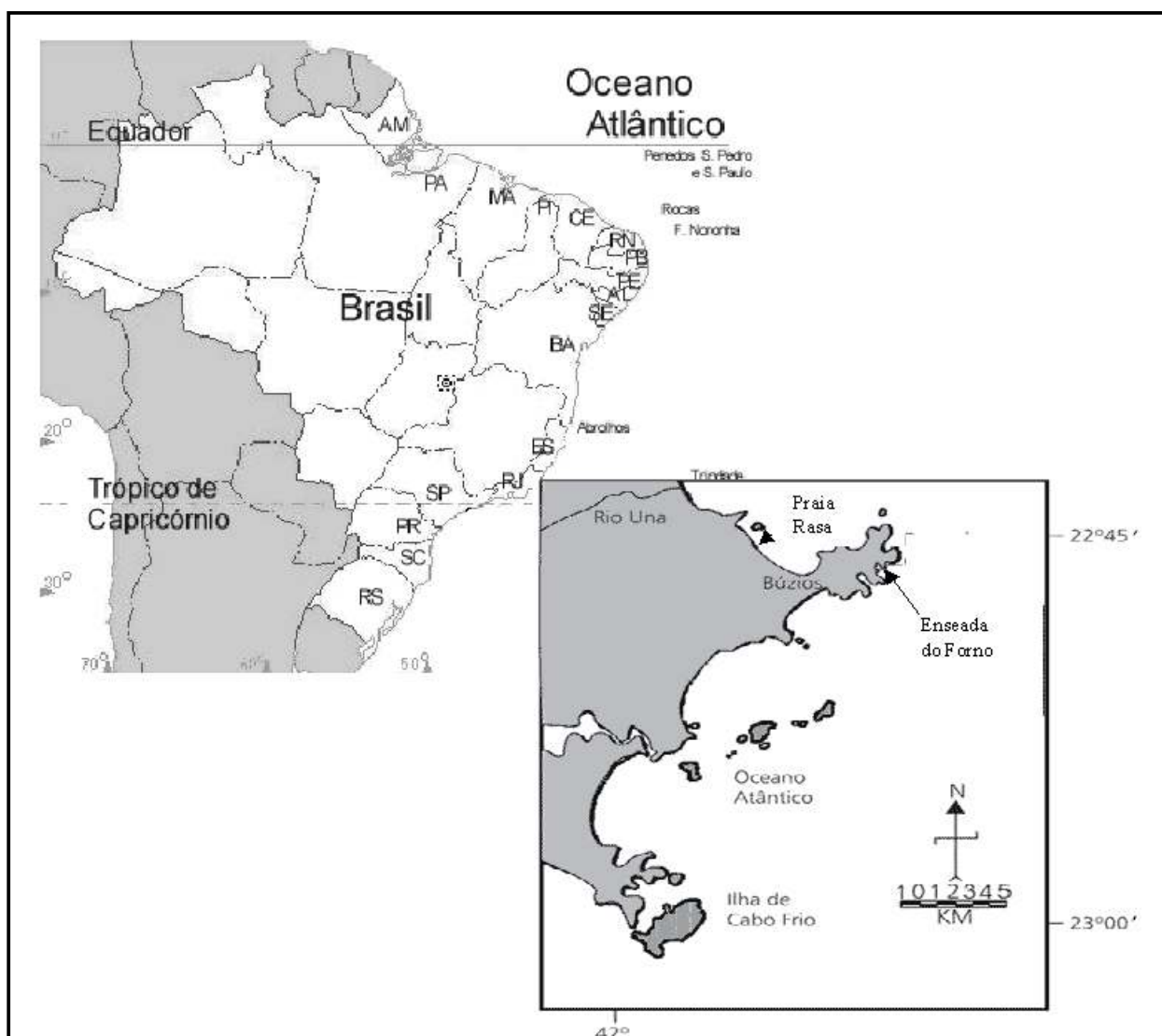


Figura 7. Localização geográfica dos pontos de coleta (a partir do mapa do Brasil modificado de <http://www.ib.usp.br/algamare-br> e o mapa da região de Búzios modificado de Sabino & Villaça, 1999)

3.2. Caracterização dos locais de coleta

Enseada do Forno

A Enseada do Forno localiza-se no município de Búzios (Figura 7) , litoral norte do estado do Rio de Janeiro (22°45'S e 41°52'W). A praia localiza-se no fundo de uma longa e estreita enseada voltada para sudoeste, o Saco do Forno, possuindo uma profundidade máxima de 12 m. É formada por costões rochosos em ambos os lados e uma pequena faixa de areia de aproximadamente 150m (Yoneshigue, 1985). A temperatura da água fica em torno de 18°C à superfície e de 16°C a 10 m de profundidade, podendo atingir um mínimo de 12,8°C à 28m de profundidade. A salinidade local situa-se em torno de $35,5 \times 10^{-3}$ (Valentin, 1981) (Figura 8).



Figura 8. Enseada do Forno, Búzios, RJ

Praia Rasa

A Praia Rasa localiza-se no município de Armação de Búzios, litoral norte do estado do Rio de Janeiro. A praia apresenta um costão com declividade bastante suave, sendo relativamente bem protegido do batimento de ondas e praticamente fora da área de atuação da ressurgência de Cabo Frio (Yoneshigue-Valentin & Valentin 1992). A água na praia Rasa apresenta temperaturas variando entre 19°C e 27°C (Yoneshigue, 1985) e é fortemente influenciada pelos rios Una e São João, localizados ao norte, que fazem com que a região apresente águas bastante turvas praticamente ao longo de todo o ano. Apesar disso, Yoneshigue & Valentin (1988) relatam uma alta riqueza de espécies e uma grande cobertura de algas no local. A franja do infralitoral é caracterizada por uma densa cobertura de *Sargassum*, visível durante as marés baixas formando um cinturão contínuo de aproximadamente 5m de largura ao longo da costa, sendo *S. furcatum* uma das espécies mais abundantes (Yoneshigue, 1985) (Figura 9).



Figura 9. Praia Rasa, Búzios, RJ

3.3. Procedimentos Experimentais

Obtenção dos extratos brutos

Após a secagem, os exemplares de *P. brasiliense* foram pesados em balança digital semi-analítica Kern, triturados com o auxílio de um liquidificador e extraídos exaustivamente em CH₂Cl₂ por 45 dias. Ao final deste período, o solvente foi evaporado em temperatura ambiente, obtendo-se um resíduo viscoso de coloração marrom.

Análise em Cromatografia em Camada Delgada

A fim de realizar inspeção inicial do perfil químico qualitativo, os extratos foram observados em cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se placas de alumínio em gel de sílica 60 F254 (E. Merck, Darmstadt) e hexano (100%) como eluente.

Após a corrida, as placas foram inspecionadas sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) e reveladas com borrifamento de solução de sulfato cérico em ácido sulfúrico a 2%, seguido de aquecimento.

Análise em Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H)

Uma pequena alíquota dos extratos brutos (25 mg), assim como de frações obtidas através de técnicas de cromatografia em coluna de gel de sílica foram enviadas ao laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense, para obtenção dos espectros de 1D de RMN ¹H e APT.

Os espectros de RMN foram realizados em aparelho Varian-Unity Plus 300, utilizando-se a frequência de 300 MHz para Hidrogênio e 75,2 MHz para Carbono (APT), tendo o tetrametilsilano (TMS) como referenciador interno e clorofórmio deuterado (CDCl₃) como solvente.

Análise em Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG/EM)

Para a análise em CG/EM, foram extraídos 2,5 g de massa de alga seca de cada população em 15 ml de CH_2Cl_2 durante 7 dias. Ao final da extração, o solvente foi evaporado em temperatura ambiente. O procedimento padronizado de extração teve por objetivo não produzir interferências nos resultados.

Os espectros de massa por impacto de elétrons foram obtidos através de um cromatógrafo HP 6890, em fase gasosa de alta resolução, acoplado a um espectrofotômetro de massas HP 5973 a 70 eV, coluna HP-1 MS, 30 m de comprimento, 0,25 um de espessura de filme e 0,25mm de diâmetro interno.

Fracionamento do Extrato Bruto

O extrato foi fracionado em coluna de gel de sílica (Merck, 230-400 mesh), utilizando-se sucessivas misturas de solventes como sistemas e obedecendo a uma ordem de polaridade crescente: Hexano (100%), Hexano/ CH_2Cl_2 (5%), Hexano/ CH_2Cl_2 (10%), Hexano/ CH_2Cl_2 (20%), Hexano/ CH_2Cl_2 (30%), Hexano/ CH_2Cl_2 (1:1), CH_2Cl_2 (100%), CH_2Cl_2 /Acetato de Etila (20%), Acetato de Etila (100%) e Acetona (100%).

Foram utilizados 200 ml de cada solvente ou sistema de solventes, sendo obtidas 10 frações de 20 ml. Após a evaporação do solvente, todas as frações foram analisadas por CCD, utilizando-se misturas de Hexano e CH_2Cl_2 como sistema eluente: Hexano (100%), Hexano/ CH_2Cl_2 (10%), Hexano/ CH_2Cl_2 (30%), Hexano/ CH_2Cl_2 (1:1), CH_2Cl_2 (100%), CH_2Cl_2 /Acetato de Etila (20%).

Ensaio Biológicos

A atividade defensiva dos extratos de espécimes de *P. brasiliensis* das duas praias foi avaliada em bioensaios em laboratório com alimento artificial. Os bioensaios constituem um experimento de dupla escolha onde foram oferecidas duas opções de alimento aos animais, uma contendo o extrato a ser testado – alimento com tratamento – e outra, sem o mesmo, constituindo o alimento controle sem tratamento.

Coleta dos Consumidores

Coleta do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus*

Os indivíduos do ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* (Lamarck) (Figura 10) foram coletados na Enseada de Itaipu (Niterói – RJ) durante maré baixa com auxílio de técnicas de mergulho livre. Após a coleta, os animais foram transportados ao laboratório onde foram mantidos em aquários com água do mar aerada e movimentação constante, sendo oferecido como alimento a clorofícea *Ulva* sp.



Figura 10. Ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* em habitat natural

Coleta de *Acanthonyx scutiformis*

O caranguejo *Acanthonyx scutiformis* (Dana, 1851) (Brachiura:Majidae – Figura 11) é uma espécie endêmica da costa brasileira com distribuição descrita entre os estados do Espírito Santo e São Paulo (Melo, 1996). Os indivíduos de *A. scutiformis* foram coletados no sublitoral da Praia Rasa (Armação de Búzios – RJ). Os animais foram removidos diretamente de tufos de *P. brasiliense*, acondicionados em isopor com água do mar e transportados para o laboratório. Em laboratório, foram mantidos em aquários com água do mar aerada e movimentação constante sendo oferecido como alimento a clorofíceia *Ulva* sp.

A. scutiformis pode ser encontrado associado a tufos de *P. brasiliense* nos dois pontos de coleta da alga. No entanto, na Praia Rasa o mesmo encontra-se em maior número, o que justifica a escolha pelo local de coleta.



Figura 11. *Acanthonyx scutiformis* associado a tufos de *P. brasiliense* (foto gentilmente cedida por Éverson Miguel Bianco)

Preparação dos alimentos artificiais

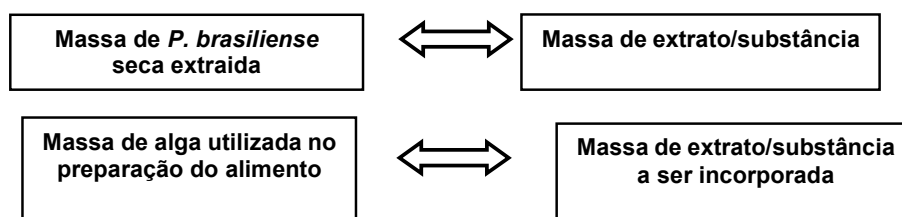
Os alimentos artificiais foram preparados a base de agár e pó da clorofícea *Ulva* seco, seguindo método proposto por Hay *et. al.* (1994).

O extrato ou a substância a serem testados foram solubilizados em solvente orgânico (CH_2Cl_2) e transferidos para um balão do tipo pêra (50 ml), contendo 2 g de pó de *Ulva*. Em seguida, o solvente foi eliminado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, sendo acrescentados 16 ml de água destilado à amostra, para homogeneizar o metabolito no pó de *Ulva*.

Posteriormente, foi preparada uma mistura de agár (1,10 g) com água destilada (20 ml), que foi aquecida em forno de microondas em potência alta, sendo mantida sobre constante agitação com o auxílio de um bastão de vidro. Resfriada a mistura, acrescentou-se o pó de *Ulva*, sendo mantida a agitação. A mistura agár + *Ulva* foi então vertida em uma tela de *nylon* com malha de aproximadamente 1mm.

O alimento controle sem tratamento foi preparado seguindo-se os mesmos passos do alimento tratamento, sem incorporação do extrato. Neste alimento foi adicionado apenas o solvente de forma que possíveis resíduos não influenciem as amostras.

O alimento tratamento tenta mimetizar as concentrações naturais que as substâncias são encontradas em *P. brasiliense*. O cálculo da concentração natural de extrato/substância foi feito através de uma correlação por regra de três e está esquematizado abaixo:



No bioensaio com *L. variegatus*, utilizou-se uma fôrma de acrílico para a confecção das tiras sobre a tela de nylon. Para o bioensaio com *A. scutiformis*, não foi utilizada a forma, sendo o alimento prensado diretamente sobre a tela de *nylon* (Figuras 12 e 13).

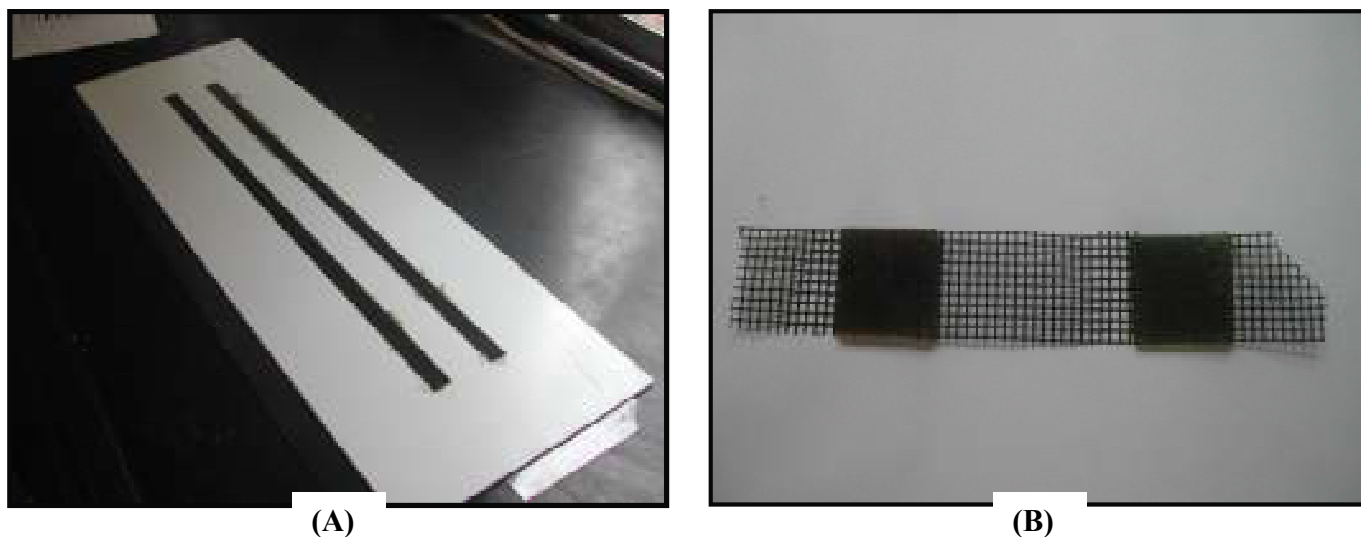


Figura 12. Preparação do alimento artificial para o bioensaio com *L. variegatus*, onde (A) mostra a forma utilizada para preparação do alimento e (B), estrutura com as duas opções de alimento (com tratamento e sem tratamento) utilizada no bioensaio.



Figura 13. Preparação do alimento artificial para ensaio com *A. scutiformis*.

Desenho Experimental

Antes da realização dos bioensaios, os indivíduos de *L. variegatus* foram acondicionados em potes plásticos furados e com tampa, sendo colocado um animal por pote e, os indivíduos de *A. scutiformis* acondicionados em aquários pequenos (Figura 14). Foram realizadas 25 réplicas para cada bioensaio, sendo cada réplica constituída de apenas um animal. No bioensaio com *L. variegatus*, as duas opções de alimento (controle e tratamento), foram oferecidas em uma única tira enquanto que no ensaio com *A. scutiformis*, as duas opções de alimento foram oferecidas separadamente.

As réplicas foram encerradas quando observado o consumo preferencial (em média 35%) de uma das opções de alimento sendo o montante consumido mensurado através da contagem dos espaços vazios na malha.



Figura 14. Bioensaio com *L. variegatus*

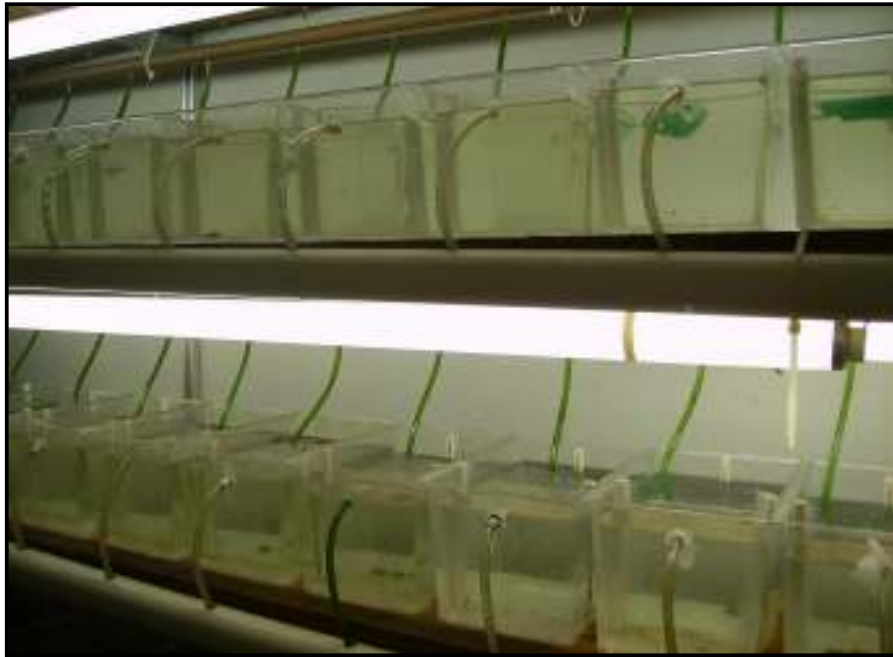


Figura 15. Aquários utilizados no bioensaio com *A. scutiformis*.

Análise Estatística dos Resultados

Uma vez atendida a premissa da normalidade, os dados foram analisados com o teste t de Student para amostras dependentes. Caso a premissa fosse violada, utilizou-se o respectivo não-paramétrico ao teste t de Student, o teste de Wilcoxon.

Uma vez que os dados obtidos estavam em porcentagem, foi realizada a transformação para o arco-seno antes de qualquer análise estatística.

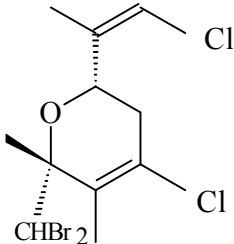
4. Resultados

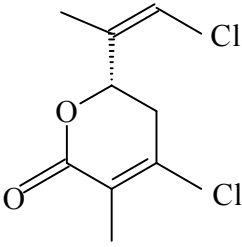
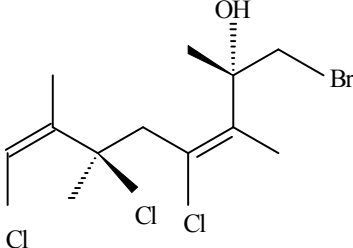
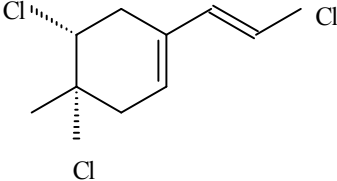
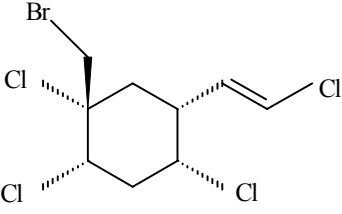
Monoterpenos halogenados do gênero Plocamium

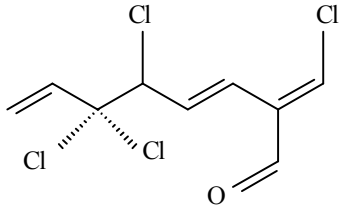
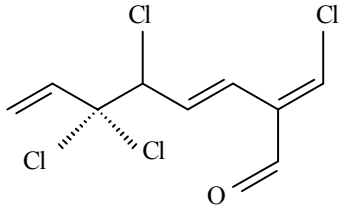
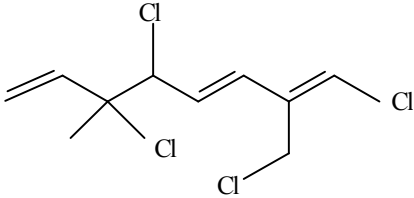
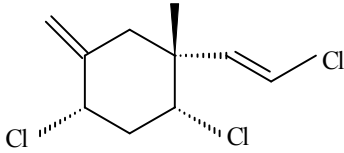
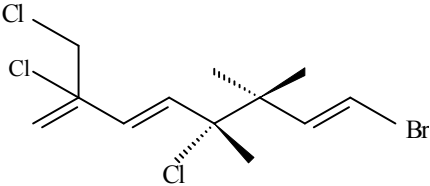
As informações obtidas através da revisão bibliográfica possibilitaram a elaboração de uma tabela contendo as substâncias conhecidas, a espécie produtora e a região geográfica na qual a mesma ocorre. Esta relação pode ser observada na Tabela IV.

A literatura sobre a química de produtos naturais do gênero *Plocamium* possibilitou elaborar uma tabela com a ocorrência de 102 monoterpenos halogenados. Poucas espécies foram estudadas quanto à química de produtos naturais, sendo elas *P. cartilagineum*, *P. costatum*, *P. violaceum*, *P. coccineum*, *P. sandvicense*, *P. hamatum*, *P. telfaire*, *P. pacificum*, *P. oregonum*, *P. mertinsii*, *P. cruciferum* e *P. corallorhyza*, *P. hamatum*. Foram estudadas populações pertencentes aos Oceanos Pacífico, Índico, Antártico e Atlântico Norte, não havendo informações sobre a ocorrência de monoterpenos halogenados na região do Atlântico Sul (Figura 16).

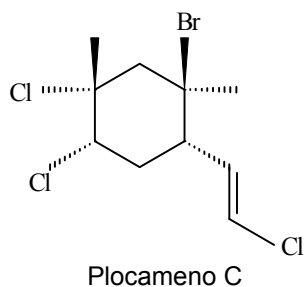
Tabela IV. Relação entre as substâncias conhecidas, as espécies produtoras e os respectivos locais de coleta

| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|---|--------------------|------------------|----------------------|
|  | <i>P. costatum</i> | Sul da Austrália | Stierle, et al. 1976 |

| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|--|-------------------------|--|-----------------------------|
|  | <i>P. costatum</i> | Sul da Austrália | Stierle, et al. 1976 |
|  | <i>P. costatum</i> | Sul da Austrália | Kazlauskas et al., 1976 |
|  <p>Plocameno B</p> | <i>P. violaceum</i> | Monterey Bay Ray Bay (California) | Crews & KhoWiseman, 1975 |
|  <p>Violaceno</p> | <i>P. violaceum</i> | Monterey Bay (California) | Mynderse & Faulkner, 1974 |
| | <i>P. cartilagineum</i> | El Tabo, Montemar e La Herradura (Chile) | San-Martin e Roviroso, 1986 |
| | | Antártica | Stierle et al., 1979 |

| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|---|-------------------------|--|---------------------------|
|  | <i>P. hamatum</i> | Barreira de Corais | König et al., 1999b |
|  | <i>P. violaceum</i> | Point Joe Pescadero Point (Monterey Bay) | Crews et al, 1977 |
| Cartilagineal | <i>P. cartilagineum</i> | Monterey Bay (California) | Crews e Kho-Wiseman, 1977 |
|  | <i>P. sandvicense</i> | Havaí | Crews et al., 1977 |
|  | <i>P. violaceum</i> | Pigeon Point Bonny Doon (California) | Crews et al., 1978 |
| Plocameno D | | | |
|  | <i>P. cartilagineum</i> | Espanha | König et al, 1990 |

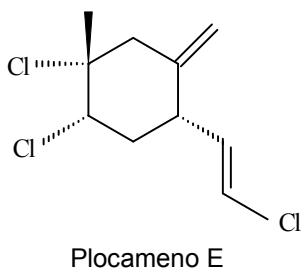
| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|------------|---------|-----------------|------------|
|------------|---------|-----------------|------------|



P. violaceum

Pigeon Point
Bonny Doon
(California)

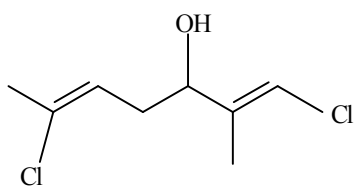
Crews et al., 1978



P. violaceum

Pigeon Point
Bonny Doon
(California)

Crews et al., 1978



P. crucoferum

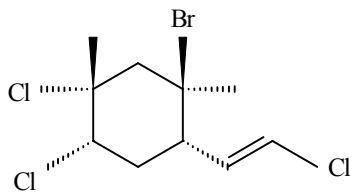
Nova Zelândia

Blunt et al., 1978

P. cartilagineum

Nova Zelândia

Blunt et al, 1985



P. cartilagineum

Espanha
Portugal

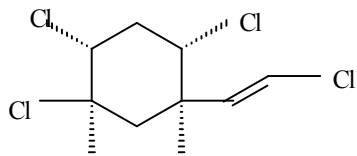
González et al., 1978
Abreu e Galindro, 1996

P. coccineum

Espanha

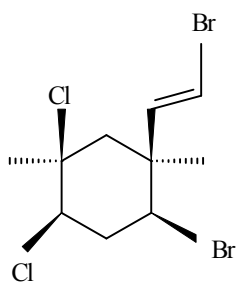
Castedo et al, 1984

| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|------------|---------|-----------------|------------|
|------------|---------|-----------------|------------|



P. telfaire

Wasaka Bay
(Japão)



P. cartilagineum

Espanha

Gonzalez et al., 1978

P. coccineum

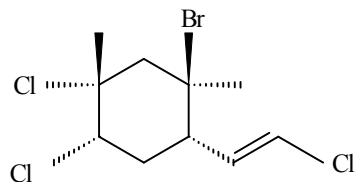
Espanha

Castedo, et al. 1984

P. telfaire

Wasaka Bay
(Japão)

Watanabe et al., 1978



P. cartilagineum

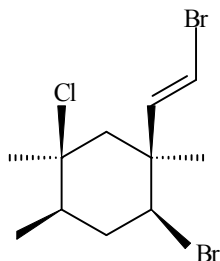
Espanha

Gonzales et al., 1978

P. coccineum

Espanha

Castedo et al, 1984

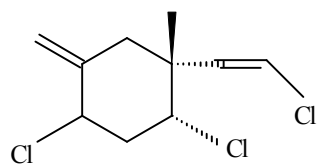


P. cartilagineum

Espanha

Gonzales et al., 1978

| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|------------|---------|-----------------|------------|
|------------|---------|-----------------|------------|



Epi Plocameno D

P. cartilagineum

Chile
Antártica

Argadoña et al., 2000
Ankisetty et al., 2004

P. violaceum

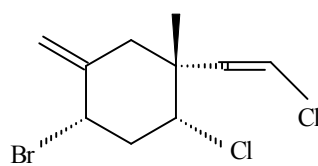
California

Crews et al., 1984a

P. hamatum

Australia

Coll et al. 1988



P. hamatum

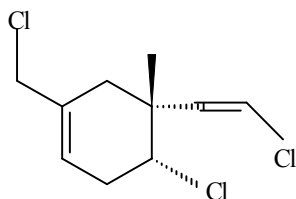
Australia

Coll et al. 1988

P. cartilagineum
(?)

Antártica

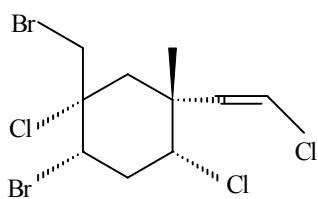
Stierle et al., 1979



P. cartilagineum
(?)

Antártica

Stierle et al., 1979



P. cartilagineum
(?)

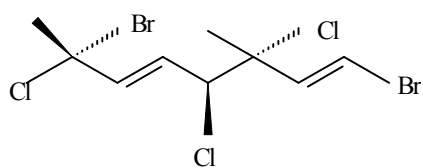
Antártica

Stierle et al., 1979

P. hamatum

Australia

Coll et al. 1988

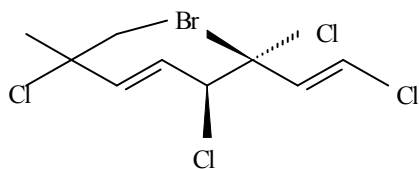


P. cartilagineum
(?)

Antártica

Stierle et al., 1979

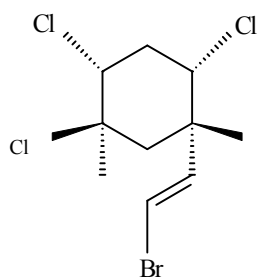
| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|------------|---------|-----------------|------------|
|------------|---------|-----------------|------------|



P. cartilagineum
(?)

Antártica

Stierle et al., 1979

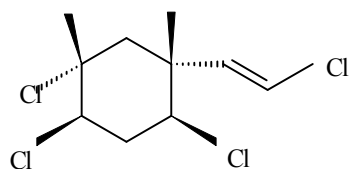


Telfairino

P. telfaire

Wakasa Bay
(Japão)

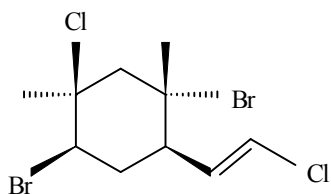
Watanabe et al. 1990



P. telfaire

Wakasa Bay
(Japão)

Watanabe et al. 1990



P. cartilagineum

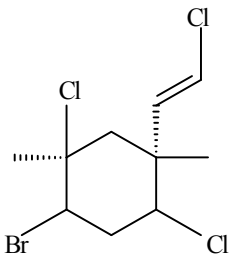
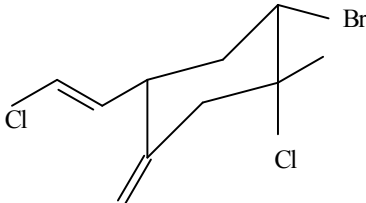
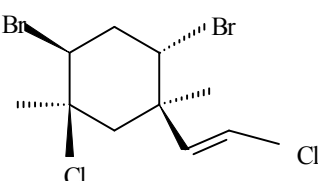
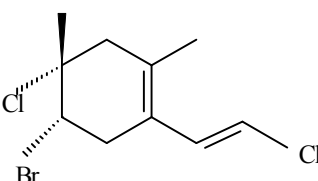
Portugal
Espanha

Abreu e Galindro, 1996
König et al, 1990

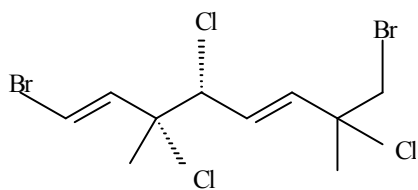
P. coccineum

Espanha

Castedo et al, 1984

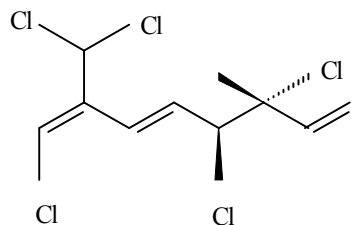
| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|---|-------------------------|--|---|
|  <p>Mertenseno</p> | <i>P. mertinsii</i> | Sul da Australia | Norton et al, 1977 |
| | <i>P. coccineum</i> | Espanha | Castedo et al, 1984 |
| | <i>P. cartilagineum</i> | El Tabo, Montemar La Herradura (Chile) | San-Martin e Rovirosa, 1986 |
|  | <i>P. mertinsii</i> | Sul da Austrália | Norton et al, 1977 Capon et al., 1984 |
| | <i>P. cartilagineum</i> | Portugal | Abreu e Galindro, 1996 |
|  | <i>P. coccineum</i> | Espanha | Castedo et al, 1984 |
| | <i>P. cartilagineum</i> | Portugal Espanha | Abreu e Galindro, 1996 König et al, 1990 |
|  | <i>P. coccineum</i> | Espanha | Castedo et al, 1984 |

| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|------------|---------|-----------------|------------|
|------------|---------|-----------------|------------|

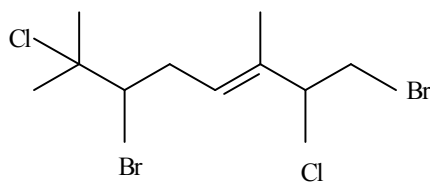


Oregoneno A

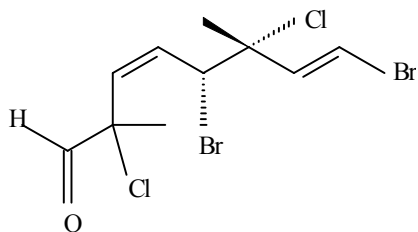
| | | |
|-------------------------|--|--------------------------|
| <i>P. cartilagineum</i> | California | Crew e Kho-Wiseman, 1977 |
| <i>P. cartilagineum</i> | Espanha | König et al., 1990 |
| <i>P. brasiliense</i> | Praia Rasa Enseada do Forno (Brasil) | Presente Estudo |



| | | |
|-------------------------|--|---------------------------|
| <i>P. cartilagineum</i> | La Jolla (California) | Mynderse e Faulkner, 1975 |
| | Portugal | Abreu e Galindro, 1996 |
| <i>P. oregonum</i> | California | Crew e Kho-Wiseman, 1977 |
| <i>P. brasiliense</i> | Praia Rasa Enseada do Forno (Brasil) | Presente Estudo |

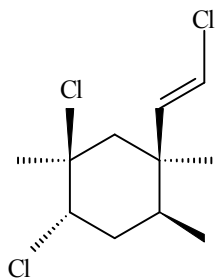


| | | |
|-------------------------|----------|------------------------|
| <i>P. cartilagineum</i> | Portugal | Abreu e Galindro, 1996 |
|-------------------------|----------|------------------------|



| | | |
|-------------------------|----------|------------------------|
| <i>P. cartilagineum</i> | Portugal | Abreu e Galindro, 1996 |
|-------------------------|----------|------------------------|

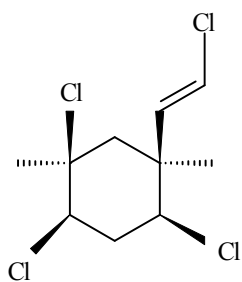
| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|------------|---------|-----------------|------------|
|------------|---------|-----------------|------------|



P. cartilagineum

Chile

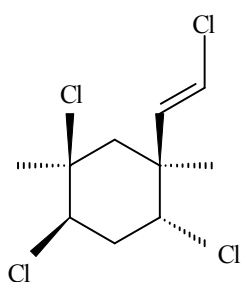
Argadoña et al., 2000



P. cartilagineum

Chile

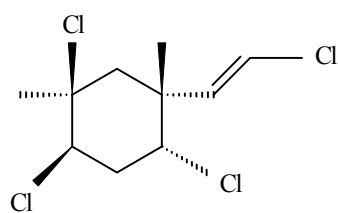
Argadoña et al., 2000



P. cartilagineum

Chile

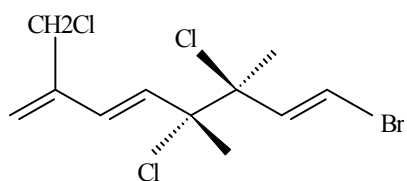
Argadoña et al., 2000



P. cartilagineum

Chile

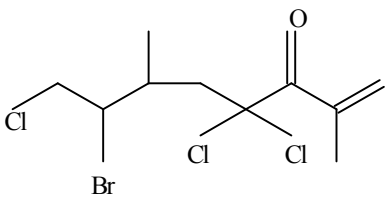
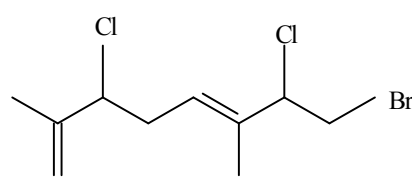
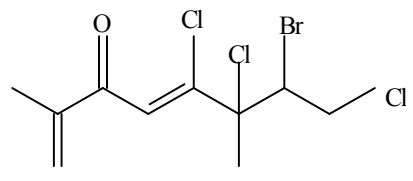
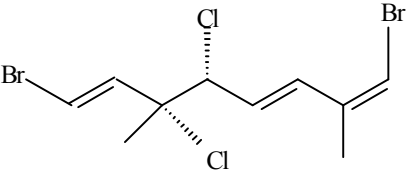


Argadoña et al., 2000

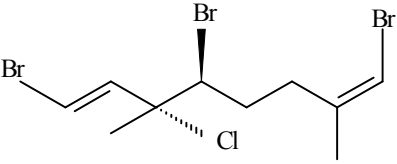
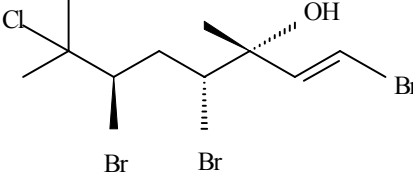
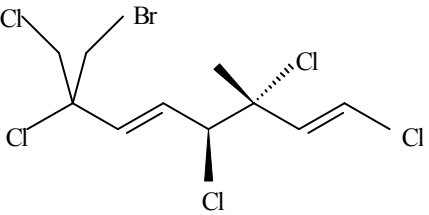
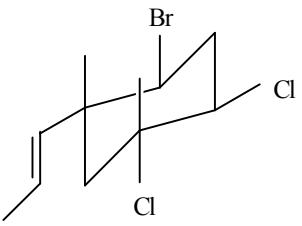
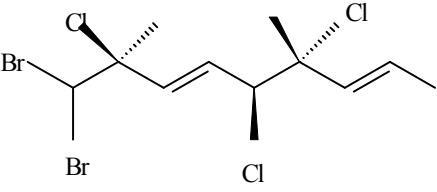


P. cartilagineum

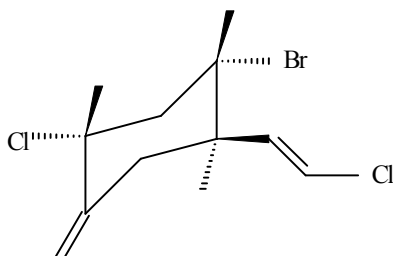
Espanha

König et al., 1990

| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|--|-------------------------|------------------------------|--------------------------|
|  <p>Plocamenona</p> | <i>P. angustum</i> | Austrália (Pop. Pacífico) | Stierle e Sims, 1984 |
|  | <i>P. angustum</i> | Austrália (Pop. Índico) | Dunlop et al., 1979 |
|  | <i>P. costatum</i> | Tâsmania | König et al., 1999a |
|  | <i>P. angustum</i> | Austrália (Pop. Índico) | Dunlop et al., 1979 |
|  | <i>P. cartilagineum</i> | Califórnia | Crew e Kho-Wiseman, 1977 |
|  | <i>P. oregonum</i> | Califórnia | Crew e Kho-Wiseman, 1977 |

| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|---|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|
|  | <i>P. cartilagineum</i> | California | Crew e Kho-Wiseman, 1977 |
| | <i>P. oregonum</i> | California | Crew e Kho-Wiseman, 1977 |
|  | <i>P. pacificum</i> | California | Stallard e Faulkner, 1974 |
| | <i>P. cartilagineum</i> | California | Kaslauzkaz et al., 1976 |
|  | <i>P. cartilagineum</i> (?) | Antártica | Stierle et al., 1979 |
|  | <i>P. cartilagineum</i> (?) | Antártica | Stierle et al., 1979 |
|  | <i>P. cartilagineum</i> | La Jolla (California) | Mynderse e Faulkner, 1975 |
| | <i>P. pacificum</i> | California | Mynderse e Faulkner, 1974 |
| | <i>P. costatum</i> | Tásmania | König et al., 1999a |

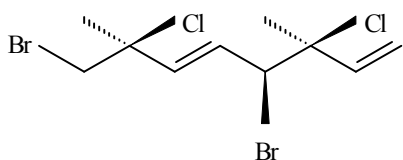
| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|------------|---------|-----------------|------------|
|------------|---------|-----------------|------------|



P. hamatum

Milne Reef
Telford Reef
(Austrália)

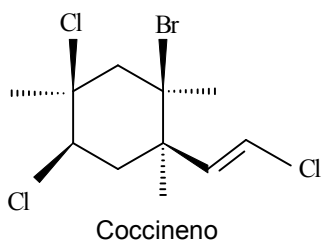
Coll et al., 1988
König et al., 1999b



P. hamatum

Milne Reef
Telford Reef
Rib Reef
Porter Reef
(Austrália)

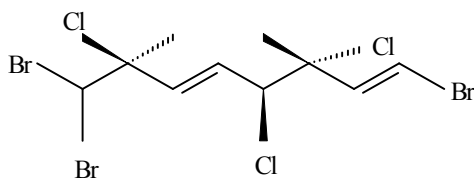
Coll et al., 1988
König et al., 1999b



P. coccineum

Espanha

Castedo et al., 1984



P. costatum

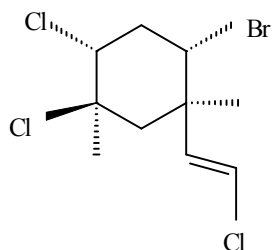
Tásmania

König et al., 1999a

P. cartilagineum

Nova Zelândia

Blunt et al., 1985

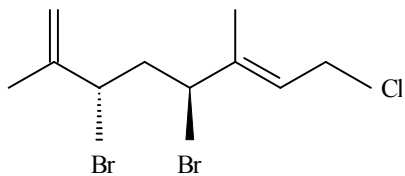


P. hamatum

Porter Reef
(Austrália)

König et al., 1999b

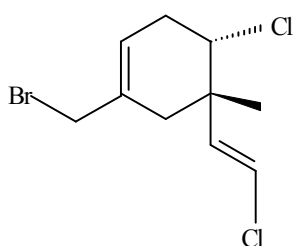
| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|------------|---------|-----------------|------------|
|------------|---------|-----------------|------------|



P. hamatum

Rib Reef
(Austrália)

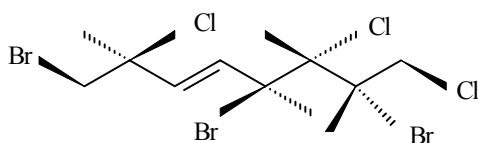
König et al., 1999b



P. hamatum

Barreira de Corais
(Austrália)

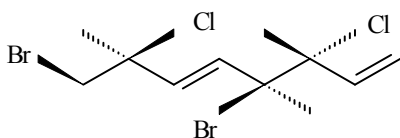
Coll et al., 1988



P. hamatum

Barreira de Corais
(Austrália)

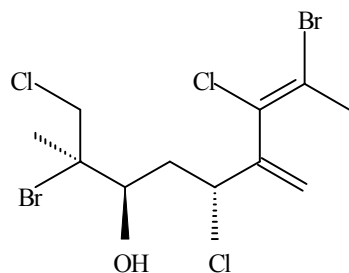
Coll et al., 1988



P. hamatum

Milne Reef
Telford Reef
(Austrália)

König et al., 1999b

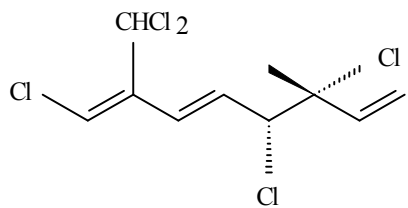


P. cartilagineum

Chile

Díaz-Marrero et al., 2003

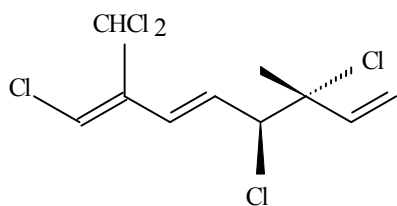
| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|------------|---------|-----------------|------------|
|------------|---------|-----------------|------------|



P. cartilagineum

La Jolla
(California)

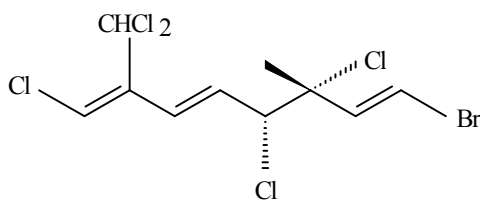
Mynderse e Faulkner, 1975



P. cartilagineum

La Jolla
(California)

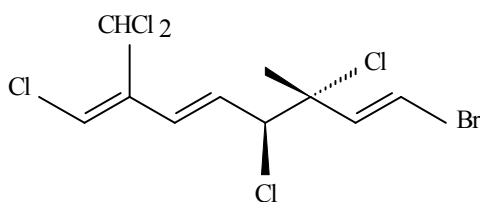
Mynderse e Faulkner, 1975



P. cartilagineum

La Jolla
(California)

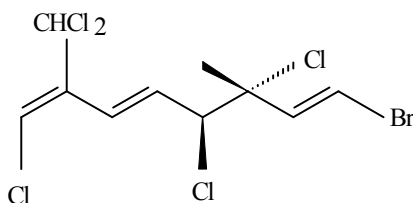
Mynderse e Faulkner, 1975



P. cartilagineum

La Jolla
(California)

Mynderse e Faulkner, 1975

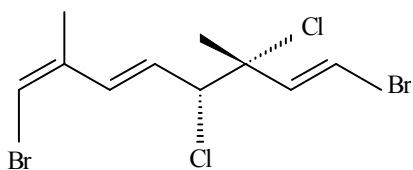


P. cartilagineum

La Jolla
(California)

Mynderse e Faulkner, 1975

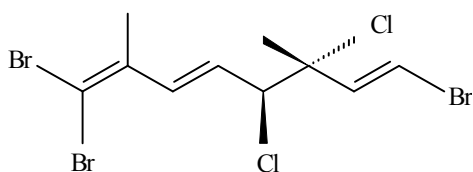
| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|------------|---------|-----------------|------------|
|------------|---------|-----------------|------------|



P. cartilagineum

La Jolla
(California)

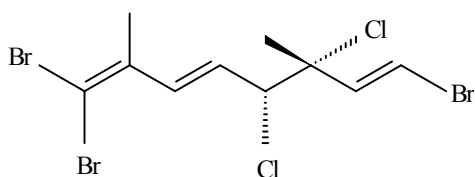
Mynderse e Faulkner, 1975



P. cartilagineum

La Jolla
(California)

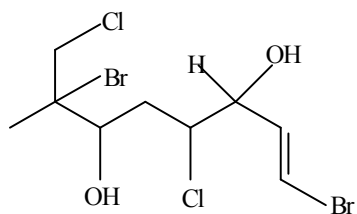
Mynderse e Faulkner, 1975



P. cartilagineum

La Jolla
(California)

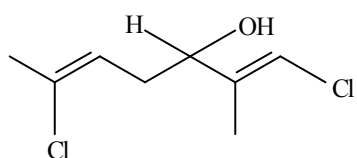
Mynderse e Faulkner, 1975



P. cartilagineum

Chile

Diaz-Marrero et al., 2002a

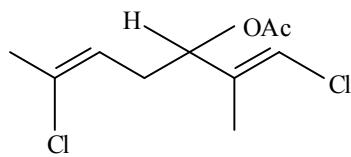


P. cartilagineum

Nova Zelândia

Blunt et al., 1985

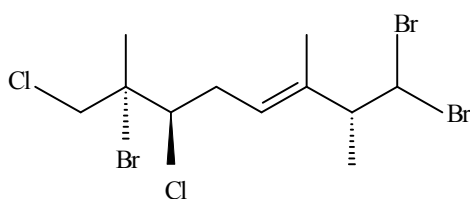
| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|------------|---------|-----------------|------------|
|------------|---------|-----------------|------------|



P. cartilagineum

Nova Zelândia

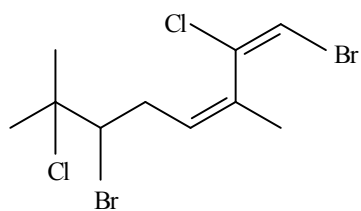
Blunt et al., 1985



P. cruciferum

Nova Zelândia

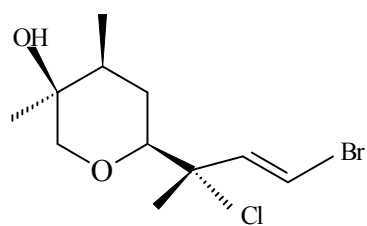
Bates et al., 1979



P. cartilagineum

Nova Zelândia

Blunt et al., 1985

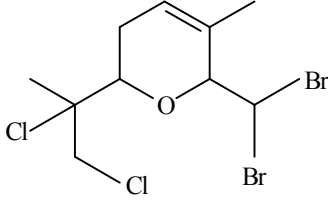
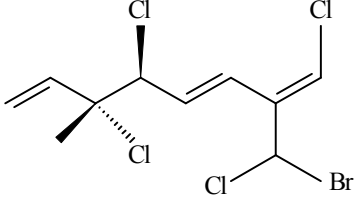
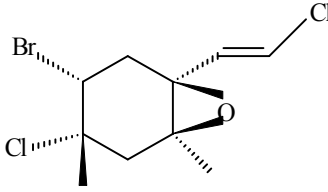
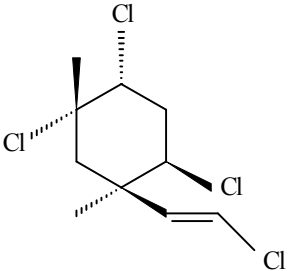
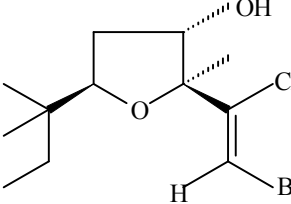


Plocamiopiranoide

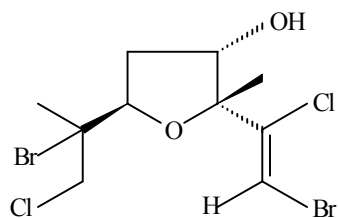
P. cartilagineum

Antártica

Cueto et al., 1998

| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|---|-------------------------|-----------------|----------------------|
|  | <i>P. cartilagineum</i> | Antártica | Cueto et al., 1998 |
|  | <i>P. cartilagineum</i> | Antártica | Crews et al., 1984 |
|  | <i>P. cartilagineum</i> | Antártica | |
|  | <i>P. cartilagineum</i> | Chile | Darias et al., 2001 |
|  | <i>P. cartilagineum</i> | Chile | Darias et. al., 2001 |
| Furoplamioide B | | | |

| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|------------|---------|-----------------|------------|
|------------|---------|-----------------|------------|

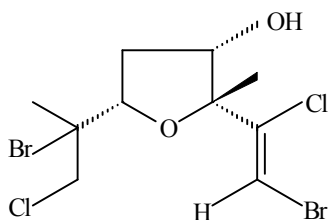


Furoplacamiode A

P. cartilagineum

Chile

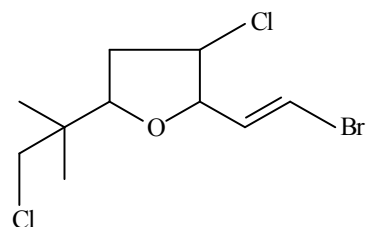
Darias et. al., 2001



P. cartilagineum

Chile

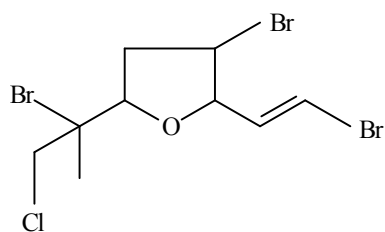
Darias et. al., 2001



P. cartilagineum

Chile

Diaz-Marrero et al., 2002a

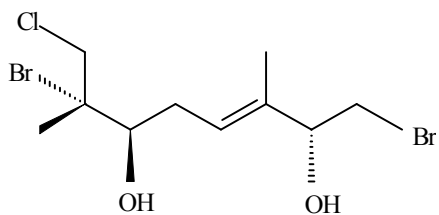


P. cartilagineum

Chile

Diaz-Marrero et al., 2002a

| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|------------|---------|-----------------|------------|
|------------|---------|-----------------|------------|

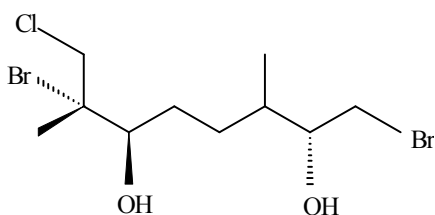


Plocamenol A

P. cartilagineum

Chile

Diaz-Marrero et al., 2002b

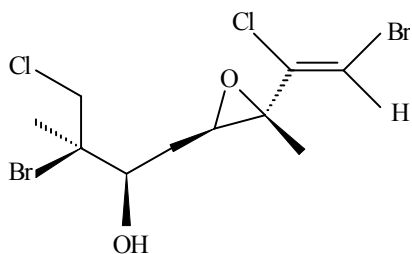


Plocamenol B

P. cartilagineum

Chile

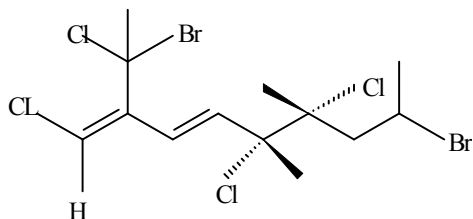
Diaz-Marrero et al., 2002b



P. cartilagineum

Chile

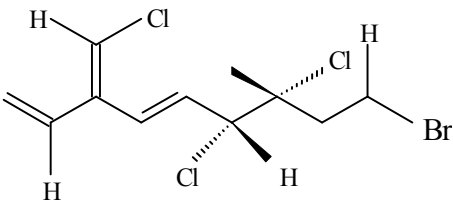
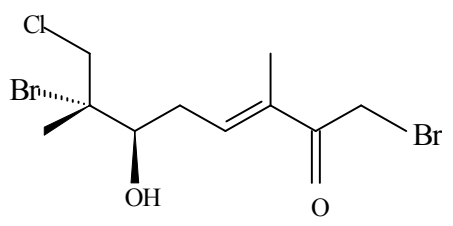
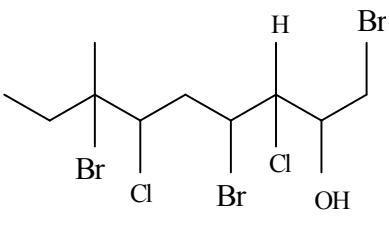
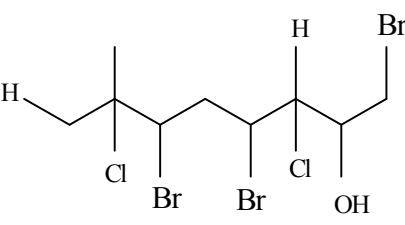
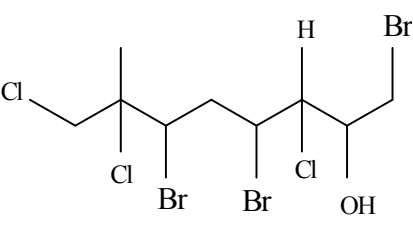
Diaz-Marrero et al., 2003



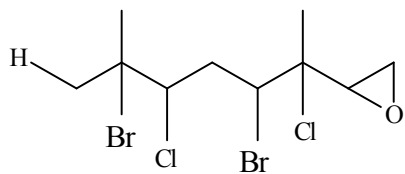
P. cartilagineum

Tásmania

Jomgaramruong e Blackman 2000

| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|---|-------------------------|-----------------|-------------------------------|
|  | <i>P. cartilagineum</i> | Tâsmania | Jomgaramruong e Blackman 2000 |
|  | <i>P. cartilagineum</i> | Chile | Diaz-Marrero et al., 2002b |
|  | <i>P. cartilagineum</i> | Nova Zelândia | Blunt et al., 1985 |
|  | <i>P. cartilagineum</i> | Nova Zelândia | Blunt et al., 1985 |
|  | <i>P. cartilagineum</i> | Nova Zelândia | Blunt et al., 1985 |

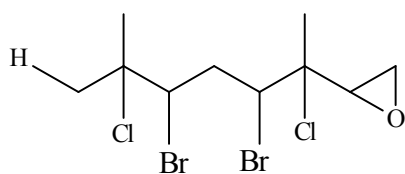
| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|------------|---------|-----------------|------------|
|------------|---------|-----------------|------------|



P. cartilagineum

Nova Zelândia

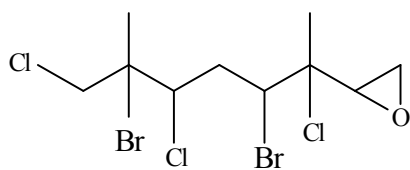
Blunt et al., 1985



P. cartilagineum

Nova Zelândia

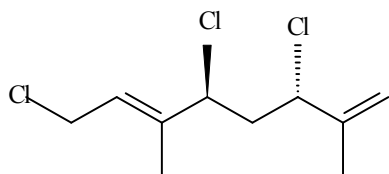
Blunt et al., 1985



P. cartilagineum

Nova Zelândia

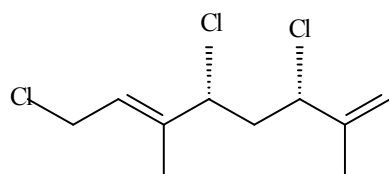
Blunt et al., 1985



P. violaceum

Point Joe
(California)

Crews e Kho-Wiseman, 1977

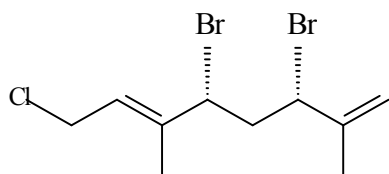


P. violaceum

Point Joe
(California)

Crews e Kho-Wiseman, 1977

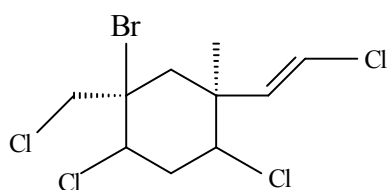
| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|------------|---------|-----------------|------------|
|------------|---------|-----------------|------------|



P. violaceum

Point Joe
(California)

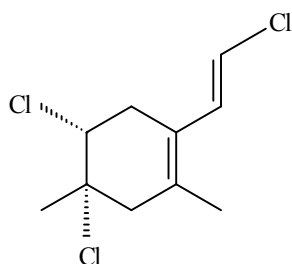
Crews e Kho-Wiseman, 1977



P. violaceum

California

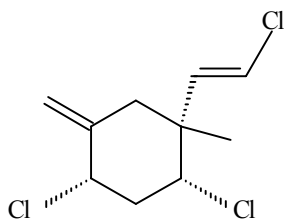
Mynderser et al., 1975



P. violaceum

California

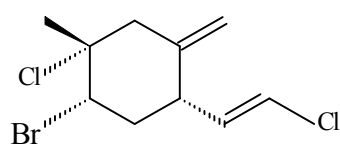
Mynderser et al., 1975



P. violaceum

California

Kazlauskaz et al., 1976

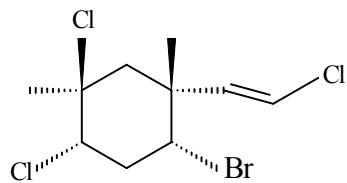


P. cartilagineum

Portugal

Abreu e Galindro, 1996

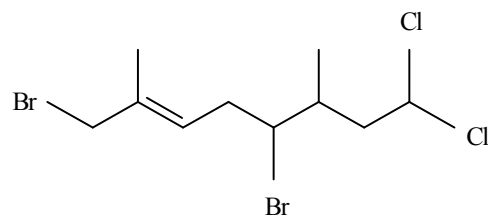
| Substância | Espécie | Local de Coleta | Referência |
|------------|---------|-----------------|------------|
|------------|---------|-----------------|------------|



P. cartilagineum

Espanha

König et al., 1990



P. corallorhiza

África do Sul

Knott et al., 2005

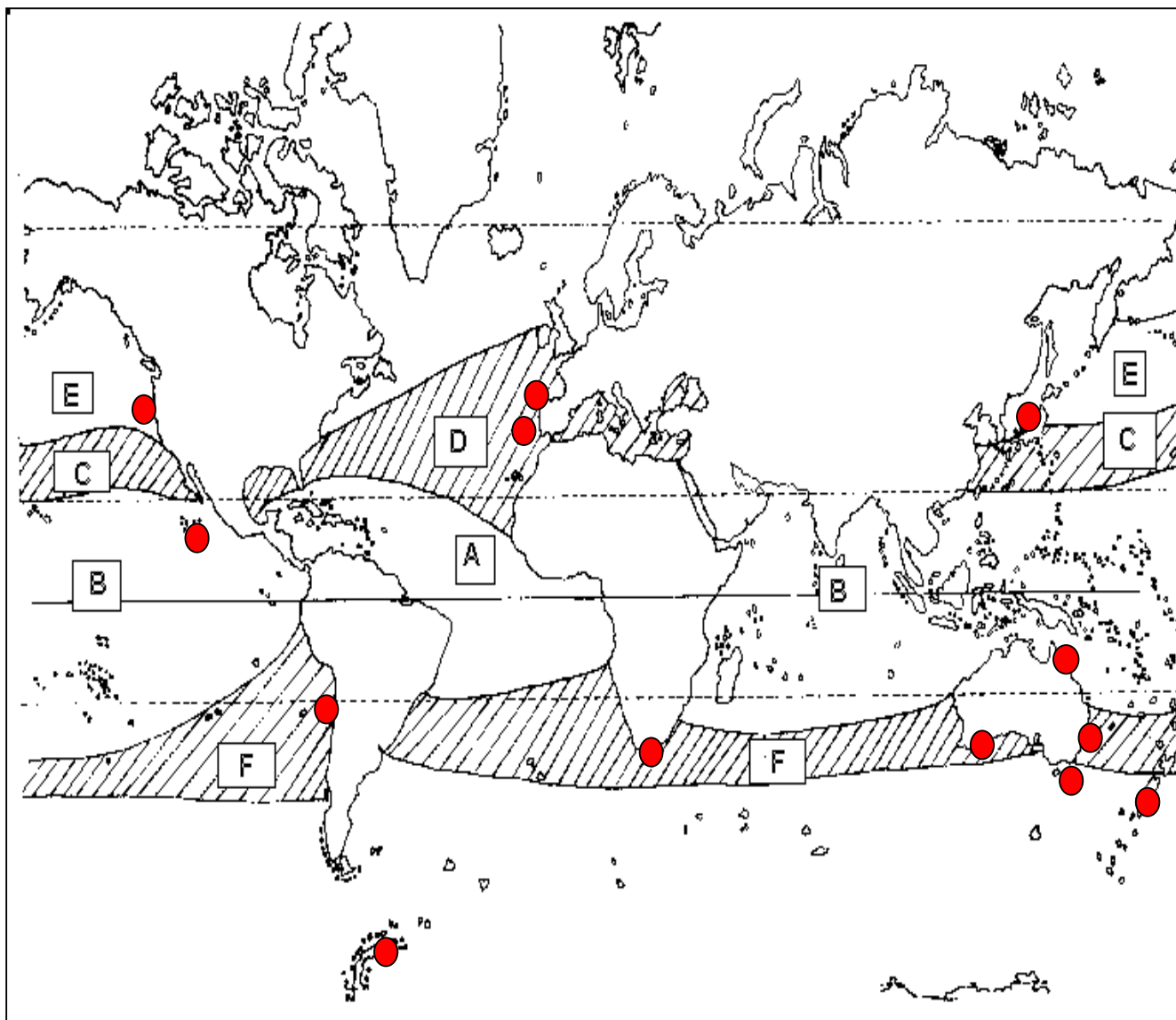


Figura 16. Regiões biogeográficas estabelecidas por Luning, 1990, onde as regiões na qual ocorreram os estudos sobre a química de produtos naturais do gênero *Plocamium* encontram-se marcadas de vermelho (modificado de Luning, 1990).

(A) Região Tropical Atlântica Americana, (B) Região Tropical do Índico Oeste, (C) Região Temperada Quente do Pacífico Norte, (D) Região Temperada Quente Mediterrânea-

Atlântica, (E) Região Temperada Fria do Pacífico Norte e (F) Regiões Quentes do Hemisfério Sul

Análise Química dos Extratos

O rendimento nas extrações foi similar para as duas populações estudadas. A Tabela V exhibe a relação entre a massa de alga extraída, a quantidade de extrato obtido e o rendimento da extração.

Tabela V. Relação entre a massa de alga extraída (em peso seco) e a massa de extrato bruto (EB) obtida.

| Local de coleta | Massa de alga (g) | Massa de EB (g) | Rendimento (%) |
|------------------|-------------------|-----------------|----------------|
| Praia Rasa | 423 | 2,5 | 0,6 |
| Enseada do Forno | 240 | 1,6 | 0,67 |

A análise inicial dos extratos das populações de *P. brasiliense* em CCD revelou um padrão similar de substâncias, tanto na inspeção com luz ultravioleta (U.V.) como após a revelação com sulfato cérico. A Figura 17 representa uma placa comparativa (CCD) do padrão de substâncias dos extratos das duas populações, onde podem ser observadas, claramente, a mancha correspondente aos esteróides e a mancha correspondente aos monoterpenos.

Do mesmo modo, através das análises dos espectros de RMN ¹H, também foi possível observar que os extratos oriundos de espécimes de *P. brasileinse* provenientes das duas populações eram similares, apresentando monoterpenos halogenados como

substâncias majoritárias. Portanto, as duas populações apresentavam perfis químicos semelhantes (Figura 18 e 19).

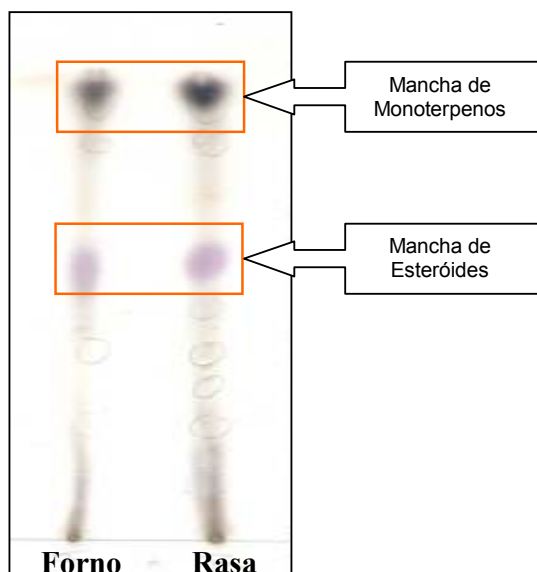


Figura 17. Análise comparativa em CCD dos extratos brutos das populações.

A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) demonstrou um mesmo padrão qualitativo de substâncias entre os extratos (Figuras 20 e 21). Além disso, foi possível realizar estimativas quanto à abundância de cada substância presente. Com exceção da substância com tempo de retenção de 15,5min (Proporção Eb Rasa; 59,35% ; Proporção Eb Forno: 18,98%), majoritária em ambos os extratos, as proporções entre os constituintes dos extratos brutos não exibiram grandes variações. As tabelas VI e VII relacionam as substâncias presentes nos extratos com seus respectivos tempos de retenção e abundância relativa.

Para uma melhor visualização, os dados apresentados nas Tabelas VI e VII foram representados graficamente na Figura 22.

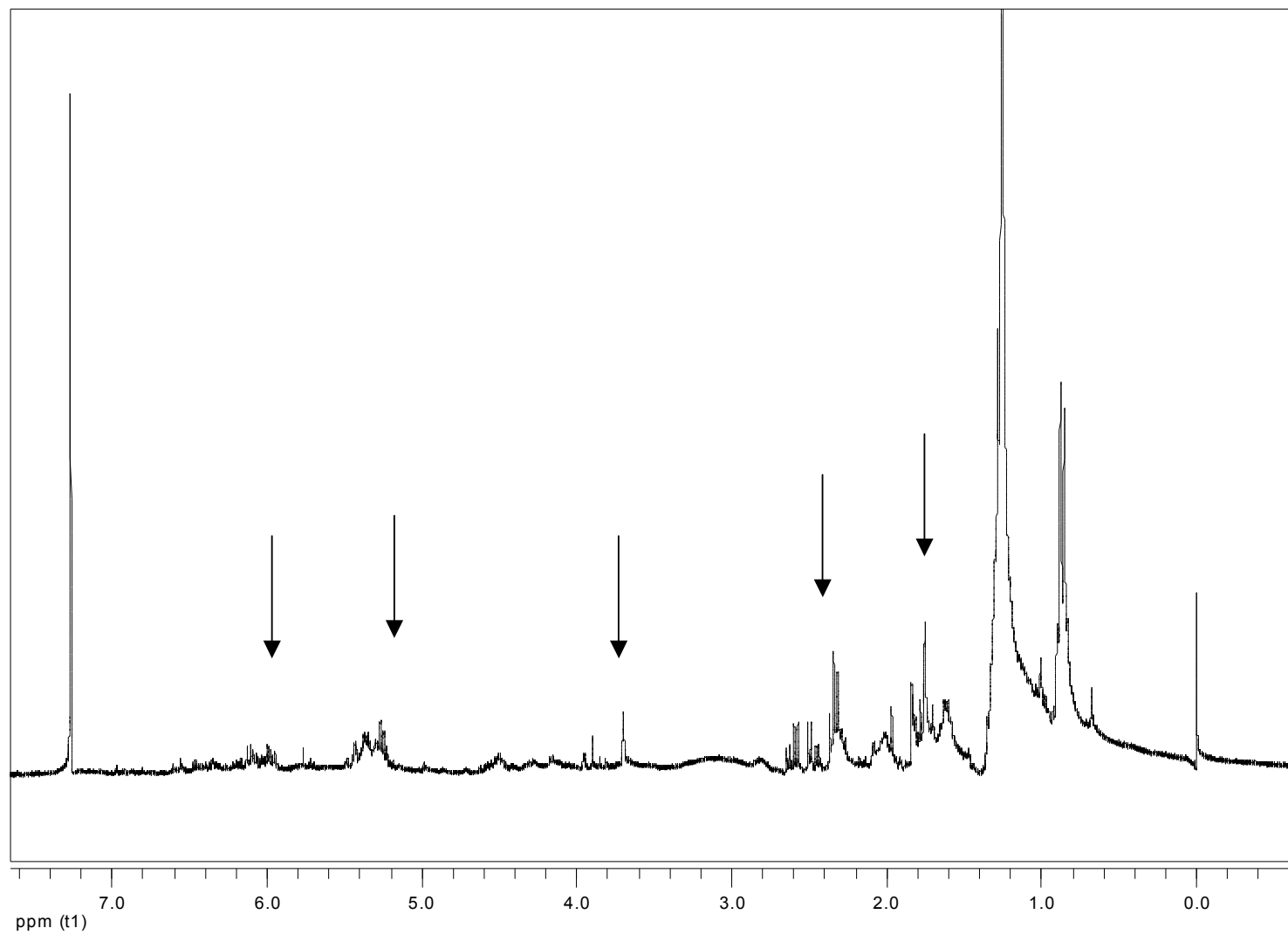


Figura 18. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do extrato bruto de *P. brasiliense* da Enseada do Forno. As setas indicam os sinais dos monoterpenos

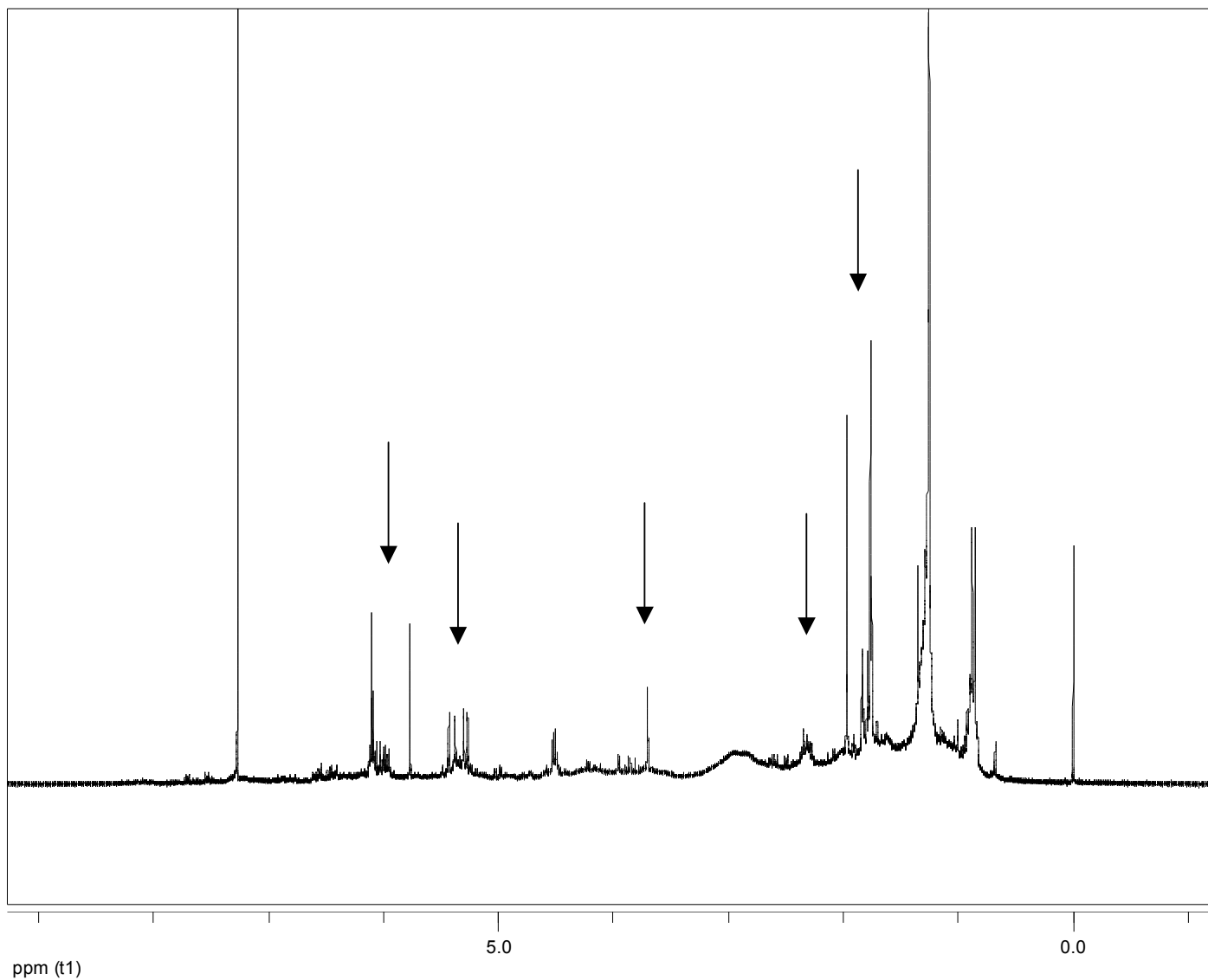


Figura 19. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do extrato bruto de *P. brasiliense* da Praia Rasa. As setas indicam os sinais dos monoterpenos

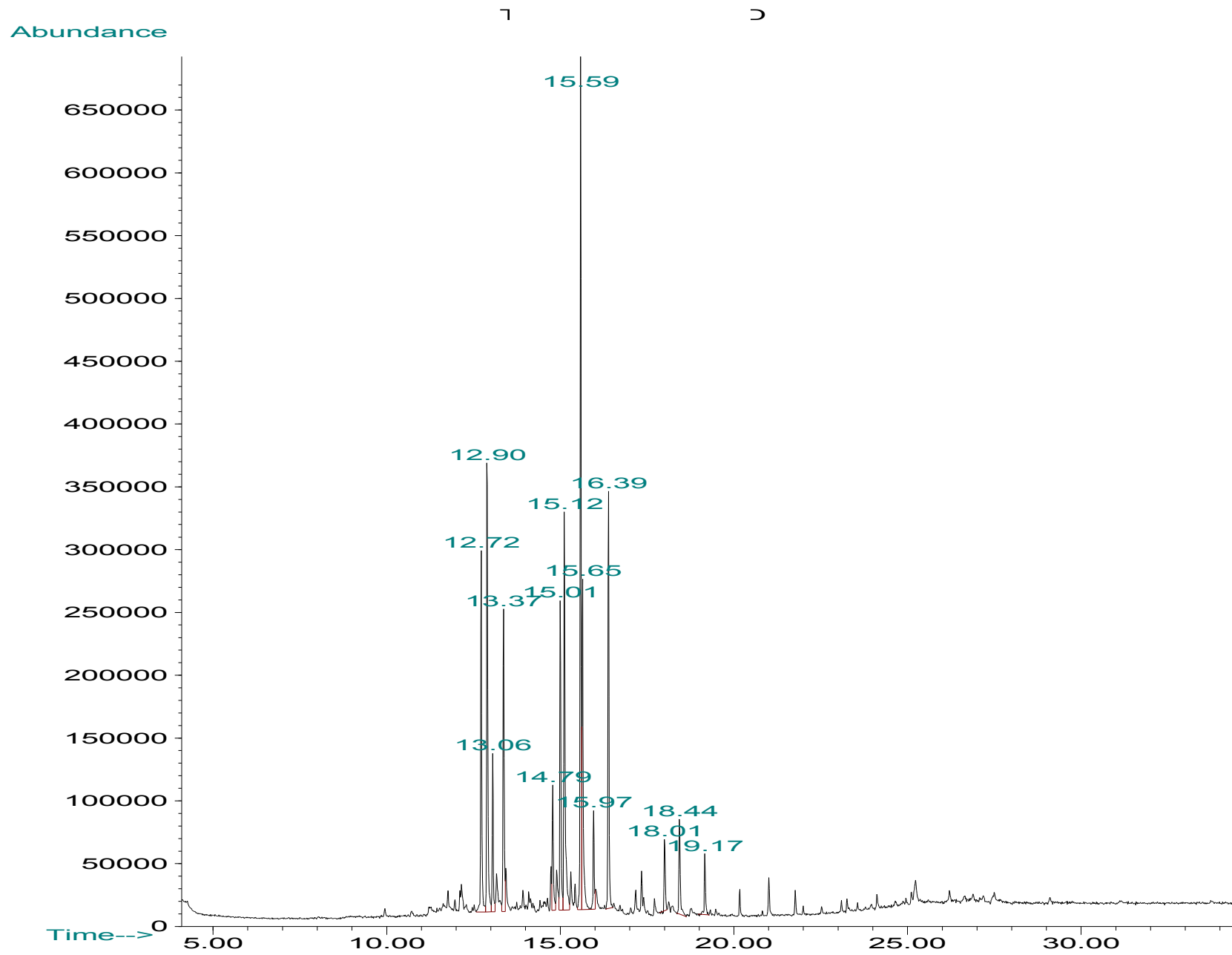


Figura 20. Cromatograma (CG/EM) do extrato bruto de *P. brasiliense* da Enseada do Forno

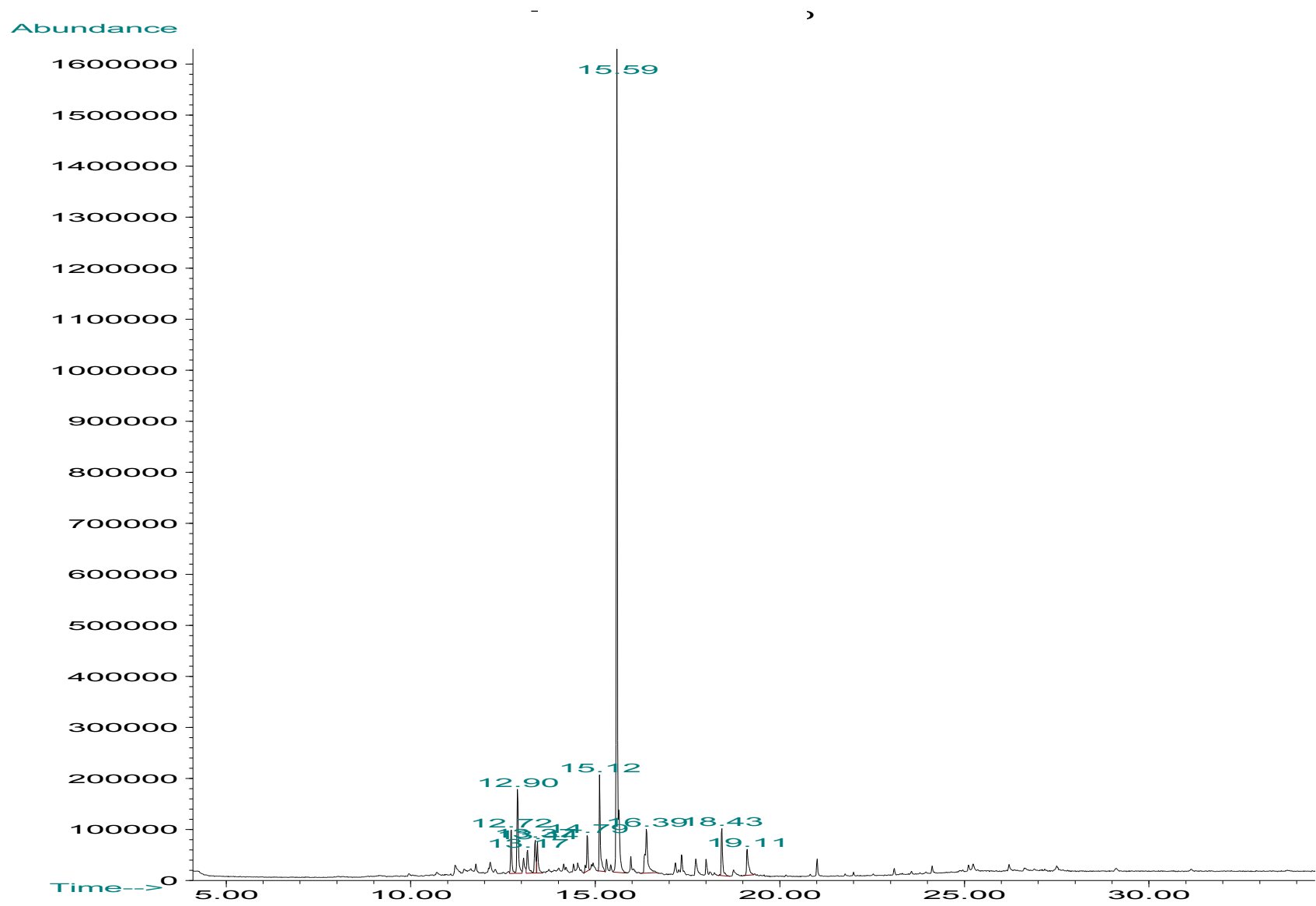


Figura 21. Cromatograma (CG/EM) do extrato de *P. brasiliense* da Praia Rasa

Tabela VI. Relação entre as substâncias presentes no extrato bruto de *P. brasiliense* da Enseada do Forno, seus tempos de retenção e suas proporções relativas (onde Tr = tempo de retenção, A= área do pico no cromatograma, CR= composição relativa).

| T R | Área | Cr |
|--------|----------|-------|
| 12.724 | 6668629 | 9,3 |
| 12.898 | 8870992 | 12,30 |
| 13.058 | 2632464 | 3,60 |
| 13.369 | 5227645 | 7,30 |
| 14.786 | 2285280 | 3,20 |
| 15.008 | 5557290 | 7,70 |
| 15.122 | 7894089 | 10,90 |
| 15.588 | 13656338 | 18,90 |
| 15.645 | 6719660 | 9,30 |
| 15.965 | 1892663 | 2,60 |
| 16.393 | 7176176 | 9,90 |
| 18.008 | 125710 | 0,17 |
| 18.436 | 2009515 | 2,70 |
| 19.168 | 1226490 | 1,70 |
| Total | 71942941 | 100 |

Tabela VII. Relação entre as substâncias presentes no extrato bruto de *P. brasiliense* da Praia Rasa, seus tempos de retenção e suas proporções relativas (onde Tr = tempo de retenção, A= área do pico no cromatograma, CR= composição relativa).

| TR | Área | Proporção |
|--------|----------|-----------|
| 12,724 | 2180197 | 3,6 |
| 12,898 | 4316693 | 7,1 |
| 13,372 | 1717730 | 2,8 |
| 13,438 | 1703769 | 2,8 |
| 14,786 | 1792000 | 2,9 |
| 15,122 | 4354505 | 7,2 |
| 15,589 | 35771926 | 59,3 |
| 16,391 | 4069134 | 6,7 |
| 18,431 | 2390480 | 4,0 |
| 19,115 | 1971868 | 3,3 |
| Total | 60268302 | 100 |

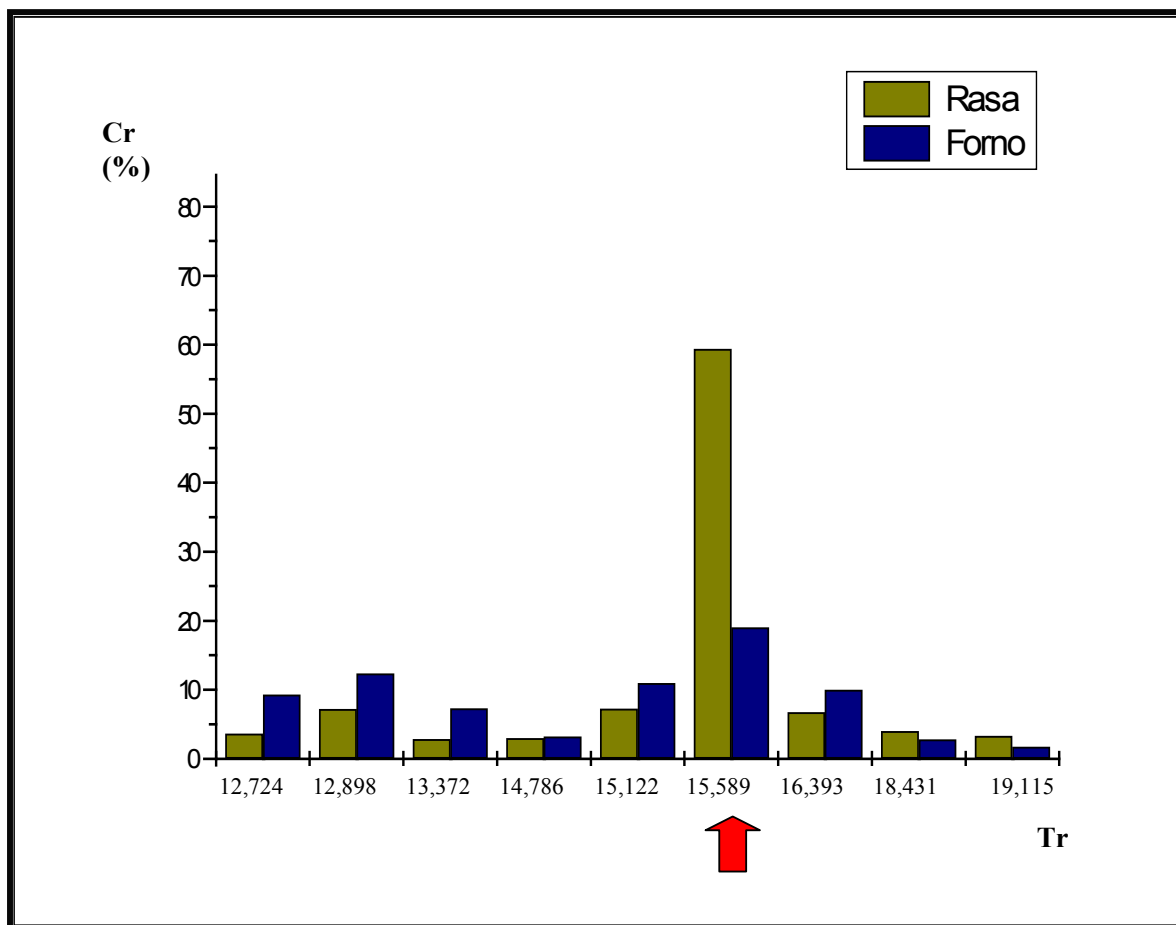


Figura 22. Representação gráfica da abundância relativa das substâncias encontradas nos extratos brutos dos espécimes de *P. brasiliense* das populações das Praias Rasa e do Forno (onde, Cr = concentração relativa e Tr = tempo de retenção) .

Por apresentar maior concentração da substância majoritária, o extrato bruto da Praia Rasa foi selecionado para fracionamento através de técnicas de cromatografia em coluna sílica gel. O primeiro fracionamento (515mg de extrato) gerou um total de 46 frações e foi realizado segundo fluxograma apresentado a seguir.

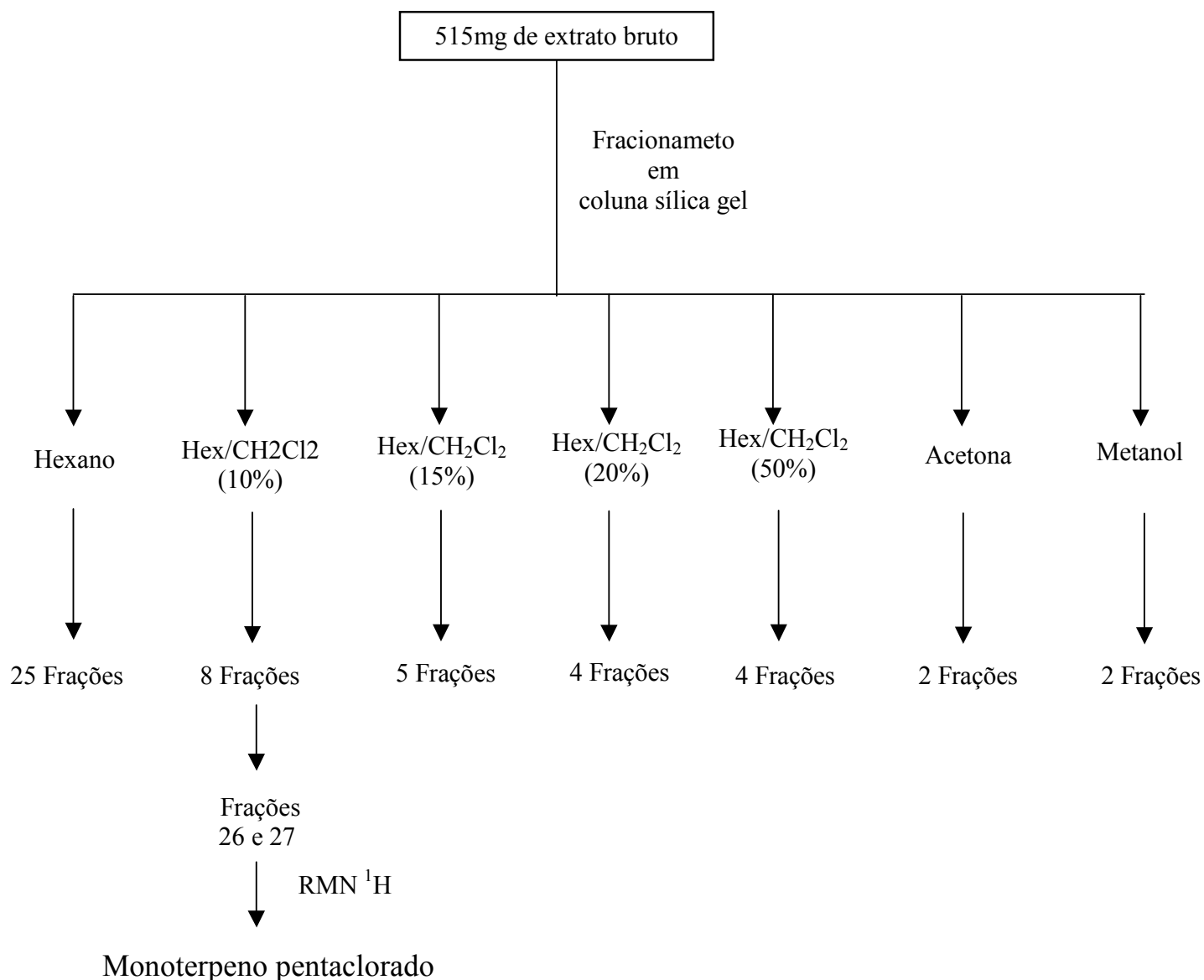
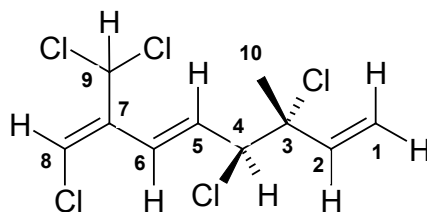


Figura 23. Fluxograma representativo do primeiro fracionamento do extrato bruto de *P. brasiliense* da Praia Rasa

A Fração 27 (2,2 mg), obtida com o sistema Hexano/CH₂Cl₂ (10%), apresentava aspecto de um óleo incolor e, através da análise comparativa do espectro de RMN ¹H e de ¹³C (APT), com dados da literatura (Tabela VIII), foi possível identificar o monoterpene linear pentaclorado (1) (Abreu e Galindro, 1996).



(1)

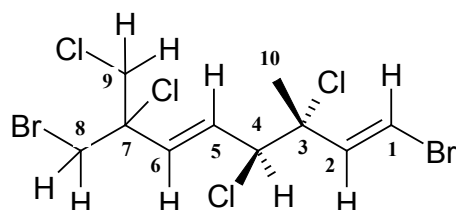
Tabela VIII. Dados comparativos de RMN de ¹H e APT do monoterpene pentaclorado em CDCl₃ isolado de *P. brasiliense* (presente estudo) com os dados obtidos na literatura a partir de *P. cartilagineum* (Abreu & Gallardo 1996).

| | presente estudo ^a | Abreu & Gallardo 1996 ^b | presente estudo ^a | Abreu & Gallardo 1996 ^b |
|-----------|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| Carbono | δ_H (<i>J</i> em Hz) | δ_H (<i>J</i> em Hz) | δ_C multiplicidade | δ_C multiplicidade |
| 1 | 5,43 (d; 16,8) e 5,31 (d; 10,5) | 5,41 (d; 17,0) e 5,29 (d; 10,5) | 116,5 (CH ₂) | 116,5 (t) |
| 2 | 6,10 (dd; 16,8 e 10,5) | 6,09 (dd; 17,0 e 10,5) | 139,3 (CH) | 139,8 (d) |
| 3 | | | 71,6 (C) | 71,8 (s) |
| 4 | 4,60 (d; 8,1) | 4,58 (d; 8,1) | 69,3 (CH) | 69,6 (d) |
| 5 | 6,49 (dd; 16,5 e 8,1) | 6,47 (dd; 16,3 e 8,1) | 123,7 (CH) | 124,3 (d) |
| 6 | 6,64 (d; 16,5) | 6,63 (d; 16,3) | 123,7 (CH) | 124,2 (d) |
| 7 | | | 135,9 (C) | 136,5 (s) |
| 8 | 6,40 (s) | 6,39 (s) | 131,8 (CH) | 132,3 (d) |
| 9 | 6,77 (sl) | 6,76 (s) | 69,3 (CH) | 69,3 (d) |
| 10 | 1,79 (s) | 1,78 (s) | 25,0 (CH ₃) | 25,4 (s) |

^a Em 300 MHz e 75.5 MHz, em CDCl₃ (TMS como referência interna)

^b Em 600 MHz e 150 MHz, em CDCl₃ (TMS como referência interna)

O segundo fracionamento (1,5g de extrato bruto) seguiu um aumento de polaridade gradativo, que gerou um total de 107 frações, e que após análise em CCD foram agrupadas em 33 frações conforme fluxograma (Figura 24). A Fração 17 (4,3mg) obtida em Hexano/CH₂Cl₂ (10%) apresentou aspecto de um óleo incolor e através da análise comparativa do espectro de RMN 1H e de APT com dados da literatura (Tabela IX), foi possível identificar a mesma como sendo o já conhecido monotерpo linear oregoneno A (Tr = 15.645min) (König et al., 1990^a).



oregoneno A

Tabela IX. Dados comparativos de RMN de ¹H e APT do oregoneno A em CDCl₃ isolado de *P. brasiliense* (presente estudo) com os dados obtidos na literatura a partir de *P. cartilagineum* (König et al., 1990).

| | presente estudo ^a | König et al. 1990 ^b | presente estudo ^a | König et al. 1990 ^b |
|-----------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Carbono | δ_H (J em Hz) | δ_H (J em Hz) | δ_C multiplicidade | δ_C multiplicidade |
| 1 | 6,57 (d; 13,5) | 6,57 (d; 13,5) | 110,21 (CH) | 110,4 (d) |
| 2 | 6,41 (d; 13,5) | 6,41 (d; 13,5) | 138,36 (CH) | 138,5 (d) |
| 3 | | | 71,29 (C) | 71,4 (s) |
| 4 | 4,49 (d; 7,8) | | 67,01 (CH) | 67,1 (d) |
| 5 | 6,19 (dd; 7,8 e 15,3) | 6,19 (dd; 7,7 e 15,3) | 130,19 (CH) | 130,3 (d) |
| 6 | 6,07 (d; 15,3) | 6,07 (d; 15,3) | 133,34 (CH) | 133,5 (d) |
| 7 | | | 68,75 (C) | 68,9 (s) |
| 8 | 3,87 (d; 10,8) e 3,78 (d; 10,8) | 3,87 (d; 11,0) e 3,79 (d; 11,0) | 37,16 (CH ₂) | 37,3 (t) |
| 9 | 3,93 (d; 11,7) e 3,98 (d; 11,7) | 3,92 (d; 11,7) e 3,98 (d; 11,7) | 49,51 (CH ₂) | 49,6 (t) |
| 10 | 1,75 (s) | 1,75 (s) | 25,0 (CH ₃) | 25,1 (s) |

^{a,b} Ambos em 300 MHz e 75.5 MHz, respectivamente, em CDCl₃ (TMS como referência interna)

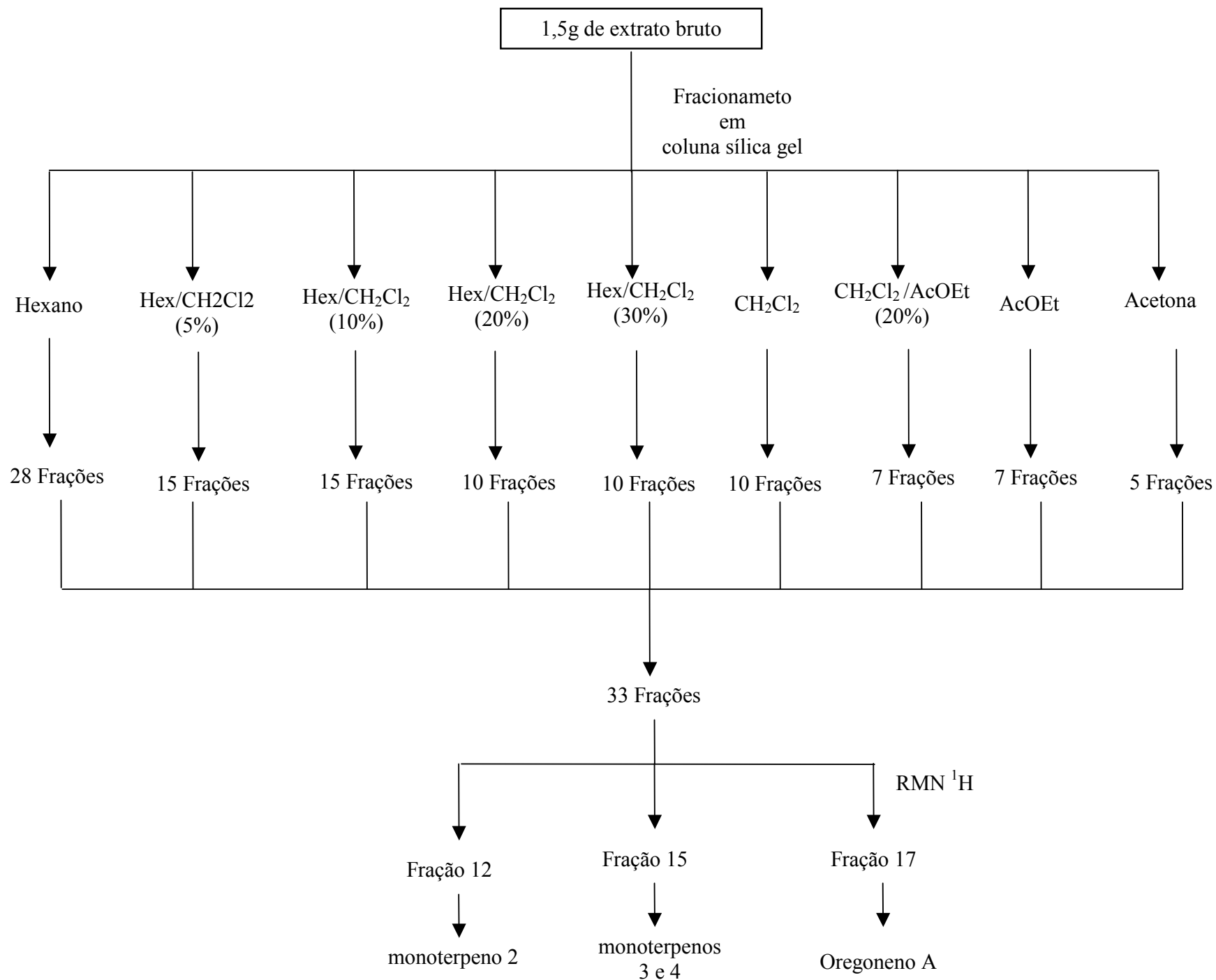
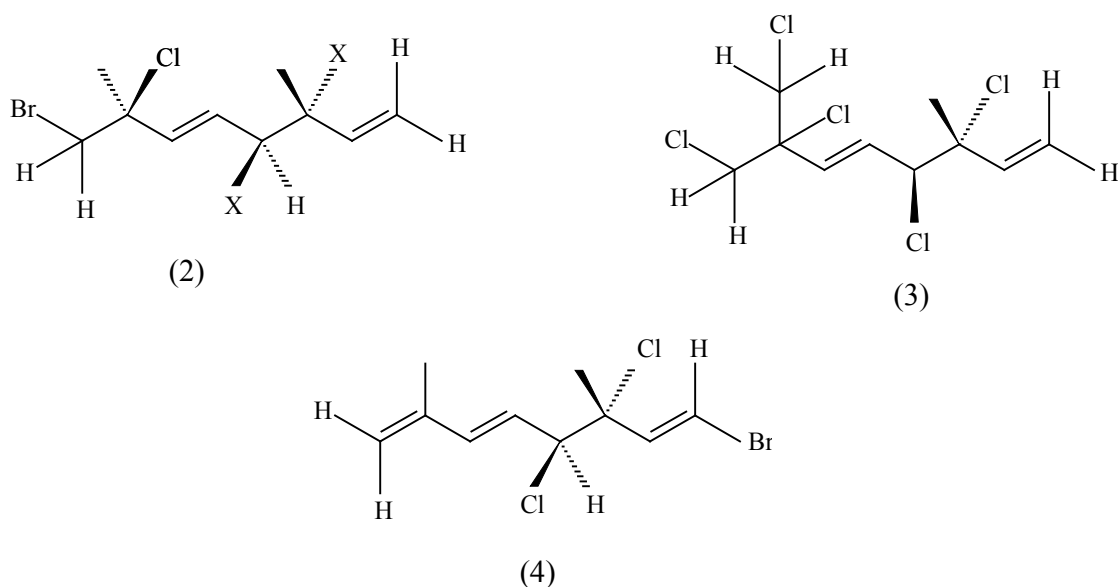
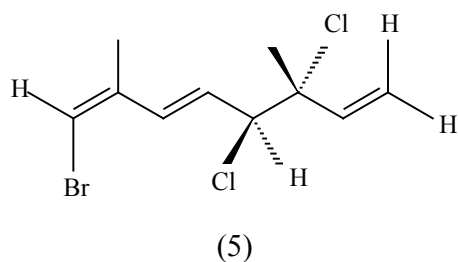


Figura 24. Fluxograma representativo do segundo fracionamento do extrato bruto de *P. brasiliense* da Praia Rasa

Além das substâncias isoladas, através da comparação de dados de RMN ^1H e CG/EM também foi possível detectar a presença de outros 4 monoterpenos acíclicos. A fração 12 possuía um aspecto de óleo incolor e, sendo composta por uma mistura de no mínimo 4 monoterpenos halogenados, sendo possível identificar o monoterpene (2) já descrito na literatura, onde os radicais X são possivelmente cloretos (König et al, 1999b). A fração 15, também tinha aspecto de um óleo incolor e, era composta por uma mistura de 3 monoterpenos acíclicos onde foi possível detectar o monoterpene pentaclorado (3). Através de comparação com dados da literatura também foi possível identificar nesta fração o monoterpene (4) (König et al, 1990).



Através da comparação dos dados das duas técnicas em questão, RMN ^1H e CG/EM, também foi possível detectar o monoterpene (5) como o constituinte majoritário dos extratos das duas populações ($\text{Tr} = 15,589$, Tabela VI e VII).



Defesas Químicas de Plocamium brasiliense

Nos bioensaios com alimentos artificiais contendo o extrato de *P. brasiliense* coletada na Enseada do Forno frente ao ouriço-do-mar *L. variegatus*, o alimento controle foi preferencialmente consumido em relação ao alimento contendo o extrato da alga ($p = 0,001$). Em outras palavras, este resultado sugere a presença de defesas químicas contra consumidores no extrato. De forma similar, os bioensaios com alimentos artificiais contendo o extrato de *P. brasiliense* coletada na Praia Rasa também demonstraram a presença de defesas químicas no extrato ($p = 0,0002$).

No entanto, o alimento contendo o extrato da população da Enseada do Forno foi preferencialmente consumido em relação ao alimento contendo o extrato da população da Praia Rasa ($p = 0,01$). Estes resultados sugerem, que a química defensiva da população da Praia Rasa é mais eficiente quando comparada a da população da Enseada do Forno (Figura 25).

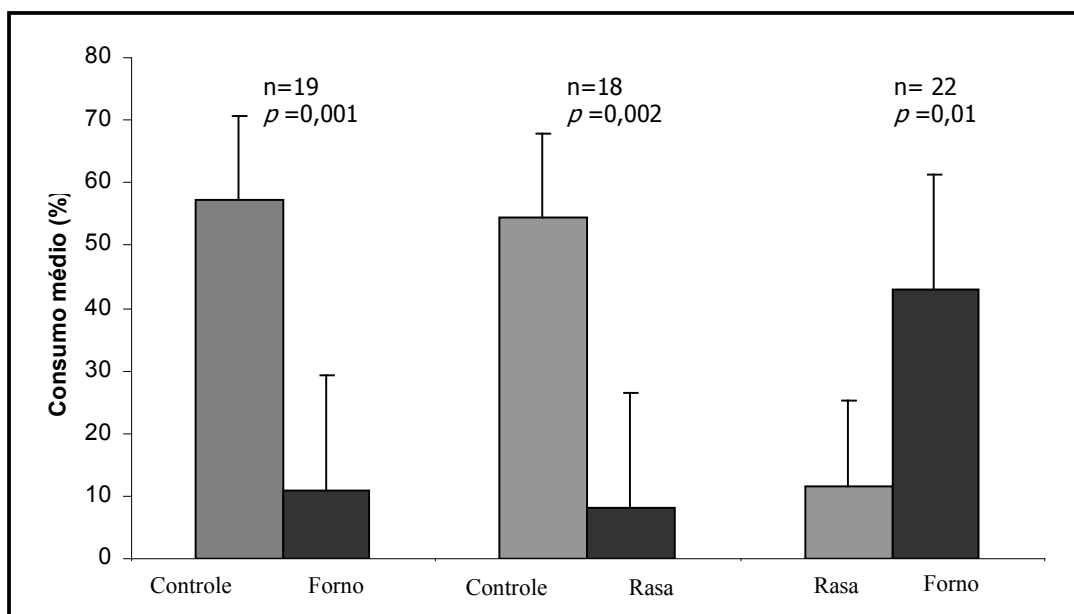


Figura 25. Consumo médio dos alimentos artificiais por de *L. variegatus* (%) nos bioensaios. X+DP, Teste de Wilcoxon $\alpha = 00,5$

Nos bioensaios com *A. scutiformis*, onde foram testadas a química defensiva das populações, não houve diferenças nos consumos dos alimentos tratamento e controle, indicando que as defesas químicas de *P. brasiliense* não atuam contra esse consumidor. No ensaio confrontando as populações, também não houve diferença significativa no consumo dos alimentos (Figura 26).

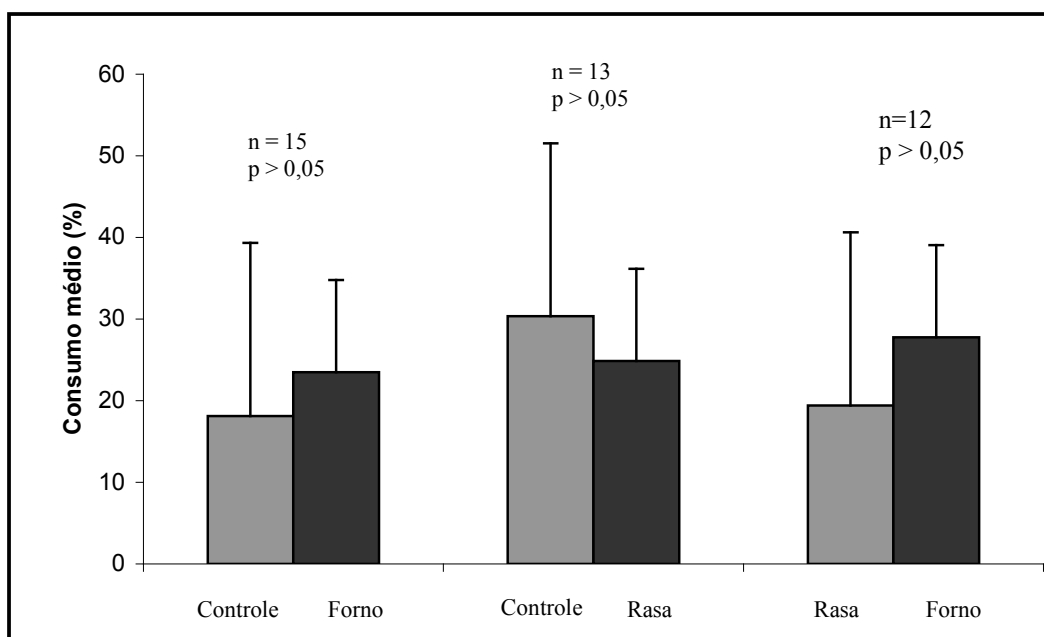


Figura 26. Consumo médio dos alimentos artificiais por de *A. scutiformis* (%) nos bioensaios. X+DP, Teste de Wilcoxon $\alpha = 00,5$

O potencial defensivo das substâncias isoladas foi testado frente ao ouriço do mar *L. variegatus*. Os resultados do bioensaio com alimento artificial impregnado com o monoterpene oregoneno A sugerem que esta substância não atua como defesa frente a consumidores, uma vez que os alimentos com tratamento e sem tratamento foram consumidos de forma não seletiva. De forma contrária, o bioensaio com alimento artificial impregnado com a substância 1 sugere que a mesma atua como defesa química uma vez

que o alimento sem tratamento foi preferencialmente consumido em relação ao alimento tratamento ($p < 0,01$). (Figura 27).

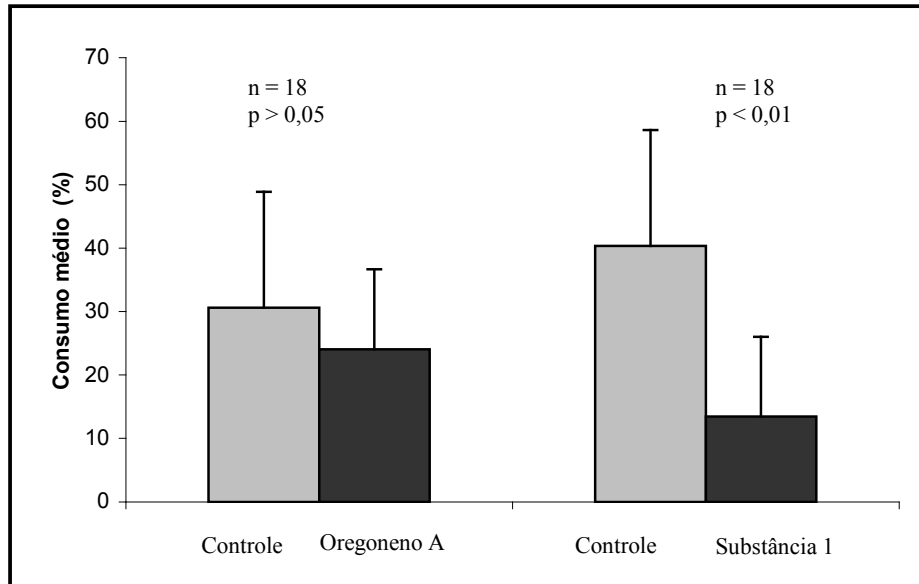


Figura 27. Consumo médio dos alimentos artificiais por de *L. variegatus* (%) nos bioensaios. $X+DP$, Teste de Wilcoxon $\alpha = 00,5$

5. Discussão

Macroalgas do gênero *Plocamium* são caracterizadas pela produção de monoterpenos polihalogenados cíclicos e acíclicos, apresentando um surpreendente grau de halogenação, incomum para moléculas contendo apenas dez átomos de carbono (Diaz-Marrero, 2002a). Foram descritas um total de 105 substâncias isoladas de espécies coletadas na região do Pacífico Norte, Pacífico Sul, Atlântico Norte, Índico e da Antártica (Kazlauskas, 1976; Castedo, et al., 1978; Stierle & Sims., 1979; Abreu & Galindro, 1996; Cueto et al., 1998a; Darias et al., 2001; Knott et al., 2005).

As análises dos extratos brutos de *P. brasiliense* revelaram similaridade química entre seus constituintes, sendo os extratos compostos basicamente por monoterpenos acíclicos bromados e clorados. Segundo classificação proposta por Crews et al. (1977) as populações de *P. brasiliense* estudadas pertencem ao quimiotípo α , uma vez, que só produzem monoterpenos lineares. Segundo a classificação proposta por Roviroso et al. (1988) as populações pertencem ao quimitípo β pois possuem as enzimas bromoperoxidase e cloroperoxidase.

Através da partição dos extratos brutos foi possível isolar o monoterpeno oregoneno A, anteriormente descrito para *P. cartilagineum* da Espanha (König et al., 1990). Além desta substância, foi possível isolar o monoterpeno pentaclorado (substância 1), descrito para *P. cartilagineum* da costa da Califórnia (Mynderse e Faulkner, 1975) e de Portugal (Abreu e Galindro, 1996). Também foi possível detectar os monoterpenos acíclicos (2), descrito para *P. cartilagineum* da costa da Espanha (König, et al. 1990) e o monoterpeno (4), descrito para *P. hamatum* da Austrália. Ainda foram detectados os monoterpenos (3) e (5), inéditos para *Plocamium*, sendo (5) a substância majoritária dos extratos analisados. No

entanto, o isolamento e posteriores análises espectroscópicas mais detalhadas devem ser realizadas para confirmar suas estruturas. Sob o ponto de vista biogeográfico, os monoterpenos deste trabalho constituem os primeiros relatos da ocorrência destas substâncias na região do Atlântico Sul, sendo as substâncias 3 e 5 possivelmente exclusivas para as populações estudadas.

A química de monoterpenos do gênero *Plocamium* aponta alguns problemas taxonômicos no gênero. Através da revisão da literatura dos constituintes químicos, pode-se constatar que a espécie *P. coccineum* é similar à espécie *P. cartilagineum* (Castedo, et al. 1978, Gonzales, et al. 1978, Castedo et al., 1984, Barrow e Temple, 1985; König, et al. 1990; Abreu e Galindro, 1996). Neste caso, a similaridade química entre *P. coccineum* e *P. cartilagineum* indica um problema na taxonomia das espécies, uma vez que a espécie *P. coccineum* é relatada atualmente como uma sinonímia de *P. cartilagineum* (Algaebase, 2006).

De fato, a separação e delimitação de espécies dentro do gênero têm representado um grande problema para os taxonomistas principalmente no que diz respeito à espécie tipo *P. cartilagineum*. Os critérios morfológicos, característica primária utilizada na separação de espécies, muitas vezes não são efetivos para estas inferências devido a grande variação observada no grupo (Yano et al. 2006; Scarbel et al. 1996). Como relatado por Yano et al. (2004) em estudo realizado com populações de *Plocamium* da costa japonesa, a separação das espécies *P. cartilagineum*, *P. recurvatum* e *P. telfaire*, quando realizada apenas com a utilização de caracteres morfológicos é imprecisa e pode conduzir a erros.

A química de produtos naturais tem sido utilizada como uma ferramenta auxiliar em estudos taxonômicos se mostrando eficiente principalmente em estudos realizados

com diterpenos de algas do gênero *Dictyota* (Teixeira e Kelecom 1988, Teixeira et al. 1990, Kelecom et al. 1991, Teixeira et al. 2001). No entanto, a utilização de substâncias halogenadas de algas vermelhas como marcadores taxonomicos tem recebido pouca atenção, podendo ser destacados alguns poucos trabalhos com *Laurencia* (Masuda e Suzuki, 1997, Masuda et al., 1997). No que diz respeito aos monoterpenos halogenados de *Plocamium*, os estudos que investigaram a eficiência destas substâncias como marcadores demonstraram que estes são efetivos como identificadores populacionais (Crews et al. 1977, Naylor et al., 1983, Roviroso et al., 1988, König, et al. 1999). Entretanto, nenhum estudo se propôs a investigar a aplicação destas substâncias como marcadores a nível específico.

Através da literatura (Tabela IV) observa-se que as análises mais detalhadas da química de monoterpenos do gênero podem indicar outros problemas taxonômicos, principalmente no que diz respeito a *P. cartilagineum*. Esta espécie se destaca como a espécie mais estudada, cuja composição química tem variado a nível geográfico. Por exemplo, populações coletadas na costa do Chile, diferem em seus constituintes em relação a populações coletadas na Baía Monterey, Califórnia. Estariam estas diferenças apontando para erros taxonômicos como no caso entre *P. cartilagineum* e *P. coccineum*? Ou seria estas apenas um reflexo da influência das condições ambientais aliadas a variação genética?

A espécie *P. brasiliense* é descrita como sendo típica de águas tropicais possuindo uma distribuição extensa, ocorrendo na América do Sul (Brasil e Venezuela), Ilhas Caribenhas (Antilhas Holandesas e Trinidad e Tobago) e América do Norte (Carolina do Norte e Carolina do Sul, EUA) (Algaebase, 2006). Constata-se que a espécie possui uma distribuição ampla ocorrendo em locais distantes sob o ponto de vista geográfico e que presumivelmente possuem diferenças ambientais marcantes. No que tange a taxonomia e

descrição da espécie, poucos trabalhos foram realizados na costa brasileira merecendo destaque o trabalho realizado por Joly (1965).

Levando em consideração as colocações feitas sobre a distribuição geográfica de *P. brasiliense*, a carência de estudos descritivos da espécie na costa brasileira e toda problemática envolvida na taxonomia do gênero, estaria a química de monoterpenos desta espécie apontando para uma sinonímia com *P. cartilagineum*? Seria este um caso similar ao ocorrido entre *P. coccineum* e *P. cartilagineum*?

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que os monoterpenos de *P. brasiliense* podem atuar como defesa frente a consumidores no ambiente marinho e que as duas populações são quimicamente defendidas. Também foi possível demonstraram que a atividade defensiva dos extratos brutos, esta associada em partes a presença da substância 1. Sob o ponto de vista ecológico, pouco se conhece sobre os papéis que os monoterpenos halogenados de *Plocamium* podem desempenhar no ambiente marinho. Alguns trabalhos sugerem que estas substâncias podem exibir papel multifuncional, atuando como defesa frente a consumidores, competidores, organismos incrustante e microorganismos (de Nys et al., 1991., Sakata, et al., 1991; König et. al., 1999a, Ankisetty et al., 2004).

No entanto, algumas ressalvas devem ser feitas no que diz respeito à atuação destas substâncias. Os monoterpenos de *P. brasiliense* foram eficientes como defesas químicas frente ao ouriço-do-mar *L. variegatus* e não demonstraram atividade frente ao caranguejo *A. scutiformis*. Estes resultados refletem um padrão de ação das defesas químicas que já é bem documentado na literatura onde substâncias que atuam contra ouriços-do-mar e peixes, considerados consumidores generalistas, podem não atuar e até mesmo estimular o consumo por pequenos herbívoros como poliquetas, anfípodas e caranguejos, que possuem uma dieta mais especializada (Hay et al., 1988b; Hay et al., 1989, Hay et al., 1990). A

escolha e/ou preferência pelo consumo de macroalgas que produzem substâncias com ação defensiva por pequenos herbívoros pode estar relacionada a proteção obtida uma vez que estas seriam menos visitadas por consumidores onívoros (Hay et. al., 1998a.; Duff e Hay 1991, Hay 1992, Duffy & Hay 1994). Por exemplo, o anfípoda *Ampithoe longimana* vive e se alimenta preferencialmente da macroalga parda *Dictyota dichotoma*, conhecida por produzir diterpenos com ação defensiva frente a peixes simpátricos (Hay et al. 1987a).

A. scutiformis pode ser encontrado em grande número associado a tufo de *P. brasiliense* e utiliza pequenos pedaços da macroalga para a decoração. Uma vez que os resultados deste estudo indicam que os monoterpenos de *P. brasiliense* podem atuar como defesa frente a consumidores, é provável que *A. scutiformis* ganhe proteção contra seus predadores se associando a macroalga. A associação de caranguejos da família Majidae com algas produtoras de defesas químicas tem sido alvo de investigações. Estudo realizado na Carolina do Norte demonstra a associação entre espécies de *Libinia* e a macroalga parda *D. menstrualis*, produtora do diterpeno dictyol E que exibe ação defensiva frente a peixes onívoros (Stachowicz & Hay, 1999^a). De forma similar, *Macropodia rostrata* se decora quase que exclusivamente com *Dictyota linearis*, macroalga que produz diterpenos similares aos de *D. menstrualis* (Cruz-Rivera, 2001).

A despeito da similaridade encontrada na composição dos extratos brutos das populações estudadas, as análises químicas demonstraram haver variações quantitativas entre seus constituintes. O produto majoritário detectado no espectro de massas sob o tempo de retenção de 15,58min apresenta-se a uma concentração relativa de 59,3% no extrato da população da Praia Rasa e a 18,9% no extrato da população da Enseada do Forno.

De forma geral, a variabilidade química observada entre populações crescendo em locais distintos pode estar associada a diferenças genéticas, a influência de fatores ambientais como luz, concentração de nutrientes, radiação UV, dessecação e, a ativação/indução por herbívoros. Este tema vem sendo alvo de pesquisas e discussão dentro da Ecologia Química Marinha, uma vez que a maioria dos estudos que tentaram demonstrar a influência destes fatores sobre a produção de metabólitos secundários foram pouco conclusivos, mostrando pouca ou nenhuma correlação entre estas duas variáveis (ver Van Alstyne *et al.*, 2001, Paul & Plugisi, 2004 e Paul *et al.* 2006, para revisões).

Os estudos a cerca da química de produtos naturais do gênero *Plocamium* chamam a atenção para a variabilidade na produção de monoterpenos entre populações separadas geograficamente (Argadoña *et al.*, 2000; Kladi *et al.*, 2004).

Faulkner, (1975) com uma das hipóteses propostas para explicar as variações observadas relacionava a variabilidade química ao estágio de vida das algas estudadas. No entanto, como demonstrado pelos trabalhos de Crews *et al.* (1977), Rovirosa *et al.* (1988), essas variações são inexistentes ou pouco expressivas. No presente estudo as análises químicas não foram realizadas levando em consideração a predominância dos diferentes estádios nas populações, no entanto parece pouco provável que a variação química observada esteja relacionada a este fator.

Castedo *et al.*, (1984) formularam hipóteses de variabilidade sazonal, que também devem ser descartadas no presente estudo, uma vez que as algas foram coletadas no mesmo dia e praticamente no mesmo horário.

Um único trabalho no que concerne a investigação das influência dos fatores ambientais sobre a produção de monoterpenos halogenados em *Plocamium* foi realizado (Palma *et al.* 2004). Neste trabalho foi avaliada a influência da luminosidade (fluxo de luz)

e da temperatura sobre a produção dos monoterpenos violaceno, mertenseno e o monoterpeno cíclico denominado pelos autores como substância 1 em *P. cartilagineum*. Os resultados obtidos demonstraram que apenas a produção da substância 1 foi significativamente afetada por alterações na luminosidade e na temperatura, enquanto que o violaceno e mertenseno, os produtos majoritários, sofreram pequenas tendências de modificação quantitativa. Mesmo sendo um único exemplo, estes resultados sugerem que fatores ambientais podem influenciar a produção de monoterpenos halogenados em *Plocamium*.

Até o momento nenhum esforço foi empregado no sentido de correlacionar variações genéticas populacionais com a variação na produção de monoterpenos halogenados em *Plocamium*.

A variação química observada entre as populações de *P. brasiliense* foi significativa do ponto de vista ecológico. Nos ensaios onde a química das duas populações foi confrontada, *A. scutiformis* consumiu os alimentos tratados com os extratos das duas populações de forma não seletiva. Já o ouriço-do-mar *L. variegatus* distinguiu entre os alimentos tratados com os extratos das duas populações, consumindo em maior quantidade o alimento contendo o extrato da população da Enseada do Forno. Estes resultados sugerem que a química defensiva da população da Praia Rasa é mais eficiente que a química defensiva da população da Enseada do Forno. Como a única variação expressiva entre os constituintes dos extratos das populações se refere ao produto majoritário pode-se inferir que os resultados observados estão associados à variação desta substância, que se encontra em maior concentração no extrato da Praia Rasa.

Este trabalho deu início ao estudo da química de produtos naturais de *P. brasiliense* e os resultados obtidos suscitaram uma gama de questionamentos. Alguns destes, como os

que envolvem a variabilidade química dentro do gênero, são referidos com frequência em trabalhos com *Plocamium*. Por mais que existam trabalhos descritivos sobre a variabilidade entre populações e indivíduos, poucos se propõem a investigar a fundo as suas possíveis causas. É interessante que a continuidade das pesquisas com a espécie se empenhem em resolver as questões levantadas, contribuindo não somente para o melhor conhecimento de *P. brasiliense* como também para o esclarecimento de aspectos quanto à variabilidade na produção de monoterpenos dentro do gênero.

Conclusões

- A química de metabolitos secundários de *P. brasiliense* caracteriza-se pela produção de monoterpenos halogenados acíclicos (quimiotipo α segundo Crews *et al* 1977) bromados e clorados (quimiotipo β segundo Rovirosa *et al* 1988).
- Do ponto de vista químico *P. brasiliense* é similar à espécie-tipo *P. cartilagineum*.
- Não foram detectadas variações qualitativas entre os dois locais de coleta. No entanto, variações quantitativas foram observadas entre os constituintes das populações estudadas, principalmente no que diz respeito a substância majoritária.
- *P. brasiliense* possui defesas químicas contra consumidores. Esta característica pode estar associada à presença do monoterpeno pentaclorado (substância 1) e da substância majoritária (5).
- A variabilidade química observada entre as populações é significativa do ponto de vista ecológico.

Referencias Bibliográficas

- Abreu, P. M. E Galindro, J. M. 1996. Polyhalogenated monoterpenes from *Plocamium cartilagineum* from the Portuguese coast. *Journal of Natural Products*. 59: 1159-1162.
- Argadoña, V., Del Pozo, T., San Martin A. & Rovirosa, J. 2000. Insecticidal activity of *Plocamium cartilagenum* monoterpenes. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 45. p371-376
- Ankisetty, S.; Nandiraju, S.; Win, H.; Park, Y. C.; Amsler, C. D.; McClinton, J.B.; Baker, J. A.; Diyalabanage, T. K.; Pasaribu, A.; Singh, M. P. Maiese, W. M.; Walsh, R. D.; Zaworotko, M.J. & Baker, B. J. 2004. Chemical Investigation of Predator-Deterred Macroalgae from the Antarctic Peninsula. *Journal of Natural Products* 67: 1295 – 1302
- Bates, P.; Blunt, J. W., Hartshorn, M. P., Jones, A. J.; Munro, M. H. G.; Robinson, W. T. & Yorke, S. C. 1979. Halogenated metabolites of the red alga *Plocamium cruciferum*. *Australian Journal of Chemistry*, 32:2545-2554
- Barrow, K. D. & Temple, C. A. 1985. Biosynthesis of halogenated monoterpenes in *Plocamium cartilagineum*. *Phytochemistry*, 24 (8): 1697-1704

- Blunt, J. W.; Hartshorn, M. P.; Munro, M. H. G. & Yorke, S. C. 1978. A novel C8 dichlorodienol metabolite of the red alga *Plocamium cruciferum*. *Tetrahedron Lett.*, 19: 4417-4418.
- Blunt, J. W.; Bowman, N. J.; Munro, M. H. G.; Parsons, M. J.; Wright, G. J. & Yeow, K. K. 1985. Polyhalogenated monoterpenes of the New Zealand marine red alga *Plocamium cartilagineum*. *Australian Journal of Chemistry*, 38: 519-525.
- Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T. & Prinsep, M. R. 2003. Marine natural products. *Natural Products Reports*, 21 (1): 1 –49.
- Capon, R. J.; Engelhardt, L. M.; Ghisalberti, E. L., Jefferies, P. R., Patrick, V. A. & White, A. H. 1984. Structural studies on polyhalogenated monoterpenes from *Plocamium* species. *Australian Journal of Chemistry*, 37: 537-544.
- Carvalho, L. R. & Roque, N. F. 2000. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. *Química Nova*, 23 (6): 757-764.
- Castedo, L.; Luisa Garcia, M.; Quiñoá, E. & Riguera, R. 1984. Halogenated Monoterpenes from *Plocamium coccineum* of northwest Spain. *Journal of Natural Products*, 47 (4): 724-726.
- Coll, J. C.; Skelton, B. W.; White A. H & Wright, A. D. 1988. Tropical Marine Algae. 2. The structure determination of new halogenated monoterpene from *Plocamium*

- hamatum* (Rhodophyta, Gigartinales, Plocamiaceae). *Australian Journal of Chemistry*, 41 (11): 1743-1753.
- Crews, P. & Kho-Wiseman, E. 1975. Plocamene B, a new cyclic monoterpene skeleton from a red marine algae. *Journal of Organic Chemistry*, 40: 2568 - 2570
- Crews, P. & Kho-Wiseman, E. 1977. Acyclic polyhalogenated monoterpenes from de red alga *Plocamium violaceum*. *Journal of Organic Chemistry*, 42: 2634-2636.
- Crews, P., Campbell, L. & Heron E. 1977. Different chemical types of *Plocamium violaceum* (Rhodophyta) from the Monterey Bay region; California. *Journal of Phycology*, 13: 297-301.
- Crews, P., Kho-Wiseman, E & Montana, P. 1978. Halogenated alicyclic monoterpenes from the red algae *Plocamium*. *Journal of Organic Chemistry*. 43: 116-120.
- Crews, P.; Myers, B. L.; Naylor, S.; Clason, E. L.; Jacobs, R. S. & Staal, G. B. 1984a. Bio-active monoterpenes from red seaweeds. *Phytochemistry*, 23: 1449-1451.
- Cueto, M.; Darias, J.; Rovirosa, J.; San-Martin, A. 1998. Pantoneurotriols: Probable biogenetic precursors of oxygenated monoterpenes from Antarctic *Pantoneura plocamioides*. *Tetrahedron*, 54: 3575-3580.

- Cruz-Rivera, E. 2001. Generality And Specificity In The Feeding And Decoration Preferences Of Three Mediterranean Crabs. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 266: 17-31.
- Darias, J.; Roviroso, J.; San-Martin, A.; Diaz-Marrero A. R.; Dorta, E & Cueto, M. 2001. Furoplocamioides A-C, novel polyhalogenated furanoid monoterpenes from *Plocamium cartilagineum*. *Journal of Natural Products*, 64: 1383-1387.
- Diaz-Marrero A. R.; Cueto, M ; Dorta, E; Roviroso, J.; San-Martin, A. & Darias, J. 2002a. New halogenated monoterpenes from the red alga *Plocamium cartilagineum*. *Tetrahedron*, 58: 8539-8542.
- Diaz-Marrero A. R.; Roviroso, J.; Darias, J.; San-Martin, A. & Cueto, M. 2002b. Plocamenols A-C, novel linear polyhalohydroxylated monoterpenes from *Plocamium cartilagineum*. *Journal of Natural Products*, 5: 585-588.
- Diaz-Marrero A. R.; Dorta, E.; Cueto, M ; Roviroso, J.; San-Martin, A. & Darias, J. 2003. New 1,2-bromochloro vinylic monoterpenes from the red alga *Plocamium cartilagineum*. In: Proceedings of International Symposium "Chemistry and Biology of Marine Organisms", Greece, Crete, p.129
- de Nys R.; Coll, J. C. & Price, I. R. 1991. Chemically Mediated Interactions between the Red Alga *Plocamium-Hamatum* (Rhodophyta) and the Octocoral *Sinularia-Cruciatata* (Alcyonacea). *Marine Biology*, 108

Duffy, J. E.; Hay, M. E. 1991. Food And Shelter As Determinants Of Food Choice By An Herbivorous Marine Amphipod. *Ecology*, 72 (4): 1286-1298.

Duffy, J. E.; Hay, M. E. 1994. Herbivore Resistance To Seaweed Chemical Defense - The Roles Of Mobility And Predation Risk. *Ecology*, 75 (5): 1304-1319

Dunlop, R. W.; Murphy, P. T. & Wells, R. J. 1979. New polyhalogenated monoterpene from the red algae *Plocamium angustum*. *Australian Journal of Chemistry*, 32: 2735-2739.

Faulkner, D. J. 1977. Interesting aspects of marine natural products chemistry. *Tetrahedron*, 33 (12): 1421-1443.

Faulkner, D. J. Marine Natural Products. 2001. *Natural Products Reports*, 19 (1): 1-48.

Fenical, W. 1975. Halogenation in the rhodophyta, a review. *Journal of Phycology*, 11: 245-259.

Fenical, W.; Norris, J. N. 1975. Chemotaxonomy in marine algae: Chemical separation of some *Laurencia* species (Rhodophyta) from the Gulf of California. *Journal of Phycology*, 11: 104-108

- Gonzales, A. G.; Arteaga, J. M.; Martín, J. D.; Rodríguez, M. L.; Fayos, J. & Martínez-Ripolls, M. 1978. Two new polyhalogenated monoterpenes from the red alga *Plocamium cartilagineum*. *Phytochemistry*, 17: 947-948.
- Hay, M. E., Renaud, P. E. & Fenical, W. 1988a. Large mobile versus small sedentary herbivores and their resistance to seaweed chemical defenses. *Oecologia*, 75: 246-252.
- Hay, M. E.; Pawlik, J. R.; Duffy, J. E.; Fenical, W. 1989. Seaweed-Herbivore-Predator Interactions: Host-Plant Specialization Reduces Predation On Small Herbivores. *Oecologia*, 81 (3): 418-427.
- Hay, M.E., Duffy, J. E. Fenical W. 1990a. Host-Plant Specialization Decreases Predation On A Marine Amphipod - An Herbivore In Plants Clothing. *Ecology*, 71 (2): 733-743
- Hay, M. E. The Role Of Seaweeds Chemical Defenses In The Evolution Of Feeding Specialization And In The Mediation Of Complex Interactions. In: Paul, V. J., Ed. *Ecological Roles Of Marine Natural Products*, New York: Cornell University Press, 1992. P. 93-118.
- Hay, M. E.; Kappel, Q. E. & Fenical, W. 1994. Synergism in plant defenses against herbivores: Interactions of chemistry, calcification and plant quality. *Ecology*, 75: 1714 -1726.

- Higgs, M. D., Vanderah, D. J. & Faulkner, D. J. 1977. Polyhalogenated monoterpenes from *Plocamium cartilagineum* from the British Coast. *Tetrahedron*, 33: 2775-2780.
- Joly, A. B. 1965. Flora marinha do litoral norte do estado de São Paulo e regiões circunvizinhas. Separata do Bol. N°294, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP Botânica 21. 383p
- Jomgaramruong, J.& Blackman, A. J. 2000. Polyhalogenated monoterpenes from a Tasmanian collections of the red seaweed *Plocamium cartilagineum*. *Journal of Natural Products*, 63: 272-275.
- Kazlauskas, R.; Murphy, P. T.; Quinn, R. J. & Wells, R. J. 1976. Two polyhalogenated monoterpenes from the red alga *Plocamium costatum*. *Tetrahedron Letters*, 49: 4451-4454.
- Kladi, M.; Vagias, C. & Roussis, V. 2004. Volatile halogenated metabolites from marine red algae. *Phytochemistry reviews*, 3: 337-366.
- Kelecom, A.; Teixeira, V. L. & Pitombo, L. F. 1991. Quimiotaxonomia de Dictyotales (Phaeophyta). 6. Da sinonímia entre as algas pardas *Dictyota dentata* e *D. mertensii*. *Ann. Assoc. Brasil. Quim.*, 40: 67-70

- Knott, M.G., Mkwanzani, H., Arendse, C.E., Hendricks, D.T., Bolton, J.J., and Beukes, D.R. (2005). Plocoralides A-C, polyhalogenated monoterpenes from the marine alga *Plocamium corallorhiza*. *Phytochemistry* 66, 1108-1112.
- Konig, G. M.; Wright, A. D.; de Nys, R. & Sticher, O. 1990. New terpenoid metabolites from marine algae. *Planta Medica*: 56: 559- 560.
- Konig, G. M., Wright, A. D.; de Nys, R. 1999a. Halogenated monoterpenes from *Plocamium costatum* and their biological activity. *Journal of Natural Products*. 62(2): 383-385
- Konig, G. M., Wright, A. D. & Linden, A. 1999b. *Plocamium hamatum* and its monoterpenes: chemical and biological investigations of the tropical marine red algae. *Phytochemistry*, 52: 1047-1053.
- Masuda, M. & Susuki, M. 1997. A taxonomic study of the genus *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) from Vietnam. 3. *Laurencia calliclada* sp. nov. *Cryptogamie Algologie*, 18: 273-282.
- Masuda, M.; Takashi, Y.; Okamoto, K.; Matsuo, Y. Susuki, M. Morphology and halogenated secondary metabolites of *Laurencia snackeyi* (Weber-van Bosse) stat. nov. (Ceramiales, Rhodophyta). *European Journal of Phycology*. 32 (3): 293-301.

- Mynderse, J. S. & Faulkner, D. J. 1974. Violaceno; a polyhalogenated monoterpene metabolite from *P. cartilagineum* and *P. violaceum*. *Phytochemistry*, 17:237-240
- Mynderse, J. S. & Faulkner, D. J. 1975. Polyhalogenated monoterpenes from the red alga *Plocamium cartilagineum*. *Tetrahedron*, 31: 1963-1967
- Mynderse, J. S.; Faulkner, D. J.; Finer, J. & Clardy, J. 1975. (1R; 2S; 4S; 5R)- 1-bromo-trans-2-chlorovinyl-4-5-dichloro-1,5-dimethyl cyclohexane, a monoterpene skeletal type from the red alga *Plocamium violaceum*. *Tetrahedron Lett.* 16:2175-2178.
- Mynderse, J. S. & Faulkner D. J. 1978. Variations in the halogenated monoterpene metabolites of *Plocamium cartilagineum* e *Plocamium violaceum*. *Phytochemistry*, 17:237-240
- Norton, R. S.; Warren, R. G. & Wells, R. J. 1977. Three new polyhalogenated monoterpenes from *Plocamium* species. *Tetrahedron Lett*, 18: 3905-3908.
- Palma, R.; Edding, M.; Roviroso, J.; San-Martin, A. & Argadoña, V. H. 2004. Effect of photon flux density and temperature on the production of halogenated monoterpenes by *Plocamium cartilagineum* (Plocamiaceae, Rhodophyta). *Zeitschrift für naturforschung – A Journal of Biosciences*, 59 (9-10): 679-683.

- Paul, V. J. & Puglisi, M.P. 2004. Chemical mediation of interactions among marine organisms. *Natural Products Report*, 21: 189-209
- Paul, V. J.; Plugisi, M. P. & Ritson-Williams, R. 2006. Marine chemical ecology. *Natural Product Reports*, 23 (2): 193-196.
- Rovirosa, J.; Moena, J.; San-Martín, A. 1988. Two chemical types of red alga *Plocamium cartilagineum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 16: 593-595.
- Sakata, K. Iwase, Y.; Ina, K., Fujita, D. 1991. Chemical studies on feeding inhibitors for marine herbivores. 2. Halogenated terpenes isolated from the red alga *Plocamium leptophyllum* as feeding inhibitors for marine herbivores. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57 (4): 743-746.
- San-Martin, A. & Rovirosa, L. J. 1986. Variations in the halogenated monoterpenes metabolites of *Plocamium cartilagineum* of the Chilean Costa. *Biochemical Systematics and Ecology*, 14: 459-461.
- Scarabel, L., Camuccio, P., Foltran, A., Maranzana, G.; Talarico, L., Rascio, N. & Andreoli, C. 1996. Thalli of *Plocamium cartilagineum* (L.) Dixon (Gigartinales, Rhodophyta) growing at two different depths. *Giorn. Bot.It.*, 130: 690-693.

- Stachowicz, J. J. & Hay, M. E. 1999^a. Reducing Predation Through Chemically Mediated Camouflage: Indirect Effects Of Plant Defenses On Herbivores. *Ecology* 80 (2): 495-509
- Stallard, M. O. & Faulkner, D. J. 1974. Chemical constituents of the digestive gland of the sea hare *Aplysia californica*. 1- Importance of diet. *Comp. Biochem. Physiol*, 49: 25-35.
- Soares-Gomes, A. 2002. *In*: R.C. Pereira & A. Soares-Gomes, eds. *Biologia Marinha*, Rio de Janeiro: Ed. Interciência.
- Stierle, D. B.; Wing, R. M. & Sims, J. J. 1976. Marine natural products. XI. Costatone costatolide, new halogenated monoterpenes from the red seaweed *Plocamium costatum*. *Tetrahedron Lett.* 17: 4455-4458.
- Stierle, D. B. & Sims J. J. 1979. Polyhalogenated Cyclic Monoterpenes from the red alga *Plocamium cartilagineum* of Antarctica. *Tetrahedron*, 35: 1261-1265
- Stierle, D. B. & Sims J. J. 1984. Plocamenone, a unique halogenated monoterpene from the red algae *Plocamium*. *Tetrahedron Lett*, 25: 153-156.
- Teixeira V. L. 2002. Produtos Naturais Marinhos. *In*: R.C. Pereira & A. Soares-Gomes, eds. *Biologia Marinha*, Rio de Janeiro: Ed. Interciência.

- Teixeira, V. L. & Kelecom, A. 1988. A chemotaxonomic study of diterpenes from marine brown algae of the genus *Dictyota*. *Sci. Total Environment.*, 75: 271-283.
- Teixeira, V. L., Almeida, S. A. S. & Kelecom, A. 1990. Chemosystematic and biogeographic studies of the diterpenes from the marine brown alga *Dictyota dichotoma*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 18: 87-92.
- Teixeira, V. L.; Cavalcanti, D. N. & Pereira, R. C. 2001. Chemotaxonomic study of the diterpenes from the brown alga *Dictyota menstrualis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29: 313-316.
- Yano, T.; Kamiya, M.; Arai, S., Kawai, H. 2004. Morphological homoplasy in Japanese *Plocamium* species (Plocamiales, Rhodophyta) inferred from the Rubisco spacer sequence and intracellular acidity. *Phycologia* 43 (4): 383-393.
- Yano, T.; Kamiya, M.; Murakami, A.; Sasaki, H. & Kawai, H. 2006. Biochemical phenotypes corresponding to molecular phylogeny of the red algae *Plocamium* (Plocamiales, Rhodophyta): Implications of incongruence with the conventional taxonomy. *Journal of Phycology*, 42 (1): 155-169.
- Watanabe, K.; Miyakado, M.; Ohno, N.; Okada, A.; Yanagi, K; Moriguchi, K. 1989. A polyhalogenated insecticidal monoterpene from the red alga, *Plocamium telfairiae*. *Phytochemistry*, 28 (1): 77-78

Watanabe, K.; Umeda, K.; Kurita, Y., Takayama, C. & Miyakado, M. 1990. Two insecticidal monoterpenes from the red algae *Plocamium telfaire* – Structure elucidation, biological-activity, and molecular topographical consideration by a semiempirical molecular orbital study. *Pesticidal Biochemistry and Physiology*, 37 (3): 275 – 283.

Algaebase, 2006: www.algaebase.org

Alagamare, 2006: www.ib.usp.br/algamare-br